

LES SOPHOROSIDES DE FLAVONOLS DE QUELQUES POLLENS*

F. PRATVIEL-SOSA et F. PERCHERON

Equipe de Recherches Associée du C.N.R.S. No. 99, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques Université René Descartes, 4, Avenue de l'Observatoire Paris VIe, France

(Reçu le 6 Novembre 1971)

Résumé—Les pollens des plantes étudiées appartiennent aux familles des Juglandacées, Bétulacées, Fagacées et Oléacées. La plupart contiennent comme constituant hétérosidique majeur le quercétol-3-sophoroside que l'on a caractérisé à partir d'une dizaine d'espèces. De plus dans quelques pollens on a obtenu et identifié le kempférol-3 sophoroside.

Abstract—Pollens from trees of the Juglandaceae, Betulaceae, Fagaceae and Oleaceae contain quercetin-3-sophoroside as a major constituent. Kaempferol 3-sophoroside was also identified in some pollens.

INTRODUCTION

LE SOPHOROSE a été trouvé à l'état naturel pour la première fois comme constituant du sophoraflavonoloside (kempférol-3 sophoroside) des fruits verts de *Sophora japonica* par Rabaté et Dussy^{1,2} en 1936. Ce 2-*O*- β -D-glucopyranosyl (1 \rightarrow 2)-glucopyranose a été synthétisé.⁶⁻¹¹ Ce disaccharide est également synthétisé par voie enzymatique à partir du glucose par l'émulsine d'amandes.¹² Il a été aussi isolé des milieux de culture de diverses espèces d'*Acetobacter* renfermant du glucose comme seule source de carbone.¹³

Par la suite on a trouvé le sophorose attaché à un autre flavonol, le quercétol puis à quelques anthocyanidols tels le cyanidol et le pétunidol (genres *Papaver* et *Petunia*). En dehors des flavonolosides ce disaccharide a été trouvé combiné soit à un alcool diterpénique, le stéviol (dans le stévioside),¹⁴ soit à des hydroxyacides gras chez les levures *Torulopsis*

* Ce travail fait partie d'une thèse de Doctorat d'Etat (F. Sosa) *Contribution à l'étude des glycosides flavonoliques des pollens d'Angiospermes*. Faculté des Sciences de Lille (Juin 1970).

¹ J. RABATE et J. DUSSY, *Compt. Rend.* **202**, 111 (1936); *Bull. Soc. Chim. Biol.* **20**, 459, 467 (1938).

² J. RABATE, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **7**, 565 (1940).

³ K. FREUDENBERG et K. SOFF, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **69**, 1245 (1936).

⁴ K. FREUDENBERG et H. KNAUBER, *Naturwissenschaften* **34**, 344, (1947).

⁵ K. FREUDENBERG, H. KNAUBER et F. CRAMER, *Chem. Ber.* **84**, 144 (1951).

⁶ A. M. GAKHOKIDZE, *J. Gen. Chem. USSR* **11**, 117 (*Chem. Abs.* **35**, 5467 (1941)).

⁷ S. HAQ, *Ph. D. Dissertation, University of Wales*; Wales (1957).

⁸ M. J. CLANCY, *J. Chem. Soc.* 4213 (1960).

⁹ B. COXON et H. G. FLETCHER, JR., *J. Org. Chem.* **26**, 2892 (1961).

¹⁰ P. A. FINAN et C. A. WARREN, *J. Chem. Soc.* 5229 (1963).

¹¹ B. H. KOEPPE, *Carbohydr. Res.* **7**, 410 (1968).

¹² S. PEAT, W. J. WHELAN et K. A. HINSON, *Nature, Lond.* **170**, 1056 (1952).

¹³ I. K. WALKER, P. N. PELLEGRINO et A. W. KHAN, *Arch. Biochem. Biophys.* **83**, 161 (1959).

¹⁴ R. VIS et H. FLECHTER, JR., *J. Am. Chem. Soc.* **69**, 1245 (1956).

magnoliae^{16,17} et *Candida bogoriensis*¹⁸ soit encore comme constituant du polysaccharide d'*Agrobacteria radiobacter*.¹⁵

Le quercétol-3 sophoroside aurait été signalé en 1960 par Rösler¹⁹ dans les feuilles de *Solanum tuberosum*, puis isolé des fleurs de *Petunia hybrida*, en 1962, par Birkofe et Kaiser.²⁰ Par la suite il a été isolé des feuilles²¹ et des fleurs²² de *Sorbus aucuparia*, des fleurs de *Gossypium barbadense*.²³ Harborne²⁴ a trouvé dans plusieurs espèces de pommes de terre sauvages un quercétol-3 diglucoside qui serait le quercétol-3 sophoroside. Il existerait également dans les pétales de plusieurs espèces de roses,²⁵ dans l'*Helleborus*,²⁶ dans les feuilles de *Pisum sativum* et chez *Primula sinensis* (pétales). Parfois il est accompagné de kempférol-3 sophoroside. Ce dernier a été récemment signalé dans les fleurs de *Galanthus nivalis*.²⁷ Wagner et al.²⁸ ont réalisé la synthèse de ces deux flavonolosides.

