

LE KEMPFEROL-3-O-RHAMNODIGLUCOSIDE, NOUVEL HETEROSIDE DU POLLEN DE *POPULUS YUNNANENSIS*

F. SOSA et F. PERCHERON

Laboratoire de Chimie Biologique, et Equipe de Recherches Associée du C.N.R.S.
"Oses et Osidases", Faculté de Pharmacie de Paris

(Received 23 June 1969)

Résumé—Un nouvel hétéroside flavonique a été isolé du pollen de *Populus yunnanensis* Dode. L'étude structurale montre qu'il s'agit d'un kempférol-3-*O*-rhamnodiglucoside. La fraction glucidique a pu être isolée par hydrolyse ménagée de l'hétéroside; c'est un trisaccharide branché, nouveau, répondant à la structure: 2¹-*n*- α -rhamnopyranosyl-laminaribiose.

Summary—A new heteroside has been isolated from *Populus yunnanensis* Dode pollen. Structural studies have established it is a kempferol-3-*O*-rhamnodiglucoside. The carbohydrate moiety, obtained through mild hydrolysis of the heteroside, is a new branched trisaccharide with the structure 2¹- α -L-rhamnopyranosyl-laminaribiose.

INTRODUCTION

LES GLYCOSIDES en 3 du kempférol sont très répandus; par contre, on a signalé seulement quelques trisaccharides liés aux flavonols, et leur structure n'a pas fait l'objet d'études approfondies. Nous décrivons ici l'étude de la structure d'un rhamnodiglucoside du kempférol, isolé du pollen de *Populus yunnanensis* Dode (Salicaceae).

Précédemment, Harborne avait isolé des fleurs de *Solanum tuberosum*¹ un kempférol-3-*O*-rhamnodiglucoside. Le spectre u.v. de l'hétéroside de *Populus* est évidemment très voisin de celui de l'hétéroside de *Solanum*, mais le comportement chromatographique est différent, ce qui suggère une différence dans la structure de la partie glucidique.

Un kempférol-3-*O*-rhamnodiglucoside a également été décrit dans *Camellia sinensis*² mais aucune précision n'a été donnée sur la structure de la fraction glucidique de cet hétéroside.

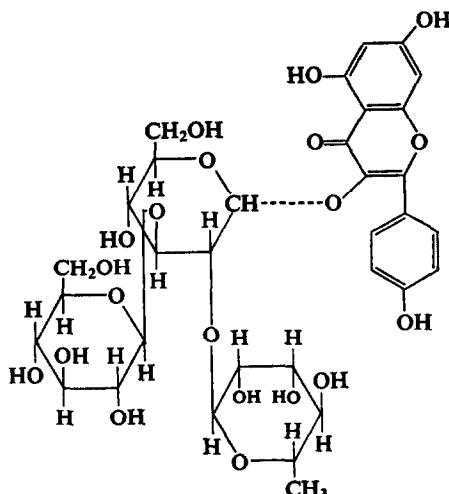
DETERMINATION DE LA STRUCTURE

Aglycone. L'hydrolyse acide totale de l'hétéroside libère une aglycone dont les propriétés physicochimiques (point de fusion, spectres u.v. et i.r., migration chromatographique) sont identiques à celles du kempférol. Le spectre u.v. de ce nouveau flavonoloside présente deux maximums l'un à 266 nm (I) l'autre à 350 nm (II). L'absence de déplacement du maximum II en présence d'oxychlorure de zirconium en milieu acide citrique montre qu'il n'y a pas d'hydroxyle libre en position 3.

Le déplacement bathochrome du maximum II de 47 nm sans diminution de son intensité, par le méthylate de sodium indique la présence d'un OH en 4'. La présence d'un hydroxyle libre en position 5 est révélée par le déplacement bathochrome de 45 nm du maximum II après addition de trichlorure d'aluminium.

¹ J. B. HARBORNE, *Biochem. J.* **84**, 100 (1962).

² Y. TAKINO, H. IMAGAWA et H. YOSHIDA, *J. Agr. Chem. Soc. Japan* **28**, 186 (1954).



(I)

Enfin, le déplacement bathochrome du maximum I de 8 nm en présence d'acétate de sodium révèle un hydroxyle libre en position 7. Ces données spectrales, rassemblées dans le Tableau 1 indiquent que le point de rattachement de la partie glucidique est en position 3 de l'aglycone.

