

23. Contribution à la phytochimie du genre *Gentiana*. XXV.¹⁾

Etude des composés flavoniques et xanthoniques dans les feuilles de *Gentiana X marcaillhouana* RY. Nouveaux cinnamoyl-C-glucosides flavoniques

par Minh Duc Luong, Pierre Fombasso et André Jacot-Guillarmod

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

(6. XII. 79)

Phytochemistry of genus *Gentiana* XXV: Study of the flavonic and xanthonic compounds in leaves of *Gentiana X marcaillhouana* RY. New cinnamoyl-C-glucosyl-flavones

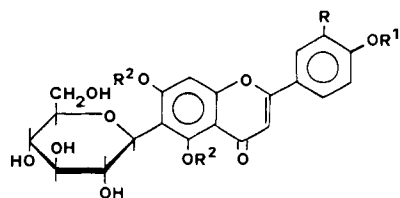
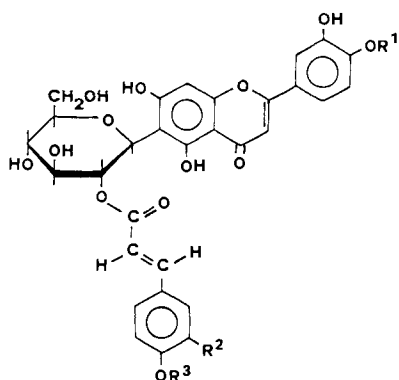
Summary

Nine flavonic compounds: isoorientin (1), isovitexin (2), isoorientin-4'-O- β -D-glucoside (3), isovitexin-4'-O- β -D-glucoside (4), luteolin-7-O- β -D-glucoside (5), *trans*-cafeoyl-2''-isoorientin (6), *trans*-feruloyl-2''-isoorientin (7), *trans*-*p*-coumaroyl-2''-isoorientin (8), *p*-O- β -D-glucosyl-*trans*-cafeoyl-2''-isoorientin (9) and three xanthonic: gentioside (10), isogentisine (11), mangiferin (12), have been identified from leaves of *Gentiana X marcaillhouana* RY. Compounds 8 and 9 were described for the first time. The cyclitol L-(+)-bornesitol (13) has been also isolated.

1. Introduction. - Bien que les espèces *Gentiana lutea* L. et *Gentiana burseri* LAPEYR. aient toutes deux fait l'objet de diverses investigations chimiques [2] [3], aucune étude correspondante n'a été entreprise avec l'hybride: *Gentiana X marcaillhouana* RY. Rappelons que les deux premières espèces citées se caractérisent, comme d'ailleurs toutes les espèces de la section *Gentiana* (*Coelanthe Grisebach*), par la présence uniforme, dans les organes aériens, des C-glucosides flavoniques: isoorientine (1), isovitexine (2) et de leurs 4'-O-glucosides (3 et 4). *Gentiana lutea* L. se différencie toutefois par la présence de xanthones, à savoir: gentioside (10), isogentisine (11) et mangiférine (12). Nos études récentes concernant *Gentiana burseri* LAPEYR. ont mis en évidence l'existence des cinnamoyl-2''-C-glucosyl-flavones 6, 7, 14 et 15 [4]. L'examen de l'héritage en composés polyphénoliques de l'hybride présente d'autant plus d'intérêt que d'importants phénomènes d'hybridation sont survenus au cours de l'évolution de la section *Gentiana*.

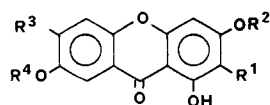
Le présent mémoire a trait à l'isolement et à la détermination de structure de trois xanthones (10-12), de cinq flavones (1-5) et de quatre cinnamoyl-2''-C-gluco-

¹⁾ Partie XXIV., v. [1].

