

Note

Un nouveau trisaccharide de *Rhamnus* :

O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-D-galactopyranose

FLORE PRATVIEL-SOSA, RENÉE WYLDE*, RICHARD BOURBOUZE ET FRANÇOIS PERCHERON

Laboratoire de Chimie Biologique, E.R.A. n° 99 du C.N.R.S., Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, 4, Avenue de l'Observatoire, 75006-Paris (France)

(Reçu le 27 octobre 1972; accepté le 12 décembre 1972)

Au cours de recherches concernant une activité β -D-glucosidasiqque particulière chez divers *Rhamnus*, nous avons décelé, lors de l'incubation d'extraits enzymatiques obtenus à partir de la pulpe de baies de *R. cathartica* L., l'apparition d'un trisaccharide provenant de l'hydrolyse d'un hétéroside endogène. Il s'agit probablement du rhamninoze dont la structure n'est pas connue. En effet, Tanret et Tanret¹ avaient décrit l'hydrolyse d'un glycoside des fruits de *R. infectoria* L., la xanthorhamnine, en rhamnétine (7-méthylquercétine) et rhamninoze, au moyen d'un extrait enzymatique de ces mêmes fruits. Plus tard, Nystrom *et al.*² ont isolé de la xanthorhamnine commerciale deux autres glycosides dont la partie glucidique est également constituée de deux molécules de L-rhamnose et une molécule de D-galactose et dont les aglycones sont respectivement la quercétine et la rhamnazine (3',7-diméthylquercétine). Quirin³ a isolé de la pulpe des fruits de *R. cathartica* un trioside du 7-monométhylkaempférol, le catharticoside, qui, par hydrolyse, libère du D-galactose et du L-rhamnose. Enfin, Faugeras et Paris⁴ ont isolé des fruits de *R. alaternus* l'alaternoside, flavonolosite proche du catharticoside, mais différent par certaines de ses propriétés physiques. Nous décrivons ici l'isolement et la détermination de la structure d'un trisaccharide des pulpes sèches des fruits de *R. cathartica* où il se trouve à l'état libre et qui provient vraisemblablement de l'hydrolyse enzymatique d'un des glycosides cités.

Le trisaccharide a été isolé par chromatographie sur colonne de charbon-Célite d'extraits hydroalcooliques de pulpe sèche de *R. cathartica* L. et purifié par chromatographie préparative sur papier successivement au moyen de deux mélanges de solvants différents. L'hydrolyse acide totale en libère deux résidus de L-rhamnose (1,86–2,10) et un résidu de D-galactose. Par hydrolyse acide ménagée ou par action d'une α -L-rhamnosidase on obtient un disaccharide qui a été isolé. Ce dernier est constitué de L-rhamnose et de D-galactose dans le rapport molaire 1,1. Sa migration chromatographique dans plusieurs systèmes de solvants est identique à celle du robinobiose (6-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-D-galactopyranose⁵) que nous avons obtenu par hydrolyse du robinoside au moyen de la « rhamnodiastase »⁶. Quelques milli-

*Adresse actuelle : E.N.S.C.M., 8, rue de l'École Normale, 34000-Montpellier (France).

grammes des deux disaccharides ont été méthylés parallèlement par la méthode de Hakomori⁷, et, après hydrolyse, dans les deux cas, on caractérise sur les chromatogrammes le 2,3,4-tri-*O*-méthyl-L-rhamnose et le 2,3,4-tri-*O*-méthyl-D-galactose.

Le trisaccharide a été méthylé et, après hydrolyse, les oses méthylés ont été séparés par chromatographie préparative en couche mince. Ils ont été identifiés par leurs propriétés physiques et celles de leur *N*-phénylglycosylamine correspondante. Il s'agit du 2,3,4-tri-*O*-méthyl-L-rhamnose, du 2,4-di-*O*-méthyl-L-rhamnose et du 2,3,4-tri-*O*-méthyl-D-galactose.

L'ensemble de ces données permet d'assigner au trisaccharide la structure suivante : *O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-D-galactopyranose.

