

UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL
FACULTÉ DES SCIENCES

IDENTIFICATION DE COMPOSES POLYPHENOLIQUES
DANS GENTIANA CAMPESTRIS L.,
GENTIANA GERMANICA WILLD.
ET GENTIANA RAMOSA HEGETSCHW.

THÈSE PRÉSENTÉE À LA FACULTÉ DES SCIENCES PAR

MARYSE KALDAS
INGÉNIEUR CHIMISTE DIPLOMÉ
DE L'UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL
POUR L'OBTENTION DU GRADE DE
DOCTEUR ÈS SCIENCES



INSTITUT DE CHIMIE
DE L'UNIVERSITÉ DE
NEUCHÂTEL

MARS 1977

IMPRIMATUR POUR LA THÈSE

Identification de composés polyphénoliques
dans Gentiana campestris L., Gentiana
germanica Willd et Gentiana ramosa
Hegetschw.

de M^{me} Maryse Kaldas

UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL

FACULTÉ DES SCIENCES

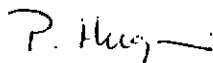
La Faculté des sciences de l'Université de Neuchâtel,
sur le rapport des membres du jury,

MM. les professeurs A. Jacot-Guillarmod,
C. Favarger et R. Hegnauer (Leiden)

autorise l'impression de la présente thèse sans exprimer
d'opinion sur les propositions qui y sont contenues.

Neuchâtel, le 1^{er} juin 1977

Le doyen :



P. Huguenin

A mes parents.

A ceux qui me sont chers.

Le présent travail a été effectué de septembre 1973 à mars 1977 dans les laboratoires de chimie organique de l'Institut de Chimie de l'Université de Neuchâtel sous la direction de Monsieur le Professeur André Jacot-Guillarmod, auquel nous exprimons toute notre reconnaissance pour le soutien précieux et les conseils qu'il nous a donnés tout au long de ce travail.

Nous tenons à remercier également Monsieur le Professeur Claude Favarger pour son efficace collaboration quant au choix du matériel végétal et ses nombreux conseils dans le domaine botanique. Nous remercions Monsieur le Professeur Raphaël Tabacchi de son aide pour l'interprétation des spectres de résonance magnétique nucléaire.

Nous exprimons toute notre gratitude à Monsieur Kurt Hostettmann qui nous a fait bénéficier de son expérience dans le domaine de l'isolement et de la chromatographie.

Enfin, tous nos remerciements vont à ceux qui nous ont apporté leur collaboration, en particulier Michel Goetz, Luong Minh Duc, Jean-Bernard Weber.

Nos remerciements vont aussi à la maison Hoffmann-La Roche & Co., à Bâle, pour le relevé des spectres RMN 100 MHz.

TABLE DES MATIÈRES

Page

I. INTRODUCTION

1.	HISTORIQUE DU GENRE <u>GENTIANELLA</u>	1
2.	COMPARAISON ENTRE LES GENRES <u>GENTIANA</u> ET <u>GENTIANELLA</u>	3
3.	OBJET DE NOTRE INVESTIGATION	6
4.	DISTRIBUTION DES POLYPHENOLS DANS LE GENRE <u>GENTIANELLA</u>	8

II. RECHERCHE ENTREPRISE

5.	RESULTATS OBTENUS EXTRACTION ET ISOLEMENT DES POLYPHENOLS	12
5.1.	Matériel végétal	15
5.2.	Extraction	16
5.3.	Séparation et isolement	20
6.	IDENTIFICATION DES SUBSTANCES ISOLEES	29
6.1.	Comportement chromatographique	31
6.2.	Etude des spectres UV	37
6.2.1.	Flavones et flavonols	38
6.2.2.	Xanthones	54
6.3.	Spectrométrie IR	85
6.4.	Spectrométrie RMN	89
6.4.1.	Substances identifiées par RMN	96
6.5.	Résumé et conclusions	107
6.6.	Données analytiques	110

III. UTILISATION DES RESULTATS EN CHIMIOTAXONOMIE

7.	PHYTOCHIMIE COMPAREE DU GENRE <u>GENTIANELLA</u> MOENCH	112
8.	DISCUSSION DES RESULTATS	115
8.1.	Distribution des substances identifiées dans la famille des <u>Gentianaceae</u>	115
8.2.	Répartition des composés xanthoniques des <u>Gentianaceae</u>	118
9.	CONCLUSIONS	122

IV. PARTIE EXPERIMENTALE

10.	TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES	123
10.1.	Chromatographie sur couche mince	123
10.2.	Chromatographie sur couche mince à l'échelle préparative	125
10.3.	Chromatographie sur colonne	125
11.	TECHNIQUES D'ANALYSE	
11.1.	Hydrolyse acide	127
11.2.	Hydrolyse enzymatique	127
11.3.	Méthylation	128
11.4.	Acétylation	129
11.5.	Spectrométrie UV	130
11.6.	Spectrométrie IR	130
11.7.	Spectrométrie RMN	130

BIBLIOGRAPHIE

I. INTRODUCTION

I. HISTORIQUE DU GENRE GENTIANELLA ¹⁾

Le genre Gentiana est généralement attribué à TOURNEFORT [1] qui utilise un nom de DIOSCORIDE [2] commémorant la légende du roi Gentius d'Illyrie. RUPPIUS [3] en 1726 distingue deux genres : Gentiana et Gentianella. Dans son "Genera Plantarum" de 1737 cependant, LINNE reprend le genre Gentiana de Tournefort et le divise en sept groupes, dont quelques uns correspondent aux sections actuelles. MOENCH en 1794 [4] propose un genre particulier : Gentianella, comprenant une seule espèce : Gentianella tetrandra MOENCH (= Gentiana campestris L.). En 1796, BORKHAUSEN [5] de son côté propose un genre Gentianella dans lequel il inclut les gentianes ciliées (Section Crossoptalum Fröhl.). Ces travaux resteront ignorés durant tout le dix-neuvième siècle. Lorsqu'en 1894 KUSNEZOV [6] propose sa classification des gentianes, il regroupe toutes les espèces dans le genre Gentiana qu'il subdivise en deux sous-genres : Eugentiana et Gentianella Kusnez. En 1922, SCHUSTLER [7] rétablit Gentianella au rang de genre en attribuant le nom incorrectement à Borkhausen plutôt qu'à Moench.

Alors que de très nombreux ouvrages maintiennent un seul genre, certains auteurs, depuis une vingtaine d'années ont adopté le genre Gentianella : en particulier LÖVE [8], GILLET [9], TOYOKUNI [10] et ILTIS [11] .

1) Pour rédiger cette introduction, nous nous sommes servis, entre autres, de la mise au point de GILLET (1957). [9]

Tableau No. 1 :

Position systématique des taxons étudiés

d'après Toyokuni 1963 [10] , Kusnezov [6] et Gillett 1957 [9]

Famille :	<u>G E N T I A N A C E A E</u>	(ca 52 genres ²⁾)	
Tribu :	<u>Gentianeae</u>		
Sous-tribu :	<u>Gentianinae</u>		
Genres :	Halenia, Ophelia, Swertia, Lomatogonium, Gentianopsis, Ptérigocalyx, Tripterospermum, <u>Gentiana</u> , etc.		<u>Gentianella</u>
Sous-genre :			<u>Gentianella</u> , etc.
Sections :		<u>Amarella</u> , Andicola, Antarctophila, etc.	
Espèces :		<u>G. campestris</u> L. <u>G. ramosa</u> Hegetschw. <u>G. germanica</u> Willd. G. amarella G. austriaca etc.	

2) R. Hegnauer (1966) [12]

2. COMPARAISON ENTRE LES GENRES GENTIANA ET GENTIANELLA

Hylander (1945) [13] a résumé comme suit les caractères morphologiques appuyant la séparation des 2 genres :

GENTIANA

1. Nectaires basigynes (autour du pédicelle de l'ovaire).
2. Lobules accessoires entre les pétales (plicae).
3. Membrane intracalycinale unissant, à l'intérieur, les lobes du calice. Préfloraison du calice valvaire.
4. Anthères fixes.
5. Pétales à 3 faisceaux libéroligneux.
6. Mésophylle des feuilles contenant des cristaux d'oxalate de calcium.

GENTIANELLA

- 1'. Nectaires à la face intérieure des pétales, près de la base.
- 2'. Pas de lobules entre les pétales.
- 3'. Pas de membrane intracalycinale. Préfloraison du calice imbriquée.
- 4'. Anthères versatiles.
- 5'. Pétales 5-9 faisceaux libéroligneux parallèles.
- 6'. Mésophylle des feuilles dépourvu de cristaux d'oxalate de calcium.

L'anatomie florale apporte d'autres critères :

Selon Lindsey [14] par exemple, les faisceaux ventraux des carpelles fusionnent chez Gentiana, alors qu'ils restent libres chez Gentianella. (Sauf dans la section Crossopetalum qui constitue maintenant le genre Gentianopsis).

Les données palynologiques sont trop complexes et nuancées pour apporter des arguments en faveur de la séparation des genres Gentiana et Gentianella. Selon Nilsson (1967) [15] la morphologie du pollen des sections Crossopetalum et Comastoma diffère de celle des autres sections du genre Gentianella ce qui confirme le point de vue de Ma (in Toyokuni 1963) et de Toyokuni (1962) [10]. En revanche, la section Amarella, rappelle par ses caractères palynologiques les espèces de Gentiana de la section Cyclostigma.

Il convient de faire remarquer que plusieurs des caractères séparant Gentianella de Gentiana se rencontrent dans les genres Swertia, Lomatogonium et Comastoma. Ce dernier a été considéré jusqu'en 1961 comme section du genre Gentiana ou respectivement Gentianella, bien que R. von Wettstein (1896) [16] ait montré la ressemblance des espèces de la section Comastoma avec Lomatogonium ³⁾ et Swertia. C'est en particulier le cas de la position des nectaires et de l'absence de la membrane intracalycinale.

Au point de vue cytologique, d'après D. Löve (1953) [8], Gillett (1957) [9], Toyokuni (1963) [10] et Favarger (1949, 1952, 1965 et communication orale) [17], le genre Gentianella

3) A. et D. Löve (1956) avaient proposé de transférer les espèces de la section Comastoma dans le genre Lomatogonium.

dans l'acception de Toyokuni (1963), est remarquablement homogène puisque la presque totalité des espèces étudiées ont un nombre zygotique de $2n = 36$ ⁴⁾. Favarger (1949) [17] estime que le nombre de base du genre est $X = 9$, contrairement à D. Löve (1953) [8] qui admet $X = 6$. En revanche, le genre Gentiana (sensu stricto) offre une ample gamme de variations des nombres chromosomiques puisqu'on y rencontre: $2N = 14, 18$ ⁵⁾, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 36, 40, 42, 44, 52. On peut en déduire, avec plus ou moins de certitude les nombres de base suivants: $X = 5, 6, 7, 9, 11$ et 13. Le nombre $N = 16$ chez G. favrati semble être un nombre de base secondaire (Müller 1974). Le genre Swertia est lui aussi polybasique. Selon Gill (1972) [19], les nombres de base seraient les suivants: $X = 8, 9, 10, 12, 13$ et 14. Cependant, les résultats des comptages sur la même espèce divergent parfois d'un auteur à l'autre; d'autre part, selon Skalinska (1952) [20] et Löve (1953) [8], les nombres 10, 12 et 14 pourraient être ramenés respectivement à $X = 5, X = 6$ et $X = 7$.

