

IDENTIFICATION ET CARACTÉRISATION
DE L'ANTHOCYANE ACYLÉE PRÉSENTE DANS LES FEUILLES
DE *PERILLA NANKINENSIS* (LOUR.) DECNE

par J. JADOT et P. NIEBES

SUMMARY

An acylated anthocyanin has been isolated from *Perilla nankinensis* (LOUR.) DECNE, using mild conditions of extraction and purification.

This red pigment is shown to have the structure of a salt of the cyanidine-3-(6-p. coumaroyl- β -D-glucoside) 5- β -D-glucoside.

Perilla nankinensis (LOUR.) DECNE est une plante de la famille des Labiées se présentant sous forme de buissons. Les feuilles sont fortement colorées en rouge sombre ; elles contiennent une anthocyane dont l'étude biogénétique est en cours dans les laboratoires de l'Institut de Botanique de l'Université de Liège [1].

Isolement de l'anthocyane.

Après différents essais classiques d'extraction et de purification, la chromatographie sur colonne de papier enroulé et pressurisé, à l'aide d'un mélange à égal volume de *n*.butanol et de HCl2N, a permis l'isolement d'une anthocyane dont le spectre U V dans le méthanol contenant 0,1 % de HCl possède la bande d'absorption caractéristique des anthocyanes acylées située à 270 m μ . En conséquence, la purification du pigment rouge a dû se dérouler dans des milieux faiblement acides afin d'éviter l'hydrolyse de la fonction ester.

Les feuilles de *Perilla* lyophilisées et pulvérisées ont été débarrassées des pigments chlorophylliens par plusieurs extractions au chloroforme. Les acides aromatiques libres ont été enlevés par extraction à l'éther sulfurique et une partie des flavones a été éliminée par épuisement de la poudre à l'acétate d'éthyle. Le résidu a été ensuite chauffé à 30° C sous vide, pour le débarrasser du solvant et ensuite extrait trois fois avec un mélange de méthanol, d'eau et d'acide formique (parties en volume 60/40/7).

Les solutions résultantes réunies et filtrées sont fortement colorées en rouge sombre. Elles sont concentrées sous vide à l'évaporateur rotatif à une température inférieure à 30° C. Le liquide rouge ainsi obtenu, additionné d'un volume double d'acétone pure distillée sur sulfate ferreux, est placé au frigidaire pendant 16 heures. Une grande partie des sels et des substances pectiques, extraits en même temps que le colorant, se déposent et sont filtrés. Le filtrat est évaporé sous vide à basse température pour chasser l'acétone. L'analyse chromatographique de la solution sur couche mince de gel de silice « Merck » G (solvant : acétate d'éthyle - acide formique - eau, 70/15/15 en volume) montre qu'elle contient encore, à côté de l'anthocyane,

Manuscrit reçu le 19 décembre 1968.

une proportion importante de flavones et des traces d'acides phénoliques (fig. 1, colonne 1).

Purification de l'anthocyane.

L'extrait concentré (100 cm³) est purifié par chromatographie sur une colonne de polyamide « Woelm » (250 gr.) de 75 cms de haut et de 5 cms de diamètre. L'élution se fait avec un mélange de méthanol, d'eau et d'acide formique (proportions en volume 60/40/5) passant à la vitesse de 30 ml/heure. L'éluat est recueilli à l'aide d'un collecteur automatique (fractions de 10 cm³). Les premières fractions colorées contiennent un triglycoside quand la plante est adulte comme le révèle la chromatographie en couche mince (figure 1, colonne 2). Le triglycoside est absent quand il s'agit de l'extrait d'une plante jeune. Les fractions suivantes contiennent l'anthocyane presque pure en concentration élevée (figure 1, colonne 3), puis les fractions moins colorées en rouge contiennent moins d'anthocyane accompagnée de traces de deux flavones (figure 1, colonne 4). Les dernières fractions contiennent des flavones (figure 1, colonne 5).

