

## FERETOSIDE ET GARDENOSIDE DU *FERETIA APODANTHERA*: RMN DU CARBONE 13 EN SÉRIE IRIDOÏDE

FRANÇOIS BAILLEUL\*, PIERRE DELAVEAU\*, ALAIN RABARON†, MICHEL PLAT† et MICHEL KOCH‡

\* Laboratoire de Phytopharmacologie, Faculté de Pharmacie: 4 avenue de l'Observatoire—75006 Paris, France; † Laboratoire de Pharmacie Chimique U.E.R. de Chimie Thérapeutique: rue J.B. Clément, 92290 Chatenay Malabry, France; ‡ Laboratoire de Pharmacie Galénique, Faculté de Pharmacie: 4 avenue de l'Observatoire, 75006 Paris, France

(Received 21 July 1976)

**Key Word Index**—*Feretia apodanthera*; Rubiaceae; iridoïdes; feretoside; gardenoside;  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy.

**Abstract**—The  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of some iridoïds of known structure are analysed. The data obtained have been applied to the determination of structure of feretoside and the identification of gardenoside, both isolated from the stem bark of *Feretia apodanthera*.

### INTRODUCTION

Puissante méthode d'investigation des structures moléculaires, la RMN du carbone 13 apparaît comme la méthode spectroscopique la plus fructueuse pour l'identification et l'analyse structurale des iridoïdes, ainsi que l'ont déjà souligné Weinges et collaborateurs lors d'une étude récente des époxy-7,8 iridoïdes et de leurs dérivés [1a, b]. Dans une première partie du présent travail sont analysés les spectres de divers iridoïdes, seco-iridoïdes et substances apparentées dans le but d'apporter un complément à l'étude précédente. Dans une seconde partie les données acquises sont appliquées à la révision de la structure du feretoside (1a) ainsi qu'à l'identification du gardénoside (2a), isolés l'un et l'autre des écorces de tiges du *Feretia apodanthera* Del. (Rubiaceae).

### RESULTATS ET DISCUSSION

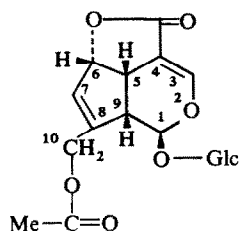
Les modèles étudiés appartiennent soit à la série iridoïde *sensu stricto*: aspéruloside 3, aucuboside 4, verbénaloside 5, soit à la série 'seco-iridoïde': bakankoside 6, tétraacétyl-swertiamaroside 7, tétraacétyl-gentioside 8 [2a, b]. Deux autres substances étudiées peuvent être rapprochées de cette dernière série: la gentianine 9 et le gentiadiol 10 obtenu par réduction de cette dernière. Les spectres ont été enregistrés selon les deux modes habituels: découplage par bruit et découplage partiel ('off-resonance') et interprétés en fonction de la multiplicité des signaux due aux couplages réduits  $^1J_{\text{C-H}}$  de la théorie du déplacement chimique [3a, b, c] et des données bibliographiques en ce qui concerne la partie osidique [4]. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 1.