D'autre part, le spectre de r.m.n. du disaccharide obtenu par hydrolyse du trisaccharide, enregistré en solution dans l'oxyde de deutérium est absolument identique à celui du robinobiose enregistré dans les mêmes conditions : δ 1,35 (d, *J* 7 Hz, Me de L-rhamnose) et 4,86 (d, *J* 2 Hz, H-1 de L-rhamnose).

Dans le spectre de r.m.n. du trisaccharide enregistré dans l'oxyde de deutérium la valeur de 4,84 pour le déplacement chimique d'un proton H-1 équatorial est un peu faible; cette valeur est cependant voisine de celles données pour les mêmes protons dans le *p*-nitrophényl- β -rutinoside acétylé (δ 4,7)⁸, dans les éthers triméthylsilylés des 7-*O*- et 3-*O*- β -rutinosides (6-*O*- α -L-rhamnosyl- β -D-glucopyranosides) de flavonols (δ 4,4)⁹ et dans le dérivé pertriméthylsilylé du *O*- α -D-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-D-glucopyranose¹⁰ (δ 4,84 et 4,76). Nous soulignerons donc ici les difficultés d'attribution de la configuration par la r.m.n. dans les dérivés du mannose et du rhamnose aussi bien par les déplacements chimiques que par les constantes de couplage. Les deux doublets centrés à δ 4,60 et 5,28 d'intensité relative 2:1 sont attribués aux protons anomères du résidu de D-galactose et indiquent que ce résidu est en position terminale réductrice dans le trisaccharide et que le pourcentage des anomères α et β à l'équilibre est sensiblement le même que pour le D-galactose (litt.¹¹ : H-1 du β -D-galactose dans l'oxyde de deutérium, δ 4,68; H-1 de l'anomère α , 5,34; équilibre des anomères : 73:27).

Le spectre de r.m.n. du dérivé acétylé du trisaccharide en solution dans le chloroforme-*d* comporte deux doublets centrés à δ 5,71 (*J* 8 Hz) et 6,37 (*J* 3 Hz) attribués aux protons anomères du galactose (rapport d'intensité du proton β au proton α , 1:2; on remarquera que l'acétylation ne fige pas l'équilibre du trisaccharide et conduit préférentiellement au dérivé α ; litt.^{12,13} : 1,2,3,4,6-penta-*O*-acétyl-D-galactopyranose, β -H-1 δ 5,74, α -H-1 6,36) et entre δ 4,25 et 4,38 un triplet centré à δ 4,32 attribué au proton H-5 du galactose. Les deux protons méthyléniques en C-6 résonnent entre δ 3,52 et 3,64. Les deux protons H-5 des rhamnoses sont situés entre δ 3,68 et 3,85. Par intégration et par double irradiation on a pu montrer la présence en ce massif du proton H-3 du deuxième résidu de L-rhamnose entre δ 3,85 et 4,08. Le déplacement chimique enregistré semble être dû à l'anisotropie de la liaison osidique. Les données spectrographiques sont donc en accord avec la structure établie par les méthodes chimiques.

Pendant la rédaction de cet article nous avons eu connaissance d'un travail de Schmid *et al.*¹⁴ concernant l'établissement de la structure de plusieurs hétérosides flavoniques par spectrographie de masse. Le trisaccharide dont nous décrivons ici la constitution correspond à la fraction glucidique de l'alaternoside.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Méthodes générales. — Les points de fusion ont été déterminés en tube capillaire et ne sont pas corrigés. Les pouvoirs rotatoires ont été mesurés sur un polarimètre Carl Zeiss (longueur du tube : 0,5 dm). Les concentrations ont été effectuées sous pression réduite à une température externe inférieure à 50°.

Les spectres de r.m.n. ont été réalisés à la Faculté des Sciences de Montpellier, sur un appareil Varian Ha-100. Les spectres ont été enregistrés en solution dans l'oxyde de deutérium après échange isotopique de tous les protons hydroxyliques suivi de lyophilisation, avec le tétraméthylsilane en référence externe. Les spectres du dérivé acétylé ont été enregistrés dans le chloroforme-*d* avec le tétraméthylsilane comme référence interne. Les déplacements chimiques (δ) sont donnés en p.p.m. par rapport au tétraméthylsilane.