La phylogénie de la soustribu de Gentianinae comprenant le genre Gentianella a été ébauchée par Toyokuni (1962) [10] dans le tableau suivant que nous reproduisons en y ajoutant le nombre de base.

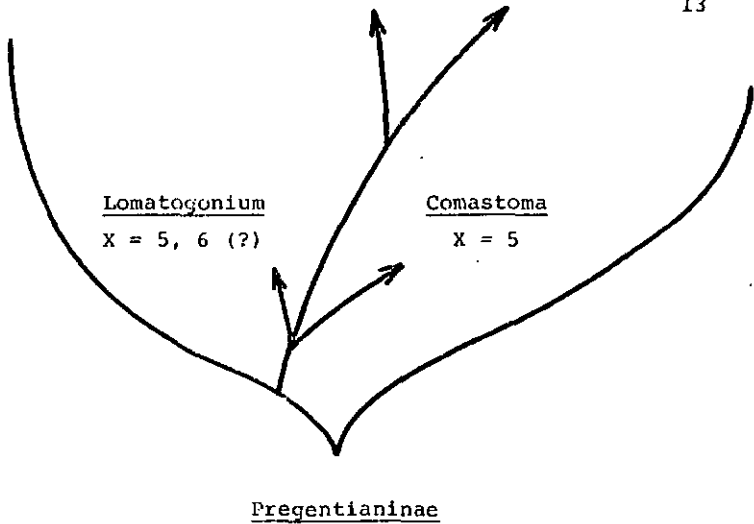
4) Le nombre $2n = ca 54$ a été compté par Holmen (in Löve et Löve 1961) chez G. uliginosa

5) D'après Vasudevan 1975 [18].

Tableau No. 2

PHYLOGENIE DE LA SOUS-TRIBU DES GENTIANINAE

<u>Swertia</u>	<u>Gentianella</u>	<u>Gentianopsis</u>	<u>Gentiana</u>
X = 5 (?) 6 (?) 7 (?) 8, 9, 13	X = 9	X = 11, 13	X = 5, 6, 7, 9, 11, 13



3. OBJET DE NOTRE INVESTIGATION

Nous nous sommes proposé d'utiliser les données de la phytochimie comparée pour tenter de résoudre les deux problèmes suivants:

- 1) L'homogénéité que montre sur le plan caryologique le genre monobasique Gentianella en regard de la variabilité des genres Gentiana et Swertia va-t-elle de pair avec une homogénéité du spectre des polyphénols ?

- 2) Est-il exact que le genre Gentianella est plus étroitement apparenté à Swertia, Lomatogonium et Halenia qu'à Gentiana, ainsi que l'ont affirmé Schustler (1923) [7] et Gillett (1957) [9] ?

Favarger (1952) [17] a insisté sur le fait que les espèces du sous-genre Gentianella (Gentianopsis et Comastoma exclus) ont non seulement $X = 9$, mais une morphologie des graines très semblable. Nilsson (1967) [15] de son côté a observé que les espèces de la section Amarella ressemblent par la morphologie du pollen à certains Gentianella d'Amérique du Sud. L'homogénéité constatée n'est pas due au fait que ce genre compte peu d'espèces. C'est au contraire un des plus riches en espèces de la famille (Toyokuni 1963) [10]. Tout récemment, Toyokuni et Toyokuni (1975) [10] ont proposé de séparer les espèces de Gentianella de l'Hémisphère Sud et celles de l'Hémisphère Nord, mais les auteurs n'indiquent pas sur quel argument ils se basent.

Nous ne pourrions répondre aux deux questions posées que d'une manière très partielle puisque nous n'avons étudié que trois espèces appartenant à la section Amarella. Toutefois, en comparant nos résultats avec ceux d'autres auteurs ayant travaillé sur des espèces néozélandaises de la section Antarctophila et sur le genre Swertia, nous pensons pouvoir obtenir quelques éléments d'une réponse.

4. DISTRIBUTION DES POLYPHENOLS DANS LE GENRE GENTIANELLA

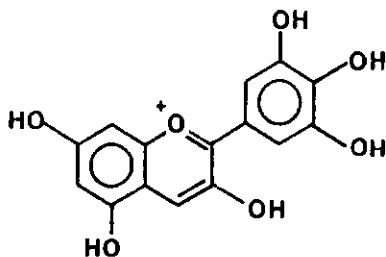
Les études phytochimiques du genre Gentianella n'ont fait l'objet que d'un nombre restreint de mémoires. La distribution des polyphénols telle qu'elle apparaît avant nos travaux est résumée dans le tableau suivant .

Tableau No. 3

Distribution des polyphénols dans le genre *Gentianella*.

Section	Espèces	Substances	Réf.
Amarella	<i>G. campestris</i> L.	glucosides de la delphinidine glycoflavones	[21] [73]
Amarella	<i>G. germanica</i> Willd.	gentialutéine	[22]
Antarctophila	<i>G. corymbifera</i> Kirk.	corymbiférine glycoside de la corymbiférine	[23] [23]
Antarctophila	<i>G. bellidifolia</i> Hook.	bellidifoline 5 - O-méthylbellidifoline desméthylbellidifoline isobellidifoline corymbiférine trihydroxy - 1,3,8- diméthoxy - 4,7 xanthone ou 4,7-di-O-méthylbellidine	[24] [24] [24] [25] [26] [26]

delphinidine



bellidifoline :

$R_3 = CH_3$

$R_5 = R_8 = H$

desméthylbellidifoline :

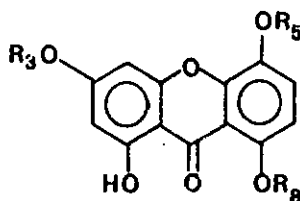
$R_3 = R_5 = R_8 = H$

5-O-méthylbellidifoline :

$R_3 = R_5 = CH_3$; $R_8 = H$

isobellidifoline :

$R_3 = R_8 = H$; $R_5 = CH_3$

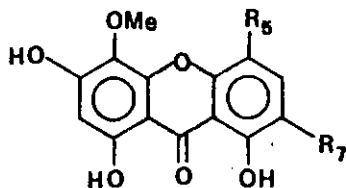


corymbiférine :

$R_5 = OCH_3$; $R_7 = H$

4,7-di-O-méthylbellidifoline :

$R_5 = H$; $R_7 = OCH_3$



Formules des composés cités

II. RECHERCHE ENTREPRISE

Le chimiste qui s'attache à l'étude de substances naturelles est en fait confronté à deux problèmes de recherches majeurs : l'extraction et l'isolement d'un ou plusieurs constituants à partir d'un substrat donné, d'une part, et la détermination de structures de ces constituants, d'autre part.

Le développement des techniques chromatographiques sous toutes leurs formes a permis ces dernières années de réaliser des séparations de nombreuses et nouvelles molécules d'origine naturelle. Dans le domaine qui nous intéresse, ces techniques ont été bien développées et perfectionnées à l'Institut de chimie de l'Université de Neuchâtel. De ce fait, dans le cadre du présent travail nous n'avons nullement l'ambition de nous étendre sur les critères qui nous ont conduit à choisir tel type de fractionnement plutôt qu'un autre, cela d'autant plus que Luong Minh Duc [27] dans son travail de thèse s'est attaché à donner une méthode systématique d'approche pour la mise au point des séparations de polyphénols. Dans les trois espèces que nous avons étudiées nous n'avons en fait caractérisé que des flavones et des xanthones. Leur identification ne pose pas a priori de difficultés majeures, car dans ce domaine, il est possible de se référer à de nombreux travaux. Là encore, à l'Institut de chimie de Neuchâtel, nous avons pu bénéficier des techniques mises au point par nos devanciers. Toutefois, étant donné que dans la plupart des cas il s'agissait de substances nouvelles, nous nous sommes attachée à décrire en détail les processus d'identification en tentant de dégager certaines règles notamment pour l'interprétation des spectres UV et RMN.

RÉSULTATS OBTENUS

Dans les trois espèces étudiées, le contenu en polyphénols est identique. Nous avons pu isoler et identifier au total 9 substances, à savoir: 7 xanthones et 2 flavones. Reste à caractériser un polyphénol.

Les xanthones sont tétra- ou pentasubstituées. Nous avons deux schémas d'oxydation: 1, 3, 5, 8 et 1, 3, 4, 5, 8. Il s'agit d'une part d'aglucones et de quelques-uns de leurs O- β -D-glucosides d'autre part, parmi ceux-ci I, K et L sont décrits pour la première fois. Mentionnons encore un C-glucoside xanthonique: la mangiférine. Les flavones isolées ne sont pas nouvelles, ce sont des C-glucosides.

Les structures de nos différents composés sont décrites dans le tableau suivant. (No. 4).

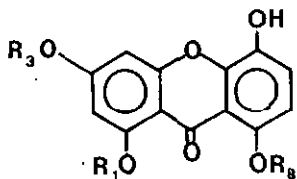
5. EXTRACTION ET ISOLEMENT DES POLYPHÉNOLS

L'expérience de nos devanciers nous a incité à partir de matériel sec; en effet, il a été prouvé que le contenu en polyphénols était le même que celui de la plante fraîche [28].

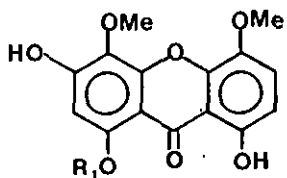
Notre attention s'est uniquement portée sur les feuilles. Cette discrimination est voulue car tous les travaux entrepris à ce jour à l'Institut de Chimie de Neuchâtel ont toujours porté sur l'étude des feuilles d'espèces du genre *Gentiana*. En vue de jeter les bases d'une chimiotaxonomie, il est indispensable de comparer les mêmes organes végétaux, puisque l'on sait que les autres organes: fleurs ou racines, n'ont pas forcément le même contenu en polyphénols que les feuilles [29].

