

LA 5'-MÉTHOXYBILOBÉTINE, UNE BIFLAVONE EXTRAITE DU *GINKGO BILOBA*

MARC JOLY, MICHELINE HAAG-BERRURIER et ROBERT ANTON

Laboratoire de Pharmacognosie, Faculté de Pharmacie, Université Louis Pasteur, B.P. 10, 67048 Strasbourg Cedex, France

(Revisé reçu le 10 janvier 1980)

Key Word Index—*Ginkgo biloba*; Ginkgoaceae; biflavones; 5'-methoxybilobetin; ^1H NMR; ^{13}C NMR.

Abstract—A new biflavone, I-5'-methoxybilobetin has been isolated from *Ginkgo biloba* leaves. ^1H and ^{13}C NMR spectral data show that it is a II-4', I-5, II-5, I-7, II-7-pentahydroxy-I-4', I-5'-dimethoxy-[I-3', II-8] biflavone.

INTRODUCTION

Le *Ginkgo biloba* L. est la première plante d'où ont été isolées des biflavones. Ce sont: la ginkgétine (3) et l'isoginkgétine (4) [1], dont la détermination de structure a fait l'objet de nombreux travaux [2–6], la bilobétine (2) [6] et la sciadopitysine (5) [7]. Nous avons obtenu ces mêmes biflavones à partir d'un extrait acétonique de feuilles de *Ginkgo biloba* L.; la fraction brute renfermant 2 a montré la présence d'au moins deux autres substances *a priori* inconnues. Nous rendons compte dans le présent travail de l'isolement et de l'identification de l'une d'elles: une nouvelle biflavone pour laquelle nous proposons le nom de I-5'-méthoxy-bilobétine (6).*

RÉSULTATS ET DISCUSSION

La fraction brute contenant 2 est chromatographiée sur colonne de Polyclar AT; 6 (25 mg) a été obtenu après cristallisation dans un mélange éthanol-eau sous forme d'un solide jaune, $F = 251^\circ$. En CCM, 6 présente une fluorescence pourpre à 366 nm, et jaune intense après révélation par AlCl_3 et par l'ester β -amino-éthylrique de l'acide diphenyl-borique, caractéristiques des pigments flavoniques [8]. Le spectre UV dans le méthanol est proche de celui de l'apigénine, mais la bande λ_{M} 270 nm comparée à la bande λ_{M} 330 nm présente une intensité d'absorption plus élevée que pour les flavones monomères; le déplacement bathochrome après addition d' AlCl_3 engendre l'apparition de deux épaulements à 385 et 300 nm et de deux maxima à 345 et 280 nm; ce sont des propriétés générales des spectres UV-visibles des biflavones de type 'biapigénine' [9, 10].

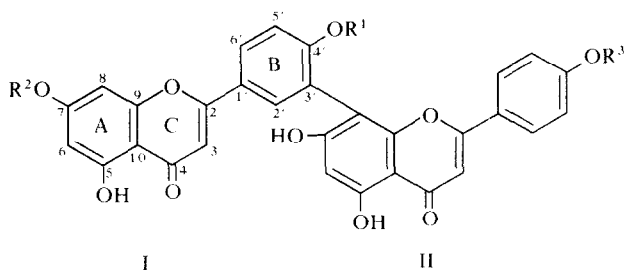
Le spectre de masse de 6 per-TMS donne $M^+ = 942$, $M^+ - 15 = 927$, tandis que celui de 6 per-TMS- d_5 donne $M^+ = 987$, $M^+ - 18 = 969$. L'augmentation de masse est donc de 45, ce qui correspond à la fixation de 5 TMS sur 5 hydroxyles libres de 6. La masse de 6 est donc de 582. Le spectre ^1H RMN de 6 montre onze protons sur double liaison et deux pics correspondant à trois protons chacun,

du à deux méthoxyles (voir Tableau 3). Une CCM préparative permet de recueillir les produits formés au cours des différents stades réactionnels d'une déméthylation ménagée de 6. Les spectres UV de 6 et du produit partiellement déméthylé sont semblables, et en particulier, le déplacement bathochrome obtenu après addition d' AlCl_3 ne dépasse pas 55 nm (épaulement à 385 nm) tandis que le déplacement obtenu dans les mêmes conditions pour 6 totalement déméthylé atteint 80 nm (maximum à 410 nm) qui, par addition de HCl, subit un déplacement hypsochrome de 25 nm (épaulement à 385 nm). Ainsi, dans 6 totalement déméthylé il existe deux hydroxyles libres en *ortho*, dont au minimum un existe sous forme de méthoxyle dans 6 [9]. L'un au moins des monomères de 6 est donc du type 'lutéoline'.

