

NOUVELLES C-GLUCOSYLFLAVONES CHEZ
GENTIANA PEDICELLATA

A. J. CHULIA* et A. M. MARIOTTE

Laboratoire de Pharmacognosie, UER de Pharmacie, Université Scientifique et Médicale de Grenoble,
Domaine de la Merci, 38700 La Tronche, France

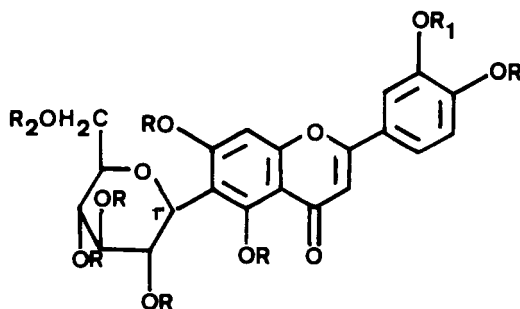
Gentiana pedicellata Wall (Gentianaceae) est une petite plante herbacée dont l'aire de développement principale est la chaîne de l'Himalaya. L'étude de l'espèce indienne, utilisée en médecine traditionnelle, met en évidence la swertiamarine et de nouvelles aryl-6-pyrone-2 (1), tandis que l'espèce népalaise permet l'identification de plusieurs C-glucosylflavones, isovitexine, isoorientine (2), isoorientine 3'-O-glucoside (3) et d'un phthalide nouveau, le pédicelloside (4). Une investigation ultérieure des feuilles de *G. pedicellata* d'origine népalaise nous a permis de caractériser l'isoorientine 6''-O-glucoside (1) et l'isoorientine 3',6''-di-O-glucoside (2).

L'extrait méthanolique des feuilles dégraissées de *G. pedicellata* fournit, après fractionnement sur colonnes de polyamide et cellulose principalement, les composés 1 et 2.

Le spectre uv de 1, en présence des réactifs habituels (5), est caractéristique d'une flavone tétra hydroxylée en 5,7,3' et 4'. Son comportement chromatog-

raphique est celui d'un diglycoside de flavone. L'hydrolyse acide de 1 conduit au glucose (ccm) et au couple orientine-isoorientine (uv, co-chromatographie, ccm, hplc). L'ensemble de ces données indique que la O-glucosylation affecte le C-glucosyle. Le spectre de masse de 1 perméthylé (1a), est caractéristique d'un perméthyl O-hexosyl-X'' C-hexosyl-6 lutéoline: $M^+ 764$, $[M-15]^+$, $[M-31]^+$, $[M-175]^+$, $[M-219]^+$, $[M-235]^+$, $[M-249]^+$, $[M-365]^+$, $[M-379]^+$ (6). Les deux ions à m/z 749 (10%) et m/z 733 (33%), associés à l'ion fragment m/z 385 (100%) éliminent l'éventualité de la glucosylation en 2'' du C-glucosyle. Ceci est confirmé d'autre part, par le comportement chromatographique différent (ccm, hplc) de 1 et de l'isoorientine 2''-O-glucoside de référence.

Le spectre de masse de 1b, produit d'hydrolyse acide de 1a, indique par l'intensité relative des ions suivants: $M^+ 546$ (30%), $[M-31]^+$ (83%), $[M-89]^+$ (30%), $[M-161]^+$ (100%), $[M-175]^+$ (50%), une perméthyl C-glucosyle-6



- 1 $R=R_1=H$, $R_2=\beta$ -D-glucosyl
 1a $R=R_1=Me$, $R_2=$ permethylated-glucosyl
 1b $R=R_1=Me$, $R_2=H$
- 2 $R=H$, $R_1=R_2=\beta$ -D-glucosyl
 2a $R=Me$, $R_1=R_2=$ permethylated-glucosyl
 2b $R=Me$, $R_1=R_2=H$

lutéoline mono hydroxylée en 6" (7). Ces différentes données permettent de définir **1** comme la *O*-glucosyl-6" isoorientine.

Le spectre de $\text{rmn } ^{13}\text{C}$ de **1**, comparé à ceux de l'isoorientine (8) et de la *O*-arabinosyl 6"-isoorientine (9), confirme, notamment par les déplacements chimiques des C-6" et C-5", notés respectivement à δ 69,1 ppm et δ 79,7 ppm, la *O*-glucosylation en 6" de l'isoorientine. D'autre part, l'ensemble des valeurs de déplacements chimiques en $\text{rmn } ^{13}\text{C}$ du sucre en R_2 (60,9 à 103,1 ppm) caractérise une unité β -D-glucopyranosyle *O*-liée par son C-1.