Tableau No. 4 : Composés isolés

Xanthones



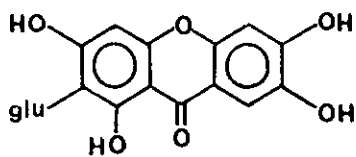
	R ₁	R ₃	R ₈
C	H	H	H
B	H	CH ₃	H
L	H	H	β -D-glucosyle
K	H	CH ₃	β -D-glucosyle



A : R₁ = H

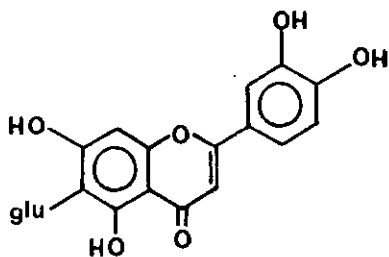
I : R₁ = β -D-glucosyle

H : mangiférine

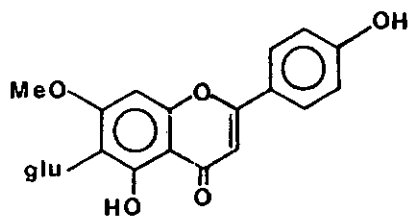


Flavones

G : isoorientine



F : swertisine



5.1 MATÉRIEL VÉGÉTAL.

Les espèces étudiées sont cueillies à l'époque de la floraison. Elles proviennent de divers endroits, ce qui n'a pas d'incidence sur leur contenu chimique, comme nous l'avons prouvé dans nos essais préliminaires.

Nous citons ci-après (tableau No. 5) la provenance de ce matériel végétal ainsi que l'époque à laquelle il a été prélevé.

Les feuilles ont été séchées pendant 48 heures à l'étuve à 40 °C puis moulues finement.

Tableau No. 5 Matériel végétal.

<u>Espèces</u> ⁶⁾	<u>Origine</u>	<u>Floraison</u>
<u>Gentiana campestris</u> L.	Ceillac (Hautes-Alpes France) Chasseron (VD) Pierre du Moëlle (Sepey VD)	Août - septembre
<u>Gentiana ramosa</u> Hegetschw.	Simplon (VS)	Mi-août
<u>Gentiana germanica</u> Willd.	Sainte-Croix (VD)	Septembre

6) Echantillons d'herbier déposés à l'Institut de botanique Neuchâtel.

5.2. EXTRACTION.

Hostettmann et Jacot-Guillarmod [30] ont montré l'intérêt d'une extraction sélective du matériel végétal séché, cela à l'aide de solvants de polarité croissante, par exemple : ligroïne, éther, acétate d'éthyle, méthanol. Cette manière de faire permet un fractionnement entre aglycones et hétérosides.

Nous avons apporté une variante à l'extraction sélective en mettant en jeu également le chloroforme.

Pratiquement, on extrait successivement 150 g de poudre de feuilles avec 2 fois 1,5 litre de solvant à ébullition pendant 12 heures, sous agitation continue. Nous avons utilisé successivement la ligroïne, l'éther éthylique, le chloroforme, l'acétate d'éthyle et le méthanol. L'addition de 1-2 g de carbonate de calcium évite une hydrolyse des glycosides.

Les différents extraits sont concentrés sous pression réduite et analysés par chromatographie sur couche mince (CCM) de polyamide. Le système d'éluion choisi : méthanol-acide acétique-eau (90 : 5 : 5) donne un aperçu général des polyphénols dans *G. campestris* (voir Fig. 1).

Les extraits à la ligroïne (s_1), à l'éther (s_2) et au chloroforme (s_3) contiennent beaucoup d'impuretés, principalement chlorophylles, carotènes, lipides. Les 3 spots présents dans s_2 et dans s_3 , donc solubles dans des solvants très peu polaires correspondent certainement à des aglycones. Les extraits de l'acétate d'éthyle (s_4) et au méthanol (s_5) contiennent vraisemblablement des glycosides.

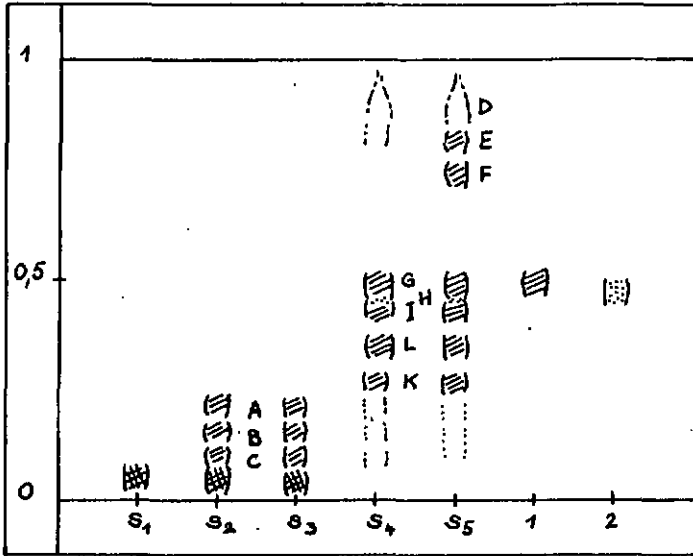


Fig. 1 : Chromatogramme schématique des extraits de *G. campestris*.

Légende :

s₁ : extrait ligroïnique

s₂ : extrait étheré

s₃ : extrait chloroforme

s₄ : extrait acétate d'éthyle

s₅ : extrait méthanolique

1 : isoorientine

2 : manfigérine

Rév. : UV (350 nm)

(●) : spot rouge

(//) : spot brun

(X) : spot orangé

() : spot bleu

A première vue, le processus d'extraction pourrait être simplifié puisqu'il y a similitude entre les extraits s_2 et s_3 et entre les extraits s_4 et s_5 . Toutefois, l'expérience nous montre que si l'on abandonne le traitement au chloroforme (extrait s_3) la séparation des glycosides est gênée par des impuretés non éliminées au préalable. En revanche, le stade du traitement à l'acétate d'éthyle peut être évité.

En résumé, le processus d'extraction est fondé sur l'emploi successif de ligroïne, d'éther, de chloroforme et de méthanol.

Les trois espèces végétales ont été traitées de façon identique (voir Fig. 2).

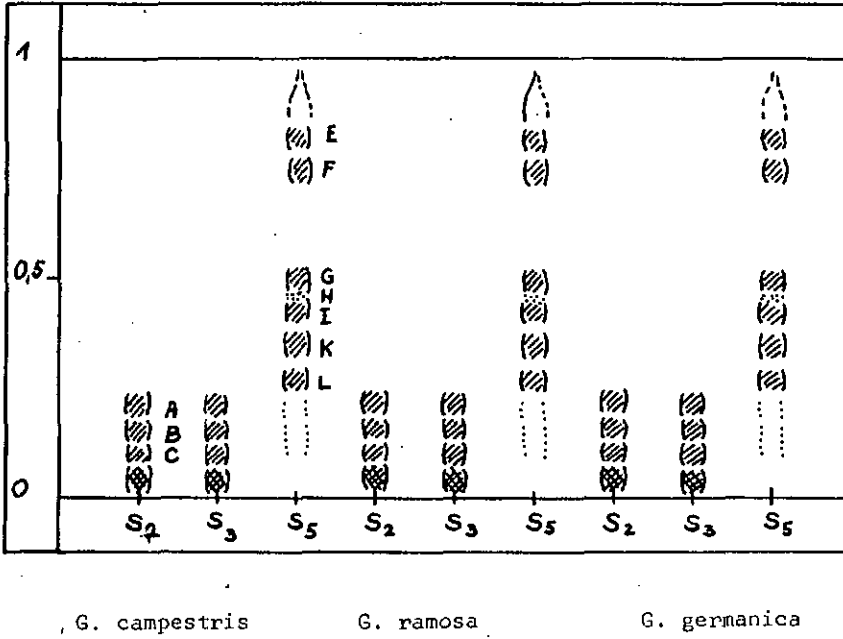


Fig. 2 : Chromatogrammes comparatifs

Légende :

- s_2 : extrait étheré
- s_3 : extrait chloroforme
- s_5 : extrait méthanolique

Rév.: UV (350 nm)

5.3. SÉPARATION ET ISOLEMENT

Le choix des conditions de séparation à l'échelle préparative sur colonne découle de nombreux essais entrepris par chromatographie sur couche mince. Comme nous l'avons mentionné plus haut, nous n'avons nullement l'intention de nous étendre sur les différents critères qui ont été à la base du choix des systèmes chromatographiques. [27]

L'isolement de tous les composés identifiés a été chaque fois effectué avec les 3 espèces. Les méthodes ont été peu à peu perfectionnées, elles diffèrent donc comme l'indiquent les schémas représentés dans les Fig. 3-5. La marche à suivre la plus judicieuse nous paraît celle décrite pour *Gentiana germanica*. Toutefois, la détermination de toutes les structures a été faite sur la base des substances isolées de *Gentiana campestris* (Fig. 3). L'identité avec les polyphénols isolés des espèces *ramosa* et *germanica* découle de la comparaison de spectres UV, avant et après hydrolyse, du comportement chromatographique et des spectres IR.

Il va de soi que l'obtention d'une substance pure nécessite souvent plusieurs chromatographies préparatives successives sur colonne dans les mêmes conditions.

Pour nos séparations, nous avons mis en oeuvre avec succès chaque fois la polyamide ⁷⁾ (Macherey-Nagel SC 6), bien que le gel de dextrane puisse être aussi valablement utilisé dans certains cas.

En fait, ce support (séphadex LH 20) nous a servi principale-

7) Dans nos schémas Fig. 3-5, abréviation CC PA.