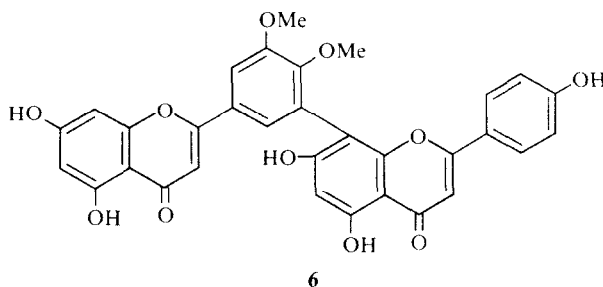
Dans le spectre ^{13}C RMN, cinq parties peuvent être distinguées: I: deux carbones de carbonyle à 182.1 et 181.9 ppm; II: onze carbones quaternaires liés à un oxygène, entre 164.4 et 150.8 ppm; III: trois carbones quaternaires non liés à un oxygène et six-CH entre 128.2 et 110.8 ppm, à attribuer aux carbones des cycles B; IV: trois carbones quaternaires et cinq-CH entre 104.9 et 94.3 ppm, où apparaissent les carbones des positions C-3, C-6, C-8 (non liés à un oxygène) et C-10; V: deux méthyles de méthoxyles à 56.4 et 60.3 ppm [11].

Les déplacements chimiques des carbonyles dans la partie I, montrent qu'il s'agit d'une biflavone, plutôt que d'un dimère de flavonol, de flavanone ou de flavanonol [12]. Dans la partie II, huit carbones quaternaires reviennent aux carbones C-2, C-6, C-8 et C-9; il y a donc trois carbones liés à un oxygène sur les cycles B. Sur les douze carbones des cycles B, on en retrouve neuf dans la partie III (les trois carbones de la partie II manquent ici); deux des carbones quaternaires revenant aux carbones C-1', le troisième intervient donc dans la liaison interflavonique. La partie IV contient tous les huit carbones attendus; deux carbones quaternaires et deux-CH sont réservés aux carbones C-10 et C-3 respectivement; par conséquent, les carbones C-6 et C-8 se partagent un carbone quaternaire et trois-CH. Ainsi, on peut déjà affirmer que la liaison C-C interflavonique se fait entre le cycle B d'une des unités flavoniques vers la position C-6 ou C-8 de l'autre.

* Pour garder l'analogie avec les biflavones du *Ginkgo biloba*, nous avons maintenu la liaison C-C de 6 en I-3'.



- | | |
|------------------|---------------------------|
| 1 Amentoflavone | $R^1 = R^2 = R^3 = H$ |
| 2 Bilobétine | $R^1 = Me, R^2 = R^3 = H$ |
| 3 Ginkgétine | $R^1 = R^2 = Me, R^3 = H$ |
| 4 Isoginkgétine | $R^1 = R^3 = Me, R^2 = H$ |
| 5 Sciadopitysine | $R^1 = R^2 = R^3 = Me$ |



D'après la littérature [11], les déplacements chimiques de 102.7 et 104.9 ppm appartiennent aux carbones C-3 (—CH), celles de 103.9 et 103.6 (ou 103.9) ppm aux carbones C-10. Quatre déplacements chimiques subsistent pour les carbones C-6 et C-8: 94.3; 98.6; 99.1; 103.9 (ou 103.6) ppm. D'autre part, un —CH en C-6 résonne vers 99 ppm, et un —CH en C-8 vers 94 ppm: voir Tableau 1 (tiré de [11]).

6 possède ainsi deux —CH en position I-6 et II-6, et un seul —CH en position C-8; la liaison interflavonique est donc nécessairement réalisée en position C-8 sur l'un des flavonoides. Le déplacement du C-8 en raison de la liaison C-C est de l'ordre de 10 ppm. Habituellement, ce déplacement n'est que de 5 ppm environ, sauf pour l'amentoflavone (**1**) où il est aussi de 10 ppm, ce qui incite à penser à une liaison du même type pour **6** [12].

