

315. Contribution à la phytochimie du genre *Gentiana* III. Etude des composés flavoniques et xanthoniques dans les feuilles de *Gentiana lutea* L. (2^{me} communication)

par Kurt Hostettmann, Günter Bellmann¹⁾, Raphaël Tabacchi
et André Jacot-Guillarmod

Institut de chimie de l'Université, Av. de Bellevaux 51, CH-2000, Neuchâtel

(8. XI. 73)

Summary. The xanthone isogentisin and two flavonic heterosides (isoorientin-4'-O-glucoside and isovitexin-4'-O-glucoside) have been isolated from leaves of *Gentiana lutea* L. by means of column chromatography on polyamide. The determination of the structures and the NMR. spectra of the acetylated derivatives are reported.

1. Introduction. – Dans une précédente communication [1], nous avons décrit six hétérosides polyphénoliques isolés à partir d'un extrait méthanolique de feuilles de *Gentiana lutea* L. au moyen de la chromatographie sur couche mince et sur colonne de polyamide. La structure de ces composés a été établie à l'exception de deux d'entre eux, (E (I) et F (II)). Ces deux dernières substances libèrent, par hydrolyse acide, respectivement les C-glucosides flavoniques isoorientine III et isovitexine IV (partiellement isomérisés en orientine V et vitexine VI), ainsi que du glucose.

La présente communication est relative d'une part à la mise au point d'un autre mode d'extraction des feuilles de *Gentiana lutea* L. en vue de l'isolement d'autres substances. Elle a trait d'autre part à la détermination de la structure des hétérosides flavoniques E (I) et F (II).

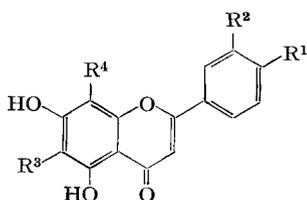
2. Résultats obtenus. – 2.1. *Isolement des composés.* La méthode décrite précédemment [1] consiste à extraire le matériel végétal séché par le chloroforme en vue d'éliminer les lipides, les carotènes, les chlorophylles. L'isolement des constituants polyphénoliques avait été entrepris à partir d'un extrait méthanolique de ce matériel purifié. Cette méthode est toutefois sujette à certaines critiques du fait qu'un traitement préalable au chloroforme peut éliminer des polyphénols peu polaires, notamment, les dérivés méthoxylés des composés flavoniques et xanthoniques.

Nous avons adopté une autre technique, à savoir, l'extraction à chaud du matériel séché, par des solvants de polarité croissante: ligroïne, éther, acétate d'éthyle, méthanol.

A partir de l'extrait étheré, nous avons isolé par chromatographie préparative l'isogentisine VII (dihydroxy-1,3-méthoxy-7-xanthone). Sa structure a été établie sur la base de l'étude des spectres UV., IR. et RMN., ainsi que par comparaison directe avec un échantillon préparé selon la méthode de *Grover & Shah* [2] (voir partie expér.).

¹⁾ Adresse présente: Institut Battelle, Centre de recherches de Genève, 7, Route de Drize, CH-1227, Carouge/GE.

Les composés I et II ont été isolés à partir de l'extrait méthanolique par chromatographie préparative sur colonne de polyamide avec l'eau comme éluant.



I: $R^1 = O\text{-}\beta\text{-D-glucopyranosyle}$, $R^2 = OH$
 $R^3 = C\text{-}\beta\text{-D-glucopyranosyle}$, $R^4 = H$

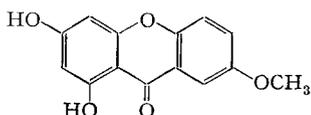
II: $R^1 = O\text{-}\beta\text{-D-glucopyranosyle}$, $R^2 = H$
 $R^3 = C\text{-}\beta\text{-D-glucopyranosyle}$, $R^4 = H$

III: isoorientine
 $R^1 = R^2 = OH$
 $R^3 = C\text{-}\beta\text{-D-glucopyranosyle}$, $R^4 = H$

IV: isovitexine
 $R^1 = OH$, $R^2 = R^4 = H$
 $R^3 = C\text{-}\beta\text{-D-glucopyranosyle}$

V: orientine
 $R^1 = R^2 = OH$, $R^3 = H$
 $R^4 = C\text{-}\beta\text{-D-glucopyranosyle}$

VI: vitexine
 $R^1 = OH$, $R^2 = R^3 = H$
 $R^4 = C\text{-}\beta\text{-D-glucopyranosyle}$



VII: isogentisine
 (dihydroxy-1,3-méthoxy-7-xanthone)

2.2. Détermination de la structure des composés E (I) et F (II). L'hydrolyse acide des substances I et II conduit respectivement à l'isoorientine III et à l'isovitexine IV qui s'isomérisent peu à peu en orientine V et en vitexine VI.