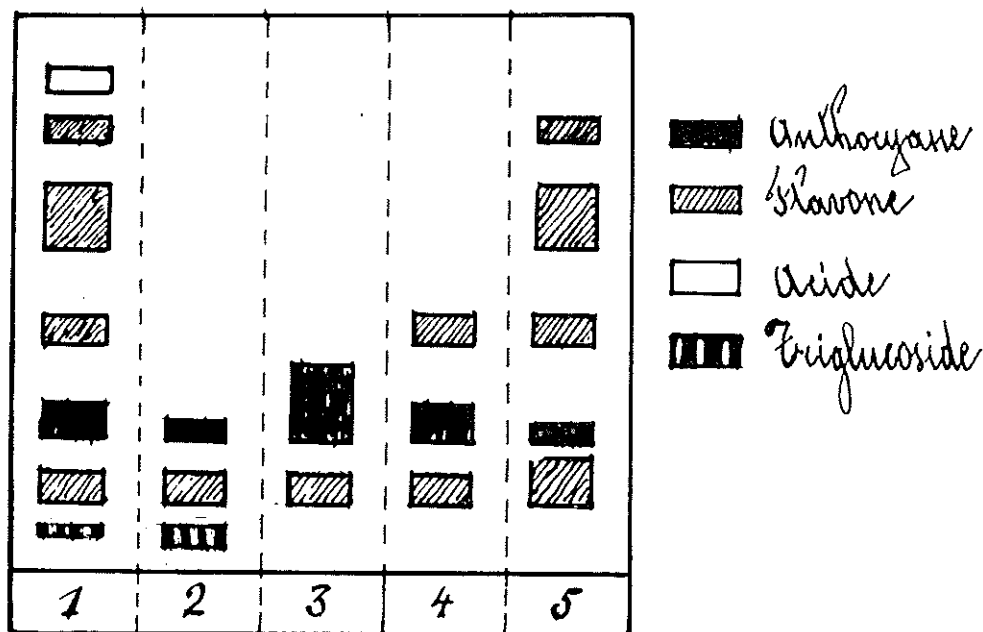


Fig. 1. — Chromatographie, sur couche mince de gel de silice G, avec le mélange acétate d'éthyle — acide formique — eau (70/15/15 en volume), des fractions d'élution de la chromatographie sur colonne de polyamide de l'extrait purifié et concentré des feuilles de *Perilla nankinensis* (LOUR.) DECNE (solvant éluant : méthanol-eau-acide formique, 60/60/5).

La distribution fractionnée à contre-courant permet l'isolement de fractions d'anthocyane acylée pure comme le révèle la chromatographie analytique sur couche mince de gel de silice G.

On procède d'abord, dans un appareil de Craig, à 50 transferts à l'aide des deux phases résultant du mélange volume à volume d'acide acétique à 15 % et d'éther sulfurique. L'anthocyane reste dans les premiers tubes et est débarrassée des acides phénoliques et des flavones de poids moléculaires peu élevés. On soumet la solution contenant les anthocyanes à une nouvelle distribution comportant 200 transferts à l'aide des deux phases du mélange volume à volume d'acide acétique à 15 % et d'acétate d'éthyle. L'anthocyane, qui reste dans les premiers tubes, est séparée des flavones. L'anthocyane acylée s'hydrolysant souvent partiellement en diglucoside, on la purifie par une troisième distribution comptant 100 transferts à l'aide des deux phases résultant de l'agitation de 4 volumes de *n*.butanol avec 1 volume d'acide acétique et 5 volumes d'eau.

L'anthocyane acylée se retrouve dans les tubes 50 à 60. Son spectre U V et la chromatographie sur couche mince de gel de silice « Merck » G prouvent qu'elle est tout à fait pure. L'évaporation de la phase butanolique peut toutefois provoquer une dégradation partielle du colorant qu'elle contient. Afin d'éviter cet inconvénient, on y ajoute 5 % d'acide acétique glacial avant évaporation afin de maintenir le pH suffisamment acide.

Quelle que soit la méthode de purification utilisée, les fractions contenant l'anthocyane pure sont concentrées sous vide à 30° C. et la solution concentrée est laissée au repos à température ordinaire dans un exsiccateur, sous vide, en présence de P₂O₅. Le résidu est redissous dans un minimum d'acide acétique aqueux à 15 % et filtré sur verre fritté serré. La solution est concentrée rapidement en exsiccateur sous vide et la poudre microcristalline obtenue est séchée en présence de P₂O₅. L'analyse de la poudre obtenue par purification sur colonne de polyamide donne 52,41 % de carbone. (Calculé pour l'acétate de cyanidine 3-(6-*p*.coumaroyl-β-D-glucose)-5-β-D-glucose : 52,94 % de carbone).

Toutes les tentatives d'obtention de cristaux bien formés ont échoué. Au contraire, le chlorure du diglucoside correspondant séparé de l'acide *p*.coumarique cristallise parfaitement. Il suffit de le dissoudre dans le minimum d'eau chaude, d'ajouter la solution obtenue d'un égal volume de solution méthanolique de HCl à 3 % et d'abandonner le tout au frigidaire en vase ouvert pendant 3 à 4 jours.

Identification de l'aglycon, des sucres et de l'acide phénolique.

L'hydrolyse totale est réalisée par chauffage à 80° au bain-marie pendant 1½ heure, de 10 mg d'anthocyane dissous dans 10 ml d'une solution aqueuse de HCl 0,7 N. L'aglycon libéré est extrait de la solution à l'aide de 3 fois 15 ml d'alcool isoamylique. Après évaporation du solvant, le résidu est dissous à chaud dans 5 ml d'HCl aqueux à 20 % et abandonné au frigidaire à 0° C. On obtient de beaux cristaux rouge foncé à éclat métallique. Le spectre U V de l'aglycon, dans une solution méthanolique contenant 0,1 % de HCl, est caractéristique de la cyanidine [2]. Les bandes d'absorption dans le visible subissent un déplacement bathochromique de 20 mμ quand on ajoute du AlCl₃ à la solution d'aglycon, ce dont est responsable la présence des deux fonctions phénoliques dans l'anneau latéral de la cyanidine. Le spectre IR est identique à celui publié par P. Ribereau-Gazon [3] pour la cyanidine. Ces arguments sont encore confirmés par la dégradation alcaline de l'aglycon [4] suivie de chromatographie sur couche mince de gel de silice G « Merck », qui permet de mettre en évidence de l'acide protocatéchique. D'ailleurs, la chromatographie de l'aglycon et de cyanidine pure ne permet pas de séparation : les deux substances sont identiques.

