

C-DIHOLOSYLFLAVONES DANS LES FEUILLES DU MELON (*CUCUMIS MELO*)

BERNARD MONTIES*, MARIE-LOUISE BOUILLANT† et JEAN CHOPIN†

*Laboratoire de Chimie biologique et de Photophysiologie (INRA) Institut National Agronomique, 78850 Thiverval-Grignon, France; †Laboratoire de Chimie biologique Université Claude Bernard, Lyon 1, 69621 Villeurbanne, France

(Revised received 17 November 1975)

Key Word Index—*Cucumis melo*; Cucurbitaceae; C-diglucosylapigenin; C-diglucosylluteolin.

Abstract—Four C-glucosylflavones were isolated from muskmelon leaves and shown to be 6-C-diglucosylapigenin (meloside A), 6-C-diglucosyl-luteolin (meloside L) and the respective caffeyl esters of meloside A (meloside a) and meloside L (meloside l).

INTRODUCTION

L'un de nous a rapporté l'existence dans les feuilles et les chloroplastes isolés du Melon (*Cucumis melo* L., var. Cantaloup Doublon Risser) de flavonosides [1] appartenant à la série des C-glucosylflavones [2]. La présence de glycosides de flavones et de flavonols dans les feuilles de 21 espèces de *Cucumis* a été signalée par Brown *et al.* [3]; ces auteurs ont séparé sans les identifier les flavonoïdes par chromatographie bidimensionnelle sur papier. Nous avons ici étudié la structure des C-glycosylflavones hydrolysables isolées des feuilles du Melon.§

RESULTATS ET DISCUSSION

Les flavonosides ont été identifiés par référence à la saponarine (Sp = O-glucosyl-7-isovitexine), à la lutonarine (Lt = O-glucosyl-7-iso-orienteine), ainsi qu'à leurs produits d'hydrolyse, l'isovitexine (IV = C-glucosyl-6-apigénine), la vitexine (Vt = C-glucosyl-8-apigénine), l'iso-orienteine (Io = C-glucosyl-6-lutéoline) et l'orientine (Or = C-glucosyl-8-lutéoline). Ces composés de référence ont été isolés à partir de feuilles de Saponaire (*Saponaria officinalis*) et d'Orge (*Hordeum vulgare*) et identifiés d'après Seikel [4,5].

Les flavonosides des feuilles de Melon ont été isolés à partir des extraits méthanoliques concentrés des poudres de feuilles. On a obtenu, par chromatographie sur papier de ces extraits dans BAW, deux bandes qui présentent les réactions colorées typiques de flavonoïdes (jaune très pâle sous lumière visible, brun sous UV proche, couleur et fluorescence jaunes en présence de NH₃ et de AlCl₃). Ces deux bandes peuvent être distinguées à l'aide du réactif de Benedict [6], l'une présente une réaction de type apigénine, bande "A" (*R_f* 0,55), l'autre de type lutéoline, bande "L" (*R_f* 0,50). Les extraits méthanoliques "A" et "L" de ces bandes ont été ensuite

chromatographiés sur couche de cellulose dans AcOH 15%, et résolus chacun en deux taches par migrations répétées, la bande "A" en deux bandes A et a, la bande "L" en L et l. Les quatre composés élusés sont chromatographiquement purs, nous les avons identifiés par leur *R_f* (Tableau 1) et leurs réactions colorées.

Les mélosides A et L présentent après révélation sur couche mince par AlCl₃, NH₃, NO₃Ag ammoniacal ou réactif de Benedict d'après [6] les réactions colorées caractéristiques de flavones du type apigénine (méloside A) et du type lutéoline (méloside L). Ce résultat est bien confirmé après révélation par le réactif de Neu et exposition sous UV proche (360 nm, 400 μW. cm⁻², 1 hr). De façon très caractéristique les dérivés de type apigénine (méloside A, Sp) virent à une couleur rouge à rouge brun alors que les dérivés de type lutéoline (méloside L, Lt) restent jaunes; à la lumière du jour (UV solaire) la réaction est moins reproductible [7]. Contrairement aux réactions de A et L les réactions colorées des mélosides a et l ne sont pas aussi caractéristiques bien qu'elles soient de type flavone.