Cette isomérisation peut être expliquée par la transposition de *Wessely & Moser* [3] des hydroxy-5-flavones.

L'analyse par CCM (Cellulose *Merck* AcOH 15%. Rèv. UV. 350 nm) montre que l'hydrolyse acide de I et II donne lieu après 30' à III ($R_f = 0,23$) et IV ($R_f = 0,40$); après 150' on décèle aussi, à côté de III et IV, V ($R_f = 0,10$) et VI ($R_f = 0,18$).

L'identité des produits d'hydrolyse de I et II avec respectivement d'une part l'isoorientine et l'orientine et d'autre part l'isovitexine et la vitexine a été établie par comparaison directe avec des échantillons authentiques. La recherche des sucres a mis en évidence du glucose. La position d'attache du sucre au squelette flavonique a été déterminée par l'étude des spectres UV.

Tableau 1. Spectres UV. (max. en nm)

Composé	MeOH	AlCl ₃	AlCl ₃ -HCl	NaOAc	NaOMe
I	272	282, 295	280, 295	276	268
	335	352, 380	348, 380	378	380
II	274	283, 302	282, 300	280	282
	326	342, 380	340, 380	375	375
I {	264	264	263	264, 305	264, 300
	hydrolysé	336	336	398	398
II {	263	263	263	264, 307	264, 305
	hydrolysé	326	326	364	364

Les spectres UV. de I et II dans le méthanol avant et après addition des réactifs AlCl_3 , $\text{AlCl}_3\text{-HCl}$, NaOAc et NaOMe indiquent que la position 4' est probablement substituée [4]. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons méthylié les groupes hydroxyles phénoliques et examiné les spectres UV. des substances I et II méthyliées, après hydrolyse acide.

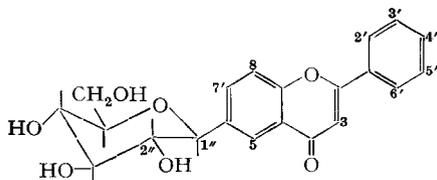
Les deux derniers spectres montrent la présence d'un groupe hydroxyle libre en position 4' [4].

La substance I est donc l'isoorientine-4'-O-glucoside et la substance II l'isovitexine-4'-O-glucoside.

Une confirmation a été apportée par l'étude des spectres RMN. des dérivés acétylés de I et de II.

Tableau 2. Spectres RMN. dans CDCl_3 du squelette flavonique de I et II acétylés (δ en ppm par rapport au TMS pris comme référence interne)

	H(3)	H(8)	H(2)	H(3')	H(5')	H(6')	5-OAc 7-OAc	3'-OAc
I	6,46	7,29	7,50	–	7,08	7,58	2,40–2,50	2,27
II	6,53	7,28	7,74	7,10	7,10	7,74	2,44–2,48	–



De plus, les spectres RMN. indiquent la présence de 2 unités hexapyranosiques²⁾:

- 1 groupe acétoxyde aliphatique vers 1,80 δ correspondant à la position 2'' du sucre relié au squelette flavonique par une liaison carbone. Gentili & Horowitz [5] ont montré que ce signal est caractéristique d'un 6-C-glucoside;
- 7 groupes acétoxydes aliphatiques entre 1,98–2,08 δ ;
- 14 protons (multiplet complexe entre 3,50 et 6,00 δ). Parmi eux, vers 4,86 δ , le proton en 1'' de la partie C-glucosidique indique qu'il s'agit de la conformation β ($J = 10$ Hz) [6].

3. Discussion. – La modification de la méthode d'extraction a permis l'identification de l'isogentisine qui n'avait été isolée jusqu'ici qu'à partir des racines de *Gentiana lutea* L. [7] [8]. Ce mode d'extraction est particulièrement indiqué pour l'isolement des aglycones flavoniques et xanthoniques possédant des groupes hydroxyles ou méthoxydes. Nous l'avons appliqué avec succès dans l'étude des constituants des feuilles de *Gentiana bavarica* L. [9].

Les substances I et II ont été identifiées pour la première fois dans la famille des *Gentianacées*. La substance I avait été signalée par Williams & Murray [10] dans les feuilles de *Briza media* L. (*Gramineae*).