La recherche des sucres a été réalisée à partir de l'hydrolysate ci-dessus. L'acide

chlorhydrique a été extrait par agitation avec une solution chloroformique à 10 % de tri-*n*-octylamine contenant un peu de vert de bromocrésol. La chromatographie sur couche mince de la solution aqueuse met en évidence la seule présence de glucose. Après dégradation totale du noyau de l'anthocyanidine par l'ozone [5], la recherche des sucres démontre également la présence de glucose dans la molécule d'anthocyane à l'exclusion de tout autre monose.

La nature du résidu acylé a été établie par hydrolyse alcaline de l'anthocyane à l'aide de NaOH 2N à froid, suivie d'acidification par HCl dilué et d'extraction à l'éther. De l'extrait étheré, on retire un acide identifié à l'acide paracoumarique par chromatographie comparative et par les spectres U V et I R.

Dosage du nombre de molécules de glucose et d'acide paracoumarique.

L'indice d'acétyle de l'anthocyane a été obtenu par la méthode de Petersen [6] légèrement modifiée. Les résultats conduisent à admettre la présence de deux molécules de glucose dans la molécule du pigment. La teneur en acide *p*.coumarique a été déterminée par une méthode spectrale [7]. On mesure le rapport de l'intensité

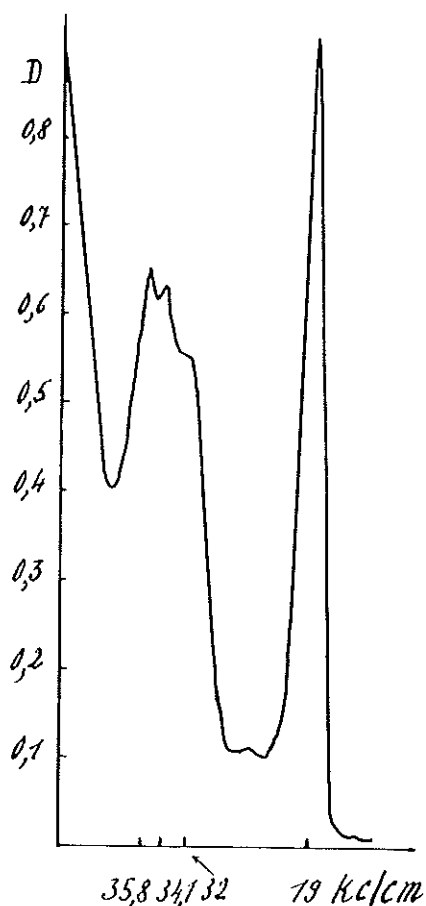


Fig. 2. — Spectre UV et visible de l'anthocyane acylée extraite de *Perilla nankinensis* (LOUR.) DECNE.

maximum d'absorption du pic situé à 312 m μ dont est responsable l'acide paracoumarique, à celle du pic de l'anthocyane dans le visible à 526 m μ .

Le rapport de 0,61 possède la même valeur que celle indiquée soit par Harborne [2] soit par Birkofer [7]. Ces auteurs donnent en effet les valeurs 0,6 et 0,65 pour les molécules d'anthocyane ne contenant qu'une molécule d'acide paracoumarique. Ceci permet de conclure à la présence d'une seule molécule d'acide paracoumarique dans la molécule du pigment de *Perilla* étudié.

Position des deux molécules de glucose et de la molécule d'acide paracoumarique.

L'anthocyane a été hydrolysée par chauffage à 80° C. dans une solution aqueuse de HCl à 2,5 %. La progression de la réaction a été contrôlée par des prélèvements se succédant de 30 en 30'. Les échantillons étaient ensuite analysés par chromatographie sur couche mince de gel de silice G à l'aide du solvant obtenu en mélangeant 70 parties en volume d'acétate d'éthyle, 15 parties d'acide formique et 15 parties d'eau. Les spots correspondant aux molécules d'anthocyane sont colorés en rouge. L'identification des spots s'est faite par comparaison avec les produits d'hydrolyse connus de la cyanidine 3-5 diglucoside fraîchement extraite des pétales de roses rouges, *Rosales crassulaceae* [8] et de la malvidine 3-5 diglucoside extraite des épidermes de raisin du genre *Vitis vinifera* dont le 5 monoglucoside fluoresce en rouge dans la lumière UV [9].