Tableau 1. Migration chromatographique comparée des mélosides des composés de référence résultats en *R_f* (× 100)

Composés§	Solvant* et Support†									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Mélosides	Pa	C	C	C	C	Py	Py	Si	Pa	
A	55	78	54	46	87	71	75	75	34	67
a	55	62	34	50	80	72	66	57	38	50
L	50	71	47	36	80	59	69	68	27	67
l	50	56	27	40	80	61	61	54	32	41
Référence										
Sp	47	65	44	28	84	81	81	62	26	45
Lt	39	49	31	12	76	73	73	44	16	30

* Solvants: 1 = nBuOH-HOAc-H₂O (100:27:73); 2 = HOAc-H₂O (15:85); 3 = HOAc-H₂O (5:95); 4 = EtOAc-HOAc-H₂O (9:2:2); 5 = HOAc-HCl-H₂O (60:6:30); 6 = EtOAc-HCO₂H-H₂O (10:2:3); 7 = MeOH-HOAc-H₂O (90:5:5); 8 = CHCl₃-MeOH-MeCOEt (30:50:10); 9 = MeCOEt-EtOAc-HOAc-H₂O (50:30:14:10).

† Supports: Pa = papier Whatman 3 MM, C = Cellulose, Py = Polyamide, Si = Silica gel.

§ Voir texte.

Nous les avons nommés mélosides **A**, **L**, **a**, **I** [7]. Les spectres UV des quatre mélosides sont du type flavone [8]. En admettant que les quatre mélosides aient le même coefficient d'absorption ϵ , on trouve que les proportions de mélosides **A** et **L** sont en moyenne voisines de 30-40%, alors que celles de **a** et **I** sont de l'ordre de 10%. La teneur totale des feuilles (calculée sur la base de $\log \epsilon = 4.3$) est de l'ordre de 5 mg de flavonosides pour 100 mg de feuilles sèches; cette teneur ne varie pas de façon sensible en fonction des conditions de culture. Le spectre du méloside **A** (λ_{M} 271, 331 nm) est très proche de celui de l'apigénine. Le spectre du méloside **L** (λ_{M} 257, 270, 346 nm) est très voisin de celui de la lutéoline. Les réactions caractéristiques [7,8] pour reconnaître les hydroxyles présents sur les noyaux flavone permettent de conclure que tous les hydroxyles présents sur les noyaux flavone des mélosides **A** et **L** sont libres.

Les spectres UV des mélosides **a** (λ_{M} 272, 323 nm) et **I** (λ_{M} 258, 270 i, 335 nm) diffèrent de ceux des mélosides **A** et **L** par un accroissement de l'absorption au-dessous de 260 nm et un déplacement de la bande I d'une dizaine de nm vers les courtes longueurs d'onde, suggérant la superposition d'un chromophore de type cinnamique. L'identification spectroscopique des mélosides **a** et **I** n'étant pas de ce fait possible par comparaison avec les mélosides **A** et **L**, nous avons caractérisé les quatre mélosides par hydrolyse ménagée. Nous avons tout d'abord comparé les produits d'hydrolyse des mélosides **A** et **L** avec ceux de **Sp** et de **Lt**. L'étude cinétique d'hydrolyse acide (HCl) est faite en milieu hydro-alcoolique [9], les produits sont identifiés sur couche de cellulose (solvant 2, Tableau 1). On constate que: (a) l'hydrolyse des mélosides est complète après 30 minutes; celle de **Sp** et **Lt** est beaucoup plus lente; (b) le premier produit d'hydrolyse est pour **A**: l'isovitexine (R_f 0,46) et pour **L**: l'iso-orientine (R_f 0,33); il en est de même pour **Sp** et **Lt**; (c) après 1 heure apparaît la vitexine (R_f 0,24) comme produit d'hydrolyse de **A** et de **Sp**; de même l'orientine (R_f 0,14) est obtenue à partir de **L** et de **Lt** et (d) le glucose est le seul sucre libéré dans ces conditions tant à partir de **A** et **L** que de **Sp** et **Lt**.

