

SUR LE CARACTÈRE PROBABLEMENT ARTIFICIEL D'UN C-BENZYL FLAVONOÏDE OBTENU À PARTIR D'UN HYDROLYSAT DE FEUILLES D'*HYMENOSPORUM FLAVUM*

MAURICE JAY, BERNARD VOIRIN, JEAN FAVRE-BONVIN et JEAN FRANÇOIS GONNET

Service de Phytochimie, Département de Biologie Végétale U.E.R. des Sciences de la Nature,
Université Claude Bernard Lyon 1, 43 boulevard du 11 Novembre 1918,
69621 Villeurbanne, France

(Reçu 16 décembre 1973)

Key Word Index—*Hymenosporum flavum*; Pittosporaceae, C-benzyl derivatives of flavonols; 8- α -methyl-C-(*p*-hydroxybenzyl)kaempferol.

Abstract—Besides quercetin, kaempferol and isorhamnetin, at least three other flavonoids can be obtained from the leaves of *Hymenosporum flavum* after acid hydrolysis. One of these, a kaempferol derivative, *p*-hydroxyphenyl(3',4',5,7-tetrahydroxy)-8-flavonyl, methylmethane or 8- α -methyl-C-(*p*-hydroxybenzyl)kaempferol has been identified by study of its spectral properties. It is probably an artifact formed during hydrochloric acid treatment of the leaves.

Résumé—A côté de la quercétine, du kaempférol et de l'isorhamnétine, les feuilles d'*Hymenosporum flavum* laissent apparaître, après hydrolyse, au moins trois autres flavonoïdes. L'un d'entre eux, identifié par ses propriétés spectrales, est le *p*-hydroxyphénol(tétrahydroxy-3',4',5,7)-8-flavonyl, méthyl-méthane ou α -méthyl-C-(*p*-hydroxybenzyl)-8-kaempférol, il s'agit probablement d'un flavonoïde synthétisé au cours du traitement hydrolytique du matériel foliaire.

INTRODUCTION

AU COURS d'une étude chimiotaxinomique des Pittosporacées, l'un d'entre nous¹ avait signalé, chez la plupart des espèces analysées, à côté de flavonols simples tels que quercétine et kaempférol, la présence d'un composé de fluorescence jaune-ocre. Les techniques de chromatographie sur papier alors utilisées nous avaient seulement permis d'atteindre ses caractéristiques spectrophotométriques UV qui militaient en faveur d'une structure de type flavonol. La chromatographie sur polyamide appliquée à un hydrolysat de feuilles d'*Hymenosporum flavum* permet aujourd'hui de compléter cette analyse; en effet, outre quercétine et kaempférol déjà identifiés, nous relevons la présence d'isorhamnétine et de trois composés de fluorescence jaune-ocre répondant très certainement au même type structural; l'un d'eux a été isolé en quantités pondérables; ses caractéristiques physico-chimiques permettent de l'identifier à un dérivé en C₂₃ du kaempférol, structure dont l'origine artificielle semble à retenir, pour le moment du moins.

Démonstration de la structure C-benzyl kaempférol

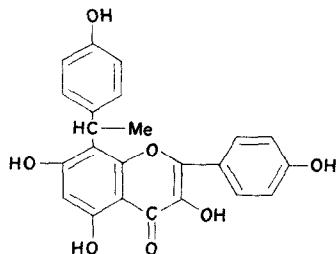
La fluorescence du composé et son spectre UV en milieu neutre (271, 371 nm) orientent

¹ JAY, M. (1969) *J. Linn. Soc. (Botany)* **62**, 423

vers une structure de base kaempférol, l'utilisation des réactifs classiques^{2,3} permet de localiser des hydroxyles libres en position 3, 7 et 4', la présence d'un hydroxyle en 5 est appuyée par la fréquence infrarouge caractéristique du groupement carbonyl chélaté ($\nu_{C=O} = 1645 \text{ cm}^{-1}$).⁴ Quant aux protons aromatiques, la spectrométrie de RMN les situe en 2'6* (*d*, 7,88, *J* 9 Hz), 3'5 (*d*, 6,97, *J* 9 Hz) et 6 (*s*, 6,44)^{†,5} d'où une substitution très probable en 8.