Le composé **2**, de comportement chromatographique plus polaire, présente une unité hexosyle supplémentaire comme l'indique la masse de **2a**, dérivé perméthylé de **2**, $\text{M}^+ m/z$ 968. L'hydrolyse acide de **2** fournit du glucose et le couple orientine-isoorientine caractérisés comme précédemment. L'analyse des spectres uv de **2**, avant et après hydrolyse, en présence des réactifs usuels, permet de fixer un glucose au moins, sur l'hydroxyle en 3' de la flavone. L'ion moléculaire à m/z 532 de **2b**, produit d'hydrolyse acide de **2a**, signale que les deux glucoses libérés ne sont pas liés entre eux. La position du deuxième glucose est déduite de l'analyse du spectre de masse de **2b** qui présente, comme **1b**, la fragmentation type d'une perméthyl C-glucosyl-6 flavone monohydroxylée en 6". Tous ces éléments définissent **2** comme la di-*O*-glucosyl-3',6" isoorientine. Ces résultats sont confirmés par la $\text{rmn } ^{13}\text{C}$ de **2** dont les valeurs des déplacements chimiques, comparativement à l'isoorientine, précisent la participation des hydroxyles en 3' ($\Delta\delta$: C-2' +1,2 ppm, C-4' +1,3 ppm, C-6' +2,4 ppm) et 6" ($\Delta\delta$: C-6" +7,8 ppm, C-5" -1,6 ppm) à des liaisons éthers avec deux unités β -D-glucopyranosyles.

G. pedicellata (section *Chondrophylla*) possède comme l'ensemble des espèces du genre, les mono C-glucosylflavones

isoorientine et isovitexine, témoins d'un métabolisme ancien et commun à divers membres de la famille des Gentianacées. Elle se distingue toutefois, des autres espèces étudiées à ce jour, par des modes de substitution du noyau flavone et du C-glucosyle particuliers. Si la glucosylation en 3' de l'isoorientine a été décrite pour la première fois chez *Gentiana nivalis* (10), la glucosylation en 6" est inédite dans le règne végétal et plus particulièrement dans le genre *Gentiana*. En effet, la majeure partie des espèces accumulent principalement de l'isoorientine et (ou) de l'isovitexine glucosylée(s) en 4' (11-15) et (ou) en 2" (14, 16-18). De même, la double glucosylation en 3' et 6" de l'isoorientine, rencontrée ici pour la première fois, différencie *G. pedicellata* des autres espèces, dans lesquelles isoorientine et isovitexine sont habituellement substituées en 4' et 2" (17, 19). Les modes de substitution originaux des C-glucosylflavones de *G. pedicellata*, comme ceux (polyméthoxylation du noyau B) rencontrés chez *Gentiana pyrenaica* (20), classée dans la même section botanique (*Chondrophylla*), font de ces substances de bons marqueurs taxonomiques.

PARTIE EXPERIMENTALE

Les différents spectres ont été enregistrés sur les appareils suivants: spectre d'absorption, Beckman U25; $\text{rmn } ^{13}\text{C}$, Cameca 350 88 MHz-TMS=standard interne-; spectre de masse, AEI MS 902, température de 150 à 190°.

MATERIEL VEGETAL.—*G. pedicellata* a été collectée au stade de floraison à 2250 m d'altitude à Raisalli (Népal) par Dr. S. R. Adhikari (Medicinal Plant of Nepal). Un échantillon d'herbier est déposé au laboratoire de Pharmacognosie de Grenoble- UER de Pharmacie, Domaine de la Merci, 38700 La Tronche, France.

EXTRACTION ET PURIFICATION DE **1** ET **2**.—Les feuilles sèches (300 g) de *G. pedicellata*, dégraissées par l'hexane et le CHCl_3 , sont épuisées par le MeOH à froid. L'extrait méthanolique (60 g) chromatographié sur colonne de polyamide (MeOH-H₂O=1:1) fournit **1** et **2** dans les fractions polaires. Les composés **1** et **2** sont purifiés par deux chromatographies succes-

sives sur colonne de cellulose éluées par AcOH 5% puis par le mélange *n*-BuOH-AcOH-H₂O (4:1:6) (phase supérieure). La purification finale sur Séphadex LH20 (MeOH) permet l'obtention de 35 mg de **1** et 55 mg de **2**.

