

278. Contribution à la phytochimie du genre *Gentiana*, XIX¹⁾
Identification de nouveaux C-glycosides flavoniques
dans *Gentiana pyrenaica* L.

par **Andrew Marston, Kurt Hostettmann et André Jacot-Guillarmod**

Institut de Chimie de l'Université, 51, avenue de Bellevaux, CH-2000 Neuchâtel (Suisse)
(29. IV. 76)

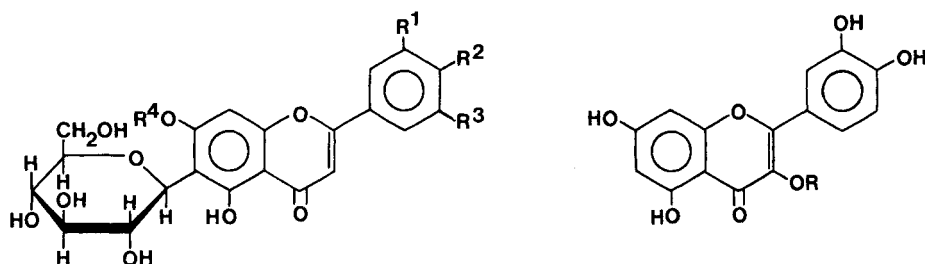
Phytochemistry of genus *Gentiana*, XIX: Identification of new C-glycosylflavones in *Gentiana pyrenaica* L. – *Summary.* Five flavone C-glycosides [6-C- β -D-glucopyranosyltricine (**1**) or isopyrenine; 7-O- β -D-glucopyranosyl-6-C- β -D-glucopyranosyltricine (**2**) or isopyrenine-7-O-glucoside; isoscaparine-7-O-glucoside (**3**); 7-O- β -D-glucopyranosyl-6-C- β -D-glucopyranosylacacetine (**4**) and isovitexine-7-O-glucoside (**5**) or saponarine] as well as the flavonol glucoside isoquercitrine (**9**) have been isolated chromatographically, using polyamide and cellulose columns, from the aerial parts of *Gentiana pyrenaica* L. **1** and **2** are new compounds and the first glycoflavones trisubstituted on cycle B. Compound **4** is also encountered for the first time in nature.

1. Introduction. – *Gentiana pyrenaica* L. dont l'aire de distribution est limitée aux Pyrénées, fait partie de la section *Chondrophylla* [2] qui compte 54 espèces différentes, la plupart d'origine himalayenne ou américaine. En Europe, cette section est encore représentée par *Gentiana Boryi* BOISS. et *Gentiana prostrata* HÄNK. Jusqu'à présent, aucune espèce de cette grande section n'a fait l'objet d'investigation chimique. Le présent travail a trait à la détermination de la structure de six glycosides flavoniques **1–5** et **9** isolés à partir des feuilles et des tiges de *Gentiana pyrenaica* L. Les composés **1**, **2** et **4** sont décrits pour la première fois.

2. Résultats. – 2.1. *Isolement des composés.* Le matériel végétal séché a été extrait selon le procédé classique des solvants à polarité croissante [3]. L'extrait méthanolique a été chromatographié sur colonne de polyamide avec comme éluant un mélange MeOH/H₂O dont la teneur en MeOH est graduellement augmentée. Les différentes fractions obtenues, chromatographiées d'abord sur colonne de cellulose microcristalline (solvant: *n*-BuOH/AcOH/H₂O 4:1:6), puis deux fois sur colonne de Sephadex LH20 (solvant MeOH), conduisent aux composés purs, à l'exception du glycoside **1**. Ce dernier a été isolé par chromatographie préparative sur couche mince de silicagel (solvant AcOEt/MeOH/H₂O 10,5:2:1,5).

2.2. *Détermination des structures.* – *Composé 1.* Les spectres UV. (voir tableau 1) enregistrés en présence des réactifs usuels sont caractéristiques d'une flavone possédant des groupes hydroxyle libres en 5,7 et 4' [4]. La position de la bande I (347 nm) suggère que le cycle B est polysubstitué. La valeur R_f élevée (polyamide, MeOH/H₂O 9:1, R_f = 0,7) indique qu'il ne peut s'agir que d'un glycoside. Le traitement à l'acide chlorhydrique conduit à l'isomérisation bien connue des C-glycosides [5]. L'isomère obtenu ayant un R_f plus bas que le composé initial sur plaque de cellulose, **1** est probablement un 6-C-glycoside. En effet, dans tous les exemples de C-glycosides connus, les 6-C-glycosides présentent toujours une valeur R_f supérieure (sur cellulose) que leurs isomères en 8. Le spectre RMN. du dérivé acétylé montre la présence

¹⁾ Partie XVIII, voir [1].