TABLEAU 1. SPECTRES U.V. DE HÉTÉROSIDE DU POLLEN DE *Populus*

Solvant	Maximums d'absorption dans l'u.v. en nm				
	Kempférol-3- <i>O</i> -rhamnoglucoside		Triméthyl-5,7,4' kempférol		
Méthanol	266 $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 232$		350	256-257	355
ZrOCl ₂ /acide citrique	266		350	256 (285)*	410
Cl ₃ Al	274	304-306	355 400	267 335 (310)*	416-420
Acétate de sodium/acide borique				256-257	356
Acétate de sodium	274	(302)*	366-372	256-257 (310)*	354-356
Méthylate de sodium	274	326	397	258	370-375
Ethylate de sodium					

* (Inflexion).

Ceci est confirmé par la méthylation du flavonoloside selon la méthode de Rao et Seshadri,³ suivie d'hydrolyse, qui fournit un triméthylkempférol (spectrographie de masse) dont les propriétés spectrales révèlent l'existence d'un hydroxyle libre en 3. (Tableau 1). Le point de fusion et la migration chromatographique de ce dérivé correspondent à ceux du triméthyl-5,7,4' kempférol.

Partie glucidique. La perméthylation du glycoside selon la méthode de Hakomori,⁴ suivie d'hydrolyse, donne du tri-*O*-méthyl-2,3,4 rhamnose, du tétra-*O*-méthyl-2,3,4,6 glucose

³ P. R. RAO et T. R. SESHADRI, *Proc. Indian Acad. Sci.* 27 (A), 104 (1948).

⁴ S. HAKOMORI, *J. Biochem.* 55, 205 (1964).

identifiés par chromatographie sur papier, et un diméthylglucose qui a été isolé, cristallisé et identifié du di-*O*-méthyl-4,6 glucose par son point de fusion et son pouvoir rotatoire.

L'oxydation permanganique selon la technique de Chandler et Harper⁵ du glycoside ou son hydrolyse ménagée (soit par l'acide acétique dilué, soit par le méthanol chlorhydrique, soit par les résines de polystyrène sulfoné⁶ libèrent en plus du rhamnose et du glucose, un trisaccharide formé de deux molécules de glucose et d'une molécule de rhamnose, et un disaccharide contenant uniquement du glucose.

La méthylation du trisaccharide, suivie d'hydrolyse, donne (comme pour le glycoside), du tri-*O*-méthyl-2,3,4 rhamnose, du tétra-*O*-méthyl-2,3,4,6 glucose et du di-*O*-méthyl-4,6 glucose. La méthylation du glucosido-glucose, suivie d'hydrolyse, donne du tétra-*O*-méthyl-2,3,4,6 glucose et du tri-*O*-méthyl-2,4,6 glucose identifiés par chromatographie sur papier.

Le glucosido-glucose est hydrolysé par la β -glucosidase d'amande. Son pouvoir rotatoire et son point de fusion correspondent à ceux que l'on trouve dans la littérature pour le laminaribiose. Enfin, sa migration chromatographique dans différents solvants est identique à celle d'un échantillon de laminaribiose authentique. Le laminaribiose a un pouvoir rotatoire dextrogyre, le branchement en 2 d'une molécule de L-rhamnose confère au trisaccharide un pouvoir rotatoire lévogyre. Il apparaît donc que le rhamnose a une liaison α -glucosidique.

L'ensemble des résultats présentés ci-dessus permet d'assigner la structure I au flavonoloside décrit.

DISCUSSION

Nous retrouvons chez le flavonoloside un trisaccharide très proche du solatriose isolé par Kuhn à partir de l' α solanine,⁷ puisque le galactose du solatriose est ici remplacé par le glucose. Les propriétés des deux trisaccharides sont d'ailleurs comparables: ni le solatriose, ni le trisaccharide de *Populus* ne sont hydrolysés par la β -glucosidase, alors que le solabiose ou β -D-glucopyranosyl (1 \rightarrow 3)-D-galactopyranose et le laminaribiose le sont aisément. Les essais tentés pour obtenir le 2-L-rhamnosido-glucose (néohespéridose) par hydrolyse ménagée ont échoué comme ce fut également le cas pour le solatriose. Ce fait est dû à la labilité de la liaison α rhamnosido (1 \rightarrow 2) glucose, labilité qu'on retrouve chez le naringoside, à partir duquel l'hydrolyse ménagée ne permet pas d'obtenir le néohespéridose.

PARTIE EXPERIMENTALE

Les spectres u.v. ont été effectués sur un spectrophotomètre Jobin et Yvon type Maroc; les spectres i.r., sur un Unicam SP. 1200; le spectre de masse sur un appareil Atlas type C-H-4.

