

**280. Contribution à la phytochimie du genre *Gentiana*. XXVI.¹⁾
Identification d'une nouvelle di-*O*-glucosyl cinnamoyl-*C*-glucosylflavone
extraite des feuilles de *Gentiana X marcaillhouana* RY.**

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

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

(6.VIII.81)

**Phytochemistry of Genus *Gentiana*. XXVI. Identification of a New Di-*O*-glucosyl
Cinnamoyl-*C*-glucosylflavone in the Leaves of *Gentiana X marcaillhouana* RY.**

Summary

A new di-*O*-glucosyl cinnamoyl-*C*-glucosylflavone has been identified as 4'-*O*- β -D-glucosyl-2''-*O*-[2-*O*- β -D-glucosyl-2,4,5-trihydroxy-(*E*)-cinnamoyl]isoorientin (**1**).

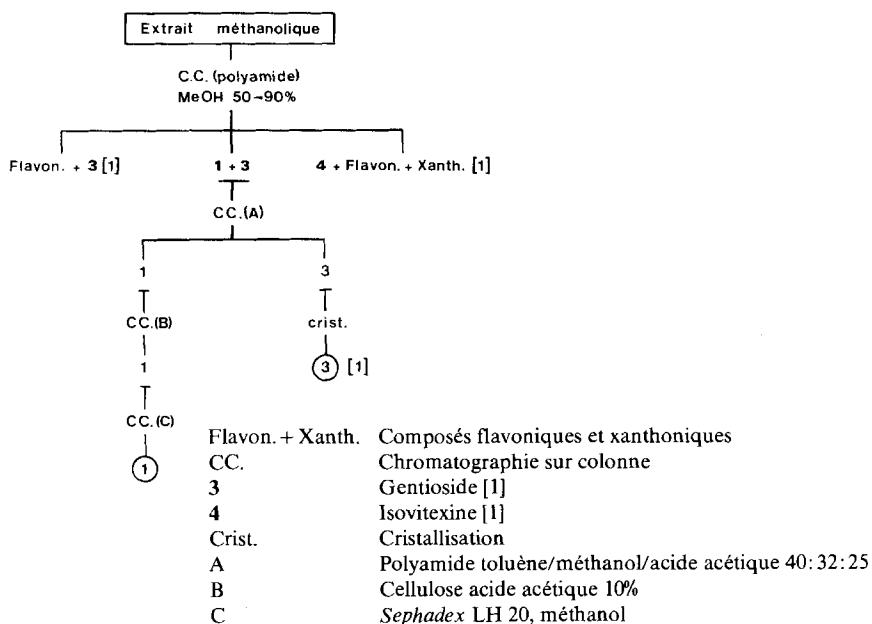
Introduction. - Dans une étude [1] consacrée à l'hybride *Gentiana X marcaillhouana* RY. (*Gentiana lutea* L. X *Gentiana burseri* LAPEYR.), nous avons décrit deux nouveaux cinnamoyl-*C*-glucosides flavoniques: la *O*-[p-coumaroyl-(*E*)]-2''-isoorientine et la *O*-[*O*- β -D-glucosyl-4-cafeoyl-(*E*)]-2''-isoorientine. Le présent mémoire a trait à l'isolement et à la détermination de structure d'un nouveau composé: *O*- β -D-glucosyl-4'-*O*-[*O*- β -D-glucosyl-4-trihydroxy-2,4,5-cinnamoyl-(*E*)]-2''-isoorientine (**1**). Rappelons que lors de l'étude phytochimique de *Gentiana burseri* LAPEYR. [2], nous avons isolé un composé de structure analogue, la *O*- β -D-glucosyl-4'-*O*-[*O*- β -D-glucosyl-4-cafeoyl-(*E*)]-2''-isoorientine (**2**). L'identification de **1** a nécessité la synthèse de l'acide hydroxy-4-diméthoxy-2,5-cinnamique (**11**) lequel, à notre connaissance, n'a pas encore été décrit.