- 1** $R^1 = R^3 = \text{OMe}, R^2 = \text{OH}, R^4 = \text{H}$
2 $R^1 = R^3 = \text{OMe}, R^2 = \text{OH}, R^4 = \beta\text{-D-glucose}$
3 $R^1 = \text{OMe}, R^2 = \text{OH}, R^3 = \text{H}, R^4 = \beta\text{-D-glucose}$
4 $R^1 = R^3 = \text{H}, R^2 = \text{OMe}, R^4 = \beta\text{-D-glucose}$
5 $R^1 = R^3 = \text{H}, R^2 = \text{OH}, R^4 = \beta\text{-D-glucose}$
6 $R^1 = \text{OMe}, R^2 = \text{OH}, R^3 = R^4 = \text{H}$
7 $R^1 = R^3 = R^4 = \text{H}, R^2 = \text{OMe}$
8 $R^1 = R^3 = R^4 = \text{H}, R^2 = \text{OH}$

- 9** $R = \beta\text{-D-glucose}$
10 $R = \text{H}$

de quatre groupes acétoxyde aliphatiques à 2,07, 2,06, 2,04 et 1,83 δ . Ce dernier est caractéristique des 6-C-glucosides et correspond à la position 2'' [6]. Pour les 8-C-glucosides ce signal est à environ 1,7 δ . Les trois groupes acétoxyde aromatiques apparaissent à 2,51 (position 5), 2,49 (position 7) et 2,37 δ (position 4'). On relève encore la présence de deux groupes méthoxyde à 3,90 δ et de quatre protons aromatiques formant des singulets à 7,36 (H-C(8)), à 6,59 (H-C(3)) et à 7,05 δ (2H) pouvant être attribués à H-C(2') et H-C(6'). Les groupes méthoxyde ne peuvent dès lors que se trouver en positions 3' et 5'. La similitude des spectres UV. de **1** et de ceux de la tricine (trihydroxy-5,7,4'-diméthoxy-3',5' flavone) [4] (voir tableau 1) permet de conclure que **1** est la 6-C- β -D-glucopyranosyltricine. Il s'agit du premier C-glucoside flavonique trisubstitué sur le cycle B. Par analogie, avec la nomenclature en usage pour les C-glycosides, nous proposons de lui attribuer le nom d'isopyrénine (la pyrénine étant l'isomère en 8 obtenu par traitement acide de **1**).

Composé 2. La valeur Rf élevée indique que **2** est un glycoside. Les spectres UV. sont caractéristiques d'une flavone possédant des groupes hydroxyle libres en 5 et 4' [4]. Ces spectres ont la même allure que ceux de **1**, à l'exception de celui enregistré en présence de NaOAc, où l'on n'observe aucun déplacement bathochrome de la bande II, suggérant que le groupe hydroxyle en position 7 est substitué. L'hydrolyse acide est difficile (voir partie expérimentale), mais conduit finalement à **1** partiellement isomérisé et au glucose. Un traitement prolongé par la β -D-glucosidase donne également **1**. Cette difficulté de l'hydrolyse est typique des 7-O-glycosides flavoniques [7]. La comparaison des spectres RMN. de **1** et de **2** acétylés (voir tableau 2) montrent que les protons aromatiques ne sont pratiquement pas déplacés, à l'exception de H-C(8) (7,36 δ pour celui de **1**, 6,90 δ pour celui de **2**). Le composé **2** est donc la 7-O- β -D-glucopyranosyl-6-C- β -D-glucopyranosyltricine ou isopyrénine-7-O-glucoside.

