

SUR UN HÉTÉROSIDE DE *Citrus trifoliata* L.

par **Ch. SANNIÉ**

PROFESSEUR AU MUSÉUM D'HISTOIRE NATURELLE

et **A. SOSA**

CHARGÉ DE RECHERCHES AU C. N. R. S. (1)

Les couleurs si vives des fleurs et des fruits sont produites par des substances chimiques bien connues actuellement, les anthocyanes et les flavones. On les trouve dans les plantes sous forme de glucosides, les sucres étant liés à des noyaux complexes dérivés du benzopyrane ; les progrès accomplis depuis 1920 ont permis d'élucider leur constitution et d'en reproduire un grand nombre par synthèse.

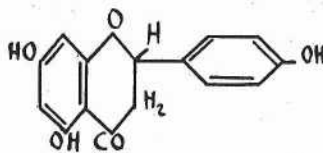
Depuis une dizaine d'années, certaines de ces substances ont pris une grande importance lorsqu'on eut découvert les divers aspects de leur activité physiologique. Ainsi, les remarquables travaux de R. KUHN et de ses collaborateurs ont montré que certaines flavones, comme la quercétine et l'isorhamnétine, agissaient à doses infimes sur les gamètes de l'algue *Chlamydomonas eugametas* pour déterminer le sexe de la cellule. Les recherches de SZENT-GYORGYI ont mis en évidence le rôle de certains glucosides flavoniques dans la perméabilité des vaisseaux capillaires et la résistance aux hémorragies. SZENT-GYORGYI a donné le nom de vitamine P à ces substances, qu'il avait d'abord isolées des citrons ; de nombreux travaux ultérieurs ont montré que l'activité vitamini-

que P était encore plus nette avec divers autres flavonosides, comme le rutoside.

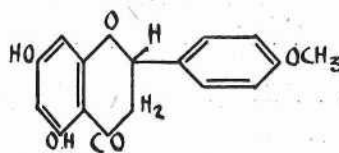
Ayant eu l'occasion d'étudier les fruits de *Citrus trifoliata*, arbuste exotique bien acclimaté en France, nous avons pu en isoler un dérivé flavonique nouveau ; il était naturel d'en poursuivre l'étude et de voir s'il était doué d'un pouvoir vitaminique P. C'est lui qui fait l'objet de cet article.

**

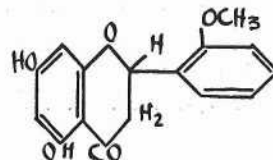
Le genre *Citrus* renferme, le plus souvent, des hétérosides de constitution voisine et d'un caractère assez particulier, en ce que leurs aglycones sont constitués par des flavanones. On a ainsi isolé, de *Citrus decumana* L. et *Citrus paradisi* Macf., le naringénol dont l'aglycone est le naringéol (I). L'isosakuranoside, dont l'aglycone est l'isosakuranéol (II) ou éther 4'-méthylique du naringéol, a été extrait des feuilles et des fleurs de *Citrus trifoliata* L. L'aglycone du citronoside de la peau de *Citrus limon* Burm. est le citronéol (III), celui de l'hespéroside du fruit de divers *Citrus* est l'hespéréol (IV). Le ponkanéol (V) a été obtenu de la peau des fruits verts de *Citrus poeensis* Hort., etc...



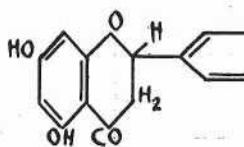
I. — Naringéol.



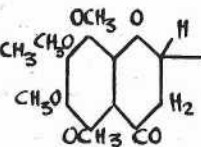
II. — Isosakuranéol.



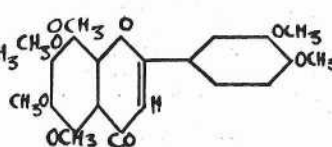
III. — Citronéol.



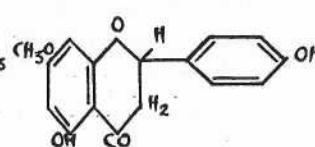
IV. — Hespéréol.



V. — Ponkanéol.



VI. — Nobiléol.



VII. — Sakuranéol.

(1) Mémoire présenté au VIIIe Congrès de Chimie Biologique à Paris le 8 Octobre 1948.