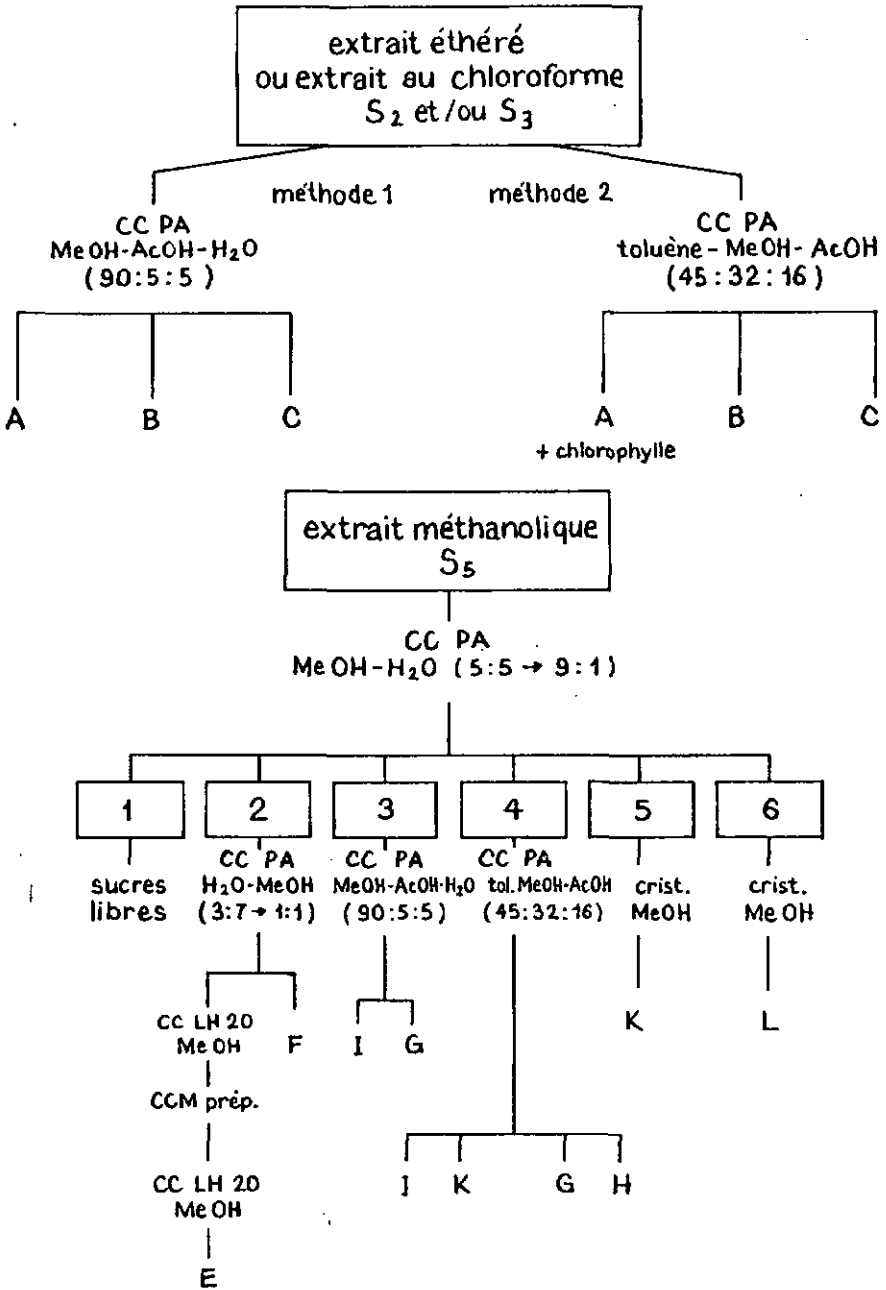


Fig. 3: Schéma général d'isolement: Gentiana campestris

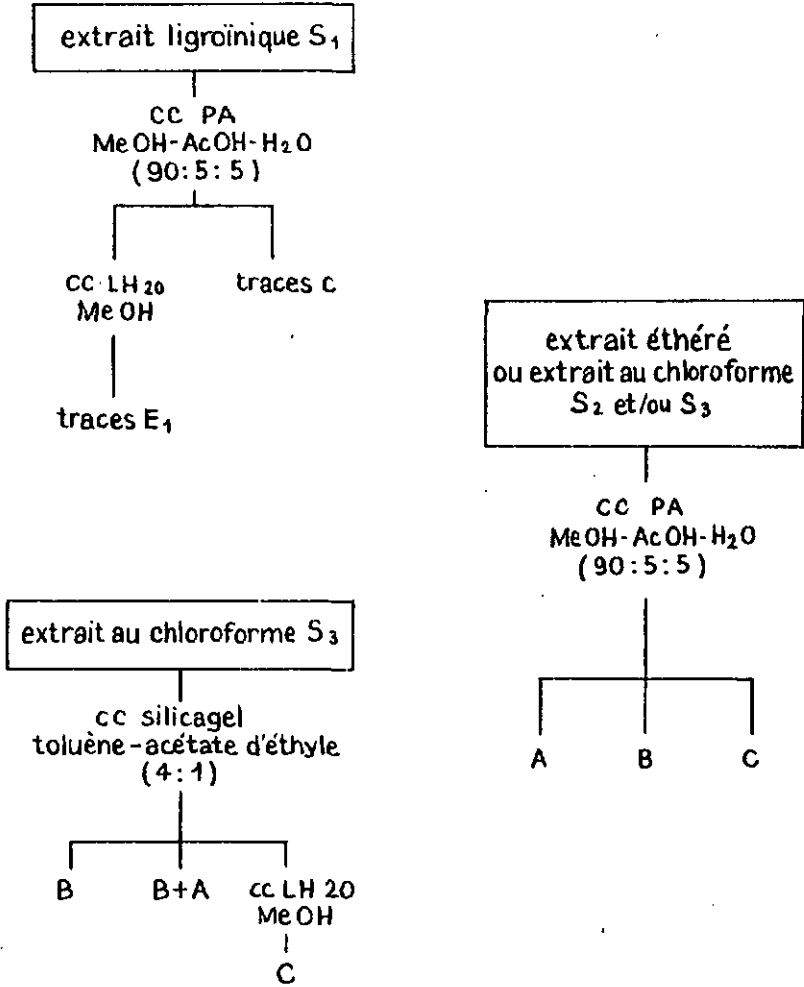


Fig. 4a: Schéma général d'isolement: Gentiana ramosa

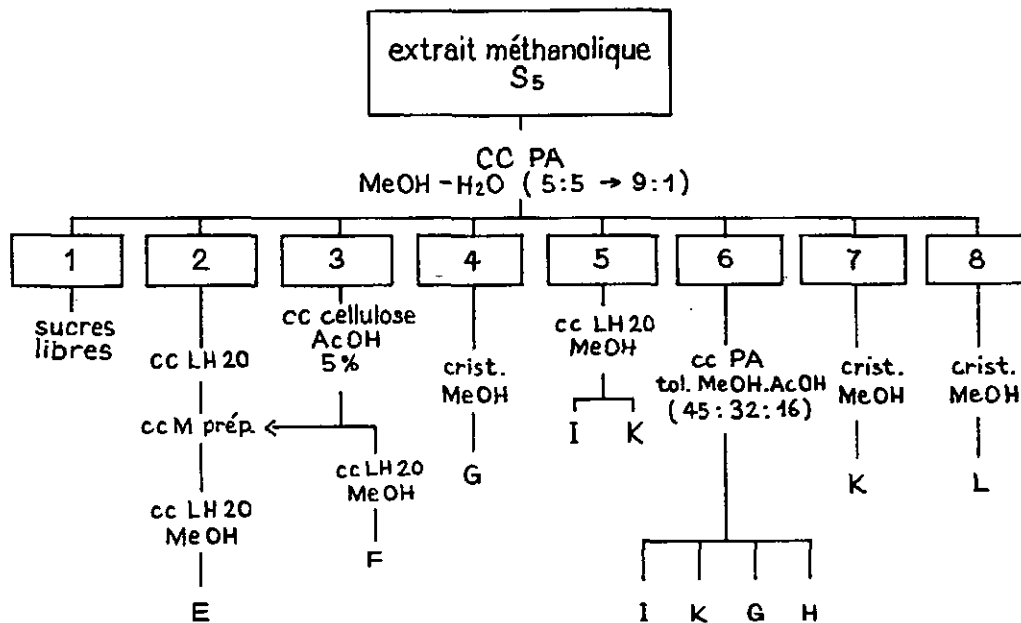


Fig. 4b: Schéma général d'isolement (suite): Gentiana ramosa

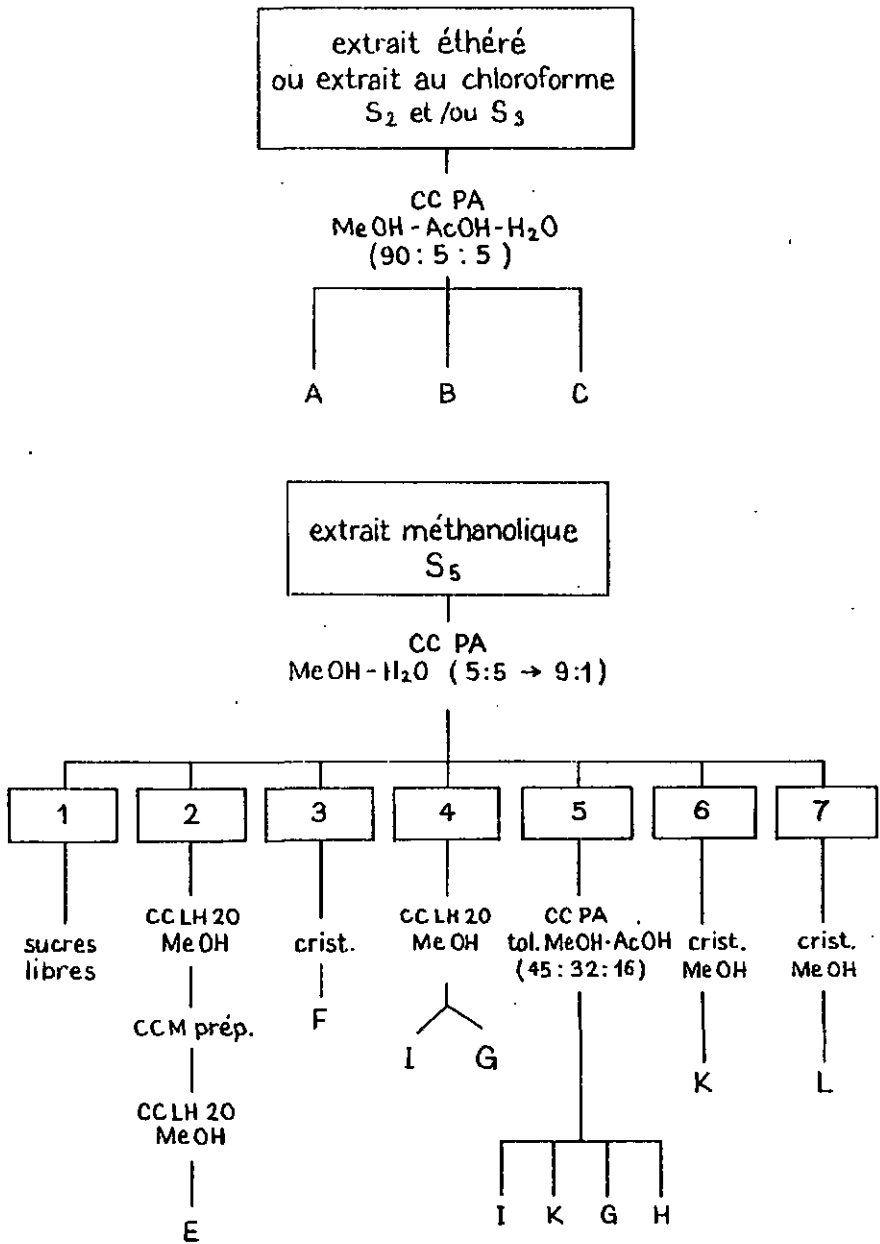


Fig. 5: Schéma général d'isolement: Gentiana germanica

ment à la purification finale.