Nous avons trouvé le quercétol-3 sophoroside, pour la première fois dans un pollen, celui d'*Alnus cordata*²⁹ et poursuivi ces recherches dans les pollens de diverses espèces où il se trouve parfois accompagné de kempférol-3 sophoroside.

TABLEAU 1. REPARTITION DES SOPHOROSIDES CHEZ LES DIVERSES ESPECES ETUDIEES

Espèce	Quercétol-3 sophoroside*	Kempférol-3 sophoroside	<i>p</i> -Coumaroyl- glucoside du kempférol
Juglandales			
Juglandacées:			
<i>Juglans cordiformis</i> Maxim.	1,4	+	—
<i>Juglans sieboldiana</i> Maxim.	3,4	—	—
Fagales			
Bétulacées:			
<i>Alnus cordata</i> Desf. ²⁹	2,4	—	—
<i>Alnus incana</i> (L.) Vill.	0,4	—	—
<i>Betula medwediewii</i> Regel	0,16	+	—
<i>Carpinus carpinizza</i> Kit.	0,11	—	—
<i>Corylus avellana</i> L.	0,69	—	—
<i>Ostrya carpinifolia</i> Scop.	0,58	—	—
Fagacées:			
<i>Fagus silvatica</i> L.	—	+	+++
Oleales			
Oléacées:			
<i>Fraxinus sogdiana</i> Bunge	0,27	—	—

* Rendement: g/100.

¹⁵ P. A. J. GORIN, J. F. T. SPENCER et D. W. S. WESTLAKE, *Can. J. Chem.* **39**, 1067 (1961).

¹⁶ P. A. J. GORIN, J. F. T. SPENCER et A. P. TULLOCH, *Can. J. Chem.* **39**, 846 (1961).

¹⁷ J. F. T. SPENCER, P. A. J. PHILIP, G. A. HOBBS et D. A. COOKE, *Can. J. Microbiol.* **16**, 117 (1970).

¹⁸ A. P. TULLOCH, J. F. T. SPENCER et M. H. DEINEMA, *Can. J. Chem.* **46**, 345 (1968).

¹⁹ H. RÖSSLER, *Dissertat.*, Univ. München (1960).

²⁰ BIRKOFE L. et C. KAISER, *Z. Naturforsch.* **17b** 359 (1962).

²¹ W. LANGENBECK, *Pharmazie* **19**, 476 (1964).

²² M. KROLIKOVSKA et J. KANECKI, *Roczn. Chem.* **39**, 1937 (1965).

²³ Z. P. PAKUDINA et A. S. SADYKOV, *Dokl. Acad. Nauk. USSR.* **21**, 30 (1964); *Chem. Abs.* **62**, 9457 (1965).

²⁴ J. B. HARBORNE, *Bioch. J.* **84**, 100 (1962); *ibid. Experientia* **19**, 7 (1963).

²⁵ J. B. HARBORNE, *Experientia* **17**, 72 (1961).

²⁶ K. EGGER et M. KEIL, *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* **78**, 153 (1965).

²⁷ L. HÖRHAMMER, H. WAGNER et K. BECK, *Z. Naturforsch.* **22b**, 896 (1967).

²⁸ H. WAGNER, L. HÖRHAMMER, R. DISCHERL, L. FARKAS et M. NOGRADI, *Chem. Ber.* **101**, 1186 (1968).

²⁹ F. SOSA et F. PERCHERON, *Compt. Rend.* **261**, 4544 (1965).

RESULTATS ET DISCUSSION

Dans les pollens des genres *Alnus*, *Betula*, *Carpinus*, *Ostrya* (Bétulacées) et *Juglans* (Juglandacées) nous avons isolé le quercétol-3 sophoroside. Ce dernier se présente comme le glucoside flavonolique majeur de ces pollens (voir Tableau 1). De plus, chez *Juglans cordiformis*, le kempférol-3 sophoroside s'y trouve en quantité extractible, comme constituant mineur. Ce dernier corps peut être mis en évidence chez *Betula Medwediewii* et il n'est pas impossible qu'il existe en très faibles quantités chez les autres pollens.