Il est intéressant de noter que le nobilétol (VI), flavone correspondant au ponkanétol, mais avec un méthoxy supplémentaire en 3', a été isolé de la peau séchée de *Citrus nobilis* Lowe. Par contre, le sakuranétol (VII), isomère 7-méthoxylé du citronétol et de l'isosakuranétol, existe dans divers *Prunus* (Rosacées), mais n'a pas été retrouvé jusqu'à maintenant dans le genre *Citrus*.

Au cours d'une étude sur les fruits de *Citrus trifoliata* L., nous avons isolé un glucoside nouveau, de formule $C_{25}H_{34}O_{14}$, fournissant à l'hydrolyse du glucose, du rhamnose et un aglycone $C_{16}H_{14}O_5$, que l'analyse nous a montré être un isomère de l'isosakuranétol et que nous avons appelé citrifoliol. Mais, tandis que l'isosakuranétol, obtenu antérieurement par SHINODA et SATO des feuilles et des fleurs de *Citrus trifoliata*, est inactif sur la lumière polarisée, le citrifoliol est lévogyre. Sa structure montre qu'il s'agit d'une flavanone contenant deux groupes phénoliques en 5 et 7 et un groupe méthoxylé en 4'. Le citrifoliol est ainsi un l-isosakuranétol et correspond, avec le matteucinol et le desméthoxymatteucinol, à une des très rares flavanones naturelles optiquement actives connues (1).

La structure flavanonique de ce dérivé est confirmée par la réaction rouge pourpre obtenue par Mg + HCl dans l'alcool, et surtout par le spectre d'absorption tout à fait caractéristique des hydroxy ou méthoxyflavanones.

La recherche des groupes méthoxy montre que le citrifoliol n'en renferme qu'un, et la fusion alcaline permet de le localiser en 4' sur le groupe phényle latéral. Comme l'on obtient en même temps du phloroglucinol et qu'il existe seulement 2 OH acétylables, la structure de l'aglycone est ainsi complètement élucidée.

Le perchlorure de fer donne une coloration violette avec le glucoside; ce dernier contient donc une fonction phénolique libre. Comme l'aglycone ne possède que deux OH phénoliques, le glucide ne peut se combiner qu'à un seul. L'acétylation totale conduit à un dérivé heptacétylé; le glucoside existe donc sous la forme d'un biose, formé par l'union d'une molécule

(1) Tout récemment, J. C. PEW (J. Amer. Chem. Soc., 1948, 70, 3031-34) a isolé du sapin de Douglas une nouvelle flavanone, la 3, 3', 4', 5, 7 pentahydroxyflavanone, optiquement active ($[\alpha]_D^{20} = +46^\circ$ dans acétone-eau 1/1). D'un hêtre des régions nordiques (*Nothofagus dombeyi*), il a isolé de même un 3 hydroxy-naringénol dextrogyre.

de rhamnose et d'une molécule de glucose. La méthylation, aussi bien par le diazométhane que par CH_3I en milieu alcalin, bloque l'oxydhyde libre; ainsi le glucide est probablement fixé en 5, comme dans le sakuranoside. Nous n'avons pu déterminer avec certitude la nature du biose; on peut penser qu'il s'agit du rutinose (β -rhamnosido-6-glucose).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

EXTRACTION

Le matériel utilisé a été récolté dans la région parisienne et à Angers.

Chaque partie du fruit (100 grammes) (pulpe, albedo et flavedo) a été traitée séparément 2 fois par 1/2 litre d'alcool à 90° bouillant. L'extrait est concentré sous vide (50°) jusqu'à élimination de l'alcool et le résidu aqueux (20cc) encore tiède, est agité 2 fois avec de l'éther éthylique qui enlève un bon nombre d'impuretés.

Le citrifolioside se dépose abondamment dans la phase aqueuse, déjà généralement au bout de 24 heures si l'on gratte souvent les parois des récipients. On le sépare sur büchner quelques jours après, et les eaux-mères sont abandonnées à la glacière pendant assez longtemps: on récupère de la sorte 1/10^e environ du poids de glucoside déjà séparé.

Nous n'avons ainsi pour les fruits verts frais récoltés à Paris le 25 Juin 1944 et dont le poids moyen était de 2,6 grammes, les valeurs suivantes:

| | Pourcentage dans le fruit | Extrait éthéré | Glucoside brut (sec) |
|--------------|---------------------------|----------------|----------------------|
| Pulpe..... | 9,1 | 1,43 | 7,9 |
| Albedo..... | 54 | 0,58 | 4,4 |
| Flavedo..... | 36,8 | 6,53 | 0 |

Le glucoside se trouve donc exclusivement dans la pulpe et l'albedo et il n'y en a pas dans le flavedo, lequel est surtout riche en extrait éthéré.