Les fraction élúées sont toutes analysées sur couche mince dans les conditions indiquées dans le tableau:

Tableau No. 6 Conditions d'analyse sur CCM des fractions élúées

Extrait	Support	Solvant
éthéré (s ₂)	PA MN DC ₁₁	MeOH-AcOH-H ₂ O (90:5:5)
chloroforme (s ₃)	PA MN DC ₁₁	Tol-MeOH-AcOH (45:32:16)
	Silicagel	C ₆ H ₆ -AcOEt (3:1)
méthanolique (s ₅)	PA MN DC ₁₁	MeOH-AcOH-H ₂ O (90:5:5)
	Cellulose	AcOH 5%, 10%, 15%
	Silicagel	AcOEt-MeOH-H ₂ O (100:16,5:7)

Extrait à la ligroïne (s₁)

Les analyses par CCM des extraits à la ligroïne (Fig. 1) ne présentent pas de polyphénols à première vue. Nous avons néanmoins procédé à une séparation sur colonne dans le cas de *Gentiana ramosa*. A cet effet, nous avons mis en jeu 5,1 g d'extrait sec (en solution dans MeOH-AcOH-H₂O (90:5:5) correspondant à 150 g de feuilles séchées.

Cette étude nous a permis de mettre en évidence des traces de E₁ et de C (identification UV et Rf).

Séparation de A et de B (à partir de s₂ et s₃)

Le comportement chromatographique étant très voisin, la séparation de ces deux substances a été difficile dans le cas de *Gentiana campestris* car il s'agissait d'obtenir au moins 20 à 30 mg de produit pour l'étude des structures. A cet effet, nous avons utilisé deux méthodes (cf. Fig.3), celle utilisant le solvant MeOH-AcOH-H₂O (méthode 1) s'est révélée la plus efficace. Dans le cas de *Gentiana ramosa*, une troisième méthode a été essayée sur gel de silice au lieu de polyamide (cf. Fig. 4a). Celle-ci n'est également pas à retenir.

Extrait méthanolique (s₅)

L'extrait méthanolique, s₅, est séparé sur colonne de polyamide en utilisant un gradient d'élution : MeOH 50%+90%. S'il est aisé, dans chaque espèce, d'isoler les produits K et L, en concentration telle qu'ils cristallisent, il est en revanche souvent très difficile d'obtenir les produits I, G et H. Leur séparation nécessite un fractionnement ultérieur sur polyamide avec le solvant toluène-MeOH-AcOH. Ce système présente toutefois l'inconvénient de ne pas former des fronts bien nets.

Quantités mises en jeu

La caractérisation des substances pures nécessite l'obtention de quantités de l'ordre de 20 à 30 mg au minimum. Il va de soi que l'opération ne peut être effectuée en une seule fois. Il

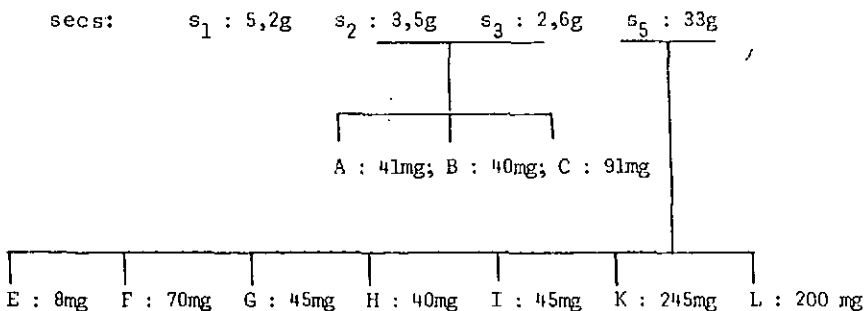
est nécessaire de répéter plusieurs fois les diverses séparations décrites dans les schémas Fig. 3-5. Pour chaque essai, on part en général de 150 g de matériel sec. Le tableau No. 7 résume l'étude pour *Gentiana campestris*.

Tableau No. 7 :

Quantités mises en jeu : exemple de *Gentiana campestris*.

Extraction : 150 g de feuilles séchées

Extraits



Les dimensions des colonnes sont adaptées aux quantités à séparer. Le tableau No. 8 ci-après donne les conditions générales les plus souvent utilisées.

Tableau No. 8 Conditions et techniques d'analyse sur colonne

Extrait	Masse introduite sur la colonne	Dim. de la colonne	
		Ø cm	haut. cm
s ₂ , s ₃	1,3 - 1,8 g	4	50
s ₂ , s ₃	0,25 - 0,35 g	2	50
s ₅	16 - 17 g	6,5	120

6. IDENTIFICATION DES SUBSTANCES ISOLÉES

L'identification d'un composé polyphénolique ne présente en fait pas de difficultés majeures, pour autant que la substance isolée soit pure. Il est donc primordial de s'assurer de la pureté de cette substance avant d'entreprendre tout travail d'analyse. En réalité, l'isolement est certainement l'étape de la recherche la plus délicate, nécessitant un long et patient travail systématique [31].

L'expérience réalisée à l'Institut de Chimie de Neuchâtel par nos devanciers nous enseigne la nécessité de vérifier la pureté d'une substance isolée par chromatographie sur couche mince, à l'aide d'au moins deux supports différents, en utilisant divers systèmes de solvants. Dans les cas qui nous occupent, cette vérification a été faite chaque fois sur trois supports: polyamide, cellulose et silicagel (voir 6.1.).

Le comportement chromatographique de ces substances sur polyamide avec solvant polaire nous renseigne éventuellement sur leur nature. Il est connu [32] que plus un polyphénol aura de groupement OH libres, plus son R_f sera abaissé; en revanche, la présence de sucres dans la molécule élèvera celui-ci. Il sera donc intéressant de comparer ces valeurs R_f avant et après hydrolyse de la substance.

Pratiquement la recherche de structure débute par le relevé des spectres UV, en présence des réactifs usuels, relevé qui permettra d'emblée de préciser si la substance est de nature xanthonique ou flavoniqué. Une telle étude donnera des indications sur la position des groupes hydroxyles libres. Il sera donc utile de comparer les spectres de la substance avant et après hydrolyse.

Par ailleurs, le spectre UV de la molécule ayant subi la méthylation par le diazométhane suivie d'une hydrolyse pourra nous préciser la position d'attache du sucre.

Toutefois, pour la description de molécules nouvelles, il est indispensable de faire appel à la spectrométrie de RMN du proton, soit sur la substance elle-même, soit le plus souvent sur le dérivé acétylé. Cette technique permettra de localiser avec certitude les substituants et surtout de dénombrer les sucres.

Dans les cas les plus ardu, l'étude devra être complétée par le relevé des spectres RMN-¹³C.

D'une manière générale, il ne faut pas négliger l'approche de la spectrométrie IR. En effet, la pratique d'usage de relever les spectres RMN de dérivés acétylés peut être dangereuse, l'expérience de nos prédécesseurs ayant attesté l'existence dans la nature de glucosides partiellement acétylés [33]. De tels dérivés n'ont pu être décelés primitivement que grâce à l'étude des spectres IR.

Relevons encore que dans de nombreux cas, les dégradations par hydrolyse conduisent à des substances connues et dont les caractéristiques ont été bien décrites, ce qui facilite grandement l'étude des structures de nos polyphénols.

Enfin, l'hydrolyse enzymatique par la β -glucosidase pourra nous préciser de façon certaine la nature du sucre présent dans l'hétéroside.

En ce qui concerne le présent travail de recherche de structure, nous exposerons ci-après :

- le comportement chromatographique des substances isolées, avant et après hydrolyse, en faisant intervenir éventuellement la méthylation.
- l'étude par spectrométrie UV et IR.
- l'étude par spectrométrie de RMN ^1H .

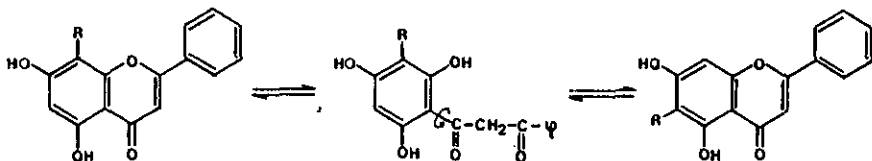
6.1. COMPORTEMENT CHROMATOGRAPHIQUE

Nous rappellerons que ces études ont été réalisées chaque fois avec les substances pures isolées selon les schémas décrits précédemment (chap. 5).

L'examen de l'ensemble des substances isolées nous permet de classer celles-ci en plusieurs groupes distincts selon les valeurs R_f (voir fig. 6 ci-après).

Les substances à bas R_f , A, B et C sont des aglucones, elles ne subissent, semble-t-il aucune transformation lors de l'hydrolyse acide, puisque le R_f de A_1 , B_1 , C_1 , produits de l'hydrolyse, sont semblables à ceux des substances de départ.

En revanche, les composés à R_f plus élevés évoluent pour la plupart lors de l'hydrolyse acide, les spots sont dédoublés pour F et G : ils correspondent certainement à des C-glucosides flavoniques, puisque ceux-ci, s'ils possèdent un OH libre en 5 s'isomérisent selon le schéma classique de Wessely-Moser : [44]



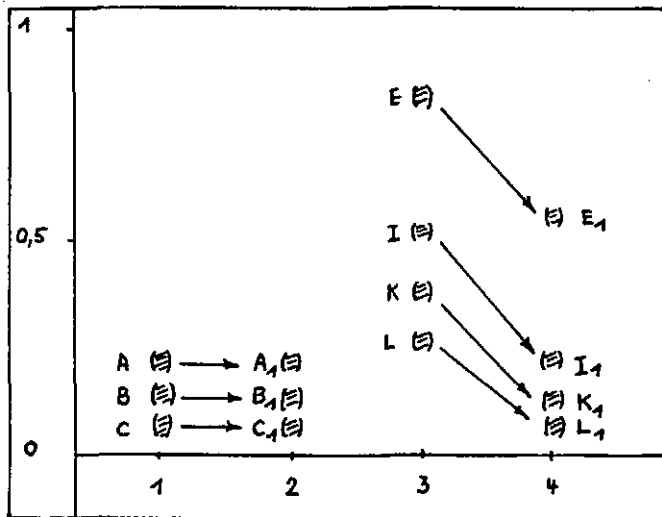
L'hydrolyse précise qu'il s'agit de 6-C-glucoside car F_1 et G_1 sont de R_f plus bas, correspondant à ceux des isomères 8-C-glucosides.