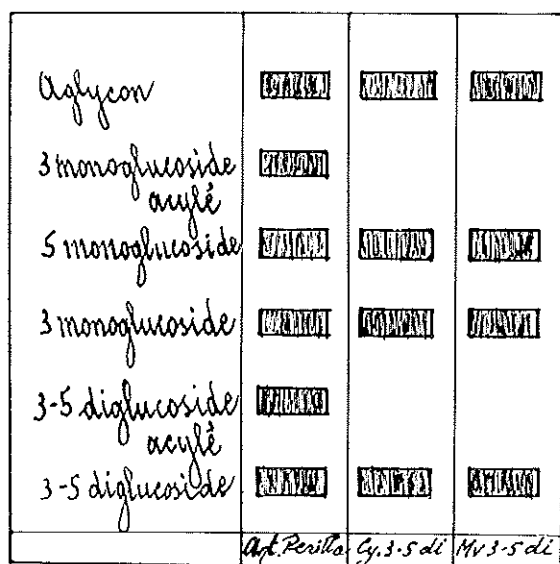


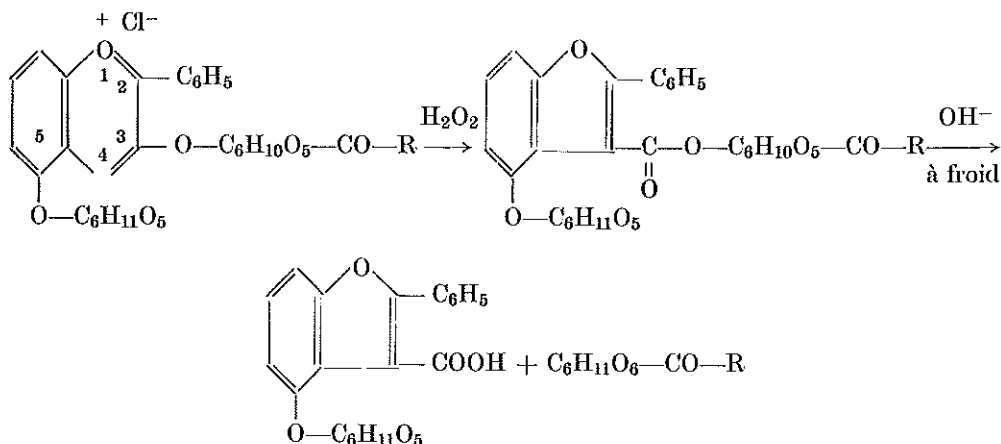
Fig. 3. — Chromatographie sur couche mince de silice G, avec le solvant acétate d'éthyle-acide formique-eau 70/15/15, des produits d'hydrolyse de l'anthocyane de *Perilla nankinensis* (LOUR.) DECNE, de la cyanidine 3-5 diglucoside et de la malvidine 3-5 diglucoside.

Dans le chromatogramme de la figure 3, on reconnaît de bas en haut la présence du 3-5 diglucoside de la cyanidine, du 3-5 diglucoside acylé, du 3 monoglucoside, du 5 monoglucoside, du 3 monoglucoside acylé et de la cyanidine. L'isolement de la substance correspondant au spot inférieur à celui de la cyanidine, son étude spectrale

qui révèle la présence dans sa molécule d'acide paracoumarique et son comportement vis-à-vis de l'oxydation à l'eau oxygénée permettent de conclure à son identité avec le 3 monoglucoside acylé.

Une dégradation par l'eau oxygénée prouve que c'est le glucose fixé en 3 qui est acylé.

Comme nous l'avons montré dans une thèse de doctorat [11] la dégradation d'un diglucoside acylé d'anthocyanidine par l'eau oxygénée peut se résumer comme suit :



La chaîne latérale se trouvant primitivement en 3 sur le noyau anthocyanidique est hydrolysée par les alcalis à froid à l'exclusion des autres chaînes ; elle peut être mise en évidence par les méthodes chromatographiques. Dans l'hydrolysats final, nous avons décelé la présence de paracoumaroylglucose à côté de glucose et d'acide paracoumarique. La présence de glucose acylé prouve donc que la cyanidine porte en 3 un groupe paracoumaroyl glucose.

Liaison glucose-acide paracoumarique.

L'anthocyane a été perméthylée à l'aide d'iodure de méthyle dans la diméthylformamide en présence d'oxyde d'argent puis elle a été hydrolysée dans une solution aqueuse d'acide sulfurique [11]. La mise au point d'une méthode de chromatographie sur couche mince de silice permet la mise en évidence de la présence de 2,3,4 triméthylglucose et de 2-3-4-6 tétraméthylglucose identifiés par comparaison avec ces deux substance pures utilisées comme références dans la même chromatographie. La présence de 2-3-4-6 tétraméthylglucose indique que la molécule de glucose en position 5 sur le noyau de la cyanidine est liée par son hydroxyle pseudoaldéhydrique. L'obtention de 2-3-4 triméthylglucose indique que le glucose fixé en position 3 de la cyanidine par son OH pseudoaldéhydrique est estérifié en 6 par l'acide paracoumarique.

Afin de vérifier cette dernière conclusion nous avons dégradé la substance par l'acide periodique suivant la méthode de P. Karrer et M. Donike [12].

Si nous supposons qu'une molécule de glucose est attachée en position 3 de la cyanidine, plusieurs alternatives se présentent pour la position de la molécule de l'acide paracoumarique.

Si l'acide *p*.coumarique est attaché en position 2 du glucose, l'action successive de NaIO₄, de NaBH₄ et de HCl conduit à la libération d'une môle de glycérine et d'une môle d'aldéhyde glycérique par môle de substrat.

Si l'acide est placé en position 3 du glucose, les mêmes réactifs conduisent à une simple hydrolyse sans oxydation et aucun polyol ne se forme donc.

Si l'acide est uni en position 4 du glucose, il y aura formation d'érythrite.

Enfin, dans le cas où l'acide est attaché en position 6 du glucose, les mêmes réactions conduisent à l'obtention d'une môle de glycérine, une môle d'acide formique et une môle d'aldéhyde glycolique.

