

## ETUDE DES HETEROSIDES FLAVONIQUES DE *VICIA SYLVATICA* ET *V. SEPIUM*

M. TORCK, M. PINKAS et L. BÉZANGER-BEAUQUESNE

Laboratoire de Matière Médicale, U.E.R. de Pharmacie, rue du Professeur Laguesse, 59-Lille, France

(Reçu le 24 avril 1972. Accepté le 1 mai 1972)

**Key Word Index**—*Vicia sylvatica*; *V. sepium*; Leguminosae; flavonoid glucosides; kaempferol; quercetin.

**Résumé**—Les fleurs de *Vicia sylvatica* L. contiennent un hétéroside flavonique très nettement prédominant, le quercitroside. Chez *Vicia sepium* L. ont été identifiés le kaempférol-3-glucoside-7-rhamnoside et le kaempférol-3,7-diglucoside dans les feuilles, le kaempférol-3-glucoside-7-rhamnoside et un flavonoside proche du quercétol-3-glucoside-7-rhamnoside dans les fleurs.

**Abstract**—Flowers of *Vicia sylvatica* contain quercetin as the predominant flavonoid. *Vicia sepium* leaves have kaempferol 3-glucoside-7-rhamnoside and the 3,7-diglucoside; the latter is absent from the flowers which also contain a quercetin-rhamno glucoside.

POURSUIVANT nos recherches sur les flavonoïdes des *Vicia*,<sup>1,2</sup> nous avons identifié plusieurs de ces composés. Les fleurs de *V. sylvatica*, cueillies en août dans les Alpes de Savoie, sont riches en un hétéroside facilement indentifié au quercitroside témoin par hydrolyse acide, chromatographie et spectrophotométrie UV. Il représente environ 13 % du poids des fleurs sèches.

Chez *V. sepium*, récoltée en Haute-Normandie et dans la campagne lilloise, les feuilles et les fleurs présentent une richesse analogue en dérivés flavoniques. Une teinture alcoolique de feuilles, soumise à la chromatographie bidimensionnelle sur papier Whatman No. 3, dans le solvant de Partridge puis dans l'acide acétique à 15 %, montre la présence de 4 flavonosides dont deux à l'état de traces. Seuls ont pu être étudiés les hétérosides dominants I et II, I constituant 40 % environ de l'ensemble flavonique des feuilles.

Une teinture alcoolique de fleurs, soumise à une chromatographie bidimensionnelle dans les mêmes conditions, montre, elle aussi, la présence de 4 flavonosides dont les deux principaux, III et IV, ont été identifiés, les autres n'existant qu'à l'état de traces.

Tous les dérivés sont séparés par chromatographie sur papier (révélation en lumière UV et après pulvérisation de réactif de Neu), les  $R_f$  étant considérés par rapport à ceux du rutoside pris comme témoin. L'étude recourt ensuite à la spectrophotométrie UV qui, en présence de différents ions minéraux, permet de déterminer le degré de liberté des groupements OH, puis à l'hydrolyse acide (100°, pendant 1,5–2 hr, avec  $H_2SO_4$  à 5 %).

Cette dernière opération libère l'aglycone et les oses. L'identification de l'aglycone est faite par spectrophotométrie UV et chromatographie sur papier Whatman No. 3 dans les 4 solvants: butanol acétique de Partridge, *n*-butanol-acétone-isopropanol-eau (4:2:2:4), solvant de Forestal, acide acétique à 60 %, celle des oses par chromatographie sur papier

<sup>1</sup> L. BÉZANGER-BEAUQUESNE, M. TORCK et M. PINKAS, *Compt. Rend.* **266D**, 839 (1968).

<sup>2</sup> M. TORCK, L. BÉZANGER-BEAUQUESNE et M. PINKAS, *Ann. Pharm. Fr.* **29**, 201 (1971).

Whatman No. 3 dans les 3 solvants acétate d'éthyle-pyridine-eau (12:5:4), alcool iso-amylque-pyridine-eau (7:7:2), *n*-butanol-pyridine-eau (9:5:4) et, pour confirmation éventuelle, par migration prolongée, de 48-55 hr, dans le solvant de Partridge. Dans certains cas, l'hydrolyse enzymatique par l'émulsine et la rhamnodiastase donne des précisions sur la structure de l'hétéroside.