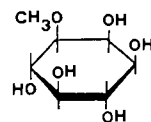
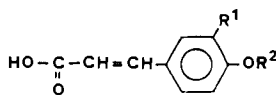
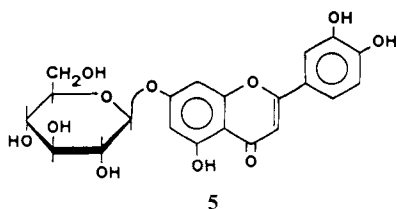


- 1 R=OH, R¹=R²=H
 2 R=H, R¹=R²=H
 3 R=OH, R¹=β-D-glucosyle, R²=H
 4 R=H, R¹=β-D-glucosyle, R²=H
 20 R=OCH₃, R¹=R²=CH₃

- 6 R¹=R³=H, R²=OH
 7 R¹=R³=H, R²=OCH₃
 8 R¹=R²=R³=H
 9 R¹=H, R²=OH, R³=β-D-glucosyle
 14 R¹=R³=β-D-glucosyle, R²=OH
 15 R¹=β-D-glucosyle, R²=OCH₃, R³=H



- 10 R²=primevérosyle, R¹=R³=H, R⁴=CH₃
 11 R¹=R²=R³=H, R⁴=CH₃
 12 R¹=β-D-glucosyle, R²=R⁴=H, R³=OH



- 16 R¹=R²=H
 17 R¹=H, R²=CH₃
 18 R¹=OH, R²=H
 19 R¹=OCH₃, R²=H

syl-flavones (6-9), dont deux (8 et 9) sont décrites pour la première fois. Les structures de ces nouveaux composés sont: *trans-p*-coumaroyl-2'' isoorientine (8); *p*-β-D-glucosyl-*trans*-cafeoyl-2'' isoorientine (9). Le L-(+)-bornesitol, dont la présence avait été relevée dans toutes les espèces de la section *Gentiana* [5] a également été identifié.

2. Résultats. - 2.1. *Isolement des composés.* L'extraction a été réalisée comme décrit précédemment [3]. Les substances 1 à 13 ont été obtenues à partir de l'extrait méthanolique selon le schéma de séparation ci-après.

2.2. *Détermination des structures. Composés 1-7 et 10-13.* L'identification de toutes ces substances a été effectuée par comparaison avec des échantillons authentiques isolés par nos soins lors des travaux antérieurs. Les critères de comparaison pour les polyphénols reposaient sur le comportement chromatographique dans plusieurs systèmes de solvants, le comportement aux hydrolyses enzymatique et acide, l'étude des spectres UV, en présence des réactifs usuels [6] et du spectre IR, ainsi que la détermination du point de fusion. Pour le composé 13, la com-

Tableau 1. Spectres UV. (max. en nm, solvant = MeOH, sh. = épaulement)

Composé	Solvant pur	Solvant additionné de			
		AlCl ₃	AlCl ₃ /HCl	NaOAc	NaOMe
8	272, 295 sh., 317, 350	278, 303 sh., 324, 421	279, 298, 320, 383 sh.	280, 300 sh., 313, 386	272, 312 sh., 362, 400 sh.
9	272, 280 sh., 328	277, 300 sh., 330, 416	280, 295 sh., 335, 382 sh.	272, 295 sh., 320 sh., 404	272, 278 sh., 300 sh., 408
16	295, 310	320	296, 312	283, 310 sh.	307, 330
17	294, 307	316	295, 312	285, 310 sh.	285, 310 sh.
19	293, 322	308, 335	297, 326	284, 311	259, 293, 343

paraison concernait le comportement chromatographique, le pouvoir rotatoire, le spectre IR. et le point de fusion.