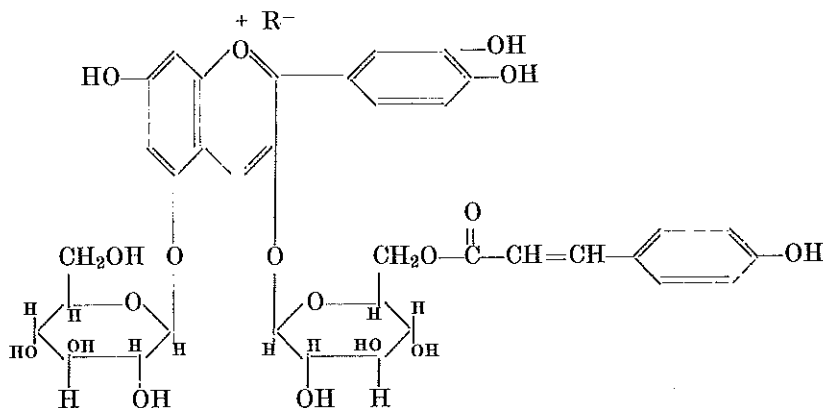
En soumettant à cette dégradation, parallèlement, des quantités équivalentes d'anthocyane de *Perilla* et de cyanidine-3-5 diglucoside pur, en isolant les polyols obtenus par chromatographie sur couche mince et en comparant l'intensité des spots révélés à l'aide d'un densitomètre « photovolt », on met en évidence la formation dans les deux cas de deux môles de glycérine pour une môle de substance, à l'exclusion de tout autre polyol. Il est ainsi possible de rejeter l'hypothèse de la position de l'acide *p*.coumarique en 3 et en 4 du glucose.

D'autre part, le *p*.coumaroylglucose isolé de *Perilla* se révèle au phtalate d'aniline ce qui impose la non-estérification de l'hydroxyle en 2 du glucose [13]. Il ne reste donc plus que l'hypothèse de l'union de l'acide *p*.coumarique en position 6 du glucose.

Nous en avons obtenu une confirmation définitive en isolant le paracoumaroylglucose. Dans ce but, l'anthocyane est absorbée sur une colonne de Duolite C 25 et oxydée, in situ, par H₂O₂ en présence de peroxydase. Après élution, le produit de dégradation est soumis à l'hydrolyse. La solution résultante est passée sur colonne d'alumine pour retenir les produits orthodiphénoliques. Dans les premières fractions d'éluat qui sortent de cette colonne, nous avons isolé un sucre acylé qui s'est révélé être identique au 6-paracoumaroyl-β-D-glucose que nous avons synthétisé selon une méthode préconisée par Kosmol pour les sucres acylés dans une autre position [14].

L'obtention de 6-paracoumaroylglucose par oxydation, par l'eau oxygénée, de l'anthocyane prouve d'une manière non équivoque que c'est le glucose lié en position 3 de la cyanidine qui est estérifié sur sa fonction alcoolique —CH₂OH par l'acide paracoumarique.

Comme les liaisons oses-anthocyanidine sont toujours des liaisons β [15], tous les arguments nous conduisent à adopter pour la molécule de l'anthocyane extraite de *Perilla nankinensis* (LOUR.) DECNE la formule suivante :



Cyanidine 3-(6-paracoumaroyl-β-D-glucoside) 5-β-D-glucoside.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Microdégradation alcaline de l'aglycon :

Introduire un mg d'aglycon dans un tube à essai, ajouter deux pastilles de KOH, chauffer quelques secondes dans la flamme bleue d'un bec bunsen. La coloration initiale vert foncé devient brune puis jaune. Arrêter le chauffage avant ce dernier stade, laisser refroidir, ajouter deux ml d'eau ; acidifier avec HCl 6N, extraire à l'éther et chromatographier sur plaque de gel de silice G — solvant : acétate d'éthyle-isopropanol-eau (65-24-11 en volume). Témoins : phloroglucinol et acide protocatéchiq-ue-révélateur : paranitraniline diazotée (2 ml de paranitraniline à 0,5 % dans HCl 2N, 3 à 5 gouttes de nitrite de sodium à 5 %, 8 ml d'acétate de sodium à 20 %), à pulvériser sur la plaque préalablement séchée à l'étuve à 80° C. Deux minutes après ce premier traitement, vaporiser une solution aqueuse de carbonate de sodium à 15 %. Le phloroglucinol se révèle en orange, l'acide protocatéchiq-ue en gris bleu.

Chromatographie des sucres — Identification du glucose.

Trois chromatographies avec une série de monosaccharides en référence :

1. — plaque de cellulose MN 300 G.
— solvant : *n*.butanol-pyridine-eau (6-4-3 en volume).
— révélateur : phtalate d'aniline (0,93 g d'aniline et 1,66 g d'acide phtalique dissous dans 100 ml d'eau saturée de butanol).
— pulvériser sur la plaque sèche, placer celle-ci à l'étuve à 100° C. pendant 10 minutes).
2. — plaque de Gel de silice Merck G.
— solvant : *n*.butanol-acide acétique-acétate d'éthyle-eau (45-30-30-5 en volume).
— révélateur : diphénylamine (1 ml d'aniline, 1 g de diphénylamine dissous dans 50 ml d'acétone et 5 ml d'acide phosphorique conc.).
— vaporiser sur plaque sèche, chauffer 15' à l'étuve à 105-110° C.
Les aldohexoses apparaissent colorés en bleu foncé, les pentoses en vert olive et les sucres cétoniques en rouge-brun.
3. — plaque de gel de silice G imprégnée d'acide borique 0,1 N.
— solvant : méthyléthylcétone-acide acétique-méthanol (6-2-2 en volume).
— révélateur : anisaldéhyde sulfurique (9 ml d'éthanol à 95 %, 0,5 ml H₂SO₄ concentré et 0,5 ml d'anisaldéhyde). Vaporiser superficiellement sur la plaque sèche et chauffer 5 à 10 minutes à 90-100°, à l'étuve. Les sucres apparaissent en gris bleu sur fond grenat.