De fait, la spectrométrie de masse permet d'attribuer à ce composé la formule brute C₂₃H₁₈O₇ (calc. 406, 1052; trouv. 406, 1050); en outre les fragments *m/e* = 286 (C₁₅H₁₀O₆; calc. 286, 0477; trouv. 286, 0477), *m/e* = 153 (dihydroxylation du noyau A⁶) et *m/e* = 121 (monohydroxylation du noyau B⁶) confirment la structure de base kaempférol.

L'ensemble de ces résultats indique donc l'existence, en position 8 du flavonol kaempférol, d'un fragment C₈H₈O (*m/e* = 120; calc 120, 0575; trouv. 120, 0575). La structure de ce dernier est précisée par le spectre de RMN qui met en évidence un noyau benzénique *p*-substitué (*d*, 7,24 ppm, *J* 9 Hz; *d*, 6,78 ppm, *J* 9 Hz) et relié au kaempférol par un -CH- dont le signal (*q*, 4,94 ppm) témoigne d'un couplage avec un méthyle en α ; la présence de ce dernier est en effet signifiée par un doublet centré à 1,73 ppm. Des essais de double irradiation confirment le couplage du proton méthénique avec chacun des protons méthyliques.



Le composé obtenu à partir d'un hydrolysat de feuilles d'*H. flavum* peut donc se voir attribuer la structure représentée ci-dessus, il s'agit d'un C-benzyl kaempférol dont le carbone en α est substitué par un méthyle, sa nomenclature peut également faire appel au carbone benzylique considéré comme méthane substitué.

Les fragmentations relevées en spectrométrie de masse (Schéma 1) s'accordent avec la structure proposée.

* Déplacements chimiques en ppm (échelle *d*) par rapport un TMS

† Le léger doute concernant la position du proton résonant à 6,44 ppm (cette valeur du déplacement chimique peut paraître élevée pour un proton 6) est levé par prise en considération des valeurs obtenues sur le même appariel et dans le même solvant pour le H-6 du méthoxy-8 kaempferol et le H-8 du méthoxy-6 kaempferol : 6,36 et 6,62 ppm respectivement.

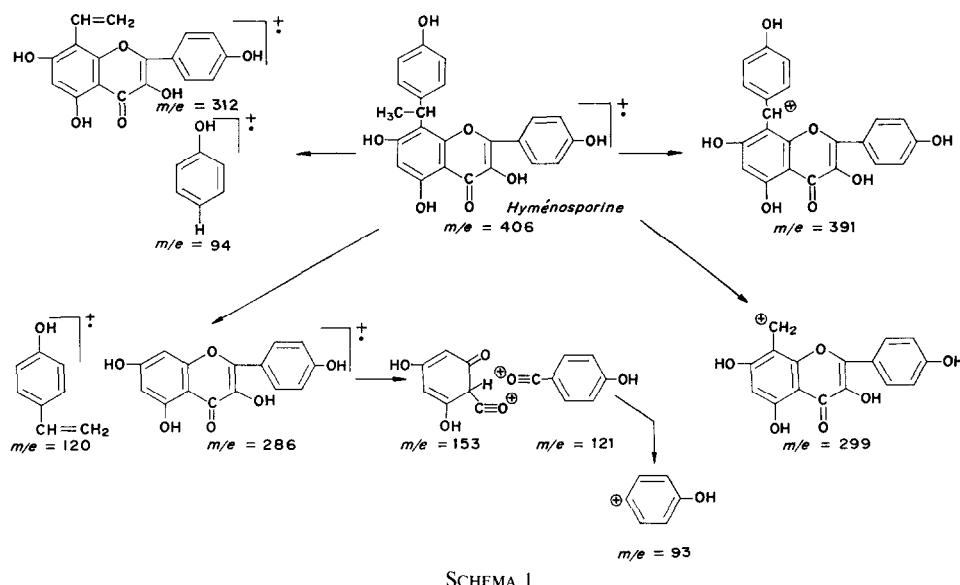
² FURRY, E. (1962) *The Chemistry of Flavonoids Compounds* (COTTRELL, T. A. ed.), p. 107. Pergamon Press, Oxford.