Résultats. - *Isolement du composé 1.* L'extraction a été réalisée comme précédemment [3]. La substance **1** a été obtenue à partir de l'extrait méthanolique selon le schéma de séparation ci-après.

Structure du composé 1. Le spectre UV. de **1** (*Tableau*) dans le méthanol est caractéristique de celui d'un composé flavonique (273 et 327 nm). Les déplacements causés par les réactifs usuels [4] révèlent la présence de groupes hydroxyles en positions 5 (AlCl₃+HCl) et 7 (NaOAc), d'un groupe *O*-substitué en position 4' (NaOMe) et l'absence de groupes *o*-hydroxyle. Le comportement chromatographique de **1** (polyamide/MeOH 70%) correspond à celui d'un di-*O*-glycosyl-*C*-

¹⁾ Partie XXV: [1].

Schéma de séparation



glycoside flavonique. Cela est confirmé par l'hydrolyse enzymatique (β -glucosidase, v. partie expérimentale) qui conduit au composé flavonique **5**, non encore décrit, porteur de groupes hydroxyle (spectre UV./AlCl₃, *Tableau*) dont le R_f est inférieur à celui de la *O*-cafeoyl-(*E*)-2''-isoorientine (**6**) déjà isolée et identifiée [1] [2]. L'hydrolyse acide (HCl 2 N) de **5** produit d'une part l'isoorientine (**7**) s'isomérisant en orientine [5] et d'autre part l'asculéine **8** (dihydroxy-6,7-coumarine, identifiée par CCM., UV.) résultant de l'estérification intramoléculaire de l'acide trihydroxy-2,4,5-cinnamique (**9**) [6]. Il apparaît donc que **1** est une di-*O*-glucosylisoorientine acylée (C=O d'ester à 1700 cm⁻¹) sur la partie C-glucosidique par l'acide **9**.

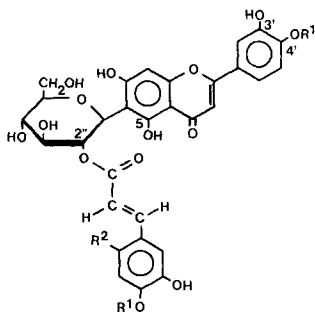
Les positions d'attache des deux unités de glucose se trouvent en position 4, d'une part sur le cycle B de l'isoorientine (**7**) et d'autre part, sur le noyau aromatique de l'acide **9**. En effet, la méthylation de **1** par le diazométhane suivie de

Tableau. Spectres UV. des composés **1**, **5**, **8** et **11** (max. en nm, solvant = MeOH, S = épaulement)

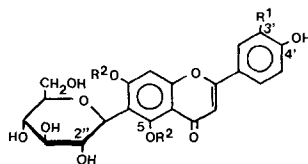
Composé	Solvant pur	Solvant additionné de			
		AlCl ₃	AlCl ₃ /HCl	NaOAc	NaOMe
1	273, 287 S	280, 289 S	280, 289 S	279, 315, 374	265, 295 S
	327	335, 382 S	333, 382 S		374
5	271, 330	273, 300 S	277, 294 S	271, 390	273, 300 S
		410	342, 380 S		410
8	258, 298, 347	273, 315 S	258, 298, 347	275, 392	280, 400
		380			
11	243, 295, 356	248, 302, 368	243, 295, 356	275, 343	306, 366

l'hydrolyse acide donne naissance à la *O*-triméthyl-5,7,3'-isoorientine (**10**) [7] et à l'acide hydroxy-4-diméthoxy-2,5-cinnamique (**11**) (comparaison: CCM., CLHP., UV.). Le composé **1** possède la structure de *O*- β -D-glucosyl-4'-*O*-[*O*- β -D-glucosyl-4-trihydroxy-2,4,5-cinnamoyl-(*E*)]-2''-isoorientine. La confirmation finale est fournie par le spectre H¹-RMN.²⁾ du dérivé acétylé de **1**:

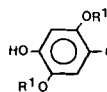
a) Partie *O*-glucosyl-C-glucoside flavonique: 5 protons aromatiques à 7,65 ($J=2$ et 9 Hz, H-C(6')) ; 7,55 (H-C(2')) ; 7,40 ($J=9$ Hz, H-C(5')) ; 7,30 (H-C(8)) ; 6,50 (H-C(3)) ; 21 protons aliphatiques entre 3,80 et 5,85 et à 4,92 ($J=10$ Hz, H-C(1''), C- β -glucosyle) ; 3 groupes acétoxyles aromatiques à 2,51 (AcO-C(5)) et AcO-C(7)) ; 2,31 (AcO-C(3')) ; absence du groupe acétoxyle aliphatique AcO-C(2'') (position d'attache du reste acyle) ; 11 groupes acétoxyles aliphatiques entre 2,0 et 2,10.



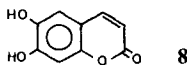
- 1** R¹ = β -D-glucosyl, R² = OH
2 R¹ = β -D-glucosyl, R² = H
5 R¹ = H, R² = OH
6 R¹ = H, R² = H



- 4** R¹ = R² = H
7 R¹ = OH, R² = H
10 R¹ = OCH₃, R² = CH₃



- 9** R¹ = H
11 R¹ = CH₃



b) Partie acyle: 2 protons aromatiques à 7,15 (H-C(6)) et à 6,55 (H-C(3)) ; 2 protons éthyléniques à 6,06 ($J=16$ Hz, H(α)) et 7,57 ($J=16$ Hz, H(β)) (configuration *E*) ; 2 groupes acétoxyles aromatiques à 2,25 (AcO-C(2)) et à 2,30 (AcO-C(5)).

Synthèse de l'acide 11. La réaction de *Friedel-Crafts* (AcCl/AlCl₃) sur le *p*-diméthoxybenzène fournit la diméthoxy-2,5-acétophénone (50%) laquelle subit l'oxydation de *Baeyer-Villiger* par l'acide peracétique pour donner l'acétate de diméthoxy-2,5-phényle (71%) puis la saponification (KOH/EtOH) pour donner le diméthoxy-2,5-phénol (80%) [8]. Celui-ci soumis à la réaction de *Gattermann* (Zn(CN)₂/HCl) [9] donne l'hydroxy-4-diméthoxy-2,5-benzaldéhyde (74,5%) lequel conduit à l'acide hydroxy-4-diméthoxy-2,5-cinnamique-(*E*) (**11**) (90%) par la réaction de *Knoevenagel* (CH₂(COOH)₂/pyridine/aniline) [10] [11]. Les analyses spectrales de l'acide **11** et des dérivés acétylé³⁾ et méthylé³⁾ ainsi que l'ester méthylé³⁾

²⁾ Enregistré à 200 MHz dans CDCl₃ (δ en ppm par rapport au TMS pris comme référence interne).

³⁾ Composés (*E*). Ceux-ci ont été isomérisés en mélanges (*Z*)/(*E*) (HCl) pour l'analyse CLHP. Ils peuvent s'isomériser spontanément lors de l'analyse CCM.

confirment la structure de l'acide synthétisé. A notre connaissance, l'acide **11** et l'aldéhyde correspondant n'ont pas encore été décrits.

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 Dr. *S. Claude* de sa collaboration pour le relevé des spectres H^1 - et C^{13} -RMN. et des spectres de masse.

Partie expérimentale

Généralités. Voir [1-3].

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 19,5 mg de **I**.

Les séparations par chromatographie sur colonne ont été réalisées à l'aide de polyamide SC6 (0,05-0,20 mm) *Macherey-Nagel*, de cellulose microcristalline *Macherey-Nagel* et de *Sephadex LH 20 Pharmacia*.