Par contre, le pollen de *Fagus silvatica* (Fagacées) présente une prédominance des glucosides à kempférol, ce qui le distingue nettement des groupes précédents. Chez ce pollen, le constituant flavonolique majeur est un *p*-coumaroylglucoside du kempférol que nous avons isolé. Il avait été précédemment signalé et identifié au tiliroside.³⁰ Nous avons également isolé de ce pollen le kempférol-3 sophoroside qui s'y trouve en moindre quantité.

Ces différences constituent une indication chimiotaxonomique pouvant être développée par la suite avec l'examen d'un plus grand nombre d'espèces. Curieusement, le quercétol-3 sophoroside apparaît comme flavonoloside majeur du pollen de *Fraxinus*, genre classé parmi les Oléacées, donc beaucoup plus distant des Bétulacées que le genre *Fagus*.

Nous avons effectué d'autre part, une comparaison avec les flavonolosides que divers auteurs ont extraits ou signalés dans les feuilles des genres et espèces voisines de celles qui ont fait l'objet de notre étude. La famille des Bétulacées a été étudiée en détail par Hörhammer *et al.* Rappelons quelques uns des résultats sur les flavonolosides des feuilles, par exemple on trouve chez *Alnus subcordata* C. A. Mey, *Alnus incana* Moench.,³¹ *Betula alba* (L.) Vill.,³² *Carpinus orientalis* Mill.,³¹ le quercétol-3 galactoside, auquel se joint le quercétol-3 rhamnoside chez *Alnus incana* et *Carpinus orientalis*. Les feuilles de *Betula pubescens* contiennent du myricétol-3 digalactoside,³³ celles de *Corylus avellana* L. du quercétol-3 rhamnoside³¹ et du myricétol-3 rhamnoside.³²⁻³⁴ Chez *Juglans regia* L. (Juglandacées) il a été trouvé du quercétol-3 arabinoside à côté du quercétol-3 galactoside,³⁵ et dans la variété *vinensis* du kempférol-3 arabinoside.³⁶ Le quercétol-3 rutinoside existe dans les feuilles de *Fraxinus angustifolia* Wohl. (Oléacées) et quelques autres espèces.³⁷

Dans l'ensemble, notamment en ce qui concerne les Bétulacées examinées, on observe une prédominance des glucosides du quercétol comme dans les pollens correspondants, avec quelques divergences spécifiques (glucoside du myricétol dans *B. pubescens*). Tous ces hétérosides ont leurs sucres liés à l'hydroxyle en position 3, mais la fraction glucidique elle-même est différente de celles des flavonolosides majeurs des pollens. En effet, chez les feuilles, la partie glucidique des hétérosides est le plus souvent constituée par un mono-saccharide tels le galactose, le rhamnose ou l'arabinose, alors que dans les pollens nous trouvons un disaccharide. D'autre part, pour les cas examinés, lorsque les hétérosides des feuilles comportent un disaccharide, celui-ci est toujours différent du sophorose. Ce dernier sucre paraît donc caractériser les flavonolosides de ces pollens. Cette particularité organique vient s'ajouter à côté de la valeur chimiotaxonomique que l'on peut attribuer à la nature des flavonols eux-mêmes.

³⁰ M. TISSUT, *Phytochem.* **6**, 1291 (1967).

³¹ L. HÖRHAMMER, E. VORNDRAN et H. WAGNER, *Arch. Pharmac.* **289**, 316 (1956).

³² R. HÄNSEL et L. HÖRHAMMER, *Arch. Pharm.* **287**, 117 (1954).

³³ L. HÖRHAMMER, H. WAGNER et R. LUCK, *Arch. Pharm.* **290**, 338 (1957).

³⁴ M. COLLOT et C. CHARAUX, *Bull. Soc. Chim. Biol.* **21**, 455 (1939).

³⁵ K. HERRMANN, *Archiv. Pharm.* **288**, 362 (1955).

³⁶ T. NAKAOKI et N. J. MORITA, *J. Pharm. Soc. Japan* **78**, 521 (1958).

³⁷ R. PARIS et A. STAMBOULI, *Compt. Rend.* **253**, 313 (1961).

EXPERIMENTALE

Récolte des pollens. Les inflorescences sont prélevées juste avant l'ouverture des étamines, étalées sur des feuilles de papier glacé laissées dans un endroit sec. En général au bout de 1-3 jours, le pollen est libéré, ensuite séparé des inflorescences et tamisé sur des tamis de finesse appropriée.