Les produits d'hydrolyse (**Io**, **IV**, **Vt**, **Or**) ont été identifiés sur couche mince dans plusieurs solvants [7] d'après Wagner *et al.* [10]. L'isovitexine et la vitexine, préparées par hydrolyse de **A**, sont interconverties par transposition de Wessely-Moser dans les conditions de l'hydrolyse acide. Sur couche de silicagel avec le solvant APEM borate [11], les produits d'hydrolyse de **A** et de **L** sont bien identiques à ceux de **Sp** et **Lt** respectivement. Enfin, l'hydrolyse par l'hemicellulase du méloside **A** libère la seule isovitexine; à partir de **L** on obtient la seule iso-orientine et dans les deux cas du glucose. Tous ces résultats conduisent à proposer les structures suivantes: méloside **A** = 6-C-diglucosyl-apigénine; et méloside **L** = 6-C-diglucosyl-lutéoline.

Les spectres IR des mélosides permettent de confirmer ces conclusions. On a observé dans le spectre des mélosides **A** et **a**, comme dans celui de la saponarine et de l'apigénine la présence d'un "pic fort" au voisinage de 840 cm^{-1} qui est caractéristique des flavone-4'-hydroxyées. Au contraire, dans les spectres des mélosides **L** et **I**, et à un degré moindre dans celui de **a**, on a observé plusieurs "pics faibles" entre 800 et 850 cm^{-1} qui existent aussi dans les spectres de **Lt** et de la lutéoline: ils sont caractéristiques des flavone-3',4'-dihydroxyées [12].

Enfin, les structures proposées pour les mélosides **A**

et **L** ont été démontrées par spectrométrie de masse après perméthylation. Les pics moléculaires du PM méloside **A** (734) et du PM méloside **L** (764) correspondent bien aux formules $C_{37}O_{15}H_{50}$ et $C_{38}O_{16}H_{52}$. De plus leur mode de fragmentation après perméthylation paraît confirmer leur structure de C-diholosyl-flavones.

Les spectres de masse des dérivés perméthylés [13,14] des mélosides **A** et **L** ont été comparés [15] à ceux d'un certain nombre de PM *O*-glycosyl C-glycosylflavones: (a) à des C-glycosyl-6 flavones *O*-glycosylées sur un hydroxyle phénolique de l'aglycone telles que la PM saponarine, la PM *O*-glucosyl-4' isovitexine [16] et la PM *O*-glucosyl-3' iso-orientine [17]; (b) à des C-glycosyl-8 flavones *O*-glycosylées sur un hydroxyle du sucre lié au carbone telles que la PM *O*-xylosyl-2' vitexine [18] ou la PM *C*-néohespéridosyl-8 acacétine (margariten) [19]; (c) à des C-glycosyl-6 flavones également *O*-glycosylées sur un hydroxyle du sucre telles que la PM *C*-néohespéridosyl-6 acacétine (isomargariten) synthétique [20] et naturelle [19] et la PM *O*-rhamnosyl-X" C-xylosyl-6 lutéoline [21]. Ces trois catégories de composés sont nettement différenciées en spectrométrie de masse, et les PM mélosides **A** et **L** présentent le schéma de fragmentation typique de la troisième (Fig. 1). Le spectre de masse de ce type de composés se caractérise surtout par l'existence d'une double scission de la liaison osidique, de part et d'autre de l'oxygène anomérique. Ainsi, les PM mélosides **A** et **L** montrent respectivement un ion moléculaire (*m/e* 734) et (*m/e* 764) correspondant aux *O*-hexosyl C-hexosyl apigénine et lutéoline qui, par transition métastable, perd un radical PM hexosyle pour donner l'ion SO (*m/e* 515) et (*m/e* 545). Le pic de base est l'ion δ (*m/e* 499) et (*m/e* 529) provenant de l'élimination du radical PM hexosyle avec l'oxygène anomérique; cet ion est absent ou faible dans les spectres des composés de