Systèmes chromatographiques pour les analyses par chromatographie sur couche mince (CCM.): A) polyamide DC6 *Macherey-Nagel*, MeOH/H₂O 7:3; B) et B') cellulose 400-10 UV 254 *Macherey-Nagel*, AcOH 10% et 5%; C) silicagel 60 F 254 *Merck*, heptane/AcOEt/AcOH 7:2:1. Les révélateurs employés sont KOH 2N/MeOH pour les composés flavoniques et Echtsaltsz B (*Fluka*) 0,2% H₂O et la *p*-nitraniline diazotée pour les acides phénoliques et leurs dérivés.

Conditions pour les analyses par chromatographie liquide sous haute pression (CLHP.): D) colonne *Knauer* 250×4,6 mm, phase stationnaire Lichrosorb RP-8 7 μ , pression 165 b (1,8 ml/min), détection UV. 300 nm, solvant MeOH/THF/AcOH/H₂O 49:1:5:45; E) colonne *Macherey-Nagel* 250×4 mm, phase stationnaire Nucléosile 50-7, pression 105 bar (1,8 ml/min), détection UV. 300 nm, solvant toluène/AcOH 99:1. Les analyses ont été réalisées avec le chromatographe *Siemens* S 111 et le détecteur *Perkin-Elmer* LC-55.

Les spectres UV. (λ_{max} , nm) ont été enregistrés sur spectrophotomètre *Perkin-Elmer* 402, les spectres IR. (cm^{-1} , KBr) sur appareil *Perkin-Elmer* 521 et les spectres de masse (intensité en % des pics principaux) sur spectrographe *Hitachi Perkin-Elmer* RMU-6L par introduction directe. Les spectres H^1 -RMN. (δ en ppm) ont été effectués à 60 MHz sur appareil *Hitachi Perkin-Elmer* R-24B et à 200 MHz sur appareil *Brüker* WP-200. Le spectre C^{13} -RMN. (δ en ppm) a été relevé à 50,29 MHz au moyen d'un appareil *Brüker* WP-200.

Composé I. F. 240° (déc.); Rf (A) 0,62, Rf (B) 0,45. - UV.: voir *Tableau*. - IR.: 3400, 2910, 2850, 1700 (C=O, ester), 1650, 1625, 1580, 1510, 1490, 1440, 1350, 1270, 1200, 1070. Dérivé acétylé recristallisé dans EtOH, F. 152-155° (déc.). - H^1 -RMN.: voir texte.

Acide hydroxy-4-diméthoxy-2,5-cinnamique (11)³. F. 178-180°; Rf (A) 0,47, Rf (B') 0,27 (E) et 0,49 (Z). Rf (C) 0,29; t_R (D) 3,4 min, t_R (E) 14,7 min (E) et 23,5 min (Z). - UV.: voir *Tableau*. - IR. (KBr): 3425, 2950, 1650, 1600, 1580, 1520, 1465, 1445, 1420, 1270, 1220, 1180, 1120, 1035, 980, 885, 840, 810, 660. - H^1 -RMN. (200 MHz, (CD₃)₂CO): 2,93 (2 H, OH et COOH échangés avec H₂O du solvant); 3,85 (3 H, OCH₃); 3,88 (3 H, OCH₃); 6,38 ($J=16$ Hz, 1H, Ha,E); 6,59 (1H, H-C(3)); 7,27 (1H, H-C(6)); 7,95 ($J=16$ Hz, 1H, H β ,E). - C^{13} -RMN. (DMSO): 56,0 (OCH₃); 56,5 (OCH₃); 100,6 (C arom.); 112,2 (C arom.); 113,1 (C(1')); 115,3 (C(2)); 138,9 (C(3)); 142,1, 150,6, 153,6 (3 C, C(2'), C(4'), C(5')); 168,3 (COOH). - SM. (160°): 224 (94, M⁺), 209 (34), 193 (20), 177 (77), 165 (26), 163 (29), 149 (63), 137 (32), 135 (27), 133 (55), 121 (164), 81 (27), 79 (31), 77 (30), 69 (100), 65 (50), 53 (28), 51 (54), 50 (25), 39 (29).