Composé 8. L'hydrolyse acide (HCl 2N) conduit d'une part à l'isoorientine (1), avec isomérisation en orientine, et d'autre part aux isomères *cis* et *trans* de l'acide *p*-coumarique (16) (identification CCM. et UV.). Le spectre UV. de 8 dans le méthanol n'est pas caractéristique de celui d'une flavone, en ce sens que la bande II est dédoublée (350 et 318 nm). Toutefois, l'addition des réactifs usuels permet de localiser les deux groupes hydroxyle en les positions 3' et 4' de l'isoorientine (AlCl₃, 420 nm) et les groupes hydroxyle en les positions 5 (AlCl₃+HCl) et 7 (NaOAc). L'acide *p*-coumarique est donc fixé sur la partie C-glucosidique de l'isoorientine et cela par l'intermédiaire d'une fonction ester (C=O 1685 cm⁻¹); la méthylation de 8 (diazométhane) suivie de l'hydrolyse acide conduit d'ailleurs à

Schéma de séparation

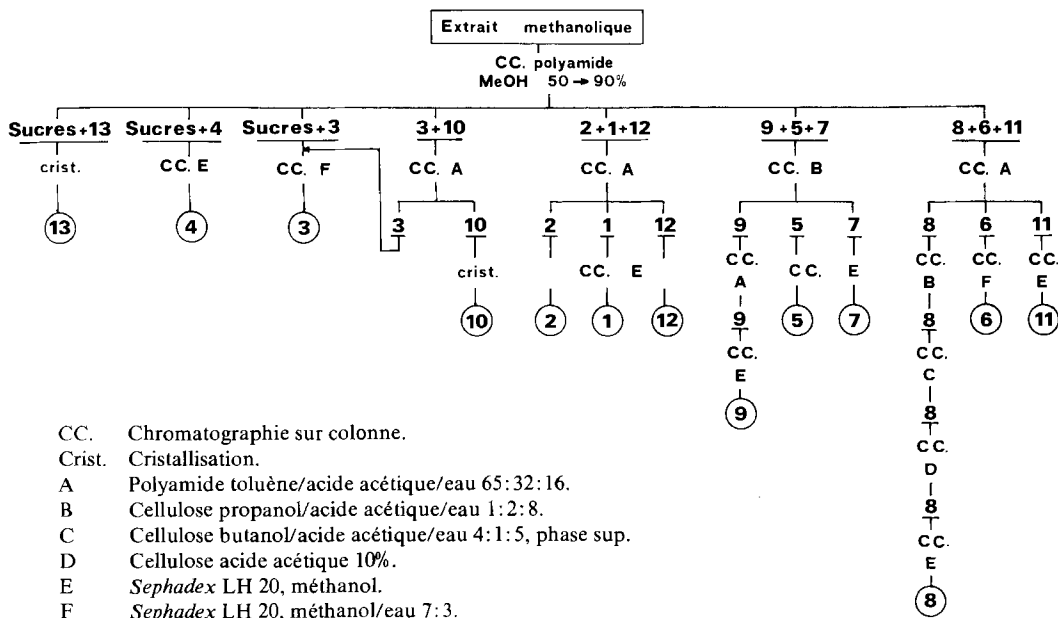


Tableau 2. Relevé des spectres H^1 -RMN.^{a)} des dérivés acétylés de **8** et **9**.

A. Déplacements chimiques de H et Ac aromatiques

Reste flavonique										
	AcO-C(3')	AcO-C(4')	AcO-C(5')	AcO-C(7)	H-C(3)	H-C(8)	H-C(2')	H-C(5')	H-C(6')	
Dérivé acétylé de 8	2,31	2,32			6,51	7,30	7,64 (2)	7,35 (9)	7,69	
Dérivé acétylé de 9	2,31	2,32			6,55	7,31	7,64 (2)	7,38 (9)	7,69	
Reste cinnamoyle										
	AcO-C(3)	AcO-C(4)	AcO-C(2)	H-C(3)	H-C(5)	H-C(6)	CH=CH	H α	H β	
Dérivé acétylé de 8	-	2,27	7,30 (9)	7,03 (9)	7,03 (9)	7,30 (9)	6,05 (16)	6,05 (16)	7,39 (16)	
Dérivé acétylé de 9	2,25	-	7,18-7,35	-	6,96 (9)	7,18-7,35	6,04 (16)	6,04 (16)	7,40 (16)	