Composés 3-5. L'hydrolyse acide prolongée conduit dans chaque cas au glucose et à deux composés de Rf inférieur. Le traitement par la β -D-glucosidase nécessite une longue durée et donne l'un des deux composés (celui dont la valeur Rf est la plus grande). Ces observations permettent de penser que **3**, **4** et **5** sont également des 7-O-glucosides de 6-C-glucosides flavoniques. La comparaison des spectres UV. de

Tableau 1. Spectres UV. des composés 1–9 (λ_{\max} en nm, solvant = MeOH)

Composé	Solvant pur	Solvant additionné de			
		AlCl ₃	AlCl ₃ /HCl	NaOAc	NaOMe
1	242, 271	260 sh, 279	261 sh, 280	264, 277 sh	265, 278 sh
	347	303, 390	302, 382	325, 418	330, 420
	tricine	244, 269	258 sh, 277	259 sh, 277	264, 276 sh
2	350	303, 393	302, 386	321, 414	330, 416
	247, 272	279, 300 sh	279, 301 sh	263, 327	262, 279 sh
	348	374 sh, 391	363, 382 sh	428	329 sh, 415
3	254, 271	267 sh, 278	266 sh, 277	266, 325	265, 280 sh
	343	362 sh, 386	354, 378 sh	410	400
4	272, 325	263 sh, 280, 301	263 sh, 281, 301	273, 315	264 sh, 295
		345, 376	338, 376		358 sh (déc.)
5	271, 329	268 sh, 278, 300	296 sh, 279, 300	270, 390	247 sh, 271
		348, 376	342, 376		308, 386
6	251, 272	267, 278, 296 sh	265 sh, 277, 295 sh	272 sh, 279	266, 277 sh
	343	363 sh, 386	350, 378	325	338 sh, 406
7	272, 305 sh	263 sh, 280, 303	264 sh, 280, 304	279, 296 sh	279, 295 sh
	326	344, 376	338, 376	364	366
8	270, 329	266 sh, 278, 303	264 sh, 280, 303	279, 303	279, 328
		346, 380	342, 380	386	394
9	257, 265 sh	275, 303 sh	270, 299 sh	274, 324	272, 327
	304 sh, 355	331, 432	360, 396	390	408

Tableau 2. Spectres RMN.^{a)} de dérivés acétylés de 1–4. Déplacements chimiques de la partie flavonique^{b)}. Les chiffres entre parenthèses se rapportent aux constantes de couplage *J* (en Hz)

	H–C(3)	H–C(8)	H–C(2')	H–C(6')	H–C(3')	H–C(5')
1	6,59	7,36	7,05	7,05	–	–
2	6,54	6,90	7,02	7,02	–	–
3	6,55	6,92	7,32 d (2,5)	7,45 d (2,5 et 10)	–	7,17 d (8,5)
4	6,51	6,92	7,79 d (10)	7,79 d (10)	7,02 d (9)	7,02 d (9)
	Ac–C(5)	Ac–C(7)	Ac–C(4')	–OMe		
1	2,51	2,49	2,37	3,90 (6H), positions 3' et 5'		
2	2,50	–	2,37	3,91 (6H), positions 3' et 5'		
3	2,50	–	2,36	3,92 (3H), position 3'		
4	2,50	–	–	3,90 (3H), position 4'		

a) Spectres enregistrés à 270 MHz dans CDCl₃ (δ en ppm par rapport au TMS pris comme référence interne).

b) La partie glycosidique de **1** est donnée dans le texte. Elle est la même pour **2–4** et comprend 8 groupes acétoxy aliphatiques (*s*, 1,75–2,22 δ) et 14 protons aliphatiques (*m*, 3,80–5,90 δ).

3, **4** et **5** avec ceux de leur produit d'hydrolyse, respectivement **6**, **7** et **8** indique clairement (voir tableau 1) que la position d'attache du glucose sur le squelette flavonique est bien en **7**. L'ensemble des données spectrales (UV. avant et après hydrolyse acide, RMN. du dérivé acétylé) permettent d'attribuer à **3** la structure d'isoscoparine-7-O-glucoside. Une vérification a été apportée par la comparaison du produit d'hydrolyse de **3** (**6**) avec un échantillon authentique d'isoscoparine ou 6-C- β -D-glucopyranosyltri-hydroxy-5,7,4'-méthoxy-3'-flavone. Le composé **3** a déjà été

signalé par *Seikel & Bushnell* en 1959 [8], cependant nous rapportons ici pour la première fois des données spectrales complètes. Les spectres UV. de **4** hydrolysé (**7**) sont identiques à ceux de la dihydroxy-5,7-méthoxy-4'-flavone ou acacétine [4]. Le spectre RMN. du dérivé acétylé de **4** (voir tableau 2) confirme la structure de 7-O- β -D-glucopyranosyl-6-C- β -D-glucopyranosylacacétine ou isocytiside-7-O-glucoside. Les données spectrales de **7** (= **4** hydrolysé) correspondent à celles indiquées dans la littérature pour l'isocytiside [9]. Le composé **4** est rencontré pour la première fois dans la nature. C'est aussi le premier O-glucoside de l'isocytiside connu.