O-β-D-GLUCOPYRANOSYL-6'' ISOORIENTINE (1).—Ccm cellulose BAW 416 et AcOH 10%: Rf 0,35 et 0,33 respectivement; hplc (C18 μBondapak 4×300 mm) MeOH-H₂O-AcOH (35:64:1) tr 8,6 min (l'isorientine 2''-O-glucoside de référence présente, dans les mêmes conditions les caractéristiques chromatographiques suivantes: rf 0,41 0,65, tr 16; min); uv λ max (MeOH) nm 242 ép., 255, 267, 345; / AlCl₃ 275, 302 ép., 332 ép., 425; / AlCl₃ + HCl 262 ép., 277, 297 ép., 360, 385; / AcONa 267, 278, 325 ép., 400; / AcONa + H₃BO₃ 260, 372; / MeNa 267, 278, 330 ép., 405; rnm ¹³C (88 MHz, DMSO-D₆) aglycone δ 181,8 ppm (C-4), 163,6 (C-2, C-7), 160,6 (C-9), 156,1 (C-5), 149,6 (C-4'), 145,7 (C-3'), 121,3 (C-1'), 118,9 (C-6'), 116,0 (C-5'), 113,2 (C-2'), 108,7 (C-6), 103,3 (C-3), 102,7 (C-10), 93,5 (C-8); C-glucosyl δ 79,7 (C-5''), 78,7 (C-3''), 72,9 (C-1''), 70,4 (C-2''), 70,0^a (C-4''), 69,1 (C-6''); O-glucosyl-6'' δ 103,1 (C-1'''), 76,8^b (C-3'''), 76,7^b (C-5'''), 73,2 (C-2'''), 69,9^a (C-4'''), 60,9 (C-6'''), ^{ab}-les valeurs ayant le même exposant sont interchangeables-.

DERIVE PERMETHYLE (1a).—(1, NaH, MeI, température ambiante, purifié par ccm préparative de silice, CHCl₃-AcOEt-Me₂CO=5:3:2 Rf 0,38); eims (70 eV) *m/z*>300 (int. rel., %) 764 (M⁺, 21), 749 (10), 733 (33), 589 (30), 545 (11), 543 (24), 531 (11), 529 (18), 515 (27), 483 (10), 457 (14), 399 (48), 397 (18), 385 (100), 371 (20), 368 (42), 355 (20), 353 (20), 341 (18), 339 (20), 313 (18).

DERIVE PERMETHYLE HYDROLYSE (1b).—(1a) HCl 4N-MeOH (1:1), température ébullition, 2 h, milieu réactionnel extrait par CHCl₃ après dilution par H₂O, purification sur ccm préparative de silice CHCl₃-AcOEt-Me₂CO=5:3:2 Rf 0,29); eims (70 eV) *m/z*>300: 546 (M⁺, 30), 531 (25), 515 (83), 457 (30), 437 (25), 397 (17), 385 (100), 383 (37), 381 (33), 371 (50), 368 (100), 357 (25), 355 (40), 353 (29), 351 (32), 341 (41), 339 (45), 327 (35).

DI-O-β-D-GLUCOPYRANOSYL-3',6'' ISOORIENTINE (2).—Ccm cellulose BAW 416 et AcOH 10% Rf 0,11 et 0,49 respectivement; hplc (C18 μBondapak 4×300 mm) MeOH-H₂O-AcOH (35:64:1) tr 6,0 min; uv λ MeOH max nm 240 ép., 270, 335; / AlCl₃ 260 ép., 277, 300 ép., 350, 382; / AlCl₃ + HCl idem AlCl₃; / AcONa 270, 280 ép., 320 ép., 395; / AcONa + H₃BO₃ 270, 340, 390 ép.; / MeONa 270 ép., 280, 330 ép., 400; rnm ¹³C (88 MHz, DMSO-*d*₆) aglycone δ 181,8 ppm (C-4), 163,2^a (C-2), 163,1^a (C-7),

160,5 (C-9), 156,1 (C-5), 150,9 (C-4'), 145,6 (C-3'), 121,3 (C-1'), 121,3 (C-6'), 116,4 (C-5'), 114,4 (C-2'), 108,7 (C-6), 103,3 (C-3), 103,0 (C-10), 93,7 (C-8); C-glucosyl δ 79,7 ppm (C-5''), 78,7 (C-3''), 72,9 (C-1''), 70,4 (C-2''), 70,0^b (C-4''), 69,1 (C-6''); O-glucosyl-3' δ 101,8 ppm (C-1'''), 77,3 (C-5'''), 76,0 (C-3'''), 73,2 (C-2'''), 69,8^b (C-4'''), 60,7^c (C-6'''); O-glucosyl-6'' δ 103,0 ppm (C-1'''), 76,8^d (C-3'''), 76,7^d (C-5'''), 73,2 (C-2'''), 69,8^b (C-4'''), 60,8^c (C-6'''), ^{abcd}-les valeurs de même exposant sont interchangeables-.