B. Déplacements chimiques des H et Ac aliphatiques (parties C-glucosidique et O-glucosidique)

	Nombre de H	H-C(1'')		H-C(1''')		Nombre de Ac
		b)	(10)	c)	(11)	
Dérivé acétylé de 8	7	3,80-5,90	(10)	(11)	3	2,06, AcO-C(6'') ^{b)}
Dérivé acétylé de 9	14	3,80-5,90	(10)	(11)	7	2,06, AcO-C(3'') ^{b)} 2,05, 2,06 2,07

^{a)} Enregistrés à 200 MHz dans CDCl₃ (δ en ppm par rapport au TMS pris comme référence interne; entre parenthèses *J* en Hz).
^{b)} C-Glucosidique.
^{c)} O-Glucosidique.

Tableau 3. *Distribution des polyphénols chez l'hybride G. Xmarcaillhouana et chez les parents*

	Glucosides flavoniques					Cinnamoyl-flavones					Xanthones			Cyclitol	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	14	15	10	11		12
<i>G. lutea</i> [2] [3]	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
<i>G. burseri</i> [2] [4] [7]	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
<i>G. Xmarcaillhouana</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+

+ = Présence. - = Absence.

l'acide *p*-méthoxycinnamique (**17**) et à la tétraméthyl-isoorientine (**20**). La position d'attache de l'acide est déterminée par l'absence du signal du groupe acétyle en position 2'' (domaine 1,70-1,82 ppm) dans le spectre H¹-RMN. du dérivé acétylé de **8**. Le signal du proton aromatique à 4,92 ppm ($J=10$ Hz, H-C(1'')) attribue à la partie C-glucosidique la configuration β ; les signaux des deux protons éthyléniques à 6,05 ppm ($J=16$ Hz, H _{α}) et 7,39 ppm ($J=16$ Hz, H _{β}) la configuration *trans* à l'acide *p*-coumarique. Le composé **8** est donc le *trans-p*-coumaroyl-2''-isoorientine.

Composé 9. Les spectres UV. en présence des réactifs usuels sont caractéristiques de ceux d'une flavone portant des groupes hydroxyle libres en les positions (ortho) 3' et 4', 5 et 7. L'hydrolyse enzymatique (β -glucosidase) libère le composé **6**, lequel s'hydrolyse en milieu acide pour donner le mélange isoorientine/orientine et l'acide caféique (**18**) (mélange *cis/trans*, identification CCM, et UV.). Le glucose est fixé en position *para* sur le reste caféoylé, puisque la méthylation de **9**, suivie de l'hydrolyse acide, mène d'une part à l'isoorientine méthylée (**20**) et d'autre part à l'acide férulique (**19**). Il s'agit donc de la *p-O- β -D-glucosyl-trans-caféoyl-2''-isoorientine* comme le confirme le spectre H¹-RMN. du dérivé acétylé. On y note l'absence du signal acétyle en position 2'' (position d'attache du reste caféoylé), les signaux des protons aromatiques H-C(1'') à 4,92 ppm avec $J=10$ Hz (C- β -glucosyle), H-C(1''') à 4,10 ppm avec $J=11$ Hz (O- β -glucosyle), les signaux des protons éthyléniques H _{α} à 6,04 ppm avec $J=16$ Hz et H _{β} à 7,40 ppm avec $J=16$ Hz (*trans*-caféoylé).

3. Discussion. - La comparaison de la répartition des polyphénols chez les parents et dans l'espèce hybride (Tableau 3) montre que l'héritage est transmis dans une grande mesure. Les xanthones **10-12** présentes exclusivement chez *Gentiana lutea* L. se retrouvent chez l'hybride. Il en est de même des cinnamoyl-C-glucosyl-flavones **6-8** propres à *Gentiana burseri* LAPEYR. Notons que le composé **8** se présente en quantité importante chez l'hybride, alors qu'il n'est qu'à l'état de trace chez le parent *Gentiana burseri* LAPEYR. [7]. Chez l'hybride, il apparaît que les systèmes enzymatiques contrôlant l'acylation et la O-glucosylation doivent être quelque peu différents, en raison de l'existence des composés **8** et **9**. Cette suggestion est d'autant plus justifiée que nous avons été à même d'isoler chez l'hybride, un nouveau cinnamoyl-C-glucoside flavonique, inexistant chez les parents, lequel fera l'objet d'une communication ultérieure [8].