Les R_G ont été établis sur papier Schleicher et Schull 2043 b Mbgl. Les mélanges de solvants (v/v) suivants ont été utilisés en chromatographie : (A) 2-propanol-1-butanol-acétate d'éthyle-eau (7:1:2:2), (B) 1-butanol-pyridine-eau (9:6:4), (C) octane-2-propanol-solution aqueuse d'ammoniaque à 10 % (50:25:2); (D) 2-propanol-méthyl-éthyl-cétone-acétate d'éthyle-1-butanol-eau (6:5:3:2:5).

Extraction. — La pulpe sèche des fruits de *Rhamnus cathartica* L. (160 g) est agitée à froid avec du méthanol aqueux à 20 % (v/v, 3 l). Le surnageant est filtré puis concentré. Après agitation avec de l'acétate d'éthyle, la phase aqueuse est lyophilisée. Une partie (5,9 g) du lyophilisat est adsorbée sur une colonne de polyamide (200 g), d'où les mono- et oligosaccharides sont élués par l'eau; cette fraction représente 66 % du poids d'extrait lyophilisé. Elle est ensuite adsorbée sur une colonne de charbon-Célite (1:1, 120 g); le trisaccharide en est élué à partir d'une concentration de 4 % en éthanol. Les fractions contenant du trisaccharide représentent environ 18 % du poids de sucres totaux.

Purification. — Le trisaccharide est purifié par chromatographie préparative sur papier Whatman n° 3 MM au moyen du solvant A, puis, après élution et concentration, au moyen du solvant B. Après élution par l'eau, le trisaccharide est lyophilisé. Nous en obtenons alors 28 % du poids de la fraction élue par l'éthanol à 4 %, p.f. 140° (cap.) après ramollissement à 135°, 153–155° (inst., bloc); $[\alpha]_D^{20}$ –43,5° (2 min.) → –40,6° (24 h, *c* 0,4, eau); R_G : (A) 0,50; (B) 0,43; (D) 0,60. Données de r.m.n. (oxyde de deutérium); δ 1,33 (d, *J* 7 Hz 6 H, 2 Me de L-rhamnose), 4,84 et 5,04 (d, *J* 2 Hz, H-1 de L-rhamnose central et d, *J* 2 Hz, H-1 de L-rhamnose terminal), 4,60 et 5,28 (2 d, *J* 8 Hz et 3 Hz, H-1 de D-galactose en position terminale, proportion relative : 2:1).

Anal. Calc. pour $C_{18}H_{32}O_{14} \cdot H_2O$: C, 44,07; H, 6,98. Trouvé : C, 44,10; H, 6,90.

Acétylation. — Le trisaccharide (190 mg) est dissous dans la pyridine (1 ml); on ajoute l'anhydride acétique (1,5 ml). Après 18 h à température ordinaire, on ajoute de l'eau glacée (30 ml). Le précipité recueilli est cristallisé dans l'éthanol aqueux (2:1) (75 mg), puis dans l'éthanol à 95% (40 mg), p.f. 215–216°; $[\alpha]_D^{20} -2,2^\circ$ (c 1,3, chloroforme); données de r.m.n. (chloroforme-*d*) : δ 1,14–1,24 (2 d, *J* 7 Hz, Me du L-rhamnose), 1,92–2,18 (9 H, Me de Ac), 4,72 et 4,90 (2 d, *J* 2 Hz, H-1 des L-rhamnoses), 5,71 et 6,37 (2 d, *J* 8 Hz et 3 Hz, H-1 de D-galactose, rapport β à α : 1:2), 3,51–4,08 (2 massifs complexes), 4,32 (t, H-5 de D-galactose), 4,98–5,85 (autres protons non identifiés).

Anal. Calc. pour $C_{36}H_{50}O_{23}$: C, 50,82; H, 5,92. Trouvé : C, 50,51; H, 5,91.