DERIVE PERMETHYLE (2a).—(Préparation analogue à celle de **1a**, purification par ccm préparative de silice, CHCl₃-AcOEt-Me₂CO=5:3:2 Rf 0,33); eims (70 eV) *m/z*>300 (int. rel., %) 968 (M⁺, 6), 937 (12), 750 (32), 603 (17), 589 (13), 575 (12), 560 (16), 532 (100), 515 (7), 501 (18), 443 (10), 429 (12), 385 (42), 384 (44), 371 (60), 369 (20), 357 (23), 355 (40), 347 (60), 341 (28), 327 (15), 313 (8).

DERIVE PERMETHYLE HYDROLYSE (2b).—(Conditions d'hydrolyse analogues à celles de **1a**, purification ccm préparative de silice, CHCl₃-AcOEt-Me₂CO=5:3:2 Rf 0,24); eims (70 eV) *m/z*>300 (int. rel., %) 532 (M⁺, 20), 517 (26), 501 (100), 469 (17), 443 (23), 423 (17), 385 (15), 383 (17), 371 (100), 369 (12), 357 (48), 355 (23), 343 (12), 341 (32), 339 (17), 327 (21).

HYDROLYSE DE 1 ET 2.—HCl 2 N, 2 h à 100°. L'hydrolysate est extrait par *n*-BuOH. La phase organique permet l'identification du couple orientine-isorientine par ccm cellulose (AcOH 15% et BAW 416) et par hplc (C18 μBondapak) en présence de témoins authentiques. La phase aqueuse résiduelle concentrée, chromatographiée sur silice imprégnée de NaH₂PO₄ (21) met en évidence du glucose.

BIBLIOGRAPHIE

1. S. Ghosal, A.A.K. Singh, et K. Biswas, *Planta Med.*, **49**, 240 (1983).
2. A.J. Chulia et A.M. Debelmas, *Pl. Med. et Phyt.*, **11**, 112 (1977).
3. A.J. Chulia, K. Hostettmann, M.L. Bouillant, et A.M. Mariotte, *Planta Med.*, **34**, 442 (1978).
4. A.J. Chulia, M. Kaouadji, et A.M. Mariotte, *Tetrahedron Lett.*, **25**, 5039 (1984).
5. T.J. Mabry, K.R. Markham, M.B. Thomas, "The Systematic Identification of Flavonoids," Berlin: Springer, 1970.
6. M.L. Bouillant, A. Besset, J. Favre-Bonvin, et J. Chopin, *Phytochemistry*, **17**, 527 (1978).
7. M.L. Bouillant, A. Besset, J. Favre-Bonvin, et J. Chopin, *Phytochemistry*, **18**, 690 (1979).

8. V.M. Chari, H. Wagner, G. Schilling, et A. Nesmelyi, "IUPAC Int. Symp. Chem. Nat. Prod. 11th," tome 2, Sofia, 1978, p. 279.
9. K. Hostettmann et A. Jacot-Guillarmod, *Helv. Chim. Acta*, **59**, 1584 (1976).
10. K. Hostettmann et A. Jacot-Guillarmod, *Helv. Chim. Acta*, **57**, 204 (1974).
11. K. Hostettmann, G. Bellmann, R. Tabacchi, et A. Jacot-Guillarmod, *Helv. Chim. Acta*, **56**, 3050 (1973).
12. K. Hostettmann, L. Minh Duc, M. Goetz, et A. Jacot-Guillarmod, *Phytochemistry*, **14**, 499 (1975).
13. M. Goetz, K. Hostettmann, et A. Jacot-Guillarmod, *Phytochemistry*, **15**, 2015 (1976).
14. M. Goetz, K. Hostettmann, et A. Jacot-Guillarmod, *Phytochemistry*, **15**, 2014 (1976).
15. M. Hostettmann-Kaldas, K. Hostettmann, et O. Sticher, *Phytochemistry*, **20**, 443 (1981).
16. K. Hostettmann et A. Jacot-Guillarmod, *Helv. Chim. Acta*, **58**, 130 (1975).
17. L. Minh Duc, "Identification de Cinnamoyl C-glucosylflavones et de leurs O-glucosides dans des espèces de la section *Gentiana* (*Coelanthus* Griseb.) du genre *Gentiana* L." Thèse de doctorat es-sciences, Neuchatel (1978).
18. F. Burret, A.J. Chulia, et A.M. Debelmas, *Planta Med.*, **36**, 178 (1979).
19. M. Goetz et A. Jacot-Guillarmod, *Helv. Chim. Acta*, **60**, 1322 (1977).
20. A. Marston, K. Hostettmann, et A. Jacot-Guillarmod, *Helv. Chim. Acta*, **59**, 2596 (1976).
21. S.A. Hansen, *J. Chromatogr.*, **107**, 224 (1975).

Received 9 November 1984