Comme on le voit aussi sur le tableau suivant, le citrifolioside a tendance à se concentrer vers l'intérieur du fruit vert. Le pourcentage de glucoside isolé est aussi en rapport avec la saison et la maturité des fruits. Il est maximum lorsque le fruit vert ne dépasse pas le poids de 5 g (Juin-Juillet), c'est-à-dire lorsque les teneurs en pulpe et albedo du fruit sont de l'ordre de 50-55 et de 9-10 % respectivement.

| Pourcentage relatif de chaque partie du fruit | | | Maturité Poids d'un fruit (en gr.) | Récolte | Glucoside isolé % | | Extrait éthéré % | | |
|---|--------|-------|------------------------------------|-----------------|-------------------|-------|------------------|-------|---------|
| Flavedo | Albedo | Pulpe | | | Albedo | Pulpe | Albedo | Pulpe | Flavedo |
| 39,4 | 21,4 | 37,8 | 10,7 | 22 Octobre 1945 | 0,17 | 0,18 | 1,7 | 2,16 | 4,0 |
| 26 | 46 | 24,9 | 7,5 | 12 Octobre 1943 | 1,3 | 1,8 | — | — | — |
| 36,8 | 54 | 9,1 | 2,6 | 25 Juin 1944 | 4,4 | 7,9 | 0,58 | 1,43 | 6,5 |

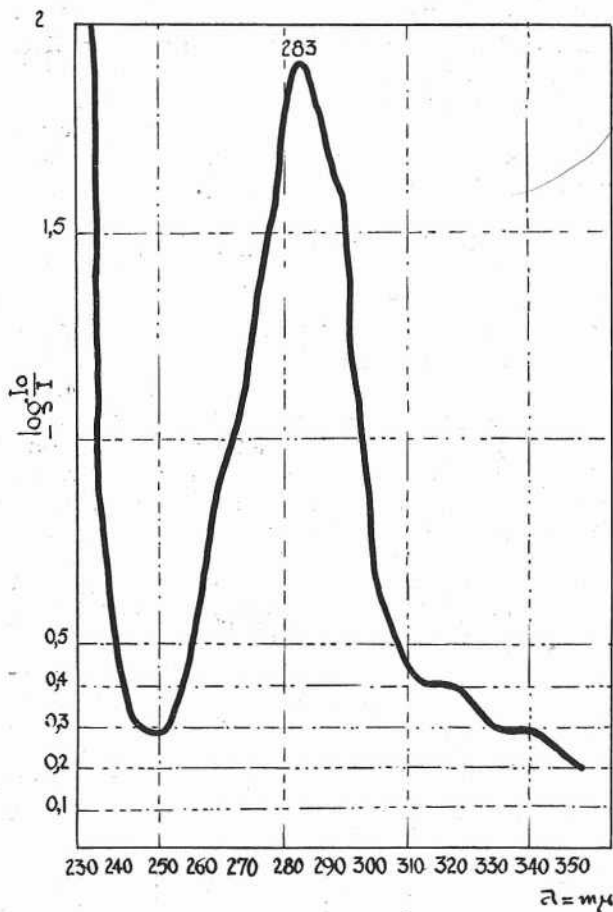


Fig. 1. — Courbe d'absorption dans l'ultra-violet du citrifolioside à 2 mg 6 pour 100 cm² d'alcool à 96°.

Par contre, lorsque le poids d'un fruit est supérieur à 10 g (pulpe 2,5 %, albedo 40 %) (Octobre-Novembre), le rendement en glucoside est généralement mauvais et devient nul lorsque le fruit est tout à fait mûr (poids moyen 15 g en général).

PURIFICATION DE L'HETEROSIDE

Le glucoside essoré est lavé avec un peu d'eau ; il est ensuite cristallisé dans H₂O et finalement dans l'alcool méthylique absolu jusqu'à constance du point de fusion et du pouvoir rotatoire. Le rendement en produit pur est de 1/3 environ du glucoside brut.