Tableau 1. RMN du  $^{13}\text{C}$  des iridoïdes

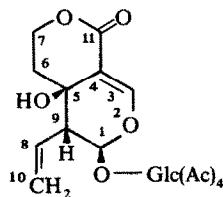
	1b	2b	3	4	5	6	7	8	9	10
C <sub>1</sub>	95,5	96,0	99,4	99,2	99,9	97,3	97,7	96,1 <sup>a</sup>	150,9 <sup>a</sup>	147,6 <sup>a</sup>
C <sub>3</sub>	151,5	149,4	150,6	140,5	154,3	146,6	150,7	147,8	150,2 <sup>a</sup>	145,7 <sup>a</sup>
C <sub>4</sub>	109,4	111,4	105,6	106,0	104,6	106,9	109,9	104,5	120,9	134,5
C <sub>5</sub>	39,8	38,0	36,8	43,7	43,4 <sup>a</sup>	26,0	63,1	125,3	144,7	144,2
C <sub>6</sub>	81,6	130,8	86,9	81,6	218,9	23,0	32,6	116,9	24,2	31,3
C <sub>7</sub>	129,0	136,5	128,8	129,5	43,8	39,6	64,6	69,3	66,1	59,9 <sup>a</sup>
C <sub>8</sub>	142,9	91,6	143,2	147,5	29,6	131,2	131,5	132,8	129,5	130,8
C <sub>9</sub>	46,3	49,4	44,5	47,2	44,9 <sup>a</sup>	40,4	50,8	45,1	130,8	133,2
C <sub>10</sub>	61,2	64,1	62,1 <sup>a</sup>	60,4	19,9	119,2	121,3	118,6	120,3	118,0
C <sub>11</sub>	166,7	166,4	173,8 <sup>a</sup>		169,7	167,0	164,8	163,1	163,4	60,4 <sup>a</sup>
OMe	51,4	51,4			52,9					
C <sub>1'</sub>	96,7	93,5	93,6	96,5	97,0	96,3	97,0	96,6 <sup>a</sup>		
C <sub>2'</sub>	70,9	70,8	73,6	73,7	73,5	71,8	70,7	70,6		
C <sub>3'</sub>	72,6	72,4	77,2 <sup>a''</sup>	77,1 <sup>a</sup>	77,1 <sup>a</sup>	75,3 <sup>a</sup>	72,4 <sup>a</sup>	72,4		
C <sub>4'</sub>	68,5	68,5	70,6	70,5	70,4	68,7	68,2	68,2		
C <sub>5'</sub>	72,6	72,7	76,6 <sup>a''</sup>	76,6 <sup>a</sup>	76,6 <sup>a</sup>	74,7 <sup>a</sup>	71,9 <sup>a</sup>	72,4		
C <sub>6'</sub>	61,8	62,0	61,8 <sup>a</sup>	61,7	61,5	59,9	61,6	61,8		
CO acet			174,0 <sup>a'</sup>							

Solvant: CDCl<sub>3</sub>, sauf pour 3, 4, 5, 6: D<sub>2</sub>O.

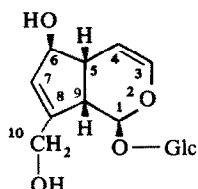
a, a', a'') les attributions peuvent être interverties sur une même colonne.



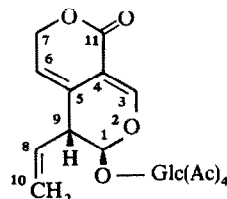
Aspéruloside (3)



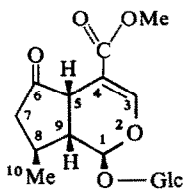
Tétra acétyl swertiamaroside (7)



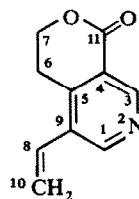
Aucuboside (4)



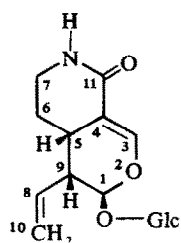
Tétra acétyl gentiopicroside (8)



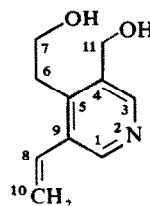
Verbénaloside (5)



Gentianine (9)



Bakankoside (6)



Gentiadiol (10)

Dans le cas de la gentianine 9, l'attribution des trois singulets à 120,9 144,7 et 130,8 ppm, déduite du calcul [3b] est confirmée par la mesure des temps de relaxation  $T_1$  suivant la méthode d'inversion-recouvrement. En effet, si l'on admet [5] que le mécanisme principal est la relaxation dipôle-dipôle avec les protons les plus proches, on peut prévoir pour  $C_5$  le temps de relaxation  $T_1$  le plus court et pour  $C_4$  le  $T_1$  le plus long, ce qui est en accord avec les valeurs trouvées (tableau 2).