Les chromatographies sur papier ont été effectuées dans les solvants suivants (toutes les quantités de solvants sont indiquées en volume), A: Benzène-acide acétique-eau (125:72:3). B: Eau. C: *n*-Butanol-acide acétique-eau (4:1:5, phase supérieure). D: Acétate d'éthyle-acide formique-eau (10:2:3). E: Acide acétique à 5%. F: Acide acétique à 30%. G: Acide acétique à 10%. H: Acide acétique à 15%. I: *n*-Butanol-éthanol-eau (20:5:11, phase supérieure). J: *n*-Butanol-éthanol-eau (5:1:4, phase supérieure). K: Isopropanol-butanol-acétate d'éthyle-eau (7:1:2:2). L: *n*-Butanol-pyridine-eau (9:5:4). M: *n*-Butanol-isopropanol-eau (1:7:2). N: Isopropanol-méthyléthylcétone-acétate d'éthyle-butanol-eau (6:5:3:2:5). O: Acétate d'éthyle-*n*-butanol-pyridine-eau (8:9:7:5).

Extraction et Purification du Flavonoloside

103 g de pollen de *Populus yunnanensis* sont extraits 3 fois par l'éthanol à 95° à l'ébullition, pendant 20 min. Les extraits sont réunis et concentrés sous pression réduite, puis délipidés deux fois par agitation avec de

⁵ B. V. CHANDLER et K. A. HARPER, *Australian J. Chem.* 14, 586 (1961).

⁶ J. MONTREUIL, A. ADAM-CHOSSON et G. SPIK, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 47, 1881 (1965).

⁷ R. KUHN, I. LÖW et H. TRISCHMANN, *Chem. Ber.* 88, 1492 (1955).

l'éther éthylique. Au sein de la phase aqueuse (a) il se dépose 3,09 g d'un solide jaune (b) qu'on sépare par filtration sur bûchner. Le filtrat (a), après concentration, est chromatographié sur 90 feuilles de papier Whatman No. 3 MM. Le produit (b) est mis en solution dans le méthanol et chromatographié sur 30 feuilles du même papier (solvant de migration C). Les larges bandes de R_f moyen 0,40 présentant une fluorescence brun-rouge en lumière u.v. sont découpées, élues par agitation avec du méthanol à la température du laboratoire (2 fois) puis 1 fois avec un mélange méthanol-eau (3:1) à 50°-60°. Les extraits sont filtrés et évaporés à sec sous pression réduite. Le résidu dissous dans un peu de méthanol est rechromatographié dans le solvant E et enfin dans le solvant I.

Les éluats des chromatogrammes dans le solvant I sont réunis, filtrés, concentrés à sec; le résidu est dissous dans quelques millilitres de méthanol tiède, et la solution précipitée par 5 à 8 volumes d'éther éthylique. Le flavonoloside précipité est rapidement séparé sur bûchner (car il brunit facilement) et désséché sous vide en présence de KOH. On obtient ainsi 2,25 g d'hétéroside à partir de (a) et 0,82 g à partir de (b). Par exposition à l'air, ce produit (c) reprend 6,6% de son poids d'eau.

Une deuxième purification de (c) par précipitation à l'éther donne un produit qui, exposé plus longtemps à l'air, contient 10,8% d'eau (d).

Analyses ($C_{33}H_{46}O_{20} = 756,68$)	H_2O		Masse moléculaire	C%	H%
	(%)	Moles			
(c) Trouvé	6,6			48,81	5,73
Calculé	6,66	3	810,73	48,68	5,81
(d) Trouvé	10,8			46,82	5,86
Calculé	10,64	5	846,76	46,81	5,95

Le flavonoloside (d) fond avec décomposition à 285° en capillaire et à 345°-346° au bloc (instantanée). $[\alpha]_{546}^{\circ} = -105,6^{\circ}$; $[\alpha]_{578}^{\circ} = -87,4^{\circ}$ ($C = 1,57$ de produit anhydre dans l'éthanol à 50%). Ses R_f se trouvent résumés dans le Tableau 2. On peut observer à ce propos que le rapport: 100 R_f (H) - R_f (B)/ R_f (H) = 39 correspond à un trioside.⁸ Les maximums d'absorption dans l.u.v. du flavonoloside en solution dans le méthanol se trouvent résumés dans le Tableau 1.