Détermination du rapport molaire de D-galactose à L-rhamnose. — Après hydrolyse par l'acide sulfurique 0,5M pendant 2 h au bain-marie bouillant, la solution est neutralisée par le carbonate de baryum. Les oses sont séparés par chromatographie sur papier Schleicher et Schull 2043 Mbgl au moyen du solvant B. Les chromatogrammes sont révélés par le citrate d'aniline¹⁵ et les taches éluées par l'éthanol à 80% 0,1M en acide chlorhydrique¹⁶. Les absorbances sont déterminées à 420 nm et comparées à une gamme étalon établie sur le même chromatogramme.

Hydrolyse acide ménagée. — Le trisaccharide est traité par l'acide sulfurique 12,5mm pendant 90 min au bain-marie à l'ébullition. On sépare le disaccharide par chromatographie préparative sur papier dans le solvant B.

Hydrolyse enzymatique. — Le trisaccharide (350 mg) est incubé pendant 24 h à 37° avec un extrait enzymatique de sarrasin (16 ml) (activité α -L-rhamnosidase 1,5.10⁻³ U.I.) et un tampon acide citrique 0,1M-hydrogénophosphate disodique 0,2M de pH 5,2 (4 ml). Le mélange est adsorbé sur colonne de charbon-Célite (1:1, 24 g) d'où le disaccharide est élué par l'éthanol à 2%, puis purifié par chromatographie préparative sur papier au moyen du solvant B (14 mg); R_G : (A), (B) 0,61.

Préparation du robinobiose. — Le robinoside (60 mg) est incubé pendant 24 h à 37° avec un extrait enzymatique de sarrasin (4 ml) ayant une activité « rhamno-diasique » et du tampon citrate-phosphate de pH 5,2 (1 ml). L'aglycone insoluble est éliminé par centrifugation. Le robinobiose est isolé par chromatographie préparative sur papier dans le solvant B (10 mg).

Perméthylation et identification des oses méthylés. — Le robinobiose (10 mg) et le disaccharide (10 mg) obtenu à partir du trisaccharide de *R. cathartica* L. sont parallèlement dissous dans le diméthyl sulfoxyde (5 ml); on fait agir pendant 4 h, en agitant, sous courant d'azote, le méthylsulfinylanion (1 ml) préparé selon Sandford et Conrad¹⁷; on ajoute ensuite l'iodure de méthyle (1 ml), lentement, de sorte que la température ne s'élève pas au-dessus de 25°. La solution est diluée avec du chloroforme, lavée avec une solution de thiosulfate de sodium à 2% puis avec de l'eau. La solution chloroformique est séchée sur sulfate de sodium et évaporée à sec. Le résidu est dissous dans un peu d'éthanol absolu et hydrolysé par l'acide sulfurique M pendant 4 h à 100°. L'hydrolysate est neutralisé et examiné par chromatographie sur papier selon la technique de Petek¹⁸.

Le trisaccharide (600 mg) a été méthylé selon la même technique. Après

hydrolyse, les oses méthylés ont été séparés par chromatographie préparative sur couche mince de Kieselgel (épaisseur 2 mm) au moyen du solvant C. Ils ont été élués par l'éthanol et le chloroforme et identifiés de la manière suivante :

Le 2,3,4-tri-*O*-méthyl-L-rhamnose, sirop, $[\alpha]_D^{20} + 22^\circ$ (c 2,4, eau) (litt.¹⁹ : $[\alpha]_D^{16} + 22^\circ$), a donné la *N*-phénylglycosylamine correspondante qui fut recristallisée trois fois dans l'éther de pétrole, p.f. 112–113°; $[\alpha]_D^{20} + 126^\circ$ (c 0,2, acétone); litt.²⁰ : p.f. 112°; $[\alpha]_D^{19} + 127^\circ$ (méthanol).