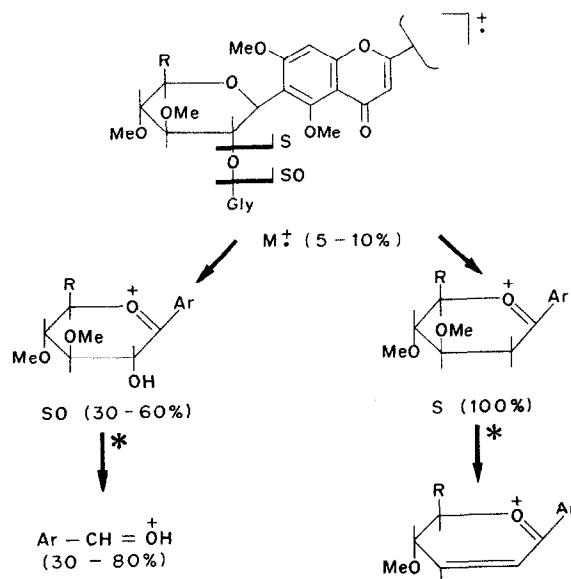


Fig. 1. Fragmentation en spectrométrie de masse des perméthyl C-glycosyl-6 flavones *O*-glycosylées sur un OH du sucre. PM Méloside **A**: R = CH_2OMe , Ar = PM apigénine, Gly = PM glucosyle; PM Méloside **L**: R = CH_2OMe , Ar = PM lutéoline, Gly = PM glucosyle; PM C-néohespéridosyl-6 acacétine: R = CH_2OMe , Ar = PM apigénine, Gly = PM rhamnosyle; PM *O*-rhamnosyl-X" C-xylosyl-6 lutéoline, R = H, Ar = PM lutéoline, Gly = PM rhamnosyle.

première et deuxième catégories. A partir de l'ion SO, une autre transition métastable conduit au pic Ar-CH = OH (*m/e* 341) et (*m/e* 371) (Ar = radical PM apigénine et lutéoline) par élimination partielle (-174) du reste C-hexosyle.

Du fait de leur identité de fragmentation avec la PM C-néohespéridosyl-6 acacétine (*O*-rhamnosyl (1 → 2) C-glucosyl-6 acacétine) il est tentant de supposer que la liaison osidique des PM méllosides est également de type 1 → 2. Cependant, l'absence d'exemples de composés possédant d'autres types de liaison ne nous a pas permis de tester la spécificité de la méthode à cet égard; il est préférable pour l'instant d'attribuer aux méllosides A et L les structures respectives de *O*-glucosyl-X"-C-glucosyl-6 apigénine et lutéoline.

Contrairement aux méllosides A et L, les méllosides I et a sont hydrolysés en milieu alcalin avec libération d'acide *trans*-caféïque. Outre l'acide caféïque, l'hydrolyse alcaline de I libère uniquement L tandis que celle de a donne à la fois A et L.

Les méllosides a et I ne sont pas hydrolysés par l'hémicellulase, contrairement à A et L qui libèrent respectivement l'isovitexine et l'iso-orientine, mais les quatre méllosides sont hydrolysés par la Rapidase (mélange d'hémicellulases et d'estérasées fongiques). On obtient à partir de A l'isovitexine, à partir de L l'iso-orientine, à partir de I l'iso-orientine et l'acide caféïque, à partir de a, l'isovitexine, l'iso-orientine et l'acide caféïque. Dans tous les cas, le seul sucre libéré est le glucose.

Ces résultats conduisent à considérer a et I comme des esters caféïques de A et L respectivement, a étant contaminé par I. Cette hypothèse a été confirmée par spectrométrie de masse des dérivés perméthylés de a et de I. En effet, le spectre de masse de ce dernier présente un pic moléculaire (M^+ 940) très faible, mais bien individualisé, et le reste du spectre est le même que celui du PM mélloside L. Le même phénomène a été précédemment observé avec la p-coumaryl-2" vitexine [22]. La perméthylation de a a conduit à deux dérivés perméthylés, l'un donnant le spectre de masse du PM mélloside A, l'autre celui du PM mélloside L.

Ainsi la présence de C-glycosylflavones est établie chez les Cucurbitacées de l'espèce *Cucumis melo*, variété Doublon. La similitude entre les propriétés des méllosides et celles des flavonoïdes décrits par Brown *et al.* [3] est suffisamment étroite pour permettre l'identification de 4 des 7 composés observés chez une autre variété de *Cucumis melo*. La correspondance entre les méllosides et les nombres attribués par Brown *et al.* est la suivante: A [10]-a [12]-L [14]-I [19]. Les autres taches observées par Brown semblent correspondre à des produits d'hydrolyse des méllosides ainsi qu'à des flavonoïdes présents en quantités différentes dans les deux variétés étudiées; ces hypothèses seront précisées ultérieurement.

PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Matériel. Les plantes, cultivées (Melon, Orge) ou spontanées (Saponaire), ont été récoltées au début de l'été dans la région parisienne. Les feuilles congelées puis broyées ont été ensuite lyophilisées.