Le Tableau 2 (qui compare **6** à des dérivés méthoxylés de la lutéoline pour la partie I), permet de faire ressortir la parfaite identité de la partie II de **6** avec la partie correspondante de l'amentoflavone (**1**). L'examen du spectre 1H RMN de **6**, comparativement à ceux de la bilobétine (**2**), de la I-4', II-4', I-7, II-7-tétraméthoxy amentoflavone et de l'acacétine (Tableau 3), montre que la seule différence entre **6** et **2** porte sur le proton en I-3 et sur les protons du cycle I-B, où le proton en C-5' manque et où il n'y a que deux protons couplés uniquement en *méta* (et non plus en *ortho*).

Compte tenu des informations précédentes, deux structures peuvent être proposées: celle d'une II-4', I-5, II-5, I-7, II-7-penta-hydroxy-I-4', 5'-diméthoxy-[I-3', II-8] biflavone (**6**) ou d'une II-4', I-5, II-5, I-7, II-7-penta-hydroxy-I-5', I-6'-diméthoxy-[I-3', II-8] biflavone (**7**).

Tableau 1. Comparaison des déplacements chimiques des carbones C-6 et C-8 dans le spectre ^{13}C RMN de la I-5'-méthoxybilobétine (**6**) et de biflavones de référence (tiré de [11]) (DMSO- d_6 -TMS: 250 MHz)

Amentoflavone (1) (I. I-3', II-8)	Robustaflavone (I. I-3', II-6)	Cupressuflavone (I. I-8, II-8)	Succédanéaflavone (I. I-6, II-6)	I-5'-Méthoxy- bilobétine (6) (I. I-3', II-8)
(104.1 II-8)	(103.5 II-6)		(101.1 I-6)	(103.9 II-8)
99.1 II-6	99.0 I-6	99.0 I-6	(101.1 II-6)	99.1 II-6
98.9 I-6		99.0 II-6		98.6 I-6
94.2 I-8	94.0 I-8	(98.7 I-8)	94.7 I-8	94.3 I-8
	93.9 II-8	(98.7 II-8)	94.7 II-8	

Les déplacements chimiques entre parenthèses correspondent aux carbones intervenant dans les liaisons interflavoniques.

Tableau 2. Comparaison des spectres ^{13}C RMN de la I-5'-méthoxybilobétine (**6**) et de substances de référence (tirées de [11] et [12]) (DMSO- d_6 -TMS; 250 MHz)

	I-5'-Méthoxy- bilobétine 6	Chrysoériol	Diosmétine	Partie II de	
				I-5'-Méthoxy- bilobétine 6	Amentoflavone I
C-2	163.7	163.7	163.6	164.4	164.3
C-3	104.9	103.8	104.0	102.7	102.8
C-4	181.8	181.8	181.8	182.1	182.2
C-5	161.5	161.6	161.7	160.8	160.8
C-6	98.6	98.8	99.0	99.1	99.1
C-7	163.1	164.2	164.4	161.8	162.0
C-8	94.3	94.0	94.0	103.9	104.1
C-9	157.5	154.4	157.5	154.3	154.7
C-10	103.6	103.3	103.7	103.9	104.0
C-1'	125.9	121.7	123.3	121.4	120.3
C-2'	110.8	110.2	113.1	128.2	128.3
C-3'	126.7	115.8	112.1	115.8	116.0
C-4'	152.9	148.0	151.2	161.1	161.1
C-5'	150.8	150.8	146.9	115.8	116.0
C-6'	123.0	120.4	118.7	128.2	128.3

Chrysoériol = 3'-O-méthyl lutéoline; diosmétine = 4'-O-méthyl lutéoline. Remarque: pour garder l'analogie avec les biflavones du *Ginkgo biloba* nous avons maintenu la liaison C-C de **6** en I-3'; il a donc été nécessaire de considérer la lutéoline comme étant une 4',5'-dihydroxy flavone, et de numéroter son cycle B en sens inverse.