Le comportement de H, qui reste inchangé lors du traitement acide, ainsi que la couleur du spot (orangé), permet d'assigner à cette substance la structure de la mangiférine.

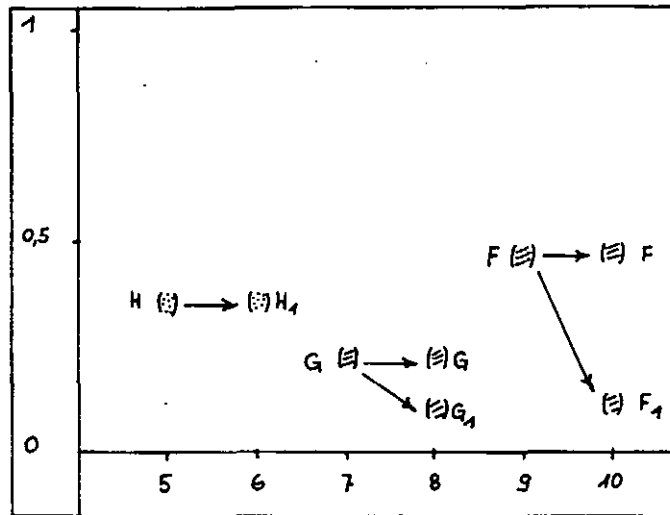
Enfin, I, K, L, et E sont chacune transformée en une seule substance à R_f plus bas (voir Fig. 6). Les spots I_1 , K_1 , et L_1 correspondent respectivement à A, B et C, ce qui nous permet d'avoir la certitude que I, K et L sont des O-glycosides des aglucones A, B et C, plus précisément des O- β -D-glucosides étant donné que l'action de la β -glucosidase donne le même résultat que l'hydrolyse acide⁸⁾.

Quant au composé E, il est transformé tant par l'hydrolyse acide que par l'hydrolyse enzymatique en un nouvel aglucone E_1 de R_f élevé.

8) Après l'hydrolyse acide de I, K, L et E, nous avons chaque fois identifié du glucose (voir partie expérimentale).



Support : PA DC₁₁
 Solvant : MeOH-AcOH-H₂O (90:5:5)



Support : cellulose
 Solvant : AcOH 15%

Fig. 6. Comportement chromatographique avant et après hydrolyse

Substances provenant de l'extrait étheré : 1, avant, 2 après hydrolyse.

Substances provenant de l'extrait méthanolique : 3,5,7,9 avant, 4,6,8,10 après hydrolyse

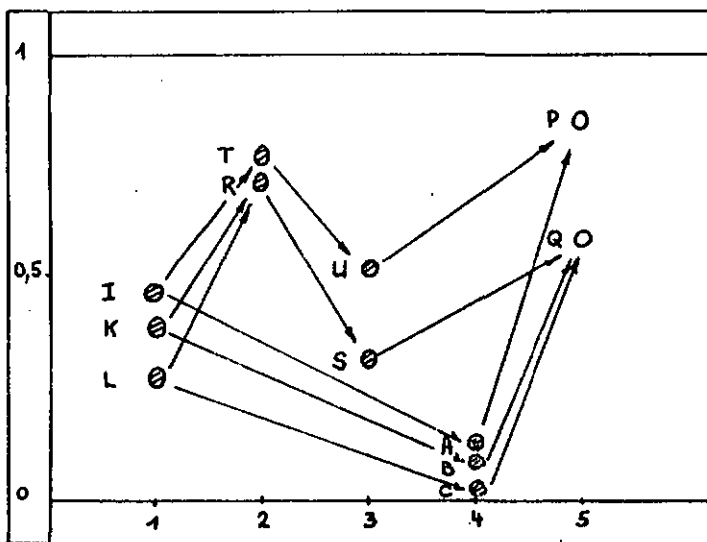


Fig. 7. Chromatogramme montrant les relations entre les xanthonés isolées.

Support : Polyamide DC 11 MN

Solvant : MeOH-H₂O (9:1)

Rév. : UV (350 nm) ⊗ : brun ○ : bleu

- Légende :
1. Extrait méthanolique partiel
 2. Extrait méthanolique partiel méthylé
 3. Extrait méthanolique partiel méthylé, puis hydrolysé
 4. Extrait méthanolique partiel hydrolysé
 5. Extrait méthanolique partiel hydrolysé, puis méthylé

↘ Hydrolyse

↗ Méthylation

Ainsi l'hydrolyse acide des substances I, K et L conduit aux substances A, B et C, et dans chaque cas libère du glucose.

La mise en jeu combinée de la méthylation suivie de l'hydrolyse acide suivie d'une nouvelle méthylation, comme indiqué dans la Fig. 7, nous précise que les substances A, B, C, I, K et L correspondent seulement à deux types de polyphénols ayant des schémas de substitution différents P et Q.

Les valeurs R_f de nos différentes substances sur les différents supports sont rassemblées dans les tableaux 9 et 10 ci-après.

Tableau No. 9 : Valeur R_f des aglucones.

Systèmes	Substances			
	A	B	C	E_1
PA DC ₁₁				
MeOH -H ₂ O (9:1)	0.13	0.10	0.04	0.60
PA DC ₁₁				
MeOH-AcOH-H ₂ O (90:5:5)	0.20	0.17	0.11	
PA DC ₁₁				
Tol-MeOH-AcOH (45:32:16)	0.81	0.70	0.38	
Cellulose				
AcOH 30%	0.45	0.36	0.31	
Silicagel				
C ₆ H ₆ -AcOEt (3:1)	0.43	0.53	0.17	0.78
Silicagel				
Tol-AcOEt-EtOH (7:3:1)	0.62	0.65	0.52	

Tableau No. 10 : Valeurs R_f des glucosides.

Systèmes	Substances						
	I	K	L	E	F	G	H
PA DC ₁₁							
MeOH-H ₂ O (9:1)	0.45	0.36	0.27	0.80	0.71	0.63	0.45
PA DC ₁₁							
MeOH-AcOH-H ₂ O (90:5:5)	0.52	0.43	0.31	0.80	0.74	0.52	
PA DC ₁₁							
Tol-MeOH-AcOH(45:32:16)	0.81	0.71					0.37
Cellulose							
AcOH 5%					0.34	0.15	
10%	0.32	0.23		0.78		0.24	0.34
15%			0.20		0.48		0.36
30%	0.64	0.61	0.37	0.82	0.73	0.45	0.55
Cellulose							
isoBuOH-AcOH-H ₂ O (10:47:7)	0.52			0.90		0.52	0.52
Silicagel							
CHCl ₃ -acétone-H ₂ O (20:80:5)	0.68	0.67					

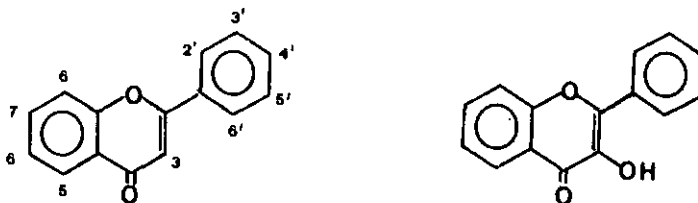
6.2. ETUDES DES SPECTRES UV.

La spectroscopie UV est devenue une technique importante dans l'analyse de structure des polyphénols pour deux raisons. Premièrement, elle nécessite une très petite quantité de substance pure pour l'enregistrement d'un spectre (éventuellement le spot prélevé sur un chromatogramme sur couche mince peut suffire). D'autre part, par addition de réactifs spécifiques, les spectres seront modifiés suivant la nature et la position des groupes fonctionnels substitués sur le squelette du polyphénol. Les réactifs couramment utilisés sont NaOMe, NaOAc/H₃BO₃, AlCl₃, AlCl₃/HCl. (Mabry 1970). [34]

D'une manière générale, il est aisé de distinguer un composé xanthonique d'un composé flavonique par spectroscopie UV. C'est ainsi que d'emblée nous avons rangé les substances A, B, C, H, J, K et L parmi les xanthones et les composés F et G parmi les flavones. Quant à la substance E, ses spectres UV sont voisins de ceux d'une xanthone.

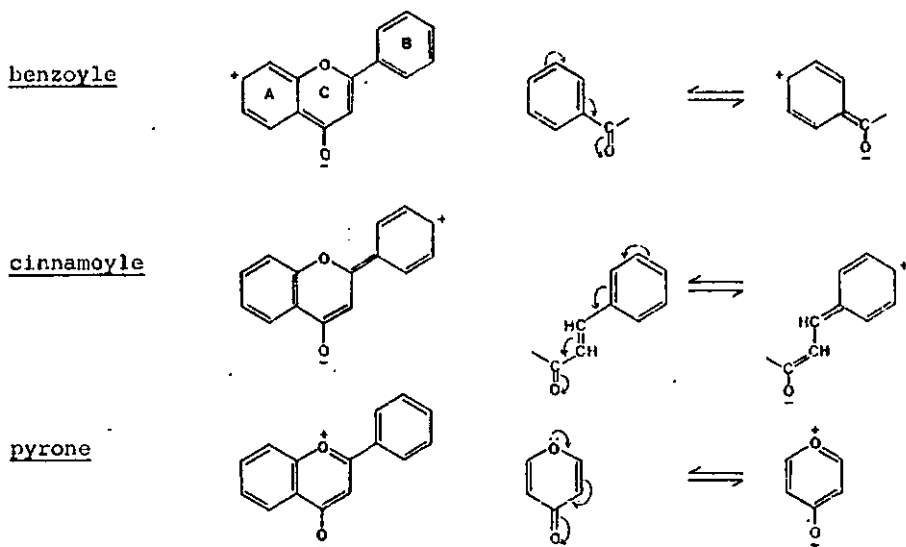
S'il est aisé, sur la base de l'UV, de déterminer presque entièrement la structure d'un composé flavonique (voir catalogue, Mabry 1970), il n'en est pas de même pour les composés xanthoniques. En effet, à notre connaissance, il n'existe pas d'étude systématique permettant de déterminer les relations entre le spectre UV et la structure d'une xanthone. L'étude des spectres UV est cependant une démarche précieuse dans la recherche de la structure et les renseignements obtenus seront confirmés et complétés par la spectroscopie RMN.

6.2.1. FLAVONES ET FLAVONOLS



A. Spectres dans le méthanol

Les spectres UV des flavones et flavonols présentent généralement deux bandes d'absorption intense : la première (bande I) dans la région de 300 à 380 nm et la deuxième (bande II) dans la région de 240 à 280 nm. La position et l'intensité de chacune de ces bandes varient selon la contribution relative de certaines formes de résonance à la résonance globale de la molécule de flavone. Les formes de résonance ayant cette influence particulière sur le spectre UV sont du type :



Bien que ces groupes agissent l'un sur l'autre, les spectres de flavones et de flavonols dans les milieux alcalins et neutres suggèrent que la bande I (300-380 nm) est principalement associée à l'absorption dans le groupe cinnamoyle, et que la bande II (240-280 nm) est principalement associée à l'absorption du groupe benzoyle.