Extraction préparative. La poudre de feuilles sèches (10 g) est extraite au Soxhlet par pentane-MeOH (98 : 2) (élimination des pigments liposolubles: 12 hr) puis par MeOH renouvelé toutes les 2 hr. Extrait MeOH concentré à 20 ml.

Séparation préparative des méllosides. L'extrait méthanolique est chromatographié sur papier Whatman 3 MM, solvant n°1

(Tab. 1), charge: 15 μ l/cm d'extrait MeOH concentré. Les deux bandes "A" et "L" sont éluées par MeOH et reprises en 5 ml. Chaque extrait "A" et "L" est ensuite chargé (10 μ l/cm) sur couche de cellulose MN 300 (ép.: 0,75 mm). Deux migrations successives dans la même direction avec le solvant 2 (Tab. 1) séparent les méllosides A, a et L, I. Les méllosides élués par MeOH forment au froid (+4°C env) un dépôt microcristallin.

Chromatographies analytiques. Silicagel G et kieselgel G étalés en couche après dispersion dans du MeOH (45 g/20 ml). Couches de polyamide contenant 20% de cellulose MN 300 préparées dans le MeOH (25 g/80 ml). La cellulose est imprégnée, avant étalement, par dispersion en solution H₂O de molybdate de Na (0,1 M) ou de borate de sodium (à saturation).

UV. réactifs et protocole d'après [12] sauf pour les réactions avec AlCl₃ [7]. La hauteur relative des pics, corrigée de la dilution par les réactifs est indiquée entre parenthèse; position des pics et des épaulements (ép) en nm.

Mélloside A. λ (MeOH): 271 (118), 331 (100); (+ NaOCH₃): 282 (108), 325 (80), 397 (103); (+ AlCl₃): 280 (98), 303 (86), 346 (93), 381 (66) (+ AlCl₃ + HCl): 280 (98), 303 (86), 346 (93), 381 (66); (+ NaOMe): 279 (146), 301 (ép), 388 (89); (+ NaO-Me + H₃BO₃): 272 (112), 300 (ép), 347 (82).

Mélloside L. λ (MeOH): 257 (102), 270 (102), 346 (100); (+ NaOMe): 277 (124), 335 (ép), 409 (103); (+ AlCl₃): 277 (125), 335 (ép), 418 (103) (+ AlCl₃ + HCl): 278 (88), 296 (60), 363 (73), 387 (72); (+ NaOMe): 275 (118), 397 (78); (+ NaO-Me + H₃BO₃): 267 (121), 376 (82), 419 (61).

IR. en les disc du KBr.

SM. perméthylation selon [14] puis purification par CCM dans CHCl₃: AcOEt: Me₂CO (5:1:4). Appareil: spectrographe de masse AEI, MS 902; T° 150–200°C; m/e (%).

Mélloside A. M⁺: 734 (4), 586 (5), 573 (3), 559 (5), 557 (3), 545 (6, 5), 529 (6), 516 (11), SO: 515 (37), 513 (8), 501 (28), 500 (29), S: 499 (100), 485 (2), S-32: 467(6), 455 (5), 453 (3), 435 (3), 425 (2), 413 (3), 411 (5), 395 (10), 383 (4), 381 (5), 355 (10), Ar-CH=OH: 341 (44), 325 (13), 323 (7), 313 (4), 312 (5), 311 (7).

Mélloside L. M⁺: 764 (5), 589 (4), 574 (4), 559 (4), 546 (12), SO: 545 (38), 543 (5), 531 (7), 530 (30), S: 529 (100), 515 (3), S-32: 497 (6), 483 (2), 465 (2), 455 (2), 451 (2), 437 (2), 428 (4), 411 (4), 399 (2), 385 (8), Ar-CH=OH: 371 (28), 355 (8), 353 (4), 343 (3), 342 (4), 341 (4), 339 (21).

Mélloside I. M⁺: 940 (1), 809 (2), 764 (3), SO: 545 (32), S: 529 (100), 371 (34).

Mélloside a. M⁺: 910 (absent), 734 (6), SO: 515 (36), S: 499 (100), 341 (36).

Hydrolyses. solutions de méllosides, soit dans le mélange EtOH-H₂O-HCl (1:1:0,4) à 100°, soit dans NaOH N sous N₂ à 0°C, soit dans du tampon HOAc-NaOAc (0,1 M, pH = 4,6) en présence d'hemicellulase (Sigma) ou de "Rapidase" (Société La Rapidase).