Identification de l'acide paracoumarique.

Traiter 5 mg d'anthocyane par 3 ml de soude 2N à température ordinaire pendant 10 minutes, neutraliser et acidifier légèrement par HCl, extraire l'acide à l'éther. En utiliser une fraction pour une chromatographie sur plaque de gel de silice G Merck avec une série d'acides hydroxycinnamiques en référence ; solvant : toluène-formiate d'éthyle-acide formique (5-4-1) ; mise en évidence des spots à la lampe UV après présentation de la plaque aux vapeurs d'ammoniac. L'autre partie de l'acide extrait est utilisée pour en prendre le spectre UV dans le méthanol et le comparer avec les spectres de différents acides hydroxycinnamiques (le pic principal de l'acide paracoumarique se trouve à 312 m μ).

Hydrolyse ménagée.

5 mg d'anthocyane dans 3 ml d'HCl aqueux à 25 % sont chauffés à 80° C. au bain-marie. Prélever, toutes les ½ heures, la quantité nécessaire de solution pour une chromatographie sur plaque de gel de silice G Merck-solvant : acétate d'éthyle-acide formique-eau (70-15-15).

Oxydation à l'eau oxygénée.

Dissoudre 10 mg d'anthocyane dans 2,5 ml d'une solution de peroxydase (deux gouttes de peroxydase dans 50 ml d'eau distillée plus une goutte de toluène) ; ajouter 2 gouttes d'eau oxygénée à 30 % et laisser reposer une ½ heure à la lumière. Après décoloration complète de la solution, détruire l'excès d'eau oxygénée par un peu de noir de platine ; filtrer, évaporer à sec sous vide à 30° C ; reprendre par un mélange d'un ml d'eau et de six ml de méthanol ; saturer la solution d'ammoniac gazeux obtenue en portant une solution concentrée d'ammoniac à l'ébullition. Laisser reposer 2 heures à température ordinaire, évaporer à sec sous vide à 30° C. et redissoudre dans un minimum d'eau. Chromatographier sur papier Schleicher-Schull 2043 Mg I avec comme solvant la phase supérieure du mélange *n*.butanol-acide acétique-eau (4-1-5 en volume). Examiner d'abord à la lampe UV après présentation de la feuille aux vapeurs d'ammoniac ; le paracoumaroylglucose ($R_f = 0,7$) a la même fluorescence bleu-violet que l'acide paracoumarique ($R_f = 0,87$). Révéler ensuite au phtalate d'aniline : le paracoumaroyl-glucose se révèle en brun comme le glucose ($R_f = 0,3$).

Méthylation et chromatographie en couche mince des sucres méthylés.

0,5 g d'anthocyane, 3 ml de CH_3I et 3 g d' Ag_2O sont agités à l'obscurité dans 20 ml de diméthylformamide anhydre. Après 96 hs., ajouter les mêmes quantités de réactifs plus 10 ml de diméthylformamide ; agiter pendant une semaine, centrifuger pour éliminer l'argent résiduel, ajouter 100 ml de KCN aqueux à 4 % et extraire au chloroforme. Après évaporation sous vide à 30° C., hydrolyser l'huile jaune-brune obtenue (4 mg de celle-ci par 0,5 ml d' H_2SO_4 à 72 %) à température ordinaire pendant 30 minutes ; ajouter 3,5 ml d'eau et chauffer à 100° C. pendant 4 heures. Neutraliser en agitant dans la solution une petite quantité de résine amberlite IR 4B (environ un demi-gramme), filtrer, laver et concentrer pour la chromatographie.

Chromatographie en couche mince des sucres méthylés : pour cinq plaques de 0,3 mm d'épaisseur, faire un mélange de 30 g de gel de silice G Merck et de 60 ml de NH_4Cl aqueux à 2 %, laisser sécher les plaques à l'étuve à 60° C. pendant une nuit. Pour la chromatographie, utiliser le mélange octane (température d'ébullition 127°-130° C)-isopropanol-solution aqueuse d'ammoniac (d. 0,89) (50-25-2 en volume). Accrocher en haut de la plaque un papier Whatman n° 3 ; le replier derrière celle-ci de sorte qu'il chevauche son arête supérieure. Fixer le papier dans cette position au moyen de petits fils de cuivre pliés en forme de U et venant coiffer le papier au sommet de la plaque. Prolonger, grâce à ce système, la chromatographie pendant 4 h ½. Sécher les plaques à l'étuve et révéler à l'oxalate d'aniline (80 ml de *n*.butanol-50 ml d'éthanol-1 ml d'aniline-40 ml d'eau et 2 g d'acide oxalique). Après chauffage à l'étuve à 110° C., pendant 10 minutes, le dérivé tétraméthylé du glucose (R_f 0,8) se révèle en rouge ; les triméthylés, bien repérés, sont colorés en marron ; le 2,3,4 triméthylglucose à un R_f de 0,51 ; le 2, 3, 6 triméthyl glucose possède un R_f de 0,44 et le 2, 4, 6 triméthyl glucose, un R_f de 0,36.