PROPRIÉTÉS

Dans l'eau le citrifolioside cristallise avec 15,9 % de solvant (= 6 mol. H₂O), qu'il perd dans le vide à chaud ; exposé à l'air, le produit anhydre reprend environ 2/5 de cette eau.

Purifié dans l'alcool méthylique, le glucoside se

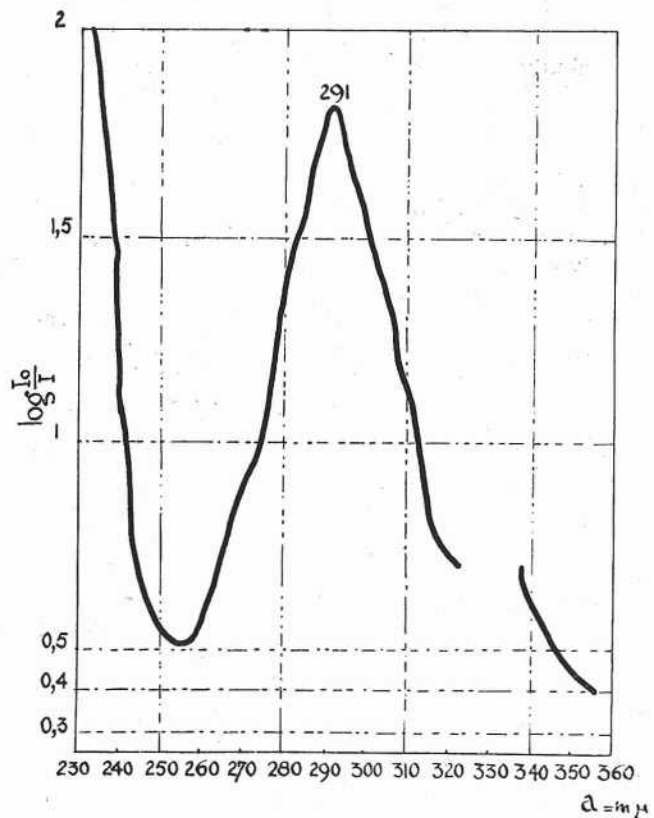


Fig. 1. — Courbe d'absorption dans l'ultra-violet du citrifolioside à 5 mg 75 pour 100 cm² d'alcool à 96°.

présente en belles aiguilles incolores qui retiennent une forte proportion (55 %) de CH₃OH dont les 9/10^e sont perdus par exposition à l'air.

Le citrifolioside est amer et ne réduit pas la liqueur de Fehling. Il fond au bloc Maquenne à 198° (fusion instantanée) ; dans le tube capillaire, il se ramollit à 165° puis fond vers 211° (corr.) (1) avec décomposition. Il est lévogyre et le pouvoir rotatoire du produit anhydre dans l'alcool éthylique à 50° (c = 1,6, l = 2) est le suivant :

$$[\alpha]_D^{18^\circ} = -90^\circ \quad (2) \quad [\alpha]_J^{18^\circ} = -91,5 \quad [\alpha]_V^{18^\circ} = -103^\circ$$

Dispersion rotatoire $\frac{\alpha_V}{\alpha_J} = 1,1$. L'indice de réduction après hydrolyse acide du citrifolioside est de 262.

(1) Tous les autres points de fusion ici indiqués ont été pris au bloc (fusion instantanée).

(2) Le $[\alpha]_D^{12}$ de deux autres flavanosides proches, naringoside et hespéroside, déterminé dans les mêmes conditions, est respectivement : -87,5° et -94°.

Solubilités. — A froid, facilement soluble dans l'acide acétique (1) la pyridine, les alcools faibles et les alcalis, moins dans l'eau, les alcools forts et l'acétone mais facilement à chaud.

Réactions de coloration. — Avec les acides concentrés : couleur rouge sang (SO_4H_2), jaune (ClH) ou jaune passant au bleu noir (NO_3H). Avec les bases : couleur jaune (NaOH) (1) et orange (NH_4OH). Avec les oxydants à chaud : orange puis trouble (ClO_4K) ; orangé ($\text{S}_2\text{O}_8\text{K}_2$), par refroidissement, laissant déposer une substance solide ocre jaune. Réactions phénoliques positives : Cl_3Fe (violet), Liebermann (rose violacé). Réaction de l' α -naphthol violet. Réactions de réduction dans l'alcool : rouge violacé par $\text{Mg} + \text{ClH}$ (2) ou par amalgame de sodium + ClH. Avec une solution aqueuse d'acide métaphosphorique, il se produit une gelée.