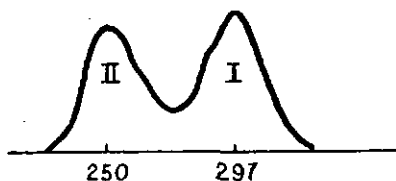
La position de la bande I permet de distinguer le type de flavonoïde. Ainsi le maximum dans le cas des flavones apparaît dans la région de 304 à 350 nm alors que dans le cas des flavonols (3-hydroxyflavones), il se situe entre 352 et 385 nm.

De plus, les flavones et flavonols hautement oxygénés absorbent à une plus grande longueur d'onde que ceux qui ont peu de substituants oxygénés. La bande II est peu modifiée par les changements de substituants oxygénés sur le noyau B; cependant les flavones 3', 4'-dihydroxylées montrent généralement deux pics (ou un pic et un épaulement) dans cette région, tandis que les flavones 4'-hydroxylées n'en montrent qu'un seul. D'autre part, la bande II est modifiée d'une façon significative par les changements du schéma d'oxydation sur le noyau A: elle augmente de 250 nm pour la flavone simple à 252 nm pour une 7-hydroxyflavone, à 268 nm pour une 5-hydroxyflavone et 5,7-dihydroxyflavone à 274 nm pour une 5, 6, 7-trihydroxyflavone et à 281 nm pour une 5, 7, 8-trihydroxyflavone. L'absence de groupes hydroxyles sur l'un et l'autre des noyaux est généralement mise en évidence par une intensité faible de l'une et/ou l'autre bande.

La méthylation ou la glycosylation des groupes hydroxyles en 3-, 5-, et 4' du composé flavonique provoque un déplacement hypsochrome de la bande I en particulier. On observe un déplacement de 3-10 nm (bande I) pour la substitution d'un groupe hydroxyle en 4', de 5-15 nm (bandes I et II) pour la substitution d'un groupe hydroxyle en 5 et de 12-17 nm pour l'hydroxyle en 3.

Exemples : (spectres schématisés)

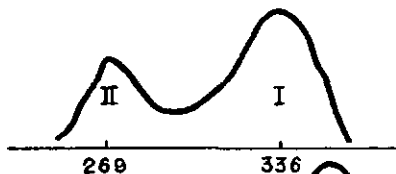
Spectre UV de la flavone :



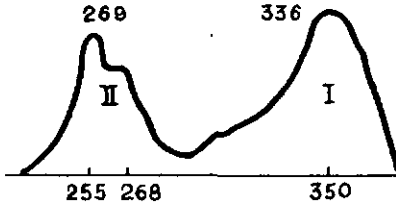
Spectre UV de la chrysin :
(Dihydroxy-5, 7 flavone)



Spectre UV de l'apigénine :
(trihydroxy-5, 7, 4' flavone)



Spectre UV de la lutéoline :
(tétrahydroxy-5, 7, 3',4' flav.)



Dans ce dernier cas, la bande II présente deux maximums ou I max. plus une inflexion. Si l'on a trois substituants sur le noyau B, la bande II présente à nouveau un seul max.

Avec les 5-deoxyflavonols, pour la substitution d'un hydroxyle en 3, le déplacement de 12-17 nm passe à 22-25 nm. De telles

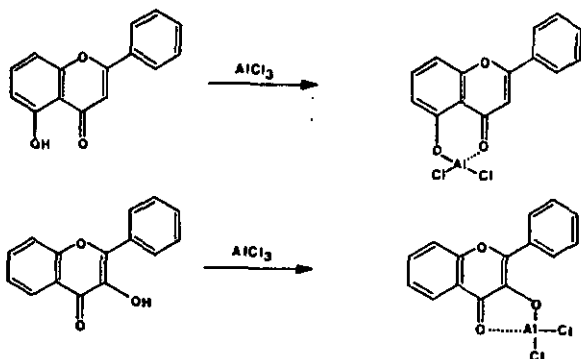
substitutions en d'autres sites de la molécule n'ont que peu d'effet sur le spectre UV.

L'acétylation des groupes hydroxyles annule leur effet sur l'absorption; de ce fait une polyhydroxyflavone complètement acétylée présente un spectre très voisin de celui de la flavone même. Ceci peut être utilisé dans certains cas douteux pour déterminer à quelle classe de flavonoïdes la substance appartient réellement.

B. Modifications des spectres par addition de réactifs

AlCl₃

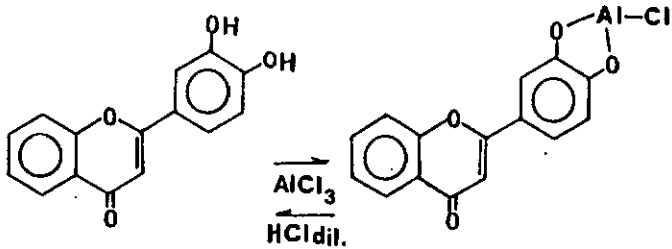
Le chlorure d'aluminium (de même que ZrOCl₂ et FeCl₃) forme des complexes avec les flavones ou les xanthones possédant un hydroxyle libre en alpha (ou péri) de la fonction carbonyle.



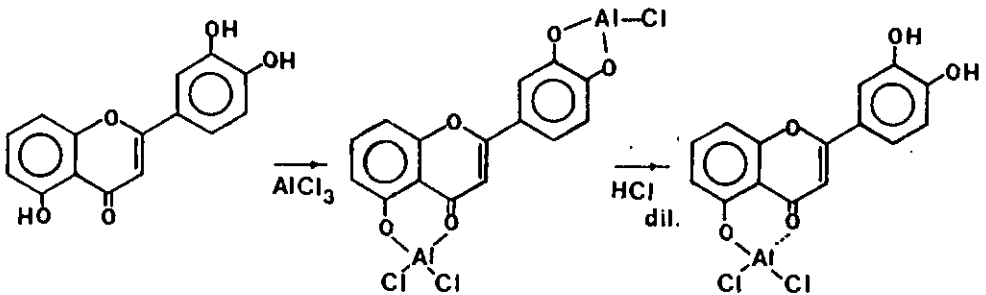
Pour le cas des composés flavoniques, la stabilité des deux types de complexes est différente vis-à-vis de l'acide citrique; ainsi, celui faisant intervenir l'OH en 5 est décomposé rapidement par addition de l'acide citrique, alors que le complexe faisant intervenir l'OH en 3 ne subit aucune altération [35]. Ceci est intéressant pour la différenciation entre fla-

ones et flavonols.

Avec les groupes o-dihydroxy, le chlorure d'aluminium forme également des complexes qui sont décomposés en milieu acide chlorhydrique dilué : [36]



En présence d'un groupe o-dihydroxyle et d'un OH en péri de la fonction carbonyle, il y a formation d'un double complexe :



Les conséquences de la formation de ces complexes sur le spectre UV sont des déplacements bathochromes importants des bandes I et II.

- a) La présence d'un groupe hydroxyle en 5 est évidente en l'absence d'un hydroxyle en 3 par un déplacement bathochrome de 35 - 55 nm par addition de AlCl_3/HCl . Un déplacement de 17 - 20 nm seulement indique la présence d'un OH en 6 (en plus de OH en 5). [37]
- b) Les composés avec hydroxyle en 3, ou 3 et 5, présentent un déplacement bathochrome de 50 - 60 nm de la bande I par addition de AlCl_3/HCl . On peut utiliser le réactif $\text{ZrOCl}_2/\text{acide citrique}$ pour détecter l'hydroxyle en 3 en présence de 5-hydroxyle.
- c) La présence d'un ortho-dihydroxyle sur le noyau B est mise en évidence par un effet bathochrome de AlCl_3 de 30 - 40 nm au-delà et au-dessus de l'effet observé par AlCl_3/HCl . Ainsi occasionnellement, si AlCl_3 est fraîchement préparé, un composé contenant un 3', 4' -hydroxyle-méthoxyle montre un déplacement de 10 nm au-dessus de celui observé pour AlCl_3/HCl . L'augmentation due à la présence d'un groupe ortho-dihydroxyle sur le noyau A est de 20 - 25 nm et elle est additive dans le cas d'ortho-dihydroxyle sur le noyau B.

NaOMe

En présence d'une base forte, tous les hydroxyles phénoliques sont ionisés, ce qui provoque un déplacement bathochrome de tout le spectre.

- a) En présence d'un hydroxyle en 4' la bande I subit un déplacement bathochrome de 40-65 nm sans diminution d'intensité.
- b) Dans les flavonols l'hydroxyle en 3 produit, en l'absence de OH en 4' un effet bathochrome de 50-60 nm de la bande I, mais avec diminution de l'intensité.
- c) La glycosylation d'un hydroxyle en 7 peut souvent être détectée par l'absence d'absorption entre 320 et 330 nm, pic normalement présent dans l'aglycone correspondant.
- d) Les flavonols contenant des hydroxyles en 3,4' et/ou 3, 3', 4' s'oxydent dans NaOMe et donnent des spectres dont l'intensité décroît avec le temps.

NaOAc

En milieu de base faible seuls les hydroxyles phénoliques les plus acides seront ionisés.

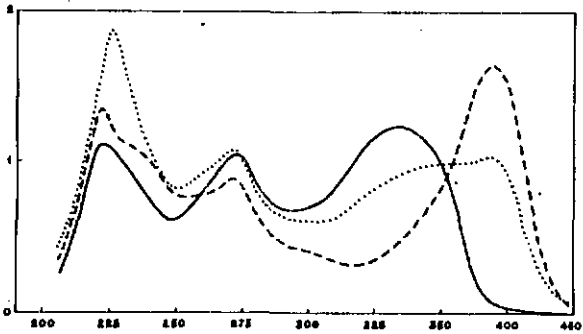
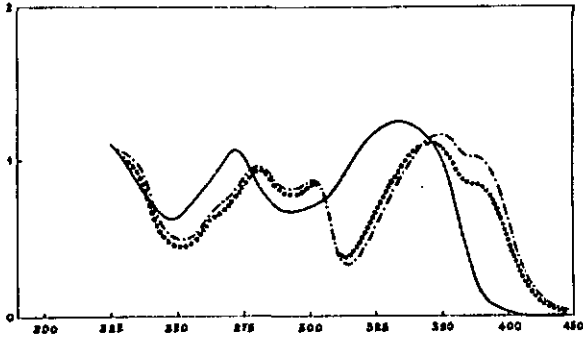
- a) Les flavones et flavonols possédant un hydroxyle en 7 montrent un déplacement bathochrome de 5 à 20 nm de la bande II (voir G.). La présence d'un substituant oxygéné en 6 ou 8, seulement dans les flavones, réduit

notablement l'ampleur du déplacement.