Stabilisation et extraction. Le pollen sec est projeté par petites fractions dans EtOH à 80-90° bouillant (100 g/300-600 ml) et l'ébullition à reflux maintenue 20 min. Essor sur bûchner, il est encore extrait deux fois par EtOH, l'extrait aqueux est agité avec deux ou trois vol Et₂O afin d'éliminer la plus grande partie des lipides. Après repos, il se forme parfois dans l'extrait aqueux un précipité donnant la réaction des flavonoïdes. Dans le cas de l'aulne et du noyer, le glucoside a ainsi cristallisé dans la phase aqueuse. Pour les autres espèces, l'extrait a été chromatographié sur papier Whatman No. 3 MM au moyen du *n*-BuOH-HOAc-H₂O (4:1:5). La bande principale apparaît en brun rouge sous lumière UV 350 nm. Elle est alors découpée et éluee par le MeOH et un mélange de MeOH-H₂O. Après distillation de l'alcool, l'extrait obtenu est rechromatographié à l'aide d'un ou deux autres solvants, différents selon l'espèce du pollen étudié et dont l'efficacité a été vérifiée par l'expérience.

Isolation du quercétol-3-sophoroside et identification. L'identification de l'hétéroside par chromatographie sur papier, a été faite par comparaison avec le produit de référence²⁹ et avec de nombreux solvants. F instantanée au bloc: 234-236°; F en tube capillaire 210° après ramollissement vers 195-200°. Spectrophotométrie UV c.f.³⁸

Spectrographie IR (disques de KBr). Pics principaux exprimés en cm^{-1} : 3370 (OH), 2928; 1666 (CO), 1613 (C=C aromatiques); 1565, 1508, 1460, 1367, (OH phénolique); 1305, 1208, 1170, 1115, 1067, 1015, 1000 (vibration des liaisons OH et de la bande C—O des sucres).

Hydrolyse acide totale—Par H₂SO₄ N, 1 hr au 100°. On a obtenu 48,2% d'aglycone, F 315-316° (t. cap.) correspondant au quercétol, ce qui confirme la migration chromatographique dans plusieurs solvants. La proportion de sucres est de 57,6%, déterminé par cuprimétrie volumétrique³⁹ et correspond à 2 mol de glucose, (Calculé: 57,51%). La méthode de dosage au résorcinol présulfoné⁴⁰ qui exige des quantités beaucoup moins importantes d'hétéroside donne un résultat de 57%.

L'hydrolyse ménagée. Par H₂SO₄ très dilué (0,02-0,04 N) permet d'obtenir le disaccharide à l'état cristallisé: F 201-202°, $[\alpha]_D +32,3^\circ \rightarrow +19,8^\circ$ dans l'eau, correspondant au sophorose de référence; il est homogène à la chromatographie sur papier. De plus, la révélation par l'*o*-phénylène-diamine en milieu oxalique donne une tache brun-rougeâtre, alors que les autres glucosido-glucoses réducteurs sont révélés en bleu par ce réactif. Les R_f glucose trouvés avec plusieurs solvants différents pour le disaccharide correspondent bien à ceux du sophorose.

Détermination de la liaison hétérosidique. L'hétéroside est méthylé par le SO₄Me₂ et K₂CO₃ en milieu acétoneique.⁴¹ Après hydrolyse on obtient le tétraméthyl-5,7,3',4'-quercétol (C₁₉H₁₈O₇), F 197-198° λ_{max} 250, 360 nm. Le dérivé acétylé du tétraméthylquercétol a été préparé, F 174° λ_{max} 246, 332 nm. Ces deux produits ont été identifiés par rapport à des échantillons authentiques.²⁹

Méthylation de la chaîne glucidique. Les meilleurs résultats ont été obtenus par la méthode de Hakomori⁴² en suivant la technique de Sandford et Conrad⁴³ puis hydrolyse. Les chromatogrammes donnent deux taches, l'une correspondant au tétra-*O*-méthyl-2,3,4,6 glucose et l'autre au tri-*O*-méthyl-3,4,6 glucose.⁴⁴

Isolation des kempferol-glucosides. Lors de la chromatographie de l'extrait par le solvant BAW, à partir de la bande brun rouge (dans l'UV), de plus grand R_f nous avons isolé le kempferol-3 sophoroside (II) que nous avons purifié par chromatographie sur papier à l'aide de divers solvants; la cristallisation a été obtenue dans l'éthanol aqueux. Les R_f sont souvent très voisins du quercétol-3 sophoroside. Dans le *Fagus sylvatica* il a été séparé du kempferol-3 *p*-coumaroyl-glucose.