TABLEAU 2. CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER DE FLAVONOLOSIDÉ

	$R_f \times 100$ solvant*							
	A	B	C	D	E	F	G	H
Kempférol-3-O-rhamnодiglucoside	4	47	50	48	63	84	70	78
Kempférol	39		84	85				3

* Voir partie expérimentale.

Pics principaux du spectre i.r. (exprimés en cm^{-1}): 3400 (OH); 2930; 1666 (carbonyle de l'hétérocycle central); 1617 (C=C aromatique); 1515, 1452, 1370 (OH phénoliques); 1076; 990; 892.

Hydrolyse Acide Quantitative du Flavonoloside

28,9 mg de flavonoloside anhydre sont hydrolysés par 3 ml d' H_2SO_4 2 N pendant 2 hr au bain-marie bouillant. On recueille par filtration 10,9 mg d'aglycone (soit 37,71% calculé pour un rhamnosido diglucoside du kempférol: 37,82%). Dans le filtrat, après neutralisation, les sucres sont dosés par cuprimétrie. Le pouvoir réducteur exprimé en glucose correspond à 62,8% de l'hétéroside. Par chromatographie, on met en évidence du glucose et du rhamnose.

⁸ C. SOSA-BOURDOUIL et A. SOSA, *Bull. Soc. Chim. Biol.* **49**, 1593 (1967).

Détermination du Rapport Moléculaire du Glucose et Rhamnose

(1) Par dosage spectrophotométrique, après élution au moyen d'éthanol à 80% 0,1 N en HCl (Hughes et Jeanloz⁹), des taches révélées par le citrate d'aniline (Date¹⁰) sur les chromatogrammes, le rapport glucose/rhamnose est de 1,86.

(2) Par dosage à la cystéine sulfurique (Dische et Shettles^{11,12}) de chaque ose après séparation chromatographique sur papier et élution, le rapport moléculaire trouvé est de 2,02.

Aglycone

Après recristallisation dans l'éthanol à 80°, ses R_f (Tableau 2), son spectre u.v. (λ_{max} : 266 nm; 368 nm) ainsi que son spectre i.r. sont identiques à ceux du kempférol. Son point de fusion est de 282°-283° (capillaire) non abaissé après mélange avec du kempférol authentique. (Calculé pour $C_{15}H_{10}O_6$, C = 62,94; H = 3,52; trouvé C = 62,62; H = 3,67%).

Méthylation

60 mg de flavonoloside en solution acétonique sont méthylés par le sulfate de méthyle en présence de K_2CO_3 , à l'ébullition à reflux pendant 30 hr. Après hydrolyse acide, on sépare l'aglycone. Après purification par chromatographie sur papier dans le solvant D, on cristallise l'aglycone dans l'éthanol. F: 132° (bloc instantané), M: 328 (spectrométrie de masse); calculé pour $C_{18}H_{16}O_6$: 328,31. Ses maximums d'absorption dans l'u.v. en présence de différents réactifs se trouvent résumés dans le Tableau 1.

Perméthylation

250 mg de flavonoloside sont dissous dans 20 ml de Me_2SO_4 ; on fait agir pendant 4 hr, en agitant, sous courant d'azote, 10 ml de méthylsulfonylanion préparé selon Sandford et Conrad;¹³ on ajoute ensuite 3 ml d'iode de méthyle lentement de sorte que la température ne s'élève pas au-dessus de 25°. La solution est diluée avec du $CHCl_3$, lavée avec une solution de $Na_2S_2O_3$ à 2% puis avec de l'eau. La solution $CHCl_3$ desséchée sur Na_2SO_4 est évaporée à sec. Le résidu est dissous dans un peu d'alcool absolu et hydrolysé par H_2SO_4 4 N pendant 4 hr à 100°. L'hydrolysat, après séparation de l'aglycone, est neutralisé et examiné par chromatographie sur papier selon la technique de Petek.¹⁴ La révélation à l'oxalate d'aniline montre trois taches dont l'une est identifiée au tri-*O*-méthyl-2,3,4 rhamnose, l'autre au tétra-*O*-méthyl-2,3,4,6 glucose; la migration de la troisième tache indique un glucose diméthylé.

Isolément du di-*O*-méthyl-4,6 Glucose

L'hydrolysat est chromatographié sur papier Whatman 3 MM dans le solvant J; la zone correspondant au glucose diméthylé est élue par l'éthanol absolu. Le di-*O*-méthyl-4,6 glucose cristallise dans l'éthanol en longues aiguilles blanches, F = 158°-160° (bloc, instantané); $\alpha_D^{20} = +66,5^\circ$ (15 hr) (C = 0,6 dans l'eau).

