

**PHELIPOSIDE ET ARENARIOSIDE, DEUX NOUVEAUX ESTERS
HÉTÉROSIDIQUES DE L'ACIDE CAFÉIQUE ISOLES
DE OROBANCHE ARENARIA**

CLAUDE ANDARY*, GUY PRIVAT,

Laboratoire de Botanique et de Cryptogamie, Faculté de Pharmacie, 34060 Montpellier, France

RENÉ WYLDE, et ANNIE HEITZ

Centre CNRS-INSERM de Pharmacologie-Endocrinologie, 34000 Montpellier, France

ABSTRACT.—Arenarioside (**1**) and pheliposide (**2**), caffeic acid glycoside esters, have been isolated from *Orobancha arenaria* by droplet countercurrent chromatography. The structures have been realized by high resolution ¹H- and ¹³C-nmr studies. Compound **1** is β-(3',4'-dihydroxyphenyl)-ethyl-*O*-α-L-rhamnopyranosyl (1→3)-β-D-[β-D-xylopyranosyl (1→6)]-(4-*O*-caffeoyl)-glucopyranoside, and **2** is β-(3',4'-dihydroxyphenyl)-ethyl-*O*-α-L-rhamnopyranosyl (1→3)-β-D-[β-D-xylopyranosyl (1→6)]-(4-*O*-caffeoyl)-(2-*O*-acetyl)-glucopyranoside.

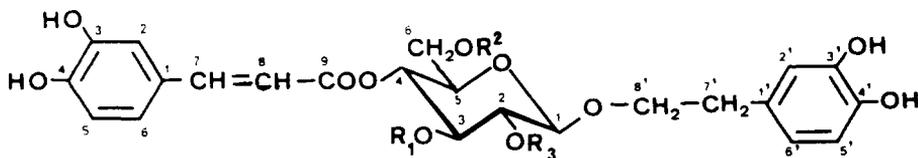
These molecules have been used as chemotaxonomic markers in the Trionychon section of the Orobanchaceae.

Lors de travaux antérieurs (1-3), nous avons montré l'importance des techniques de spectrométrie rmn à haut champ pour la détermination de la structure de dérivés hétérosidiques du 3,4-dihydroxyphényléthanol. Les techniques courantes actuelles de DEPT, nOe et découplage sélectif en rmn protonique et en rmn ¹³C permettent d'identifier avec certitude la nature, les enchaînements des sucres et leurs substitutions, sans avoir recours aux dérivés méthylés ou acétylés.

L'ensemble des spectres de rmn ¹H et rmn ¹³C obtenus au cours de ce travail, et la comparaison avec les molécules déjà décrites nous ont conduits à l'identification de deux nouveaux esters hétérosidiques de l'acide caféique, isolés à partir de *Orobancha arenaria* Borkh. (Orobanchaceae).

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les deux composés décrits et appelés arenarioside (**1**) et pheliposide (**2**) n'ont pu être séparés par chromatographie sur colonne de polyamide, technique que nous utilisons en général pour ce type de substances. Par contre, la chromatographie liquide à contre-courant par gouttelettes nous a permis d'isoler séparément et à l'état pur le pheliposide et l'arenarioside, à partir d'un extrait phénolique brut.



1 R₁ = rhamnose, R₂ = xylose, R₃ = H (arenarioside)

2 R₁ = rhamnose, R₂ = xylose, R₃ = CH₃-CO (pheliposide)

Ces deux molécules sont, par la nombre des sucres, assez proches du néoactéoside (**4**), de l'échinacoside (**2**), du myricoside (**5**), du teucrioside (**6**), et du poliumoside (**3**). Ces esters hétérosidiques de l'acide caféique possèdent tous trois sucres et ont en commun le même aglycone: le 3,4-dihydroxyphényléthanol.

Les trois molécules de sucres sont ici: le rhamnose, le glucose, et le xylose.

Nous avons retrouvé l'unité de Rha (1→3) Glc décrite pour le verbascoside (**1**), liée

par le C-1 Glc¹ au dihydroxyphényléthanol, l'acide caféique estérifiant l'hydroxyle en C-4 Glc. Comme dans l'échinacoside, la fonction alcool primaire du glucose est substituée, mais ici par un xylose.