Acide acétoxy-4-diméthoxy-2,5-cinnamique-(E)³. Recristallisé dans EtOH/H₂O, F. 192-194°; Rf (A) 0,53, Rf (B') 0,44 (E) et 0,77 (Z), Rf (C) 0,30; t_R (D) 15,9, t_R (E) 18,8 (E). - UV. (MeOH): 232, 280, 347 (MeOH); 231, 247, 290, 361 (AlCl₃); 232, 283, 349 (HCl). - H^1 -RMN. (60 MHz, CDCl₃): 2,3 (3 H, AcO); 3,85 (6 H, 2 OCH₃); 6,45 ($J=16$ Hz, 1H, Ha,E); 6,65 (1H, H-C(3)); 7,1 (1H, H-C(6)); 7,8 (1H, COOH); 8,0 ($J=16$ Hz, 1H, H β ,E). - SM. (170°): 226 (82, M⁺), 225 (69), 224 (100), 209 (85), 193 (40), 178 (22), 177 (88), 165 (22), 163 (25), 149 (34), 133 (32), 69 (48), 43 (56), 28 (31), 18 (25), 15 (22).

Hydroxy-4-diméthoxy-2,5-cinnamate-(E) de méthyle³. Recristallisé dans MeOH/H₂O, F. 110-112°; Rf (A) 0,56, Rf (B') 0,25 (E) et 0,44 (Z). Rf (C) 0,35; t_R (D) 5,1 min, t_R (E) 12,6 min (E) et 21,4 min (Z). -

UV. (MeOH): 223, 243, 296, 358 (MeOH); 223, 243, 296, 358 (AlCl₃); 222, 257, 315, 398 (NaOMe); 223, 303, 396 (NaOAc). - ¹H-RMN. (200 MHz, CD₃OD): 3,75 (3 H, COOCH₃); 3,8 (3 H, OCH₃); 3,83 (3 H, OCH₃); 4,90 (1 H, OH); 6,35 (*J* = 16 Hz, 1 H, H_a, *E*); 6,5 (1 H, H-C(3)); 7,1 (1 H, H-C(6)); 7,9 (*J* = 16 Hz, 1 H, H_β, *E*).

*Triméthoxy-2,4,5-cinnamate-(E) de méthyle*³. Recristallisé dans MeOH/H₂O, F. 90-92°; Rf (A) 0,62, Rf (B') 0,20 (*E*) et 0,40 (*Z*), Rf (C) 0,38; t_R (D) 6,5 min, t_R (E) 14,8 min (*E*) et 15,9 (*Z*). - ¹H-RMN. (200 MHz, CD₃OD): 3,75 (3 H, COOCH₃); 3,8 (3 H, OCH₃); 3,85 (3 H, OCH₃); 3,87 (3 H, OCH₃); 6,40 (*J* = 16 Hz, 1 H, H_a, *E*); 6,65 (1 H, H-C(3)); 7,15 (1 H, H-C(6)); 7,95 (*J* = 16 Hz, 1 H, H_β, *E*).

Hydroxy-4-diméthoxy-2,5-benzaldéhyde. F. 194-196°; Rf (A) 0,63, Rf (B') 0,50. Rf (C) 0,25. - UV. (MeOH): 240, 281, 347 (MeOH); 235, 291, 346 (AlCl₃); 240, 282, 347 (HCl); 223, 256, 306, 369 (NaOMe); 231, 257, 304, 367 (NaOAc). - IR. (KBr): 3100, 1640, 1610, 1570, 1500, 1470, 1440, 1420, 1310, 1280, 1215, 1113, 1003, 865, 740, 700, 640, 580. - ¹H-RMN. (60 MHz, DMSO): 3,8 (3 H, OCH₃); 3,9 (3 H, OCH₃); 6,7 (1 H, H arom.); 7,3 (1 H, H arom.); 10,2 (1 H, CHO); 10,4 (1 H, OH). - SM. (170°): 182 (100, M⁺), 167 (85), 165 (21), 139 (27), 136 (37), 111 (41), 69 (27), 39 (22), 28 (22).