*Hétéroside I.* Il possède une fluorescence brune en lumière ultraviolette et vire au vert par pulvérisation de réactif de Neu. On note, lors de la réaction à l'oxychlorure de zirconium, une disparition de la fluorescence jaune. L'aglycone est du kaempférol; les oses sont constitués par du glucose et du rhamnose en quantités égales. L'examen du spectre UV et les données précédentes permettent de conclure que les OH en 3 et 7 sont combinés tandis que OH en 5 est libre. Additionné d'émulsine, I libère du glucose et, simultanément, un composé de fluorescence jaune vif aux UV. Avec la rhamnodiastase, il y a apparition de glucose en 48 hr mais le rhamnose ne peut être mis en évidence qu'au bout de 96 hr. On en déduit que I est du kaempférol-3-glucoside-7-rhamnoside.

*Hétéroside II.* Il est formé de kaempférol et de glucose. Sa fluorescence, brune en lumière UV, vire au vert après pulvérisation de réactif de Neu. Au cours de la réaction à l'oxychlorure de zirconium la fluorescence jaune disparaît. Ces observations, jointes à l'examen du spectre UV, indiquent que les OH en 3 et 7 sont combinés et que OH en 5 est libre. Il semble donc que II soit du kaempférol-3,7-diglucoside, flavonoside auquel on attribue<sup>3</sup> des maxima d'absorption en UV à 267 et 350 nm, identiques à ceux que nous avons trouvés.

*Hétéroside III.* La comparaison des  $R_f$  en chromatographie dans plusieurs solvants, celle du spectre UV et des produits de l'hydrolyse acide et de l'hydrolyse enzymatique montrent que III est identique à I et consiste, par conséquent, en kaempférol-3-glucoside-7-rhamnoside.

*Hétéroside IV.* On y caractérise le quercétol, le glucose et le rhamnose, les deux oses paraissant exister en quantités égales. Les  $R_f$  sont extrêmement voisins de ceux du rutoside, sauf dans l'acide acétique à 15% qui permet de séparer nettement les deux corps. La fluorescence en UV et la réaction à l'oxychlorure de zirconium montrent que OH en 3 est combiné. Le spectre UV traduit la combinaison de OH en 7, la liberté des OH en 5, 3' et 4'. Il s'agit, très probablement, d'un hétéroside du quercétol où OH en 3 et 7 sont combinés au glucose et au rhamnose.

Pour déterminer la position exacte des oses, nous avons effectué des hydrolyses enzymatiques. La  $\beta$ -glucosidase de l'émulsine n'exerce aucune action sur l'hétéroside IV tandis que l' $\alpha$ -glucosidase de l'orge germée libère, elle, du glucose. La rhamnodiastase détache simultanément du glucose et du rhamnose.

Le spectre UV du flavonoside est extrêmement voisin de celui du quercétol-3-glucoside-7-rhamnoside.<sup>4</sup> Les  $R_f$  ( $R_f$  rapportés à ceux du rutoside) sont pratiquement identiques à ceux du vincétoxicoside A<sup>5</sup> dans 3 solvants: butanol acétique de Partridge, acide acétique à 15%, acide acétique à 60%. Mais cet hétéroside, qui n'est autre que le quercétol-3-glucoside-7-rhamnoside, est hydrolysé par la  $\beta$ -glucosidase.

L'hétéroside IV est certainement apparenté au vincétoxicoside A. La détermination de sa structure exacte sera poursuivie lors d'une prochaine récolte permettant une nouvelle extraction du flavonoside.

<sup>3</sup> P. RIBÉREAU-GAYON, *Les Composés Phénoliques des Végétaux*, Dunod Ed., Paris (1968).

<sup>4</sup> T. J. MABRY, K. R. MARKHAM et M. B. THOMAS, *The Systematic Identification of Flavonoids*, Springer, Berlin (1970).

<sup>5</sup> F. KOZJEK, P. LEBRETON, T. J. MABRY, K. R. MARKHAM H. YOSHIOKA et G. NÉTIEN, *Ann. Pharm. Fr.* **26**, 513 (1968).