Dosage du nombre de molécules de glucoses.

Environ 25 mg d'acétate de l'anthocyane de Perilla soigneusement purifiés sont séchés au pistolet à vide sur P_2O_5 à la température d'ébullition du CCl_4 pendant 6 heures. Introduire l'anthocyane séchée dans un petit tube de 0,5 cm de diamètre dont on a aminci au maximum le fond par soufflage du verre en fusion et préalablement taré. Repeser le tube après introduction de l'anthocyane. Ajouter environ la double quantité d'anhydride acétique redistillé par rapport à la quantité théoriquement prévue d'après la réaction d'acétylation des OH alcooliques, déterminer exactement cette quantité par pesage du tube avant et après addition. Ajouter 0,5 ml de pyridine redistillée et sans eau pour dissoudre le tout. Sceller le tube et laisser séjourner à température ordinaire pendant 84 heures. Faire un blanc avec environ la même quantité d'anhydride acétique exactement pesée et 0,5 ml de pyridine afin de déterminer, après hydrolyse, le volume de soude nécessaire pour neutraliser l'acide dérivant d'une quantité connue d'anhydride acétique.

Briser les tubes, chacun dans un vase d'erlenmeyer de 50 ml contenant 5 ml d'eau distillée décarbonatée, les rincer chacun avec 5 ml de la même eau, boucher l'erlenmeyer et laisser reposer une $\frac{1}{2}$ heure. Titrer l'acide acétique formé avec de la soude 0,04 N (indicateur : crésolphaléine).

Calcul : En comptant 2 molécules de glucose par molécule d'anthocyane nous avons théoriquement : x équivalent-grammes d'acétate d'anthocyane donnent $8x$ équivalent-grammes d'acide acétique provenant des 8 OH alcooliques (la liaison ester de l'acide paracoumarique est hydrolysée dans la pyridine) plus x équivalent-grammes d'acide acétique libérés de l'acétate d'anthocyane (la structure oxonium de l'anthocyane devenant une structure carbonium en milieu basique). Il faudra donc $9x$ équivalent-grammes de NaOH pour neutraliser les $9x$ équivalent-grammes d'acide acétique.

D'autre part, les x équivalent-grammes d'acétate d'anthocyane ont réagi avec $8x$ équivalent-grammes d'anhydride acétique ; il reste donc la quantité d'anhydride acétique de départ moins $8x$ équivalent-grammes soit y gr. d'anhydride. Grâce au blanc, une règle de trois nous permet de déduire le nombre de gr. de NaOH nécessaire pour neutraliser l'acide acétique libéré par hydrolyse de y gr d'anhydride, soit z gr de NaOH.

Au total pour deux molécules de glucose par molécule d'acétate d'anthocyane, il faudra $9x$ equiv. gr. + z gr. de NaOH.

Résultat : Théoriquement pour 26,9 mg d'acétate d'anthocyane, il faudra 42,5 mg de NaOH en comptant deux molécules de glucose. Expérimentalement, il nous en a fallu 42,4 mg.

Synthèse du chlorure de l'acide paraacétylcoumarique.

Porter à l'ébullition et agiter pendant 6 heures un mélange de 50 g de para-hydroxybenzaldéhyde, 84 g d'acétate de sodium anhydre et 210 ml d'anhydride acétique. Éliminer l'anhydride en excès par distillation sous vide. Reprendre le résidu par 300 ml d'eau bouillante, maintenir l'ébullition et agiter pendant un $\frac{1}{4}$ heure. Filtrer à chaud et laisser précipiter au frigidaire pendant 2 heures.

Reprendre le précipité par de l'eau à $80^\circ C$, filtrer en maintenant la température aux environs de $80^\circ C$; les polymères sont ainsi éliminés. Laisser précipiter une nuit au frigidaire. Sécher 5 heures au pistolet à vide sur P_2O_5 à la température de l'ébullition du CCl_4 . Traiter ensuite par le chlorure de thionyle en ne dépassant pas $60^\circ C$. Par sublimation, on isole ainsi 5,6 g de chlorure d'acide blanc cristallin, à point de fusion net de $118^\circ C$.

Cet échantillon de chlorure de l'acide *p*.acétylcoumarique a été condensé avec 5,5 g de 1,2.isopropylidène-glucofuranose dans 25 cc de pyridine suivant la méthode de Kosmol H. [14], ce qui a permis l'obtention de 4,7 g de 6-*p*.acétylcoumaroyl-1,2-isopropylidène-glucofuranose fondant à 154° C.

3,2 gr de cette substance dissous dans un mélange de 20 cc de dioxanne et de 45 cc d'eau ont été hydrolysés par 0,2 cc de HCl conc. suivant le procédé de Kosmol fournissant du 6-*p*.coumaroylglucose fondant à 185° C.