Le glucoside **5** n'a pu être isolé qu'en très faible quantité et il n'a pas été possible d'en enregistrer le spectre RMN. L'hydrolyse acide conduit à l'isovitexine **8** (identification par comparaison avec un échantillon authentique isolé précédemment dans nos laboratoires). **5** est donc l'isovitexine-7-O-glucoside appelé communément saponarine. Les spectres UV., le comportement chromatographique et le F. correspondent aux données de la littérature [10]. La saponarine a déjà été identifiée dans de nombreuses espèces végétales [11].

Composé 9. Les spectres UV. sont caractéristiques d'un flavonol possédant des groupes hydroxyle libres en 5, 7, 3' et 4' [3]. Les hydrolyses acide et enzymatique conduisent au glucose et à la quercétine **10** (pentahydroxy-3,5,7,3',4'-flavone) identifiée par comparaison avec un échantillon authentique (UV., Rf, F.). De ce fait, la position d'attache du sucre ne peut être qu'en 3. L'identité de **9** a encore été vérifiée par comparaison avec un échantillon authentique de 3-O- β -D-glucopyranosyl-tétrahydroxy-5,7,3',4'-flavone ou isoquercitrine [12].

L'isoquercitrine est un produit naturel très commun, mais cependant est décelé ici pour la première fois dans le genre *Gentiana*.

3. Discussion. – Les composés **1** et **2** sont les premiers C-glucosides flavoniques présentant une trisubstitution sur le cycle B, les C-glucosides connus jusqu'ici étant mono- ou disubstitués [11]. Le composé **4** est également un nouveau produit naturel, alors que **3** avait déjà été signalé par *Seikel et al.* [8] dans la famille des *Graminées*.

Le glucoside **5** (saponarine) en revanche a été identifié dans de nombreuses familles [11], mais pas encore dans les *Gentianacées*. Il est intéressant de remarquer que dans les O-glucosides de C-glucosides flavoniques **2–5**, le sucre hydrolysable se trouve en position 7. Cette position d'attache n'a pas été rencontrée dans les glycosides analogues identifiés dans d'autres espèces du genre *Gentiana* [13]. Elle pourrait être caractéristique de *Gentiana pyrenaica* L. qui selon *Favarger* [14] occupe une position particulière dans le genre.

Quant au composé **9**, sa présence est inattendue, les flavonols étant pratiquement absents dans le genre *Gentiana* [15].

Les auteurs remercient M. le Prof. *Cl. Favarger* de l'identification du matériel végétal et M. le Prof. *R. Tabacchi* de l'intérêt qu'il a porté à ce travail. Ils expriment leur gratitude au *Fonds National Suisse de la Recherche Scientifique* pour son support financier (crédit no 2.1600.74) ainsi qu'à la maison *Hoffmann-La Roche & Co SA* à Bâle pour le relevé des spectres RMN. 270 MHz.

Partie expérimentale

Le matériel végétal a été récolté dans la région du col de Puymorens, Pyrénées orientales, France.

160 g de poudre de feuilles et de tiges séchées ont été traités à chaud successivement par la ligroïne, Et₂O, CHCl₃ et MeOH. Les extraits à la ligroïne, à l'éther et au chloroforme ne contiennent pratiquement pas de polyphénols (vérification par CCM. sur polyamide *Macherey-Nagel* DC₁₁, solvant MeOH/AcOH/H₂O 90:5:5). L'extrait méthanolique, évaporé à sec, donne un résidu solide brun (36 g). Ce dernier est repris dans 120 ml de MeOH 50% et chromatographié en deux fois sur colonne de polyamide *Macherey-Nagel* SC₆ (6,5 cm × 125 cm) avec comme éluant MeOH 50% dont la teneur en MeOH est graduellement augmentée. Les différentes fractions obtenues sont analysées par CCM: a) sur polyamide *Macherey-Nagel* DC₁₁, MeOH/H₂O 9:1 (solvant a); b) sur cellulose F₅₀ *Merck*, *n*-BuOH/AcOH/H₂O 4:1:6 (solvant b); c) sur silicagel 60 F₂₅₄ *Merck*, AcOEt/MeOH/H₂O 10,5:2:1,5 (solvant c).

Ces fractions chromatographiées à nouveau sur colonne de cellulose microcristalline *Merck* (4 cm × 35 cm) avec le solvant b conduisent aux différents glycosides qui sont encore purifiés par passage sur Séphadex LH 20 (solvant MeOH).