Le 2,4-di-*O*-méthyl-L-rhamnose, sirop, $[\alpha]_D^{20} + 9,6^\circ$ (c 2,1, eau) (litt.²¹ : $[\alpha]_D + 10,6^\circ$), a été identifié par la *N*-phénylglycosylamine correspondante, p.f. 142°, $[\alpha]_D^{20} + 136^\circ$ (10 min) $\rightarrow +9^\circ$ (48 h, c 0,8, éthanol), après trois cristallisations successives dans l'éther de pétrole; litt.²¹ : p.f. 141–142,5° $[\alpha]_D + 136^\circ \rightarrow +4^\circ$.

Une très petite partie du 2,3,4-tri-*O*-méthyl-D-galactose a cristallisé dans l'éthanol, p.f. 83° (peu net); litt.²² : p.f. 80°. La *N*-phénylglycosylamine a été préparée à partir du sirop restant, p.f. 156° après deux cristallisations dans l'éther de pétrole, $[\alpha]_D^{20} - 34,9^\circ$ (10 min) $\rightarrow +44^\circ$ (24 h, c 0,7, méthanol); litt.²² : p.f. 167°, $[\alpha]_D - 65^\circ \rightarrow +43^\circ$. La petite quantité de produit obtenu n'a pas permis de mieux le purifier par cristallisation.

REMERCIEMENTS

Nous adressons tous nos remerciements à Monsieur le Professeur J.-É. Courtois pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail, ainsi qu'à Monsieur D. Robic pour d'intéressantes discussions au sujet des spectres de r.m.n..

RÉFÉRENCES

- 1 C. TANRET ET G. TANRET, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 21 (1899) 1065.
- 2 C. W. NYSTROM, W. L. HOWARD ET S. H. WENDER, *J. Org. Chem.*, 22 (1957) 1272.
- 3 M. QUIRIN, *Contribution à l'Étude du Rhamnus cathartica L.*, Thèse Doctorat en Pharmacie, Paris, 1960.
- 4 G. FAUGERAS ET R. PARIS, *Ann. Pharm. Fr.*, 20 (1962) 217.
- 5 P. A. J. GORIN ET A. S. PERLIN, *Can. J. Chem.*, 37 (1959) 1930.
- 6 M. BRIDEL ET C. CHARAUX, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 8 (1926) 25.
- 7 S. HAKOMORI, *J. Biochem. (Tokyo)*, 55 (1964) 205.
- 8 R. BOURBOUZE, F. PRATVIEL-SOSA ET F. PERCHERON, *Carbohydr. Res.*, 24 (1972) 444.
- 9 H. RÖSSLER, T. J. MABRY, M. F. CRANMER ET J. KAGAN, *J. Org. Chem.*, 30 (1965) 4346.
- 10 J. P. KAMERLING, M. J. A. DE BRIE ET J. F. Vliegenthart, *Tetrahedron*, 28 (1972) 3037.
- 11 R. U. LEMIEUX ET J. D. STEVENS, *Can. J. Chem.*, 44 (1966) 249.
- 12 R. U. LEMIEUX ET J. D. STEVENS, *Can. J. Chem.*, 43 (1965) 2059.
- 13 R. U. LEMIEUX, R. K. KULLNIG, H. J. BERNSTEIN ET W. G. SCHNEIDER, *J. Amer. Chem. Soc.*, 80 (1958) 6098.
- 14 R. D. SCHMID, R. PARIS, P. VARENNE ET B. C. DAS, *Tetrahedron*, 28 (1972) 5037.
- 15 J. DATE, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 10 (1958) 444.
- 16 R. C. HUGHES ET R. W. JEANLOZ, *Biochemistry*, 3 (1964) 1535.
- 17 P. A. SANDFORD ET H. L. CONRAD, *Biochemistry*, 5 (1966) 1508.
- 18 F. PETEK, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, (1965) 263.
- 19 W. BAKER, R. HEMMING ET W. D. OLLIS, *J. Chem. Soc.*, (1951) 691.
- 20 W. N. HAWORTH, P. W. KENT ET M. STACEY, *J. Chem. Soc.*, (1948) 1211.
- 21 K. BUTLER, P. F. LLOYD ET M. STACEY, *J. Chem. Soc.*, (1955) 1531.
- 22 F. SMITH, *J. Chem. Soc.*, (1939) 1724.