La seule différence entre l'arenarioside et le pheliposide réside en la présence, chez ce dernier, d'un groupement acétate substitué à l'hydroxyle en C-2 du glucose.

Les Tableaux 1, 2, 3, et 4 ci-dessous donnent les valeurs des glissements chimiques des protons et des carbones de ces deux molécules. Ces tableaux comportent également les valeurs des déplacements chimiques des protons et des carbones du méthyl-*O*- β -D-xylopyranoside mesurées dans les mêmes conditions et dans les mêmes solvants.

RMN¹H (Tableau 1).—Les protons aromatiques sont résolus comme deux systèmes ABX, l'un appartenant à la substitution "caféoyl" et l'autre au 3,4-dihyd-

TABLEAU 1. Spectres de rmn^1H (ppm) de l'Arenarioside (1) et du Pheliposide (2) dans le DMSO- d_6 . Les Déplacements Chimiques et les Valeurs de J (Hz) Sont Donnés entre Parentheses

	Arenarioside (1)		Pheliposide (2)	
	H	δ	H	δ
Acide caféique	2	7,04 (d, 2)	2	7,03 (d, 2)
	5	6,76 (d, 8)	5	6,76 (d, 8)
	6	6,98 (dd, 2-8)	6	6,99 (dd, 8; 2)
	7	7,47 (d, 16)	7	7,49 (d, 16)
	8	6,20 (d, 16)	8	6,21 (d, 16)
Aglycone	2'	6,64 (d, 2)	2'	6,57 (d, 2)
	5'	6,63 (d, 8)	5'	6,62 (d, 8)
	6'	6,49 (dd, 2-8)	6'	6,44 (dd, 8; 2)
	7'	2,69 (m)	7'	2,60 (m, 7)
	8'	3,63-3,88 (m)	8'	3,55-3,88 (m, 10)
Glucose	1	4,35 (d, 8)	1	4,61 (d, 8)
	2	3,23 (dd, 8-9)	2	4,71, (dd, 8; 9,5)
	3	3,72 (t, 9)	3	4,0 (t, 9,5)
	4	4,74 (t, 9)	4	4,81 (t, 9,5)
	5	3,70 (m)	5	3,80 (m)
	6	3,65-3,45 (m, 12)	6	3,65-3,41 (m, 12)
Xylose			Ac(2)	1,98
	1	4,12 (d, 7,5)	1	4,12 (d, 7,5)
	2	2,97 (dd, 7,5-9)	2	2,95 (dd, 7,5-9)
	3	3,08 (t, 9)	3	3,06 (t, 9)
	4	3,23 (m)	4	3,21 (m)
	5(a)	2,98 (t, 9)	5(a)	2,98 (t, 9)
5(e)	3,64 (m)	5(e)	3,65 (m)	
Rhamnose	1	5,04 (d, 1)	1	4,61 (d, 1,5)
	2	3,70 (dd, 1-3)	2	3,39 (dd, 3; 1,5)
	3	3,29 (dd, 3-9,5)	3	3,21 (dd, 3, 9)
	4	3,12 (t, 9,5)	4	3,07 (t, 9)
	5	3,36 (m)	5	3,27 (m)
	6	0,96 (d, 6)	6	0,93 (d, 6)

roxyphényléthanol. Les deux protons éthyléniques de l'acide *trans*-caféique résonnent à leurs valeurs habituelles et sont facilement identifiables par leur constante de couplage. Les deux protons en 7' de la chaîne latérale du noyau aromatique de l'aglycone donnent lieu au triplet habituel à 2,70 ppm, tandis que les deux protons β en 8' non équivalents résonnent à 3,63 et 3,88 ppm.

¹C-Glc, H-Glc, C-Rha, H-Rha, C-Xyl, ou H-Xyl avec un indice numérique représentent les carbones ou les protons correspondant à l'indice et appartenant au glucose (Glc), au rhamnose (Rha), ou au xylose (Xyl).