Les valeurs respectives et la constance des déplacements chimiques observés pour  $C_9$ ,  $C_1$  et  $C_1'$  chez les divers modèles hétérosidiques sont en accord avec l'identité de configuration de ces centres. On remarque toutefois chez l'aspéruloside 3 un déplacement vers les champs forts des signaux de  $C_1'$  et  $C_9$  ayant pour

origine une interaction stérique du groupement acétyle en 10 avec ces atomes de carbone, que la construction des modèles moléculaires permet d'observer. L'examen des variations de déplacement chimique du  $C_3$  chez les composés 3 à 8 révèle que celles-ci sont nettement influencées par la substitution en 4 et par la nature du

Tableau 2. Déplacements chimiques et temps de relaxation des carbones tétrasubstitués de la gentianine 9

	$C_4$	$C_5$	$C_9$
ppm	120,9	144,7	130,8
$T_1$ (sec $\pm$ 2 sec)			
(échantillon non dégazé)	14	7	11

substituant. On observe ainsi une progression vers les champs faibles lorsqu'on passe du  $C_4$  non substitué (4) à une substitution par un groupement carboxylique inclus dans un enchaînement cyclique: lactame (6), lactone (3, 7 et 8), puis par un groupement carbométhoxyle libre (5).

#### Feretoside et gardenoside

*Feretia apodanthera* Del. est un arbuste de savane très répandu en Afrique tropicale. Lors d'une étude préliminaire des écorces de tiges [6], deux iridoïdes ont été mis en évidence à l'état de dérivés acétylés et l'hypothèse de structure 1 proposée pour le produit majoritaire appelé férétoside. Le présent travail a été entrepris sur un nouveau lot d'écorces de tiges récoltées en Haute-Volta dans la région de Ouagadougou. Les iridoïdes en sont extraits par l'éthanol puis isolés par un fractionnement par solvants suivi d'une chromatographie sur colonne de silice. On obtient ainsi un iridoïde de même  $R_f$  que le férétoside et libérant du glucose sous l'action de l'émulsine (voir partie expérimentale). Cependant, l'analyse spectrale révèle qu'il s'agit d'un mélange dont l'acétylation conduit à deux dérivés peracétylés, séparés par chromatographie sur colonne de silice. Le composé majoritaire est l'hexaacétyl-férétoside 1b, F. 133–134°. Sa formule brute  $C_{29}H_{36}O_{17}$ , déduite de l'analyse centésimale est confirmée par le décompte des carbones et hydrogènes sur les spectres de RMN de  $^1H$  et de  $^{13}C$ . Ce dernier est analysé à l'aide des données précédemment obtenues (tableau 1).

Les résultats de cette analyse ainsi que les données biogénétiques en série iridoïde (2) conduisent à proposer la structure 1b. On observe en effet sur le spectre les signaux de: –9 carbones non protonés: 7 carbonyles (6 groupements acétyle et 1 groupement carbométhoxyle) et deux carbones éthyléniques ( $C_4$  et  $C_8$ ). –11 carbones monoprotonés: deux de nature éthylénique ( $C_3$  et  $C_7$ ),

7 de type  $H-C-O-$  (1, 1', 2', 3', 4', 5' et 6) et deux  $C-CH-C-$  ( $C_5$  et  $C_9$ ). –2 carbones diprotonés de

type  $CH_2-O-$  ( $C_{10}$  et  $C_6$ ). –7 carbones triprotonés (6 groupements acétyle et un groupement carbométhoxyle).

La comparaison de ces déplacements chimiques avec ceux observés chez l'aspéruloside 3 est en parfait accord avec une structure résultant de l'ouverture du cycle lactonique de celui-ci, car les seules modifications de déplacement chimique observées concernent  $C_4$ ,  $C_5$  et  $C_6$ . Ces données sont compatibles avec les structures de deux dérivés épimères en 6 déjà connus: hexaacétyl daphylloside [7] et hexaacétyl méthylscandoside [8]. Les constantes physiques sont les mêmes que celles du second composé auquel l'hexaacétyl férétoside 1b a été identifié (F. 133–134°, F. d'un mélange non déprimé, spectres IR superposables, CCM d'un mélange unitaire). De la même manière a été analysé le spectre de RMN du  $^{13}C$  du second iridoïde acétylé 2b, poudre blanche fondant vers 65°, de même formule brute que le précédent ( $C_{29}H_{36}O_{17}$  = 656), déduite de l'analyse des spectres de RMN. Ce spectre présente les signaux de: –9 carbones non protonés: 7 carbonyles (6 groupements acétyle et un groupement carbométhoxyle), 1 carbone éthylénique ( $C_4$ ) et un carbone alicyclique ( $C_8$ ). –11 carbones monoprotonés: 3 de nature éthylénique  $C_3$ ,  $C_6$  et  $C_7$ , 6 de type