## EXPERIMENTALE

L'extraction des hétérosides flavoniques est effectuée suivant la méthode classique: épuisement de chacun des organes étudiées par de l'EtOH à 95°, concentration sous vide partiel de l'extrait obtenu, reprise du résidu par de l'Et<sub>2</sub>O puis par de l'EtOAc et, enfin, par du BuOH.

I. *V. sylvatica*. Toutes les phases organiques possèdent la même composition. Seule la phase Et<sub>2</sub>O est retenue pour l'étude. *Isolement de l'hétéroside*. Après concentration suffisante sous pression réduite et repos au réfrigérateur, cette solution donne naissance à un précipité qui se révèle chromatographiquement pur.

II. *V. sepium*. *Isolement des hétérosides des feuilles*. Seul le *n*-BuOH est capable d'entraîner ces hétérosides. Concentrée, la solution laisse déposer un précipité orangé dont une partie est dissoute dans l'alcool à 80° et sert à l'isolement de I par chromatographie préparative sur papier Whatman 3 MM dans le solvant *n*-BuOH-acétone-*iso*-PrOH-H<sub>2</sub>O (2:1:1:2) et élution de la bande correspondante par de l'EtOH à 95°. Le reste du précipité est soumis à un fractionnement sur colonne de polyamide où l'on utilise comme éluant l'EtOH à 50°. On l'isole par chromatographie préparative dans le solvant de Partridge sur papier Whatman 3 MM.

*Isolement des hétérosides des fleurs*. Dans ce cas encore, c'est le *n*-BuOH qui convient à l'extraction. Après concentration de la solution, on obtient un précipité orangé que l'on soumet à un fractionnement sur colonne de polyamide en éluant avec le mélange alcool à 95°-H<sub>2</sub>O (3:2). Les hétérosides III et IV sont isolés par chromatographie préparative sur papier Whatman 3 MM dans l'acide acétique à 15%, découpage des bandes dont les *R<sub>f</sub>* respectifs avoisinent 0,55 et 0,60 et élution par de l'alcool à 95°.

*Hétéroside I*. Les *R<sub>f</sub>* observés dans les 4 solvants: Partridge, *n*-BuOH-acétone-*iso*-PrOH-H<sub>2</sub>O (2:1:1:2), HOAc à 15%, *iso*-AmOH-HOAc-H<sub>2</sub>O (5:3:2) sont de 0,49, 0,75, 0,51, 0,43 (pour le rutoside 0,56, 0,77, 0,69, 0,50). *Spectre UV*.  $\lambda_{\max}$  = 267 et 350 nm dans l'EtOH et en présence d'NaOAc, 267 et 354 nm avec l'NaOAc et l'acide borique, 275, 301 (inflexion), 348 et 396 nm dans le AlCl<sub>3</sub>, 277 et 410 nm dans la NaOH.

*Hétéroside II*. Les *R<sub>f</sub>* observés dans les 4 solvants susnommés sont de 0,39, 0,41, 0,61, 0,20 (pour le rutoside 0,63, 0,57, 0,49, 0,36). *Spectre UV*.  $\lambda_{\max}$  = 267, 292 (inflexion) et 350 nm (EtOH), 266 et 356 nm (NaOAc), 266 et 348 nm (NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub>), 265, 300 (inflexion) et 350 nm (AlCl<sub>3</sub>), et 278, 302 (inflexion) et 408 nm (NaOH).

*Hétéroside IV*. Les *R<sub>f</sub>* observés dans les 4 solvants susnommés sont de 0,58, 0,81, 0,68, 0,30 (pour le rutoside 0,60, 0,81, 0,54, 0,30). *Spectre UV*.  $\lambda_{\max}$  = 255, 268 (inflexion) et 360 nm (EtOH), 255, 295 (inflexion) 362, 430 nm (inflexion) en (NaOAc), 260 et 380 nm (NaOAc + H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub>), 261, 300 (inflexion), 360 et 460 nm (inflexion) (AlCl<sub>3</sub>), 275 et 416 nm (NaOH).