

SHORT COMMUNICATION

LES AGLYCONES FLAVONIQUES D'*ANTHYLLIS VULNERARIA**

J.-F. GONNET et M. JAY

Service de Phytochimie et Phytophysologie, Département de Biologie Végétale, Université Claude-Bernard
Lyon-I, 43, Boulevard du 11 novembre 1918, 69-Villeurbanne, France

(Reçu le 19 janvier 1972)

Key Word Index—*Anthyllis vulneraria*; Leguminosae; 5-deoxy and 7-methylflavonols; 7-O-methylflavonols.

Résumé—Grâce à l'apport de la technique de la chromatographie sur colonne et sur couches minces de polyamide, nous avons pu caractériser chez *Anthyllis vulneraria* (Légumineuses, sous-famille des Lotoïdées), outre quercétine, kaempférol et isorhamnétine déjà signalés, cinq autres flavonols: rhamnocitrine (I), rhamnétine (II), trihydroxy-3,7,4' flavone (III), fisétine (IV) et geraldol (V), ce dernier composé se trouvant mentionné pour la seconde fois à l'état naturel.

Abstract—*Anthyllis vulneraria* (Leguminosae, subfamily Lotoideae) has been investigated for flavonoids by means of polyamide column chromatography and TLC. The following flavonols have been characterized: quercetin, kaempferol and isorhamnetin, previously reported in this genus, and rhamnocitrin (I), rhamnetin (II), 3,7,4'-trihydroxy-flavone (III), fisetin (IV) and geraldol (V). This last compound has only been isolated once before as a natural product.

INTRODUCTION

DANS LE cadre d'une étude microsystematique de l'*Anthyllis vulneraria*,² nous avons été amenés à repréciser le chimisme flavonique de ce représentant de la tribu des Lotées (sous-famille des Papilionatées selon Taubert.³). En effet, alors que seuls, quercétine, kaempférol et isorhamnétine avaient été signalés chez cette espèce,^{4,5} notre analyse basée sur le traitement d'un hydrolysât de feuilles à l'aide de divers procédés chromatographiques (papier, colonne et couches minces de polyamide) nous a permis de séparer, outre les trois flavonols précités, huit autres composés: cinq d'entre eux sont identifiés de manière indubitable, quant aux trois autres, en raison de leur très faible teneur, leur structure définitive ne peut être encore assurée.

RESULTATS

Les constantes chromatographiques et spectrométriques qui nous ont permis d'identifier huit des onze composés isolés d'*Anthyllis vulneraria* sont récapitulées dans les Tableaux 1–3.

Nous ne nous attarderons pas sur les preuves de structure, particulièrement évidentes, qui confirment la présence de quercétine, kaempférol et isorhamnétine. Les cinq autres

* Partie XXVII dans la série "Recherches Chimiotaxinomiques sur les Plantes Vasculaires". Pour Partie XXVI voir Réf. 1.

¹ M. JAY et P. LEBRETON, *Le Naturaliste Can.* sous presse.

² H. COUDERC et J. F. GONNET, à paraître.

³ P. TAUBERT, in *Die natürlichen Pflanzenfamilien* (edited by A. ENGLER and K. PRANTL), Vol. III, p. 70, Engelmann, Leipzig (1894).

⁴ Z. KOWALESKI et H. KOWALSKA, *Diss. Pharm. Pharmacol.* **18**, 615 (1966).

⁵ R. LETOUBLON, *Contribution à l'étude biochimique des Légumineuses*. Diplôme d'Etudes Supérieures, Lyon (1968).

composés identifiés se répartissent en deux catégories, méthoxy-7 flavonols (I)(II) et désoxy-5 flavonols (III)–(V).

TABLEAU 1. CONSTANTES CHROMATOGRAPHIQUES DES FLAVONOLS D'*Anthyllis vulneraria*

	Système 1	Système 2	$R_f \times 100$ Système 3	Système 4	Système 5
Quercétine	8	14	33	43	65
Fisétine	11	17	39	54	66
Kaempférol	18	24	46	59	81
Trihydroxy-3,7,4' flavone	20	27	44	58	79
Isorhamnétine	29	44	38	51	71
Géraldol	31	50	43	57	74
Rhamnétine	35	47	41	51	73
Rhamnocitrine	58	75	51	75	89

Système 1. Couches minces de polyamide, solvant Bz–MeCOEt–MeOH (30:13:7);⁹ 2. Comme 1, solvant ratio (6:1:3); 3. Papier Whatman No. 1, solvant HOAc 60%; 4. Papier, Forestal (HOAc–H₂O–HCl, 30:10:3); 5. Papier, BAW (*n*-BuOH–HOAc–H₂O, 4:1:5).