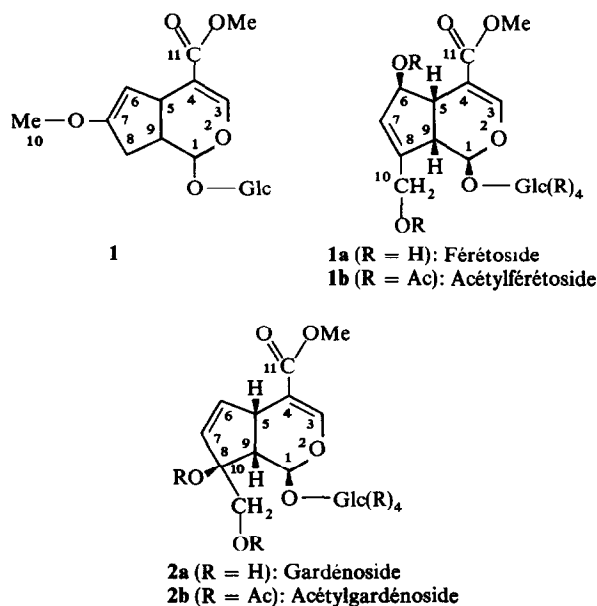
$H-C-O-$  ( $C_1$ ,  $C_{1'}$ ,  $C_2$ ,  $C_3$ ,  $C_4$ , et  $C_5$ ) et 2  $C-CH-C-$  ( $C_5$  et  $C_9$ ). –2 carbones diprotonés de type  $-CH_2-O-$  ( $C_{10}$  et  $C_6$ ). –7 carbones triprotonés (6 groupements acétyle et un groupement carbométhoxyle).

Par rapport à l'hexaacétyl férétoside 1b, on observe donc deux modifications majeures au niveau de  $C_6$  et  $C_8$ , traduisant une migration conjointe de la double liaison en 6–7 et du groupement acétoxy en 8. Cette structure correspond à celle de l'hexaacétylgardenoside [9] auquel le composé 2b a été identifié par ses constantes physiques (F. 65°,  $[\alpha]_D^{20} = -70,5^\circ$  [MeOH,  $c = 1$ ]). L'examen du spectre de RMN du  $^{13}C$  du mélange de 1a et 2a montre l'absence des signaux dus à un groupement acétyle. Le férétoside 1a est donc l'ester méthylque du scandoside: il s'agit d'un composé non encore décrit à l'état naturel. Le second iridoïde est le gardenoside 2a.

#### PARTIE EXPERIMENTALE

Les spectres de RMN du carbone 13 sont enregistrés à 20 MHz sur un appareil Varian CFT 20. Le solvant employé pour les hétérosides non acétylés est  $D_2O$  renfermant du méthanol ou du dioxane comme référence interne, les déplacements chimiques étant ensuite convertis en référence au TMS. Pour tous les autres composés le solvant utilisé est  $CDCl_3$  contenant du TMS en référence interne. Les déplacements chimiques sont déterminés avec une précision de l'ordre de 0,1 ppm. Les spectres de RMN du proton sont enregistrés sur un appareil Varian T 60 A avec comme solvant  $CDCl_3$  renfermant du TMS en référence interne.