Le spectre de l'arenarioside (1) comporte trois protons anomères, l'un à 4,12 ppm ($J=7,5$ Hz), le second à 4,35 ppm ($J=8$ Hz), et le troisième à 5,04 ppm ($J=1,5$ Hz), identifiant la configuration des trois sucres. Les irradiations sélectives des protons de chacun des trois sucres permettent leurs attributions. On retrouve le proton H-4 Glc déblindé à 4,74 ppm par la fonction ester caféique. L'irradiation de ce proton permet d'identifier avec précision H-3 Glc et H-5 Glc. Les déplacements chimiques des autres protons du glucose ainsi que ceux du rhamnose ont essentiellement les mêmes valeurs que celles rapportées pour l'échinacoside (2) et le poliumoside (3). Le second sucre de configuration β , dont le proton anomère résonne à 4,12 ppm a été identifié comme étant le xylose par comparaison avec le spectre du méthyl- β -xyloside (Tableau 2) et par microhydrolyse acide suivant une méthode antérieurement décrite (7). Le blindage du proton anomère par rapport au xylose non substitué montre que le xylose est lié au glucose en C-6 comme nous l'avons observé pour l'échinacoside et le poliumoside.

TABLEAU 2. Spectres de rmn^1H (ppm) et de rmn^{13}C (ppm) du β -Méthylxyloside dans le $\text{DMSO}-d_6$. Les Déplacements Chimiques et les Valeurs de J Sont Donnés entre Parenthèses

	rmn^1H	rmn^{13}C
H-1	3,99 (d, 7,5)	C-1 105
H-2	2,93 (ddd, 5; 7, 5; 9)	C-2 73,9
H-3	3,08 (dt, 5; 9)	C-3 76,9
H-4	~3,25 (m, 5)	C-4 70,5
H-5 (a)	3,02 (dd, 10,5-11)	C-5 65,9
H-5 (e)	3,69 (dd, 5; 11)	

Quant au pheliposide (2) il comporte des signaux voisins de ceux de l'arenarioside. On note cependant la présence d'un signal supplémentaire à 1,98 ppm correspondant à celui du CH_3 - d'un acétate. D'autre part, à côté du proton H-4 Glc déblindé par la fonction caféate, on observe un quadruplet à 4,71 ppm ($J=8; 9,5$). Ce signal est simplifié par irradiation des H-1 Glc et H-3 Glc, ce qui permet de l'attribuer à H-2 Glc. Les valeurs des H-2, H-3, et H-4 Glc sont en accord avec la substitution acétylée en position 2 du glucose, c'est-à-dire: déblindage de $\Delta\delta=0,5$ ppm du proton en α de l'acétate et déblindage de $\Delta\delta=0,3$ ppm pour les deux protons en β .

Les protons du xylose pour l'arenarioside et le pheliposide ont les mêmes valeurs en particulier pour H-1 Xyl et H-5(a) Xyl ($t, J=9$). Par contre les deux protons H-1 Rha et H-2 Rha qui subissent l'influence de l'acétate sont blindés par rapport à ceux de l'arenarioside.

RMN^{13}C (Tableaux 3 et 4).—Les spectres sont en plein accord avec la structure établie par la rmn protonique et confirment en particulier la structure des sucres et leur liaison. Les valeurs des déplacements chimiques de tous les carbones ont été déterminées par la méthode de DEPT qui permet de différencier rapidement les carbones primaires, secondaires et quaternaires, par la mesure des constantes de couplage J_{CH_1} et par comparaison avec les molécules déjà décrites.

En ce qui concerne les sucres en particulier et dans le cas de l'arenarioside, on retrouve les valeurs attendues pour le glucose substitué en C-3, C-4, et C-6. Ainsi le C-3 Glc subit le même déblindage. Le C-4 Glc, par contre, est blindé par la substitution caféoyl. Quant au C-6 Glc, il est déblindé de $\Delta\delta=7$ ppm prouvant bien ainsi la substitution du glucose en position 6.

Les valeurs établies pour le xylose sont en accord avec celles du méthyl- β -xyloside, comme on peut le constater dans le tableau 2.

TABLEAU 3. Spectre de rmn^{13}C (ppm) de l'Arenarioside (1) dans le $\text{DMSO}-d_6 + \text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ (2 gouttes)

Acide caféique								
C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9
125,51	114,77	145,54 ^a	148,49	113,43	121,41	146,76 ^a	115,78	165,90
Aglycone								
C-1'	C-2'	C-3'	C-4'	C-5'	C-6'	C-7'	C-8'	
129,28	116,34	144,91	143,47	115,49	119,79 (119,53)	35,01	70,47	
Sucres								
Glc			Xyl			Rha		
C			C			C		
1	102,24		1	103,82		1	101,19	
2	74,42		2	73,22		2	70,50	
3	78,95		3	76,31		3	70,21	
4	69,19		4	69,48		4	71,76	
5	73,12		5	65,62		5	68,74	
6	67,95					6	18,10	

^aAttribution incertaine.