³ PORTER, L. J. et MARKHAM, K. R. (1970) *Phytochemistry* **9**, 1363.

⁴ LUBRITON, P. et CHOPIN, J. (1963) *Spectrochim. Acta* **19**, 2099.

⁵ MABRY, T. J., MARKHAM, K. R. et THOMAS, M. B. (1970) *The Systematic Identification of Flavonoids*. Springer, New York.

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



ORIGINE PROBABLE DU C-BENZYL KAEMPFEROL

Tous nos essais d'isolement direct du C-benzyl kaempferol sur un extrait hydroalcoolique global de feuilles d'*H. flavum* ont échoué, de même que ceux pratiqués après hydrolyse enzymatique de cet extrait par la β -glucosidase (alors que le fractionnement opéré sur un hydrolysat chlorhydrique de ce même extrait conduit à l'obtention du flavonol). Ceci nous amène à envisager deux hypothèses. La première tendrait à considérer que ce composé existe à l'état naturel sous forme d'hétéroside (s)* (non glucosyl) nos tentatives infructueuses d'isolement pouvant alors trouver justification dans l'extrême complexité de l'extrait hydroalcoolique global et la très faible teneur du flavonoïde étudié; aucun des hétérosides flavoniques isolés à l'état pur ne nous a montré après hydrolyse l'aglycone de fluorescence jaune-ocre.

La seconde hypothèse pose le problème d'une origine artificielle, le C-benzyl kaempferol étant synthétisé au cours du traitement hydrolytique; cette dernière nous apparaît, pour le moment du moins, la plus plausible. En effet, le traitement en milieu HCl 2 N à chaud pendant 40 min de quantités équimoléculaires de kaempferol et acide *p*-coumarique a permis la synthèse de plusieurs composés de fluorescence jaune-ocre dont l'un, isolé par chromatographie sur colonne de polyamide, possède toutes les caractéristiques (UV, RMN, et SM) du C-benzyl kaempferol d'*H. flavum*. D'autres arguments, plus indirects d'ailleurs, militent également en faveur de ce point de vue; dans l'hydrolysat de feuilles de cette Pittosporacée il existe, en plus du C-benzyl kaempferol, au moins deux autres composés de fluorescence jaune-ocre. Les caractéristiques spectrales UV et SM nous permettent d'envisager pour ces dernières les structures respectives suivantes. α -méthyl-C(*p*-hydroxy) benzyl-8 quercétine (λ_{\max} MeOH = 260, 270, 376 nm; SM: m/e = 422 (3%), 302

* Dans cette optique, la structure ici décrite rappellerait par certains points celles rapportées pour l'isoporiolide ou le poriolide isolés de l'Ericacée *Leucothoe*⁷ il s'agit de flavanones portant en 3' une unité de type benzoïque dont la fonction carboxylique estérifie la fonction alcoolique primaire d'un glucose par ailleurs lié en 7