Les auteurs remercient le Prof. Cl. Favarger de l'identification du matériel végétal, le Prof. R. Tabacchi de l'intérêt qu'il a porté à ce travail ainsi que M. S. Claude de sa collaboration pour le relevé des spectres H¹-RMN. à 200 MHz.

Partie expérimentale

Généralités. Voir [1-6].

Isolement et techniques analytiques. Le matériel végétal a été récolté dans les Pyrénées centrales (Val d'Esquiery) au moment de la floraison (mi-juillet). 200 g de poudre de feuilles séchées ont fourni 100 mg de **1**, 20 mg de **2**, 150 mg de **3**, 5 mg de **4**, 5 mg de **5**, 30 mg de **6**, 11 mg de **7**, 13 mg de **8**, 15 mg de **9**, 7 mg de **10**, 6 mg de **11**, 10 mg de **12** et 30 mg de **13**.

Les séparations sur colonne ont été réalisées à l'aide de polyamide *Macherey-Nagel* SC₆, de cellulose microcristalline *F Merck* et de *Sephadex* LH 20 *Pharmacia*.

Les systèmes chromatographiques pour les analyses CCM. sont: polyamide *Macherey-Nagel* DC6 (MeOH/H₂O 7:3, solvant a) et cellulose microcristalline *Merck* (AcOH 10%, solvant b).

Données analytiques. Composés 1-7, 10-13. Comparaison avec des échantillons authentiques précédemment identifiés dans nos laboratoires.

Composé 8. F. 212° (déc.); Rf 0,21 (solvant a), Rf 0,30 (solvant b). - IR.: 1685 cm⁻¹ (C=O, ester). Dérivé acétylé recristallisé dans EtOH, F. 120° (déc.).

Composé 9. F. 228° (déc.); Rf 0,34 (solvant a), Rf 0,33 (solvant b). - IR.: 1690 cm⁻¹ (C=O, ester). Dérivé acétylé recristallisé dans EtOH, F. 145° (déc.).

Composés 16-19 (mélange *cis-trans*). Analyse CCM. polyamide *Macherey-Nagel* DC6 (MeOH/H₂O 7:3), cellulose microcristalline *F Merck* (AcOH 5%) et silicagel 60 F254 *Merck* (toluène/MeOH/AcOH 45:8:4).

Révélation Echtsalts B (*Fluka*) 0,2%, H₂O.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] *M. Goetz & A. Jacot-Guillarmod*, *Helv.* 61, 1373 (1978).
- [2] *G. Bellmann & A. Jacot-Guillarmod*, *Helv.* 56, 284 (1973); *K. Hostettmann, M. D. Luong, M. Goetz & A. Jacot-Guillarmod*, *Phytochemistry* 14, 499 (1975).
- [3] *K. Hostettmann, G. Bellmann, R. Tabachi & A. Jacot-Guillarmod*, *Helv.* 56, 3050 (1973).
- [4] *A. Jacot-Guillarmod, M. D. Luong & K. Hostettmann*, *Helv.* 58, 1477 (1975); *M. D. Luong, K. Hostettmann & A. Jacot-Guillarmod*, *Helv.* 59, 1294 (1976).
- [5] *G. Bellmann & A. Jacot-Guillarmod*, *Helv.* 56, 773 (1973); *K. Hostettmann & A. Jacot-Guillarmod*, *Phytochemistry* 13, 1625 (1974).
- [6] *T.J. Mabry, K.R. Markham & M.B. Thomas*, 'The Systematic Identification of flavonoids', Springer, New York 1970.
- [7] *M. D. Luong*, Thèse, Université de Neuchâtel 1978.
- [8] *M. D. Luong, P. Fombasso & A. Jacot-Guillarmod*, *Helv.*, à paraître.