Avec le pheliposide, on note les mêmes déplacements chimiques pour les carbones de la partie caféique et aglycone, tandis que dans la région des carbones des sucres on observe pour le C-1 Glc et le C-3 Glc, un blindage de $\Delta\delta = 1$ à 2 ppm correspondant à la présence de l'acétate en C-2 Glc. Ce dernier carbone est lui-même blindé par l'estérification.

TABLEAU 4. Spectre de rmn^{13}C (ppm) du Pheliposide (2) dans le $\text{DMSO}-d_6 + \text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ (2 gouttes)

Acide caféique								
C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	C-6	C-7	C-8	C-9
125,45	114,82	145,59	148,64	113,47	121,48	146,07	115,82	165,81
Aglycone								
C-1'	C-2'	C-3'	C-4'	C-5'	C-6'	C-7'	C-8'	
129,44	116,30	144,89	143,46	115,42	119,49	34,68	70,22	
Sucres								
Glc			Xyl			Rha		
C			C			C		
1	99,21		1	103,90		1	101,99	
2	73,32		2	73,24		2	70,73	
3	77,80		3	76,34		3	69,87	
4	69,30 ^a		4	69,49		4	71,54	
5	73,10		5	65,64		5	69,14 ^a	
6	67,77					6	18,12	
Ac(2) CO	169,08							
CH ₃	20,47							

^aAttribution incertaine.

tion de l'hydroxyle. Les C-4, C-5, et C-6 Glc ne sont pas touchés par cette modification et résonnent au même champ que pour l'arenarioside. Les valeurs des déplacements chimiques des carbones du xylose et du rhamnose sont sensiblement les mêmes que pour l'arenarioside. Quant à l'acétate, il fait apparaître deux signaux supplémentaires: un à 20,47 ppm correspondant au groupement méthyle et un autre à 169 ppm correspondant au groupement carbonyle.

La nature de la liaison du rhamnose au glucose a pu être vérifiée d'une part, par irradiation du H-3 Glc et détermination du C-3 Glc (qui est le carbone le plus déblindé, parmi les sucres, en dehors des carbones anomères) et d'autre part, par détermination de l'effet nOe sur H-1 Rha obtenu par irradiation de H-3 Glc et effet inverse.

Comme il a été observé pour le poliumoside (3), nous avons noté dans le spectre dé-couplé que les intensités des déplacements chimiques de chacun des carbones du xylose sont augmentées de 40% par rapport à celles des carbones du glucose et du rhamnose. Ces différences d'intensité, en relation avec les effets nOe et les temps de relaxation, sont en bon accord avec le degré de liberté du xylose et de la liaison (1→6) dans laquelle il est engagé. Cette observation se vérifie très aisément par fragmentation de la molécule après hydrolyse acide ménagée directement sur chromatoplaque de gel de silice (7).

Nous pouvons donc attribuer aux deux nouveaux esters hétérosidiques la structure suivante: (a) l'arenarioside est le β -(3',4'-dihydroxyphényl)-éthyl-*O*- α -L-rhamnopyranosyl (1→3)- β -D-[β -D-xylopyranosyl (1→6)]-(4-*O*-caféoyl)-glucopyranoside et (b) le pheliposide est le β -(3',4'-dihydroxyphényl)-éthyl-*O*- α -L-rhamnopyranosyl (1→3)- β -D-[β -D-xylopyranosyl (1→6)]-(4-*O*-caféoyl)-(2-*O*-acétyl)-glucopyranoside.

La mise en évidence de ces deux molécules (ainsi que d'autres esters hétérosidiques en cours d'étude au Laboratoire) nous a permis de distinguer nettement dans le genre *Orobanche* la section *Trionychon* Wallr. de la section *Orobanche* (= *Osproleon* Wallr.) seules sections représentées en Europe. De plus, dans la section *Trionychon*, la distribution différente de ces molécules selon les espèces nous a permis de décrire deux nouvelles sous-sections: *Arenariae* et *Ramosae*. Ces analyses chimiotaxinomiques sont en bon accord avec les observations microscopiques que nous avons réalisées à partir du testa de la graine ainsi qu'avec certaines distinctions morphologiques (8).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Les échantillons de *O. arenaria* parasitant *Artemisia campestris* var. *glutinosa* Gay ont été récoltés sur le littoral méditerranéen (Carnon, Hérault) et conservés dans l'herbier C.A. (n° 3-684).