Hydrolyse Ménagée du Flavonoloside Par les Résines

300 mg du flavonoloside dissous dans 60 ml d'eau sont hydrolysés par 24 ml de Dowex 50 × 8, forme H⁺ (200-400 mesh) au bain-marie à l'ébullition, avec agitation, pendant 80 min. On transvase le mélange dans une colonne et lave la résine, avec 500 ml d'eau. Les effluents sont concentrés et chromatographiés dans le solvant I. Les bandes contenant le disaccharide et le trisaccharide sont élues et repurifiées par chromatographie sur papier dans le solvant K. Après élution, ils sont précipités de leur solution hydroalcoolique, par l'éther éthylique. On a ainsi obtenu 66 mg de disaccharide et 96 mg de trisaccharide à partir de 600 mg de flavonoloside. Leurs R_f se trouvent réunis dans le Tableau 3.

Disaccharide. $[\alpha]_D^{20} = +18^\circ$ (10 min) $\rightarrow +11^\circ$ (24 hr) (C = 1,32 dans l'eau) F = 207°-208° (bloc instantané).

Hydrolyse enzymatique. 2 mg de disaccharide sont hydrolysés à pH 5 à 37° pour 0,1 mg de β glucosidase d'amandes à 420 UI/mg. Après 45 min d'incubation on identifie du glucose seulement par chromatographie sur papier.

Méthylation. 5 mg de disaccharide sont perméthylés selon la méthode déjà décrite. Après hydrolyse, on identifie par chromatographie sur papier, avec des témoins préparés à partir de laminarine, du tétra-*O*-méthyl-2,3,4,6 glucose et du tri-*O*-méthyl-2,4,6 glucose.

Trisaccharide. $[\alpha]_D^{20} = -13,7^\circ$ (15 min) $\rightarrow [\alpha]_D^{20} = -8,2^\circ$ (24 hr) (C = 2,08 dans l'eau) F: 169°-170° en capillaire, avec décomposition, après ramollissement à 125°; 210° au bloc, instantané. Calculé pour $C_{14}H_{32}O_{15}$, C = 44,26; H = 6,60; trouvé C = 43,88; H = 6,79%.

⁹ R. C. HUGHES et R. W. JEANLOZ, *Biochemistry* 3, 1535 (1964).

¹⁰ J. DATE, *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 10, 444 (1958).

¹¹ Z. DISCHE et L. B. SHETTLES, *J. Biol. Chem.* 175, 595 (1948).

¹² Z. DISCHE, L. B. SHETTLES et M. OSNOS, *Arch. Biochem.* 22, 169 (1949).

¹³ P. A. SANDFORD et H. L. CONRAD, *Biochemistry* 5, 1508 (1966).

¹⁴ F. PETEK, *Bull. Soc. Chim. Fr.* 263 (1965).

TABLEAU 3. CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER DU TRISACCHARIDE

	Solvant* ($R_f \times 100$)			
	L	M	N	O
Laminaribiose	76	75	79	75
Trisaccharide	56	59	66	52

* Voir partie expérimentale.

Hydrolyse ménagée. 1 mg de trisaccharide est hydrolysé par H_2SO_4 0,4 N, en tubes capillaires à 37°. Après plusieurs jours, on met en évidence par chromatographie sur papier une libération de rhamnose et de laminaribiose.

Méthylation. 5 mg du trisaccharide sont perméthylés. Après hydrolyse, les chromatogrammes montrent trois taches dont les migrations sont respectivement identiques à celles de l'hydrolysat du flavonoloside perméthylé.

Acétylation. On laisse en contact 10 mg du trisaccharide avec 0,5 ml du mélange anhydride acétique-pyridine (2:3 en volume) pendant 20 hr à la température du laboratoire. L'excès de réactif est évaporé sous vide poussé, puis par plusieurs additions de benzène suivies d'évaporation sous vide. Le dérivé acétylé desséché, fond à 115° au bloc (instantané).

Remerciements—Nous adressons tous nos remerciements à Monsieur le Professeur J. E. Courtois pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail. Nous remercions vivement M. le Professeur J. B. Harborne pour son échantillon de kempférol 3-(2^G glucosylrutinoside), M. le Professeur S. Peat et M. le Docteur J. R. Turvey pour leur échantillon de laminaribiose et M. le Professeur B. H. Koeppen pour son échantillon de néohespéridose.