Isolement du paracoumaroylglucose de l'anthocyane acylée de Perilla.

Préparer de la résine acide faible duolite C 25 en la lavant à l'ébullition d'abord avec HCl aqueux 0,5 %, ensuite trois fois avec le mélange eau-méthanol-acide chlorhydrique (55-30-15 en volume) ; l'activer sur colonne avec HCl aqueux à 0,8 % et la laver abondamment à l'eau. Verser la résine préparée dans une solution assez concentrée d'anthocyane pure dissoute dans de l'acide acétique aqueux à 10 % ; une absorption complète est obtenue en 4 heures. Laver soigneusement la résine à l'eau et décantier. Oxyder le colorant absorbé en ajoutant de l'eau oxygénée à 2 % contenant des traces de peroxydase ; laisser séjourner une journée à la lumière en agitant de temps en temps. Lorsque la résine est complètement décolorée, recueillir la solution d'eau oxygénée par décantation, laver ensuite la résine deux fois au méthanol puis la faire bouillir deux heures avec agitation dans de l'eau distillée. Rassembler les différentes solutions, les concentrer ; décomposer l'excès d'eau oxygénée par un peu de noir de platine, filtrer et hydrolyser à température ordinaire pendant une nuit avec de l'acide formique aqueux à 20 %. Neutraliser en agitant avec un peu de résine Amberlite IR 4B. Une chromatographie avec du méthanol sur une colonne d'alumine acide Woelm d'activité 1 permet d'éliminer les orthodiphénols fortement absorbés et d'obtenir le paracoumaroylglucose dans les premières fractions d'élution. Évaporer le méthanol, reprendre par un minimum d'eau bouillante, laisser cristalliser une semaine au frigidaire ; il apparaît de petits globules blancs (1/2 mm de diamètre) de paracoumaroylglucose dont le spectre IR correspond exactement au spectre IR du 6-*p*.coumaroyl- β -D-glucose synthétisé ci-dessus.

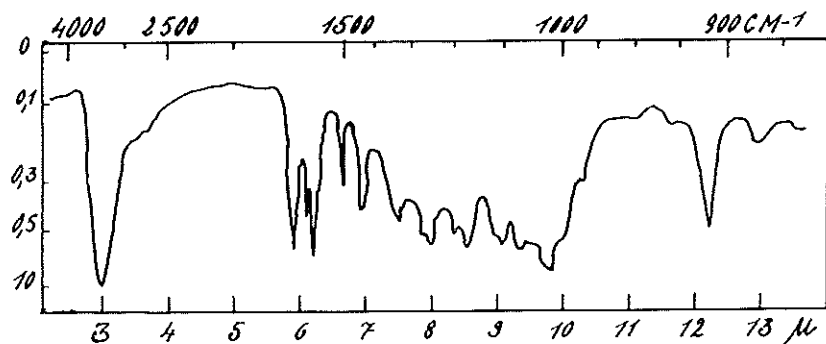


Fig. 4. — Spectre infra-rouge du 6- β -D-paracoumaroyl-glucose synthétique et du 6- β -D-paracoumaroyl-glucose provenant de l'hydrolyse par H₂O₂ de l'anthocyane extraite de *Perilla nankinensis* (LOUR.) DECNE.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier Monsieur et Madame R. Bouillenne et Monsieur R. Schumæcker qui nous ont procuré des plantes de *Perilla nankinensis* (LOUR.) DECNE au fur et à mesure de nos besoins.

Nous remercions le Fonds de la Recherche Fondamentale Collective pour le subside accordé à notre laboratoire en vue de la réalisation de cette recherche.

RÉFÉRENCES

- [1] SCHUMACKER R., Thèse de doctorat en sciences botaniques, Liège (1967).
- [2] HARBORNE J. B., *Biochem. J.*, 70, 22 (1958).
- [3] RIBÉREAU-GAZON P. et JOSIEM M. L., *Bull. Soc. Chim. France*, 934 (1960).
- [4] WILLSTÄTER R. et MALLISON J., *Liebigs Ann.*, 408, 40 (1915).
- [5] CHANDLER B. V. et HARPER K. A., *Australian J. Chem.*, 14, 586 (1961).
- [6] PETERSEN R., *Ind. Engin. Chem. Vol.*, 15, n° 3, 225 (1943) et vol. 17, n° 4, 265 (1945).
- [7] BIRKOFER L., *Z. Naturforsch.*, 18b, 631 (1963).
- [8] HARBORNE J. B., *Chemical Plant Taxonomy*, p. 367, London, 1963.
- [9] ROBINSON R., *Nature*, 137, 94 (1936).
- [10] NIEBES P., Thèse de doctorat en sciences chimiques, Liège (1967).
- [11] CROON I., *Acta Chim. Scand.*, 14, 1338 (1960).
- [12] KARRER P., *Helv. Chim. Acta*, 38, 642, (1955).
DONIKE M., Thèse de doctorat, Cologne (1965).
- [13] SCHMIDT P., *Liebigs Ann.*, 649, 137 (1961).
- [14] KOSMOL H., Thèse de doctorat, Cologne (1964).
- [15] ROBINSON R., *Ber.* 67, 102 (1934) A.

*Laboratoire de Chimie Organique
Université de Liège
1b, Quai Roosevelt, Liège*