²⁾ Dans notre précédent mémoire [1], nous laissons entendre la présence de 4 unités hexapyranosiques dans F (II). L'expérience nous a révélé que la substance F n'était pas suffisamment pure.

Cependant, ce n'est que dans un très récent travail consacré aux C-glucosides flavoniques de *Coronilla varia* (*Leguminosae*) que *Sherwood et al.* [11] en ont confirmé la structure, notamment par l'étude de son spectre RMN. Quant à la substance II, elle a été identifiée dans les *Caryophyllacées* [12], les *Graminées* [10] et les *Légumineuses* [11]. Nos données analytiques complètent celles de la littérature la plus récente [11].

Signalons enfin que nous avons isolé en quantité appréciable les substances I et II à partir d'autres espèces du genre *Gentiana* [13].

Nous remercions Monsieur le Prof. *Claude Favarger* de ses précieux conseils, ainsi que MM. *Minh Duc Luong* et *Michel Goetz* de l'aide qu'ils nous ont apportée. Nous exprimons notre reconnaissance à la maison *Ciba-Geigy* à Bâle pour l'octroi d'une bourse d'étude (à *K. H.*).

Partie expérimentale

1. *Isolement et purification des polyphénols.* 500 g de feuilles séchées à 40° pendant 48 h ont été finement moulues, puis chauffées à reflux avec 3 l de solvant d'extraction, à savoir successivement, la ligroïne, l'éther, l'acétate d'éthyle et le méthanol. Les différents extraits ainsi obtenus ont été analysés par chromatographie sur couche mince (CCM.): polyamide *Merck* DC₁₁ UV₂₅₄ avec les systèmes de solvants: MeOH/H₂O 9:1, MeOH/H₂O/AcOH 90:5:5; cellulose F₅₀ *Merck* (plaques finies) avec les systèmes de solvants: *iso*-BuOH/AcOH/H₂O 10:4:7, AcOH 5%, AcOH 15%.

L'isolement de l'isogentisine a été effectué à partir de l'extrait étheré par chromatographie sur colonne de polyamide *Macherey-Nagel* SC₆ avec le solvant MeOH/H₂O/AcOH 90:5:5. Celle des substances I et II par chromatographie sur colonne de polyamide de l'extrait méthanolique avec le solvant MeOH/H₂O 9:1. Un deuxième passage sur colonne de polyamide avec l'eau comme éluant a permis d'obtenir les substances I et II pures. Les opérations décrites ci-dessus ont été répétées huit fois.

2. *Hydrolyse acide et recherche des sucres.* Cinq à dix mg de glycoside sont chauffés à reflux avec 10–20 ml de HCl 2N pendant 3 h. Les aglycones sont extraits au BuOH. La phase aqueuse est utilisée pour la recherche des sucres: après neutralisation par NaHCO₃, elle est évaporée à sec. Les sucres sont extraits à la pyridine et chromatographiés sur papier *Schleicher & Schüll*, en présence de témoins dans différents systèmes de solvants: BuOH/pyridine/H₂O 60:40:30, BuOH/EtOH/H₂O 35:10:10. Les chromatogrammes ont été révélés par le phtalate d'aniline [14].

3. *Acétylation.* L'acétylation a été effectuée à température ambiante par l'anhydride acétique en présence de pyridine [15].

4. *Méthylation.* Le diazométhane conduit pour les aglycones et les glycosides flavoniques à des produits complètement méthylés [15].

5 mg de substance en solution dans 20 ml de MeOH absolu sont traités avec un excès de solution étherée de diazométhane (10 fois la quantité théorique requise), puis abandonnés dans l'armoire frigorifique à 4° pendant 48 h. Le mélange réactionnel est à nouveau traité avec un excès de diazométhane (5 fois la quantité théorique requise) et abandonné pendant 24 h à 4°, puis 24 h à temp. ambiante. Après évaporation du solvant, le résidu est repris dans le MeOH et purifié par filtration sur gel de *Sephadex* LH 20.

5. *Techniques spectroscopiques.* Les spectres UV. ont été enregistrés sur un appareil *Unicam* SP 800 en solution dans le méthanol et en présence des réactifs habituels [4]. – Les spectres IR. ont été enregistrés à partir de disques de KBr contenant 0,5% de substance sur un appareil *Perkin-Elmer*, modèle 521. – Les spectres RMN. ont été enregistrés à 60 MHz sur un appareil *Varian* A-60 à 37° dans CDCl₃.