| Analyses | C % | H % | PM (3) | CH_3O % (4) | HO % (5) |
|---|----------------|--------------|--------|------------------------------------|----------------|
| Trouvé..... | 56,34 56,15 | 5,58 5,93 | 607 | 5,0 | 19,9 |
| Calculé pour $\text{C}_{25}\text{H}_{34}\text{O}_{14}$ | 56,56 | 5,76 | 594,5 | 5,2 (un CH_3O) | 20,2 (7 OH) |

Le dérivé formé lors du dosage des HO par acétylation pyridinée (1h à 100°) est bien l'*heptacétylcitrifolioside* : cristaux incolores, P.F. 134° ; (acétyle %, trouvé 34,3 ; calculé : pour $\text{C}_{42}\text{H}_{48}\text{O}_{21}$: 33,9).

Hydrolyse. — 1 g de citrifolioside est chauffé avec 100cc de SO_4H_2 à 6 % pendant 6 h. au bain-marie. Après refroidissement, on agite 3 fois à l'éther pour séparer l'aglycone, puis dans une partie de la solution aqueuse, on dose le pouvoir réducteur par la méthode de G. Bertrand ; voici les résultats :

| | R en glucose | Aglycone % | Après hydrolyse |
|---|-----------------|---------------|--|
| Trouvé | 56,3 | 50 | + $32^\circ,7$ |
| Calculé pour $\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_{14}$ | 57,9 | 48,1 | + $31^\circ,3$ pour glucose et rhamnose |

A partir de la solution aqueuse résiduelle, on a préparé deux osazones, l'une soluble dans l'acétone

(1) Cette propriété différencie le citrifolioside des sphérocristaux trouvés par Penzig dans la même plante (désignés sous le nom d'aegline) qui sont insolubles dans l'acide acétique à froid et ne donnent pas de coloration jaune par la soude.

(2) Cette réaction est donnée également par le citrifolioside et ses dérivés.

(3) La détermination du P. M. est réalisée dans le camphre par la microtechnique de Rast.

(4) Les groupes CH_3O ont été dosés suivant la microméthode volumétrique due à Viebock et Ercher.

(5) Le dosage des (OH) est fait par microacétylation pyridinée.

(rhamnosazone cristallisée en oursins, P.F. instantané 190° au bloc), l'autre insoluble (glucosazone cristallisée en balais, P.F. 230° au bloc).

Le citrifolioside est partiellement et très lentement dédoublé par l'émulsine et par la rhamnodiastase ; c'est ainsi qu'au bout de 2 mois à 30° , le taux d'hydrolyse n'est que de l'ordre de 1/5 du dédoublement obtenu par les acides : l'aglycone formé est identique à celui obtenu dans l'hydrolyse acide (citrifolioside).

CITRIFOLIOL

De l'extrait étheré, après hydrolyse acide, on obtient l'aglycone que l'on recristallise dans $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ à 70° . A l'état pur, il se présente en prismes presque incolores fondant à 190° (bloc inst.) ; il est lévogyre $[\alpha]_D^{20} = -19^\circ,7$ ($c = 1,6$; $l = 2$, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ abs.) et ne réduit pas la liqueur de Fehling. Il se dissout bien dans l'éther, les alcools forts, l'acétone et les alcalis ; presque insoluble dans H_2O . Les réactions au Cl_3Fe , à la soude et celles de réduction ($\text{Mg} + \text{ClH}$ ou amalgame de sodium + ClH) sont semblables à celles du glucoside. Coloration jaune avec SO_4H_2 (diffère du glucoside), violet bleu avec NO_3H concentré.

| Analyses | C % | H % | PM (3) | CH_3O (4) | OH % (5) |
|--|----------------|--------------|--------|-------------------------------------|----------------|
| Trouvé..... | 66,87 67,07 | 4,75 5,12 | 291 | 10,7 | 12,2 |
| Calculé pour $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_5$ | 67,13 | 4,93 | 286,2 | 10,8 (un CH_3O) | 11,8 (2 HO) |

Dérivés. — Le diacétylcitrifolioside $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{O}_7$ se forme par acétylation pyridinée à chaud (1h à 100°) ou mieux encore à froid (24h) : aiguilles, P.F. 119° (bloc) ; analyse % : trouvé : C = 64,92, H = 5,0, acétyle : 25 ; calculé : C = 64,86, H = 4,9, acétyle : 23,3 ; avec $\text{Mg} + \text{ClH}$ couleur rouge, pas de coloration au Cl_3Fe .