A la première catégorie appartiennent la rhamnocitrine (I) ou méthyl-7 kaempférol, et la rhamnétine (II) ou méthyl-7 quercétine. La substitution de l'hydroxyle en 7 est démontrée par l'absence, dans les deux cas, de déplacement de la bande II du spectre UV en milieu NaOAc. Sa nature méthoxylique est précisée pour la rhamnocitrine par la spectrométrie de masse (M 300 et pic à $m/e = 167$ correspondant à un noyau A monohydroxylé, monométhoxylé⁶) et par le spectre de RMN du dérivé triméthylsilylé (présence d'un singulet situé en valeurs δ à 3,86 ppm); pour la rhamnétine, nous disposons du spectre IR de référence auquel nous avons comparé celui de notre échantillon.

TABLEAU 2. PROPRIETES SPECTRALES UV DES FLAVONOIDES D'*Anthyllis vulneraria*

	λ_{\max} (nm)	NaOAc Bande II	$\Delta\lambda$ (nm) H ₃ BO ₃ Bande I	AlCl ₃ Bande I	
	in EtOH				
Quercétine*	257 (272) 374	18	15	60	
Fisétine	250 319 365	—	23	63	
Kaempférol	267 (325) 369	14	1	58	
Trihydroxy-3,7,4' flavone	256 319 357	7	0	57	
	in MeOH				AlCl ₃ –HCl
Isorhamnétine	253 (268) 370	21	1	62	57
Géraldol	245 320 363	9	1	61	59
Rhamnétine	256 (271) 371	0	15	84	54
Rhamnocitrine	265 (324) 367	1	3	59	57

* Tous ces flavonols sont décomposés en milieu EtOH–NaOEt.

Dans la seconde série, se rangent la trihydroxy-3,7,4' flavone ou désoxy-5 kaempférol (III), la fisétine ou désoxy-5 quercétine (IV) et le géraldol ou désoxy-5 isorhamnétine (V). L'isolement et l'identification de ces composés nous ont posé de réels problèmes du fait de

⁶ H. AUDIER, *Bull. Soc. Chim. Fr.* 2892 (1966).

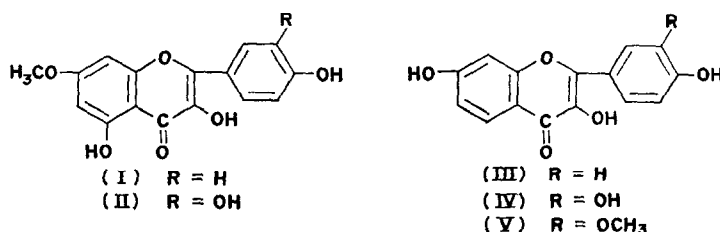
TABLEAU 3. MS DES AGLYCONES FLAVONIQUES D'*Anthyllis vulneraria*

	M		A		B	
	(<i>m/e</i>)	(%)	(<i>m/e</i>)	(%)	(<i>m/e</i>)	(%)
Trihydroxy-3,7,4' flavone	270	100	137	10	121	31
Fiséatine	286	100	137	39*	137	39*
Géraldol	300	84	137	100	151	74
Isorhamnétine	316	100	153	10	151	10
Rhamnocitrine	300	100	167	5	121	35

M désigne le pic moléculaire; A désigne le pic correspondant au noyau A; B désigne le pic correspondant au noyau B.

* Voir texte.

leur très faible teneur, de leur séparation très imparfaite avec les systèmes chromatographiques habituels, du fait enfin de leur très forte résistance à l'élution à partir d'un support cellulosique. Grâce au couplage de la chromatographie sur colonne avec la chromatographie sur couches minces de polyamide, nous avons pu surmonter les deux dernières difficultés.



Outre leur très intense fluorescence jaune-brillant, ces trois composés se distinguent des hydroxy-5 flavonols correspondants par plusieurs caractéristiques spectrales: (a) spectrophotométrie UV; en milieu alcoolique neutre apparition d'un pic supplémentaire vers 320 nm et observation d'un effet hypsochrome de 7-10 nm sur les deux bandes d'absorption, avec amortissement de la bande II; (b) spectrométrie de masse; existence d'un pic important à $m/e = 137$ (au lieu de $m/e = 153$ pour l'hydroxy-5 flavonol correspondant) en accord avec l'hypothèse de la monohydroxylation du noyau A.⁶ (On notera toutefois que dans le cas de la fisétine, ce pic est également attribuable à la dihydroxylation du noyau B).

DISCUSSION

L'originalité du chimisme polyphénolique d'*Anthyllis vulneraria* réside dans la présence de rhamnocitrine et de rhamnétine. En effet, la rhamnétine n'a semble-t-il été signalée que dans un seul genre de Légumineuses: *Acacia*;⁷ quant à la rhamnocitrine, il s'agit à notre connaissance de sa première mention dans cette famille.