Tableau 3. Comparaison des spectres ^1H RMN de la I-5'-méthoxybilobétine (**6**) et de substances de référence (DMSO- d_6 -TMS; 90 MHz)

H	I-5'-Méthoxy- bilobétine (6)	Bilobétine (2)	I-4', II-4, I-7, II-7- tetra-O-méthyl amentoflavone	Acacétine
I-3	<u>s 7.08</u>	<u>s 6.93</u>	s 7.01	s 6.87
I-6	d 6.22 (2)	d 6.21 (2)	d 6.37 (2)	d 6.20 (2)
I-8	d 6.51 (2)	d 6.50 (2)	d 6.79 (2)	d 6.51 (2)
I-2'	d <u>7.72*</u> (2)	d <u>8.07</u> (2)	d 8.10 (2)	d 8.03 (9)
I-3'				d 7.11 (9)
I-5'		d <u>7.36</u> (9)	d 7.51 (9)	d 7.11 (9)
I-6'	d <u>7.76*</u> (2)	dd <u>8.19</u> (2; 9)	dd 8.20 (2; 9)	d 8.03 (9)
II-3	s 6.80	s 6.80	s 6.96	
II-6	s 6.42	s 6.41	s 6.70	
II-2',-6'	d 7.54 (9)	d 7.52 (9)	d 7.62 (9)	
II-3',-5'	d 6.71 (9)	d 6.72 (9)	d 6.94 (9)	
-OMe	s 3.63; 4.03	s 3.79	s 3.76; 3.81; 3.84; 3.84	

*Déplacements chimiques interchangeables.

Chiffres entre parenthèses = J (Hz).

Les chiffres soulignés montrent les différences entre **6** et **2**.

L'éventualité de la présence d'un méthoxyle en I-6', au lieu de I-4' a été écartée pour la raison développée ci-dessous.

La différence de structure porte sur les deux protons pouvant être présents soit en I-2' et -6', soit en I-2' et -4'. Les déplacements chimiques expérimentaux de ces deux protons sont de 7.72 et 7.76 ppm. Nous n'avons pas pu disposer des spectres RMN de la 5,7-dihydroxy-3',4'-diméthoxy flavone et de la 5,7-dihydroxy-2',3'-diméthoxy

flavone pour les comparer. Mais la littérature donne les déplacements chimiques des protons du cycle B de la chrysine (5,7-dihydroxy flavone): H 2', 6' = 8.05 ppm; H 3', 4', 5' = 7.60 ppm [13]; d'autre part, l'introduction d'un méthoxyle en C-3' ou C-4' entraîne une diminution du déplacement chimique d'environ 0.50 ppm pour un proton en *ortho*, d'environ 0.03 ppm pour un proton en *méta* et d'environ 0.33 ppm pour un proton en *para*, et cet effet est additif jusqu'à trois substitutions [14].

Les déplacements chimiques théoriques approximatifs calculés pour les deux protons concernés sont:

$$6: \text{H } 2' = 8.05 - 0.03 (m) - 0.33 (p) = 7.69 \text{ ppm,}$$

$$\text{H } 6' = 8.05 - 0.50 (o) - 0.33 (m) = 7.52 \text{ ppm,}$$

$$7: \text{H } 2' = 8.05 - 0.03 (m) - 0.33 (p) = 7.69 \text{ ppm,}$$

$$\text{H } 4' = 7.60 - 0.50 (o) - 0.03 (m) = 7.07 \text{ ppm.}$$

L'introduction de la liaison C-C en C-3' augmente de 0.04–0.16 ppm les déplacements chimiques des protons en C-2' et C-6', et celui du proton en C-5' de 0.25 ppm (comparer les déplacements chimiques de l'acacétine avec ceux de la partie I de la bilobétine dans le Tableau 3). Même avec une augmentation de 0.25 ppm, le proton en C-4' de 7 est très loin du minimum requis (7.72 ppm), alors qu'avec une augmentation de 0.04–0.16 ppm pour les protons en C-2' et C-6' de 6, on retrouve les valeurs expérimentales.

Le nouveau biflavonoïde, la 5'-méthoxybilobétine répond donc à la structure 6, d'une II-4',I-5,II-5,I-7,II-7-pentahydroxy-I-4',I-5'-diméthoxy-[1-3',II-8] biflavone.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

F non corrigé, bloc Variac G.R. Spectres UV effectués dans MeOH, spectres ^1H RMN et ^{13}C RMN dans DMSO- d_6 -TMS, à 90 et 250 MHz respectivement; SM introduction directe, temp. de source: 270°, tension d'accélération: 8 kV, énergie des électrons: 70 et 12 eV.