⁷ OGISO, A., SATO, A., SATO, S. et TAMARA, C. (1972) *Tetrahedron Letters* 3071

(70%), 153 (7%), 137 (7%), 120 (100%), et α -méthyl-C (*p*-hydroxy benzyl-8 isorhamnétine (SM $m/e = 436$ (7%), 316 (62%), 153 (15%), 151 (11%), 120 (100%)). Autrement dit, cette espèce possède trois flavonols simples et leur homologue C-benzylé, résultat plus compatible avec l'hypothèse d'une synthèse en milieu chlorhydrique à chaud, qu'avec celle de composés naturels, nous avons d'ailleurs vérifié que ce greffage d'un fragment de poids moléculaire 120 est tout aussi facile avec la quercétine (ou l'isorhamnétine) qu'avec le kaempférol. Enfin, si ces C-benzyl flavonols étaient des composés naturels, leur originalité structurale devrait très certainement leur conférer une grande valeur d'indicateurs taxonomiques; or depuis que nous travaillons sur ce sujet, de tels composés ont été observés non seulement chez les Pittosporacées, mais encore chez les Saxifragacées (s. l. des Hydrangeacées),⁸ les Légumineuses (*Anthyllis, Astragalus*) et les Ptéridophytes (*Asplenium*).⁹

Dans l'hypothèse ici retenue du caractère artificiel de ces C-benzyl flavonols, il est permis de se demander pourquoi de tels composés sont passés inaperçus aussi longtemps, alors que la méthode hydrolytique est largement utilisée dans de nombreux laboratoires. Nous voyons à cela deux réponses. Le faible taux de synthèse qui les fait échapper aux analyses de routine pratiquées en général sur de petits échantillons végétaux, et ne les rend perceptibles qu'aux développements les plus sensibles et les plus récents des méthodes chromatographiques et spectrales, et le fait qu'au second ordre du moins, leur teneur absolue doit être liée non seulement à celle du "flavonol-parent" mais aussi à celle des acides phénols; or cette dernière peut montrer une grande variabilité d'un taxon à un autre.

EXPERIMENTALE

1 kg de feuilles fraîches d'*Hymenosporum flavum* (Hoop.) F v M (récoltées au jardin botanique de Martignier-Lapostole, 06 St Jean Cap Ferrat, France) sont soumises à une extraction hydroalcoolique (H_2O -MeOH 7/3) pendant 72 hr avec renouvellement du solvant toutes les 24 hr. Après évaporation de ce dernier sous pression réduite le résidu est repris par l'eau bouillante. La soin aq. de flavonoïdes est alors épousseté successivement par Et₂O et EtOAc. Après concentration de la phase EtOAc une partie de résidu (150 mg) est solubilisée dans l'eau chaude et soumise à l'hydrolyse chlorhydrique (HCl 2 N) pendant 40 min au BM bouillant. L'hydrolysat est extrait par Et₂O, l'évaporation à l'air libre de cette phase étherée livre un précipité flavonique de 60 mg. Ces aglycones sont séparés sur colonne de polyamide selon une technique exposée antérieurement.¹⁰ Après contrôle sur CM de polyamide (C_6H_6 , MeCOEt, MeOH 6/1/3), trois seulement des huit fractions collectées sont retenues, les constituants majeurs sont respectivement isorhamnétine, kaempférol et quercétine. Ces deux derniers flavonols avaient précédemment été identifiés,¹ quant au premier son identification repose sur ses caractéristiques chromatographiques et spectrales.

Ixorhamnétine Fluorescence jaune, R_f en CP (Whatman No 1) AcOH 0.37, BAW 0.71, Forestal 0.52, UV λ_{max} (MeOH) 253 (267), 370 nm, (+ NaOAc) 274, 395, (NaOAc + H₃BO₃) 255, 371, (+ AlCl₃) 264, 435, (AlCl₃ + HCl) 263, 433, (+ NaOH) instable SM principaux pics situés en valeurs m/e à 316, 153, 151. En plus du flavonol majeur, chacune de ces 3 fractions montre en CCM de polyamide au moins un composé mineur de fluorescence jaune-ocre et de R_f respectifs 0.62, 0.49, et 0.34 (kaempférol 0.32) dans C_6H_6 , MeCOEt, MeOH (6/1/3). En raison de leur très faible teneur nous nous sommes intéressés essentiellement au composé de R_f 0.49 qui a été isolé par CCM préparative suivie d'une filtration sur colonne de polyamide en quantité suffisante pour l'analyse spectrale UV RMN Masse.