Par contre, grâce à ses désoxy-5 flavonols (structure dont il faut souligner la distribution botanique par ailleurs assez restreinte), *Anthyllis vulneraria* s'apparente à de nombreuses Papilionacées.⁸ En effet, la présence de tels composés, identifiés chez les Mimosoïdées, les Caesalpinioïdées et dans sept au moins des neuf tribus de Lotoïdées constitue l'une des

⁷ J. W. CLARK-LEWIS et I. DAINIS, *Austral. J. Chem.* **21**, 425 (1968).

⁸ M. JAY, P. LEBRETON et R. LETOUBLON, *Boissiera* **19**, 219 (1971).

caractéristiques du chimisme polyphénolique de cette famille. On notera toutefois que ces mentions intéressent surtout la robinétine (désoxy-5 myricétine), la fisétine et la trihydroxy-3,7,4' flavone. Quant au géraldol, son identification chez *Anthyllis vulneraria* constitue la seconde mention de sa présence à l'état naturel, les travaux originaux à son sujet ayant d'ailleurs été réalisés sur une autre Légumineuse, *Trifolium subterraneum* var. Geraldton,⁹ dont les autres caractères flavoniques montrent beaucoup de similitude avec ceux de l'*Anthyllis*.

EXPERIMENTALE

Extraction. 400 g de feuilles sèches d'*Anthyllis vulneraria* (récoltées dans la Réserve des Bauges et sur le Plateau du Praz-de Lys en Haute-Savoie, France) sont soumis après broyage à une hydrolyse chlorhydrique de 40 mn au bain-marie bouillant (par fractions de 5 g dans 200 ml d'HCl 2 N).¹⁰ Après extraction quantitative des flavonols par l'éther éthylique, les fractions étherées sont réunies et concentrées.

Séparation chromatographique. Le résidu sec étant solubilisé dans une quantité minimale de méthanol, cette solution, diluée par une quantité égale de benzène est déposée au sommet d'une colonne de polyamide dont le développement est assuré par du benzène progressivement enrichi en MeCOEt puis en méthanol.¹¹ La migration des composés polyphénoliques est suivie en lumière de Wood. Les diverses fractions (50 ml) sont analysées en chromatographie monodimensionnelle sur couches minces de polyamide dans le solvant benzène-MeCOEt-MeOH (6:1:3). Après réunion des fractions chromatographiquement identiques, puis purification de ces dernières par un nouveau passage sur colonne de polyamide (la composition du solvant d'élution, mélange de benzène, MeCOEt et MeOH, est déterminée en fonction du comportement des diverses fractions lors de la première séparation), les composés purs sont cristallisés dans l'éthanol. Pour les désoxy-5 flavonols, la chromatographie sur colonne de polyamide ne permet pas l'obtention de quantités pondérables de ces composés à l'état pur. C'est pourquoi nous avons eu recours, dans ce cas, à la chromatographie préparative sur couches minces de polyamide (polyamide Macherey-Nagel DC 11, épaisseur 250 μ , solvant 6:1:3). Après délimitation en lumière UV, la bande chromatographique est récupérée sur creuset filtrant puis éluee par le méthanol (cette élution étant presque quantitative).

Identification. L'identification structurale est ensuite conduite selon les procédés classiques, chromatographie dans 5 systèmes solvants en présence de substances témoins (Tableau 1), spectrophotométrie UV en présence de divers réactifs selon^{12,13} (Tableau 2), spectrophotométrie IR après pastillage dans le KBr, MS (Tableau 3), éventuellement spectrométrie de RMN après triméthysilylation des hydroxyles selon.¹⁴

Remerciements—Le polyamide pour colonne nous a été fourni par le Dr. H. Wagner de l'Institut de Pharmacie de Munich, à qui nous adressons nos plus vifs remerciements. Nous remercions également Monsieur Garvey, de l'Ecole de Chimie de Lyon qui a réalisé les spectres de masse.

⁹ E. WONG et C. M. FRANCIS, *Phytochem.* **7**, 2123 (1968).

¹⁰ P. LEBRETON, M. JAY, B. VOIRIN et M. P. BOUCHEZ, *Chim. Anal. Fr.* **49**, 375 (1967).

¹¹ E. WOLLENWEBER, Thèse Université, Heidelberg (1970).

¹² L. JURD, in *The Chemistry of Flavonoid Compounds* (edited by T. A. GEISSMAN), p. 107, Pergamon Press, Oxford (1962).

¹³ T. J. MABRY, K. R. MARKHAM et M. B. THOMAS, *The Systematic Identification of Flavonoids*, Springer, New York (1970).

¹⁴ T. J. MABRY, J. KAGAN et H. RÖSLER, *Phytochem.* **4**, 487 (1965).