Hydrolyse enzymatique. A la substance (1 mg) à traiter dissoute dans 4 ml de solution tampon AcOH/AcONa 0,5M pH 5. Sont ajoutés 2 mg d'enzyme β-glucosidase (*Fluka purum*). Le mélange est ensuite laissé reposer à la température de 37°. Après 24 heures, celui-ci est extrait au BuOH. L'extrait est purifié par filtration sur une petite colonne (l = 10 cm, d = 1 cm, solvant = MeOH) de *Sephadex* LH 20 et analysé.

Acétylation. A un mélange constitué de 10 ml Ac₂O (*Fluka puriss*) fraîchement distillé, 2 ml de pyridine (*Fluka puriss*) séchée sur KOH et une pointe de spatule de NaOAc anhydre on ajoute 10 mg de substance. La suspension est maintenue sous agitation constante pendant 24 heures à température ambiante. Le mélange réactionnel est ensuite analysé par CCM. pour s'assurer que l'acétylation est complète. Dans le cas contraire, le temps de réaction est prolongé et éventuellement un chauffage à 40° du mélange s'avère nécessaire. Le mélange est alors concentré sous pression réduite à 50° et 30 ml d'eau désionisée froide y sont additionnés. Le précipité formé est recueilli par filtration et lavé avec beaucoup d'eau désionisée. Le dérivé acétylé ainsi obtenu est ensuite recristallisé.

Méthylation. La substance (3-50 mg) est dissoute dans le minimum de MeOH absolu. Après l'addition d'un excès de solution étherée de diazométhane [12] (10 fois la quantité théorique nécessaire), le mélange est gardé pendant 48 heures à 4° puis encore 24 heures à température ambiante. Il est ensuite analysé par CCM. Dans le cas où la méthylation est incomplète, le mélange est évaporé à sec et retraité au diazométhane (5 fois la quantité théorique requise) comme précédemment. Le dérivé méthylé est purifié par passage sur une colonne de *Sephadex* LH 20 avec MeOH comme solvant.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] M. D. Luong, P. Fombasso & A. Jacot-Guillarmod, *Helv. Chim. Acta* 63, 244 (1980).
- [2] A. Jacot-Guillarmod, M. D. Luong & K. Hostettmann, *Helv. Chim. Acta* 58, 1477 (1975).
- [3] K. Hostettmann, G. Bellmann, R. Tabacchi & A. Jacot-Guillarmod, *Helv. Chim. Acta* 56, 3050 (1973).
- [4] T. J. Mabry, K. R. Markham & M. B. Thomas, 'The Systematic Identification of Flavonoïds', Springer, New York 1970.
- [5] F. Wessely & G. H. Moser, *Mh. Chem.* 56, 97 (1920).
- [6] P. Ribéreau-Gayon, «Les Composés Phénoliques des Végétaux», Dunod, Paris 1968.
- [7] K. Hostettmann & A. Jacot-Guillarmod, *Helv. Chim. Acta* 58, 130 (1975).
- [8] C. A. Bartram, *J. Chem. Soc.* 1963, 4691.
- [9] A. I. Vogel, 'Practical Organic Chemistry', Longman, London 1978.
- [10] F. Vorsatz, *J. Prakt. Chem.* 145, 265 (1936).
- [11] K. Freudenberg & R. Dillenburger, *Chem. Ber.* 84, 69 (1951).
- [12] Th. J. De Boer & H. J. Backer, *Organic Syntheses* 4, 250 (1963).