α -méthyl-C (*p*-OHbenzyl-8 kaempférol) Fluorescence jaune-ocre R_f en CP (Whatman No 1) BAW 0.98, AcOH 0.74, Forestal 0.85 UV λ_{max} (MeOH) 271, (324), 371 nm, (+ NaOAc), 280, (315), 398, (+ NaOAc + H₃BO₃) 272, 372, (+ AlCl₃) 275, 356, 435, (+ AlCl₃ + HCl) 273, 433, (+ NaOH) 281, 409 (égale instabilité) RMN [$(CD_3)_2CO$ VARIAN, 100MC] 3H, d, δ 1.73×10^{-6} (J 7 Hz), 1H, q, δ 4.94×10^{-6} (4.87 J 7 Hz, 5.01 J 7 Hz), 1H, s, δ 6.44×10^{-6} , 2H, d, δ 6.78×10^{-6} (J 9 Hz), 2H, d, δ 6.97×10^{-6} (J 9 Hz), 2H, d, δ 7.24×10^{-6} (J 9 Hz), 2H, d, δ 7.88×10^{-6} (J 9 Hz) SM principaux pics situés en valeur m/e à 407 (3%), 406 (M 25%), 392 (5%), 391 (20%), 312 (2%), 299 (5%), 288 (5%), 287 (29%), 286 (100%), 285 (39%), 259 (3%), 258 (16%), 257 (14%), 241 (3%), 240 (3%), 230 (3%), 229 (12%), 225 (3%), 213 (8%), 212 (3%), 184 (4%), 153 (9%), 143 (14%), 137 (5%).

⁸ JAY M (1969) *Trat. Lab. Jaysinia* (Muséum Natl. Hist. Nat. Paris) 3, 111

⁹ VOIRIN B (1970) These Doc Sc Lyon France

¹⁰ GONNET, J. F. et JAY M (1972) *Phytochemistry* 11, 2313

136 (6%), 134 (6%), 129 (9%), 121 (30%), 120 (84%), 119 (22%), 108 (3%), 107 (3%), 106 (3%), 105 (7%), 94 (13%), 93 (11%), 92 (6%), 91 (33%), 89 (4%), 78 (6%), 77 (8%), 69 (14%), 67 (4%), 66 (5%), 65 (23%), 64 (4%), 63 (9%), 62 (4%), 60 (4%), 55 (6%), 51 (12%), 39 (18%)

Recherche du C-benzyl kaempférol après isolement des hétérosides 50 mg (fraction EtOAc) d'hétérosides sont traités en CP préparative (Whatman No 3) solvant BAW, après élution des taches chromatographiques par H₂O-MeOH 7-3, les différents éluats sont traités une seconde fois en CP, solvant AcOH 15%. Chacun des composés flavoniques alors visualisés sous UV est soumis à HCl 2 N pendant 40 min au BM bouillant, les extraits Et₂O obtenus à partir des hydrolysats sont analysés par CCM de polyamide (C₆H₆-MeCOEt-MeOH·6-1-3) en présence du témoin C-benzyl kaempférol

Recherche du C-benzyl kaempférol après hydrolyse enzymatique 100 mg d'hétérosides (fraction EtOAc) dissous dans 200 ml de tampon acétate pH 5,5 et additionnés de 200 mg de β -glucosidase (N B C) sont maintenus à 37° sous agitation pendant 23 hr L'extrait Et₂O obtenu à partir du mélange flavonique est analysé comme précédemment en CCM

Remerciements—Nous remercions Monsieur Marnier-Lapostole et Monsieur Laferrere qui nous ont fourni le matériel végétal, le Dr Harborne et le Dr Chopin pour leurs conseils et suggestions