Extraction et isolement. Feuilles sèches de *Ginkgo biloba* L. (10 kg), récoltées en été, épuisées par $\text{Me}_2\text{CO}-\text{H}_2\text{O}$ (6:4) (2 \times 30 l.); évapn de Me_2CO , refroidissement. Précipité (460 g) épuisé successivement par C_2HCl_3 (4 \times 450 ml), H_2O bouillante et BuOH. Phase BuOH épuisée par KOH aq. (2.5%). Phase aq. amenée à pH = 4 par addition de HCl dilué. Formation d'un ppt. (5.7 g), repris par EtOH- H_2O (1:1) bouillant (50 ml). Le précipité obtenu après refroidissement est constitué par un mélange (A) brut de biflavones (2.6 g). Le mélange A fractionné sur colonne de Polyclar AT [75 g; solvant: CHCl_3 -MeOH-MeCOFr (4:2:1)] donne des fractions brutes de bilobétine (fraction B = 1.0 g), ginkgétine-isoginkgétine et sciadopitysine. La fraction B chromatographiée sur colonne de Polyclar AT (20 g; même solvant) donne la fraction C (180 mg) contenant 6, rechromatographiée sur Polyclar AT (5 g; même solvant). Obtention d'une fraction brute (40 mg) qui, après cristallisation dans EtOH- H_2O (1:1), donne 6 (25 mg).

Préparation des dérivés per triméthylsilylés (per-TMS) de 6. Dérivé per-TMS: A 6 (100 μg) addition de 50 μl de Py et de BSTFA (*N*-O-bis-(triméthylsilyl) trifluoroacétamide) et 1% de triméthylchlorosilane; laissé au BM à 80° pendant 12 hr. Dérivé per-TMS- d_9 : Mêmes conditions, avec de l'hexaméthylidisilazane- d_{18} et 1% de triméthylchlorosilane non deutérié.

Déméthylation de 6. A 6 (2 mg) sont ajoutées 15 gouttes de HBr et de HOAc 100%; séjour au BM à 90° pendant 6 hr; addition d'un large excès d' H_2O distillée; centrifugation; le résidu est lavé avec H_2O distillée avant reprise par MeOH (200 μl). CCM préparative de la solution MeOH sur plaque de micropolyamide Schleicher et Schüll [migration 10 cm; solvant: CHCl_3 -MeOH (1:1)]. Taches éluées avec MeOH (Merck pour spectrométrie). $R_f \times 100$: 6 totalement deméthylé = 15; 6 partiellement deméthylé = 40; 6 = 85 (dans les mêmes conditions = 70).

Remerciements—Nous tenons à remercier les laboratoires IPSEN pour l'aide financière qu'ils nous ont accordée.

BIBLIOGRAPHIE

1. Furukawa, S. (1933) *Sci. Pap. Inst. Phys. Chem. Res. Tokyo* **21**, 273.
2. Baker, W. et Simmonds, V. M. C. (1940) *J. Chem. Soc.* 1370.
3. Nakazawa, K. (1941) *J. Pharm. Soc. Jpn* **61**, 90, 174, 228.
4. Baker, W. (1959) *Proc. Chem. Soc.* 91.
5. Kawano, N. (1959) *Chem. Ind. (London)* 368.
6. Baker, W., Finch, A. C. M., Ollis, W. D. et Robinson, K. W. (1963) *J. Chem. Soc.* 1477.
7. Miura, H., Kihara, T. et Kawano, N. (1969) *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **17**, 150.
8. Egger, K. (1969) in *Thin Layer Chromatography* (Stahl, E., ed.) 2nd edn., pp. 687–706. Springer, Berlin.
9. Mabry, T. J., Markham, K. R. et Thomas, M. B. (1970) in *The Systematic Identification of Flavonoids*. Springer, Berlin.
10. Joly, M., Haag-Berrurier, M. et Anton, R., in preparation.
11. Chari, V. M., Ilyas, M., Wagner, H., Neszmelyi, A., Chen, F. C., Chen, L. K., Lin, Y. C. et Lin, Y. M. (1977) *Phytochemistry* **16**, 1273.
12. Chari, V. M., Wagner, H. et Neszmelyi, A. (1977) in *Flavonoids and Biflavonoids Current Research Trends* (Farkas, L., Gabor, M. et Kallay, F., eds.), pp. 49–66. Elsevier Scientific, Amsterdam.
13. Batterham, T. J. et Highet, R. J. (1964) *Aust. J. Chem.* **17**, 428.
14. Massicot, J. et Marthe, J. P. (1962) *Bull. Soc. Chim. Fr.* 1962.