**Extraction et purification.** 1,5 kg d'écorces de tiges réduites en poudre fine sont lixiviées à l'aide  $EtOH$  à 96°, jusqu'à ce que le percolat ne donne plus de coloration bleue par chauffage en milieu chlorhydrique. La solution alcoolique (6 l.) est distillée sous pression réduite jusqu'à siccité. Le résidu sec est mélangé à de la célite pour obtenir une masse pulvérulente qui est épuisée à chaud par de  $Et_2O$  de pétrole (2 l.) puis à froid par  $CHCl_3-EtOH$  (4:1) (10 l.). L'extrait enrichi en iridoïdes obtenu par distillation (30 g) est purifié par chromatographie sur colonne de silice (250 g de silice Merck; 0,2–0,5 mm) montée dans le  $CHCl_3$  et éluée par  $CHCl_3-MeOH$  de polarité croissante. Les fractions éluées par le  $CHCl_3$  contenant de 3 à 10% de MeOH présentant une seule tache bleue en CCM (support: plaques de



silice Merck; solvant: EtOH-CHCl<sub>3</sub>-HCl 50/35/10; révélateur: HCl 6N; chauffage 10 mn à 100°, sont réunies, distillées jusqu'à siccité et séchées sous vide phosphorique: on obtient un résidu d'iridoïdes purifiés pesant 10 g (*R*<sub>f</sub> 0,66 %).

Le spectre de RMN de <sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O) d'un échantillon soumis à une nouvelle purification par CCM préparative montre qu'il s'agit en réalité d'un mélange de deux produits (**1a** + **2a**): δ ppm: 98,3-94,5 (C<sub>1</sub>); 153,9-152,0 (C<sub>3</sub>); 110,7-111,6 (C<sub>4</sub>); 38,9-42,6 (C<sub>5</sub>); 82,3-130 (C<sub>6</sub>); 135,7 (signal double (C<sub>7</sub>)); 147,5-86,3 (C<sub>8</sub>); 47,2-45,5 (C<sub>9</sub>); 67,0-61,6 (C<sub>10</sub>); 170,0-169,3 (C<sub>11</sub>); 49,0-51,9 (OMe); 100,3-99,9 (C<sub>1</sub>); 74,7-74,9 (C<sub>2</sub>); 77,8 (signal double (C<sub>3</sub>)); 71,5 (signal double (C<sub>4</sub>)); 78,2 (signal double (C<sub>5</sub>)) 62,7-61,0 (C<sub>6</sub>).

**Action de l'émulsine sur le mélange 1a + 2a.** A une solution aqueuse de 1 g du mélange sont ajoutés 100 mg d'émulsine. La solution est abandonnée 48 hr à 37°, puis filtrée et distillée à sec sous pression réduite. Le résidu obtenu, redissous dans 0,1 ml de pyridine, est étudié en CCM (support: plaques de silice Merck, solvant: *n*-BuOH-*i*-PrOH-H<sub>2</sub>O (5:3:1), révélateur: aniline 0,93 g-ac. phtalique 1,66 g-*n*-BuOH saturé d'eau 100 ml. Chauffage 10 mn à 100°) comparativement avec divers témoins d'oses (glucose, galactose, rhamnose): on observe une seule tache, de même *R*<sub>f</sub> que le glucose.

**Acétylation du mélange 1a + 2a: 1b et 2b.** 8 g du mélange sont dissous dans 40 ml de pyridine. Après addition de 200 ml d'Ac<sub>2</sub>O, la solution est abandonnée pendant 48 hr à la température du laboratoire, à l'abri de la lumière. Elle est ensuite diluée par 500 ml d'eau froide et extraite par le CHCl<sub>3</sub> (5 × 150 ml). La solution CHCl<sub>3</sub> est séchée, puis distillée sous pression réduite, jusqu'à l'obtention d'un résidu sec (12 g) constitué du mélange des deux dérivés péraécylés **1b** et **2b**. Ceux-ci présentant des *R*<sub>f</sub> distincts en CCM (support: plaques de silice Merck solvant: Et<sub>2</sub>O-pétrole (4:1), révélateur: HCl 6N-chauffage 10 mn à 100°) (0,4 et 0,5 respectivement) sont séparés par chromatographie sur colonne de silice (40 g de silice Merck 0,063-0,2 mm) montée dans pétrole et éluee par pétrole-Et<sub>2</sub>O de polarité croissante. Les fractions pétrole-Et<sub>2</sub>O (1:1) renferment **2b** qui est soumis à une nouvelle purification par CCM préparative. Les fractions pétrole-Et<sub>2</sub>O (2:3) fournissent **1b** à l'état pur.