Les spectres de rmn ont été réalisés à 360 MHz pour le ¹H et 90,53 MHz pour le ¹³C (Appareil Bruker WM 360 WB). Les déplacements chimiques sont donnés en δ (ppm) avec comme étalon interne le TMS. Les ccm ont été effectués sur plaque de cellulose (Merck, Réf.: 5552) avec comme solvant de développement le mélange: EtOAc-MeOH-H₂O-Me₂CO-CHCl₃ (60:11:11:5:1,5) (V/V) et comme révélateur la fluorescence en uv après vaporisation d'une solution méthanolique à 1% de diphénylborate amino-2 éthyl (Fluka).

EXTRACTION ET ISOLEMENT DE L'ARENARIOSIDE (1) ET DU PHELIPOSIDE (2).—La plante séchée et broyée a été extraite par de l'EtOH à 80% à température ambiante. La solution extractive débarrassée de l'alcool est dégraissée par de l'éther de pétrole puis épuisée par de l'AcOEt. L'extrait obtenu est déshydraté par du Na₂SO₄ puis concentré à sec pour donner une poudre de couleur chamois, contenant essentiellement les esters hétérosidiques. La séparation du pheliposide et de l'arenarioside a été réalisée par chromatographie liquide-liquide à contre-courant par gouttelettes avec un chromatographe: DCC, Büchi 670 (294 tubes de diamètre de 2,7 mm). La phase mobile génératrice de gouttelettes est représentée par la phase inférieure du mélange: BuOH-Me₂CO-H₂O (4:1:5). L'appareil fonctionne en mode descendant avec un débit réglé à 12 ml/h. Les fractions récoltées sont de 2,5 ml. On introduit dans l'ampoule à échantillon 300 mg d'extrait poudreux dissous dans 15 ml du mélange, à parties égales, des phases mobile et stationnaire. Les esters hétérosidiques, détectés à 330 nm apparaissent à partir de 600 ml de solvant d'élution.

Arenarioside (1).—(α)²²D = -72° (MeOH), R_f = 0,38, rmn¹H (cf. Tableau 1), rmn¹³C (cf. Tableau 3).

Pheliposide (2).—(α)²²D = -68° (MeOH), R_f = 0,46, rmn¹H (cf. Tableau 1), rmn¹³C (cf. Tableau 4).

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier le PIRMED (Programme Interdisciplinaire de Recherche sur les Bases Scientifiques de Médicaments, CNRS) qui nous a permis de réaliser ce travail par son soutien financier ainsi que Mlle A. Favel pour son aide technique.

BIBLIOGRAPHIE

1. C. Andary, R. Wylde, C. Laffite, G. Privat, et F. Winternitz, *Phytochemistry*, **21**, 1123 (1982).
2. H. Becker, W.C. Hsieh, R. Wylde, C. Laffite et C. Andary, *Z. Naturforsch.*, **37c**, 351 (1982).
3. C. Andary, R. Wylde, A. Heitz, J.P. Rascol, J.L. Roussel, *Phytochemistry*, **24**, 362 (1985).
4. L. Birkofer, C. Kaiser et U. Thomas, *Z. Naturforsch.*, **23b**, 1051 (1968).
5. R. Cooper, P.H. Salomon, I. Kubo, K. Nakanishi, J.N. Shoolery, et J.L. Occolowitz, *J. Am. Chem. Soc.*, **102**, 7953 (1980).
6. O. Sticher et F.M. Lahloub, *Planta Med.*, **45**, 157 (1982).
7. C. Andary, J.L. Roussel, J.P. Rascol et G. Privat, *J. Chromatogr.*, **303**, 312 (1984).
8. C. Andary, A. Fleuriet et J.J. Macheix, International Symposium on the Biochemistry of Plant Phenolics (PSE), 28-31 August 1984, Ghent, Belgium.

Received 25 February 1985