Identification des oses. par CCM de cellulose [23], de polyamide (24) et de kieselguhr tamponné (25); les hydrolysats sont directement déposés sur les plaques sauf pour l'hydrolyse acide après laquelle HCl est éliminé par extraction à la di-N-octylméthylamine dans le chloroforme [26].

Remerciements—Les auteurs remercient la Société "La Rapidase"—Seclin 59113, pour le don de plusieurs échantillons d'enzymes fait à l'un d'entre eux (B.M.).

REFERENCES

1. Monties, B. (1969) *Bull. Soc. Franc. Physiol. Vég.* **15**, 29.
2. Monties, B. (1972) In *Prog. Photosynth. Research-Proc. II Int. Cong. Photosynthesis-Stresa* (1971), Vol. II, 1681 (Forti, G. Editeur, Junk (Hollande).
3. Brown, G. B., Deakin, J. R. et Wood, M. B. (1969) *J. Am. Soc. Hort. Sci.* **94**, 231.
4. Seikel, M. K. et Geissman, I. A. (1957) *Arch. Biochem. Biophys.* **71**, 17.

5. Seikel M. K. et Bushnell A. J. (1959) *J. Org. Chem.* **24**, 1995.
6. Reznick, H. et Egger, K. (1961) *Z. Anal. Chem.* **183**, 196.
7. Monties, B. (1975) Thèse Doctorat ès-Sciences, Université Paris-Sud, Centre d'Orsay, n° 1410. INRA Editeur.
8. Mabry, T. J., Markham, K. R. et Thomas, M. B. (1970) *The Systematic Identification of Flavonoids*, Springer, Berlin.
9. Harborne, J. B. (1965) *Phytochemistry* **4**, 107.
10. Wagner, H., Hörhammer, L. et Kirazy, I. C. (1970) *Phytochemistry* **9**, 987.
11. Chopin, J., Bouillant, M. L. et Biol, M. C. (1971) *C.R. Acad. Sci.* **273 C**, 1262.
12. Wagner, H. (1964) In *Methods in Polyphenol Chemistry* Chap. 2, p. 37 (Pridham, J. B. Editeur), Pergamon Press, Oxford.
13. Bouillant, M. L., Favre-Bonvin, J. et Chopin, J. (1974) *C.R. Acad. Sci. Ser. D* **279**, 295.
14. Bouillant, M. L., Favre-Bonvin, J. et Chopin, J. (1975) *Phytochemistry* **14**, 2267.
15. Bouillant, M. L., Favre-Bonvin, J. et Chopin, J. (1975) Assemblée Annuelle du Groupe Polyphénols, Gargnano sul Garda, Italie.
16. Hostettmann, K., Bellmann, G., Tabacchi, R. et Jacot-Guillarmod, A. (1973) *Helv. Chim. Acta* **56**, 3050.
17. Hostettmann, K. et Jacot-Guillarmod, A. (1974) *Helv. Chim. Acta* **57**, 204.
18. Horowitz, R. M. et Gentili, B. (1966) *Chem. Ind., London*, 625; Wagner, H., Rosprim, L. et Galle, K. (1975) *Phytochemistry* **14**, 1089.
19. Horowitz, R. M., Gentili, B. et Gaffield, W. (1973) *Am. Chem. Soc. meeting*, Los-Angeles and Pers. Comm.
20. Besset, A., Bouillant, M. L. et Chopin, J., résultats non publiés.
21. Mabry, T. J., Yoshioka, H., Sutherland, S., Woodland, S., Rahman, W., Ilyas, M., Usmani, J. N., Hameed, N., Chopin, J. et Bouillant, M. L. (1971) *Phytochemistry* **10**, 677.
22. Sood, A. R., Boutard, B., Chadenson, M., Chopin, J. et Lebreton, P. (1976) *Phytochemistry* **15**, 351.
23. Schweiger, A. (1962) *J. Chromatog.* **9**, 374.
24. Marais, J. P. (1967) *J. Chromatog.* **27**, 321.
25. Talukder, M. (1971) *J. Chromatog.* **57**, 391.
26. Smith, E. L. et Page, J. E. (1948) *J. Sci. Chem. Ind.* **67**, 48.