**Hexaacétyl férétoside 1b.** Cristallise dans l'éther en micro-prismes F. 133-134°. C<sub>29</sub>H<sub>36</sub>O<sub>17</sub>: calc. C 53,03; H 5,53; O 41,43 %, tr: C 53,17; H 5,80; O 41,03 %. [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -78° (MeOH,

*c* = 0,8). UV: λ<sub>max</sub> nm (log ε) 235 (3,80) (MeOH). IR: ν cm<sup>-1</sup> 1745, 1700, 1645 (KBr). RMN <sup>1</sup>H: δ ppm 1,90-2,10 (6 Me-CO); 3,25 (*m* H<sub>5</sub>, H<sub>9</sub>); 3,75 (*s* Me-O-CO); 4,75 (*m* 2H<sub>10</sub>); 5,55 (*m* H<sub>7</sub>); 5,90 (*m* H<sub>1</sub>); 7,45 (*m* H<sub>3</sub>). RMN du <sup>13</sup>C: voir Tableau 1. Hexaacétyl gardénoside **2b**. Poudre blanche, F. 64-65°, [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -70,5° (MeOH, *c* = 1). UV: λ<sub>max</sub> nm (log ε): 233 (3,50) (MeOH). IR: ν cm<sup>-1</sup> 1760, 1720, 1650 (KBr). RMN <sup>1</sup>H: δ ppm 1,80-2,05 (6 MeCO); 2,80 (*dd* H<sub>9</sub>); 3,68 (*s* MeO); 5,90 (*d* H<sub>7</sub>); 6,07 (*d* H<sub>1</sub>); 6,36 (*dd* H<sub>6</sub>); 7,35 (*s* H<sub>3</sub>). RMN du <sup>13</sup>C: voir tableau 1.

**Remerciements**—Les auteurs expriment leur gratitude à M. Q. Bognounou pour la fourniture des écorces de Feretia et au Pr. Inouye pour l'aimable envoi d'un échantillon authentique d'hexaacétyl méthylscandoside.

## BIBLIOGRAPHIE

1. a. Schilling, G., Henkels, W.-D., Künstler, K., Weinges, K., Kloss, P., et Jaggy, H. (1975) *Liebigs Ann. Chem.* 230.  
b. Weinges, K., Künstler, K., Schilling, G. et Jaggy, H. (1975) *Liebigs Ann. Chem.* 143.
2. a. Sticher, O. et Junod-Busch, U. (1975) *Pharm. Act. Helv.* 50, 127.  
b. Jensen, S. R., Nielsen, B. J. et Damlgren, R. (1975) *Botaniska Notiser* 128, 148 et autres références citées.
3. a. Stothers, J. B. (1972) *Carbon 13 NMR Spectroscopy*. Academic Press, New York.  
b. Levy, G. C. et Nelson, G. L. (1972) *Carbon 13 Nuclear Magnetic Resonance for Organic Chemists*. Wiley Interscience, New York.  
c. Breitmaier, E. et Voelter, W. (1974) *Carbon 13 NMR Spectroscopy*. Verlag Chemie, Berlin.
4. Bock, K. et Pedersen, C. (1974) *J. Chem. Soc. Perkin II*, 293.
5. Wehrli, F. W. (1974) *Adv. in Molecular Relaxation Processes*, 6, 139.
6. Delaveau, P., Koudogbo, B., Bailleul, F., Bognounou, Q. et Randrianjohany, E. (1974). *C.R. Acad. Sci. Paris* 279, 613.
7. Inouye, H., Ueda, S., Hirabayashi, M. et Shimokawa, N. (1966) *Yakugaku Zasshi* 86, 943.
8. Inouye, H., Inouye, S., Shimokawa, N. et Okigawa, M. (1969) *Chem. Pharm. Bull.* 17, 1942.
9. Inouye, H., Saito, S., Tagushi, H. et Endo, T. (1969) *Tetrahedron Letters* 2347.