Fusion alcaline. — 0g,2 de citrifolioside ont été chauffés pendant 5 minutes à 230° - 250° avec 3 g de potasse caustique et 1,5cc d'eau. Après dissolution du résidu dans l'eau chaude et filtration, on acidifie le filtrat avec ClH au tiers. On extrait à l'éther et la solution étherée est épuisée avec une solution aqueuse de CO_3HNa .

De la solution étherée, on obtient 0,10 g d'une substance phénolique A, alors que de la solution bicarbonatée, on isole par acidification et reprise par l'éther un acide B = 0,17 g.

Le corps phénolique A, après purification par sublimation (dans le vide) se présente en cristaux incolores fondant à 220° . Il donne les réactions de coloration du phloroglucinol (Cl_3Fe , arabinose + ClH conc., vanilline + ClH, lignine) et, mélangé avec du

phloroglucinol, ne présente aucune dépression dans le point de fusion. Le corps phénolique est donc le phloroglucinol.

L'acide B a été recristallisé dans l'alcool très dilué et se présente en aiguilles prismatiques incolores fondant à 172°. Cette substance s'est révélée identique à l'acide *p*-méthoxycinnamique préparé par oxydation hypobromique de l'anisal-acétone suivant le protocole décrit dans la thèse de l'un de nous pour l'obtention de l'acide *p*-méthoxy-phényl-propionique.

Analyses (%) :

Trouvé : C = 67,0, H = 5,57, CH₃O = 16,7 ;

Calculé : C = 67,4, H = 5,65, CH₃O = 17,4.

Spectres d'absorption. — (1). (Voir figure ci-contre).

Le spectre du glucoside, obtenu dans l'alcool à 96° à une concentration de 5 mg, 75 p. 100, est pratiquement superposable à celui de son aglycone (fig. 1),

obtenu en solution alcoolique à 2 mg, 6 p. 100. Les courbes sont tout à fait caractéristiques des hydroxy ou méthoxyflavanones.

On y retrouve une forte absorption à 2300 Å, un minimum à 2500 Å, un maximum à 2850-2900 Å, et une légère inflexion vers 3240 Å. SKARZYNSKI indique, pour la 5-7-4'-triméthoxyflavanone des maxima à 2280 et à 2830, avec une inflexion vers 3200.

On sait toute l'importance que l'on a attribué aux glucosides flavoniques comme vitamine P. Nous avons donc recherché si le citrifolioside était doué d'une telle activité. Des essais effectués au laboratoire de M. le Professeur PARROT, que nous tenons à remercier ici, ont été entièrement négatifs.

Laboratoire de Chimie
du Museum d'Histoire Naturelle,
63, rue de Buffon, Paris.

BIBLIOGRAPHIE

- HATTORI, S. — Jour. Pharm. Soc. Japan, 1928, **48**, 561 et 1064-70.
Acta Phytochim (Japan), 1929, **4**, 219-226.
- PENZIG, O. — Atti Soc. Veneto-Trentina di Sc. Nat., 1892, **8**, fasc. I, Padova.
- RAST, K. — Ber. dtsh. chem. Ges., 1922, **55**, 1051 et 3727.
- SHINODA, J. et SATO, S. — Jour. Pharmac. Soc. Japan, 1928, **48**, 791-801. *Ibid.* p. 1178-9.
- SKARZYNSKI, B. — Bioch. Zeits., 1939, **301**, 150-169.
- SOSA, A. — Thèse Doct. Sc. Phys. (éd. Masson, Paris, 1939).
- SOSA, A. et SANNIÉ, Ch. — Bull. Soc. Chim. Biol., 1944, **26**, 457-61.
C. R. Ac. Sc., 1946, **223**, 45-7.
- VIEBOCK, F. et BRECHER, C. — Ber. dtsh. chem. Ges., 1930, **63**, 3207.

Nous remercions vivement M. le Professeur MEUNIER et M. JOUANETEAU qui ont bien voulu se charger de la prise des spectres et de l'établissement des courbes, et M. le Professeur MIGNONAC qui a accueilli l'un de nous dans son laboratoire.