Kempferol-3 sophoroside (C₂₇H₃₀O₁₆). Cristaux jaunes, F instantanée (au bloc) = 209-211° non abaissé après mélange avec le composé authentique. Les spectres IR respectifs sont identiques. Pics principaux du spectre IR (exprimé en cm^{-1}): 3360 (hydroxyles), 2921; 1668 (CO de l'hétérocycle); 1615 (C=C aromatiques); 1508, 1456, 1368 (OH phénoliques); 1302, 1282, 1228, 1176, 1116, 1070, 1015, 998 (liaisons OH et bande C—O des sucres), 892, 830. Hydrolyse acide totale: 8,20 mg de II + H₂SO₄ N (1 hr au b.m. bouillant). Aglycone = 3,78 mg = 46% (calc. = 46,88), F 283-284°. Identifié au kempferol. Dosage du sucre, calculé: 59,02% trouve par la méthode à l'anthrone⁴⁶ 60%; par la méthode au résorcinol présulfoné⁴⁰ 58%. Hydrolyse ménagée: sophorose caractérisé par sa migration chromatographique. La solution éthanolique

³⁸ L. JURD, *Phytochem.* **8**, 445 (1969).

³⁹ G. BERTRAND, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **35**, 1285 (1906).

⁴⁰ A. W. DEVOR, C. CONGER et I. GILL, *Arch. Biochem. Biophys.* **73**, 20 (1958).

⁴¹ P. R. RAO et T. R. SESHDARI, *Proc. Indian Acad. Sci.* **27A**, 104 (1948).

⁴² S. HAKOMORI, *J. Biochem.* **55**, 205 (1964).

⁴³ P. A. SANDFORD et H. L. CONRAD, *Biochemistry* **5**, 1508 (1966).

⁴⁴ F. PETEK, *Bull. Soc. Chim. Fr.* 263 (1965).

⁴⁵ C. SOSA-BOURDOUIL et A. SOSA, *Bull. Soc. Chim. Biol.* **49**, 1593 (1967).

⁴⁶ R. DREYWOOD, *Ind. Eng. Chem.* **18**, 499 (1946).

de l'hétéroside présente dans UV les mêmes maximums que ceux observés avec le sophoraflavonoloside isolé par Rabaté.¹ Le kempférol-3 sophoroside a été isolé de *Juglans cordiformis* avec un rendement de 0,1 à 0,54 %, de *Betula Medwediewii* et de *Fagus silvatica*, dans ces derniers cas les rendements étaient beaucoup plus faibles. Chez *Fagus silvatica* où les glycosides du kempférol sont prédominants, il existe néanmoins de très faibles quantités d'un glucoside du quercétol, probablement le quercétol-3 sophoroside. Nous avons donc obtenu dans ce pollen, en plus du kempférol-3 sophoroside le kempférol-3 *p*-coumaroyl-glucoside cristallisé et correspondant au tiliroside.⁴⁷⁻⁴⁹ Ce dernier se dépose peu à peu dans l'extrait concentré. Après séparation par filtration, on en retrouve encore dans les eaux-mères.

Tiliroside—Cristaux jaunes, F 247–248° (lit., 247–256°); λ_{max} I 270 nm, II 317 nm en solution éthanolique; en présence d' AlCl_3 λ_{max} II 402 nm. Hydrolyse acide (H_2SO_4 1,5 N): Aglycone, F 282–284°, identique au kempférol; sucre = glucose. Hydrolyse alcaline (KOH N, 3 hr à température ordinaire): acide *p*-coumarique; cristallisé: F 208–210° (au bloc, fusion, instantanée); pas d'abaissement avec le produit de référence. Les spectres d'absorption respectifs sont identiques: λ_{max} 226 et 311 nm.

Remerciements—Nous adressons tous nos remerciements à Monsieur le Professeur J.-E. Courtois pour l'intérêt qui l'a porté à ce travail; à M Pourtet et M. Géant de l'Arboretum des Barres (Loiret) qui nous ont facilité les récoltes de pollen.

⁴⁷ A. NORDAL et O. OISETH, *Pharm. Acta Helv.* **32**, 114 (1957).

⁴⁸ L. HÖRHAMMER, L. STICH et H. WAGNER, *Naturwissenschaften* **46**, 358 (1959); *ibid. Arch. Pharm.* **294**, 687 (1961).

⁴⁹ J. B. HARBORNE, *Phytochem.* **3**, 151 (1964).

Key Word Index—Juglandales; Fagales; Oleales; pollens kaempferol and quercetin 3-sophorosides; tiliroside.