Le composé **1** a été séparé par chromatographie préparative sur plaque de silicagel 60 *Merck*. Après élution de la plaque par le MeOH, **1** a également été purifié par chromatographie sur colonne de Séphadex LH 20. Les hydrolyses acide et enzymatique, l'analyse des sucres, ainsi que l'acétylation ont été effectuées comme décrit précédemment [16].

Données analytiques. – *Composé 1.* Quantité isolée: 10 mg. F. = 234–236° (déc.), recristallisé dans MeOH. R_f = 0,70 (solvant a), R_f = 0,37 (solvant b), R_f = 0,45 (solvant c). **1** isomérisé (pyrénine): R_f = 0,70 (solvant a), R_f = 0,28 (solvant b), R_f = 0,55 (solvant c).

Composé 2. Quantité isolée: 20 mg. F. = 208° (déc.), recristallisé dans MeOH. R_f = 0,85 (solvant a), R_f = 0,25 (solvant b), R_f = 0,11 (solvant c).

Composé 3. Quantité isolée: 15 mg. F. = 210–212°, recristallisé dans MeOH. R_f = 0,78 (solvant a), R_f = 0,30 (solvant b), R_f = 0,10 (solvant c).

Dérivé acétylé: F. = 135–137°, recristallisé dans EtOH.

Composé 4. Quantité isolée: 7 mg. F. = 198–200°, recristallisé dans MeOH. R_f = 0,75 (solvant a), R_f = 0,45 (solvant b), R_f = 0,20 (solvant c).

Dérivé acétylé de **4**: F. = 172°, recristallisé dans EtOH.

C₄₆H₅₀O₂₄ (986,87) Calc. C 55,98 H 5,07% Tr. C 55,97 H 5,44%

Composé 5. Quantité isolée: 8 mg. F. = 234°, recristallisé dans MeOH. R_f = 0,74 (solvant a), R_f = 0,51 (solvant b), R_f = 0,14 (solvant c).

Composé **9**, voir [12].

BIBLIOGRAPHIE

- [1] K. Hostettmann, A. Jacot-Guillarmod & V. M. Chari, *Helv. 59*, 2592 (1976).
- [2] A. Engler & K. Prantl, *Die natürlichen Pflanzenfamilien IV*, 2. Teil, Engelmann Verlag, Leipzig 1897.
- [3] K. Hostettmann, G. Bellmann, R. Tabacchi & A. Jacot-Guillarmod, *Helv. 56*, 3050 (1973).
- [4] T. J. Mabry, K. R. Markham & M. B. Thomas, *The Systematic Identification of Flavonoids*, Springer, New York 1970.
- [5] F. Wessely & G. H. Moser, *Mh. Chem. 56*, 97 (1930).
- [6] B. Gentili & R. M. Horowitz, *J. org. Chemistry 33*, 1571 (1968).
- [7] R. T. Sherwood, M. Shamma, J. L. Moniot & J. R. Kroschewski, *Phytochemistry 12*, 2275 (1973); P. Oelrichs, J. T. B. Marshall & D. H. Williams, *J. chem. Soc. 1968*, 941.
- [8] M. K. Seikel & A. J. Bushnell, *J. org. Chemistry 24*, 1995 (1959).
- [9] J. Chopin, M. L. Bouillant & A. Durix, *C. r. hebdom. Séances Acad. Sci. 260*, 4850 (1965).
- [10] M. K. Seikel & T. A. Geissmann, *Arch. Biochemistry Biophysics 71*, 17 (1957).
- [11] J. Chopin & M. L. Bouillant, in *The Flavonoids* (J. B. Harborne, T. J. Mabry & H. Mabry, éd.), Chapman and Hall, London 1975.
- [12] J. M. Schwendimann, R. Tabacchi & A. Jacot-Guillarmod, *Helv. 57*, 552 (1974).
- [13] K. Hostettmann, M. D. Luong, M. Goetz & A. Jacot-Guillarmod, *Phytochemistry 14*, 409 (1975); K. Hostettmann & A. Jacot-Guillarmod, *Helv. 57*, 204 (1974) et *58*, 130 (1975).
- [14] C. Favarger, communication personnelle.
- [15] P. Lebreton & M. P. Dangy-Caye, *Plant. médicin. et Phytothér. 1973*, VII, 87.
- [16] K. Hostettmann & A. Jacot-Guillarmod, *Helv. 59*, 1584 (1976).