6. *Données analytiques des substances isolées.* – *Isogentisine*: quantité isolée: 120 mg. F. 245°, recristallisé dans l'éthanol (Lit. F. 245–246° [8]); Rf = 0,18 (polyamide, MeOH/H₂O/AcOH 90:5:5). – UV. (méthanol): 236, 259, 310, 370 nm. (Lit.: 236, 259, 310, 368 [7]). – Spectres IR. et RMN. identiques à ceux d'un échantillon authentique synthétisé par condensation du phloroglucinol avec l'acide hydroxy-2-méthoxy-5-benzoïque [2].

Substance I: quantité isolée: 28 mg. F. 216° (déc.), recristallisé dans l'eau, Rf = 0,70 (polyamide, MeOH/H₂O 9:1), Rf = 0,55 (cellulose, AcOH 15%).

C₂₇H₃₀O₁₆ (610,35) Calc. C 53,15 H 4,93% Tr. C 51,30 H 4,95%

Substance II: quantité isolée: 40 mg. F. 206–207° (déc.) recristallisé dans le méthanol, Rf = 0,80 (polyamide, MeOH/H₂O 9:1), Rf = 0,68 (cellulose, AcOH 15%).

C₂₇H₃₀O₁₅ (594,36) Calc. C 54,58 H 5,02% Tr. C 52,45 H 5,48%

BIBLIOGRAPHIE

- [1] G. Bellmann & A. Jacot-Guillarmod, *Helv.* 56, 284 (1973).
- [2] P. K. Grover, G. D. Shah & R. C. Shah, *J. chem. Soc.*, 1955 3983.
- [3] F. Wessely & G. H. Moser, *Mh. Chem.* 56, 97 (1930).
- [4] T. J. Mabry, K. R. Markham & M. B. Thomas, *The Systematic Identification of Flavonoids*, Springer, New York, 1970.
- [5] B. Gentili & R. M. Horowitz, *J. org. Chemistry* 33, 1571 (1968).
- [6] B. Gentili & R. M. Horowitz, *Chemistry & Ind.*, 1964, 498.
- [7] L. Canonica & F. Pelizzoni, *Gazz. chim. ital.* 85, 1007 (1955).
- [8] J. E. Atkinson, P. Gupta & J. R. Lewis, *Tetrahedron* 24, 1507 (1969).
- [9] K. Hostettmann, R. Tabacchi & A. Jacot-Guillarmod, *Chimia* 27 215 (1973).
- [10] C. A. Williams & B. G. Murray *Phytochemistry* 11, 2507 (1972).
- [11] R. T. Sherwood, M. Shamma, J. L. Moniot & J. R. Kroschewski, *Phytochemistry* 12, 2275 (1973).
- [12] V. I. Litvinenko, K. Amanmuradov & N. K. Abubakinov, *Chim. Prir. Soedin* 3, 159 (1967).
- [13] K. Hostettmann & A. Jacot-Guillarmod, *Phytochemistry*, à paraître.
- [14] I. M. Hais & K. Macek, *Handbuch der Papierchromatographie*, vol. 1, p. 913, V E.B. Fischer, Jena 1963.
- [15] L. Rosprim, Dissertation, p. 85, Ludwigs-Maximilians Universität, München, 1966.

316. Heterotricyclodecanes XVII¹⁾

2,7-Dioxa-twist-4-ene and 2,7-dioxa-twista-4,9-diene

by Peter Ackermann and Camille Ganter

Laboratorium für Organische Chemie der Eidg. Technischen Hochschule, CH-8006 Zürich

(9. XI. 73)

Summary. 2,7-Dioxa-twist-4-ene (**3**) and 2,7-dioxa-twista-4,9-diene (**6**) were prepared.

In connection with our studies on diheterotricyclodecanes we describe here the synthesis of 2,7-dioxa-twist-4-ene (**3**) and 2,7-dioxa-twista-4,9-diene (**6**). Whereas the mono-unsaturated compound **3** is the first example of a heterotwistene (pure carbocyclic twistene has already been synthesized earlier [2]), 2,7-dioxa-twista-4,9-diene (**6**) represents the first twistadiene prepared thus far.

Treatment of the twistane-mesylate **2** (prepared from twistanol **1** [3]) with *t*-BuOK/Me₂SO gave almost quantitatively 2,7-dioxa-twist-4-ene (**3**), m.p. 46°. By a similar reaction sequence 2,7-dioxa-twista-4,9-diene (**6**) (m.p. 84°) was prepared in excellent yield starting from the twistane-diol **4**²⁾ via its dimesylate **5**.

¹⁾ For part XVI, see [1].

²⁾ The synthesis of **4** will be described shortly in *Helv.*