- b) Mears et Mabry [38] ont remarqué que la comparaison des déplacements de la bande I de NaOMe et NaOAc pour les 4'-hydroxyflavones et flavonols peut révéler dans la plupart des cas si l'hydroxyle en 7 est substitué. S'il est substitué, NaOAc produit sur la bande I un déplacement semblable ou plus important que celui dû à NaOMe.
- c) La présence de groupements trihydroxylés tels que 5, 6, 7 - 5, 7, 8 et 3, 3', 4', provoque une altération du spectre dans NaOAc avec le temps.

C. Substances isolées G et F

Les spectres UV des substances pures en solution de méthanol et après adjonction des réactifs usuels sont représentés dans les fig. 8 à 10 ci-après. Le tableau 11 groupe les valeurs des maximums enregistrés.



MeOH: ___ AlCl_3 -.-.- $\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$ ooooo NaOMe ----- NaOAc

Fig. 8: Spectre UV de F

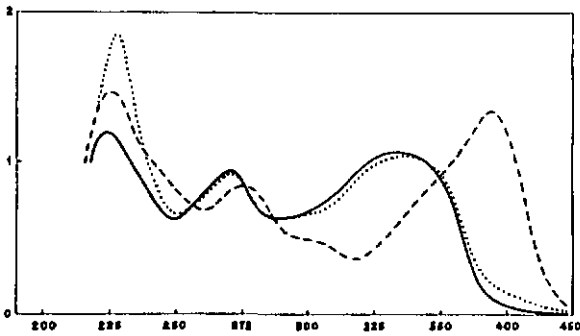
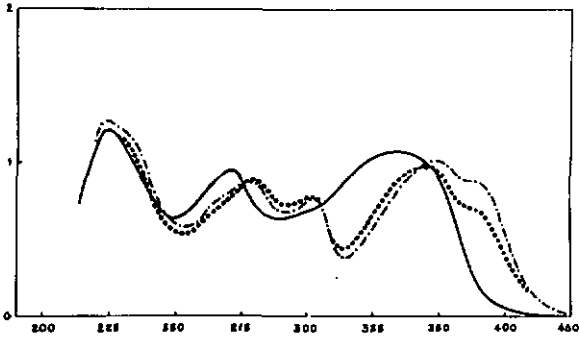


Fig. 9 Spectre UV de F₁

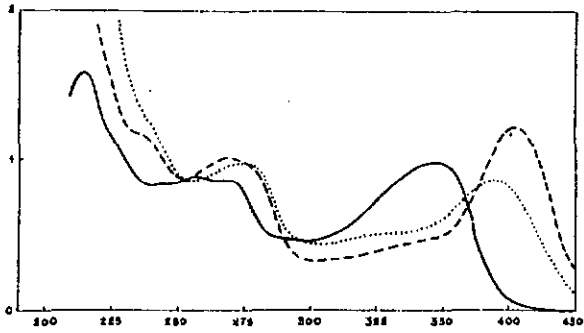
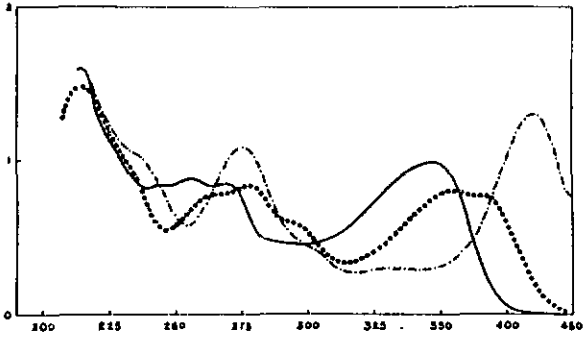


Fig. 10 Spectre UV de G

Tableau No. 11

Spectres UV (λ max. en nm, solvant MeOH)

Composé	Solvant	Bande II	Bande I
F 9)	pur	272	334
	+ AlCl ₃	281, 302	350, 376 sh
	+ AlCl ₃ /HCl	282, 302	350, 376 sh
	+ NaCMe	272	388
	+ NaOAc	272	380
G	pur	256, 270	348
	+ AlCl ₃	276, 300 sh	420
	+ AlCl ₃ /HCl	264 sh, 279, 295 sh	360, 384
	+ NaOMe	268, 276 sh	337 sh, 404
	+ NaOAc	275	324, 390

9) : F et F₁ : spectres UV identiques

Les spectres UV des composés G et F dans le méthanol caractérisent des flavones ou des flavonols : ils ne présentent qu'un maximum dans la région de 300 à 380 nm (bande I). Dans la région de la bande II (240-280 nm) F présente un maximum, alors que G a deux maximums, ce qui est le cas lorsque le cycle B est disubstitué [39] .

L'addition de chlorure d'aluminium provoque un déplacement bathochrome des deux bandes dans chaque spectre. De plus, certaines bandes présentent alors deux pics. Par conséquent, on peut envisager la présence d'un groupe hydroxyle en 3 ou en 5. L'addition de HCl ne modifie en rien le spectre de F, alors que dans le cas de G, il y a une diminution d'intensité des deux bandes avec effet hypsochrome de la bande I. F n'a vraisemblablement pas de groupes orthodihydroxyles, alors que cela est prévisible pour G.

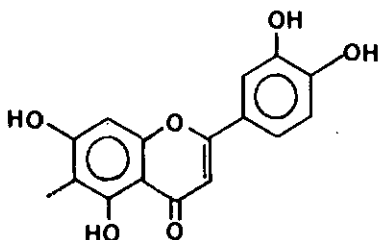
Dans l'acétate de sodium, le spectre du composé F présente un déplacement bathochrome de la bande I sans affecter la bande II: nous en déduisons un hydroxyle libre en 4', mais pas d'hydroxyle libre en 7. Alors que pour G, le déplacement bathochrome a lieu pour les bandes I et II: nous prévoyons donc des hydroxyles en position 3, 4' et 7.

Dans un milieu fortement basique (NaOMe), le déplacement bathochrome d'environ 60 nm de la bande I s'accompagne d'une augmentation d'intensité et cela pour chaque composé; ce phénomène confirme la position d'un OH libre en 4' tout en excluant une hydroxylation simultanée en 3. Pour F, la bande II n'est pas modifiée, d'où confirmation de la position 7 substituée. Quant à G, l'effet bathochrome des deux maximums de la bande II confirme le OH en 7.

En conclusion, l'examen des spectres UV permet de proposer pour F : deux groupes hydroxyles en 5 et en 4', et un groupe, par exemple OMe, en position 7; et pour G : deux groupes hydroxyles en 5 et 7, et un ortho-dihydroxyle en 3' et 4'.

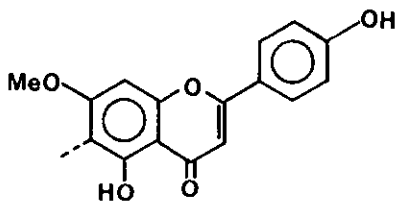
Hypothèse de structure

G:



D'après le catalogue, nous supposons par comparaison des spectres UV que G est de l'isoorientine¹⁰⁾; pour F, en consultant la littérature [40], nous pouvons prévoir la swertisine¹¹⁾.

F:

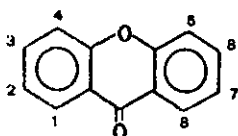


10) Résultat à confirmer par IR

11) Résultat à confirmer par RMN.

6.2.2. XANTHONES

A. Spectres dans le méthanol



A première vue, les xanthones se distinguent par des spectres UV à quatre maximums dans les régions respectives: 225 - 245 nm (bande I), 245 - 270 nm (bande II), 300 - 345 nm (bande III) et 335 - 410 nm (bande IV). L'intensité de cette dernière bande est la plus faible. D'après Markham [26], l'allure des spectres change suffisamment en fonction de la substitution oxygénée; il paraît donc possible d'envisager de reconnaître les différents types de substitution à l'allure générale des spectres.

Les travaux effectués à ce jour à l'Institut de Chimie de Neuchâtel nous permettent de tirer quelques enseignements concernant les xanthones tétrasubstituées en 1,3,7,8 et en 1,3,5,8. Nous verrons aussi que la pentasubstitution en 1,3,4,5,8 se compare avec la tétrasubstitution 1,3,5,8.

XANTHONES 1,3,7,8

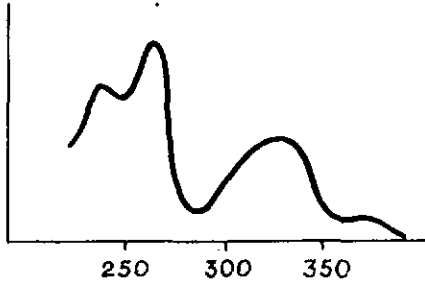
Nous nous référons ici aux xanthones isolées de *Gentiana bavarica* par Hostettmann [41].

Le tableau 12 donne les formules et les spectres des xanthones étudiées.

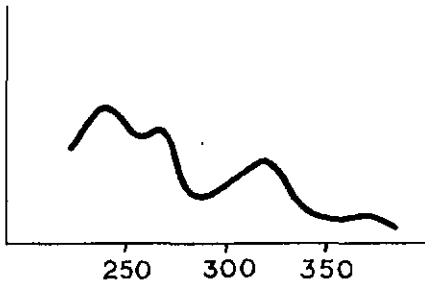
La figure 11 donne un résumé des spectres enregistrés.

Allure des spectres de xanthones substituées en 1,3,7,8.

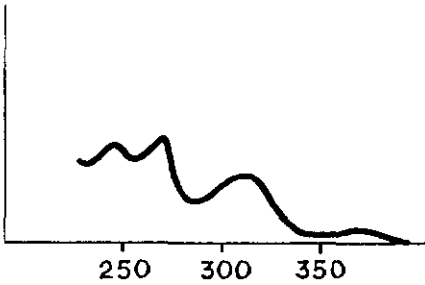
Fig. 11 :



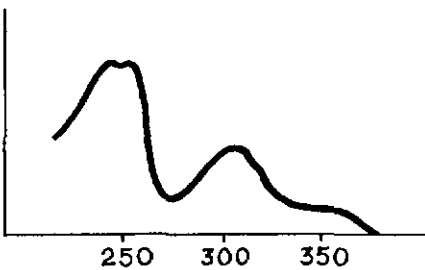
OH en 1
OR en 3 R=H, Me
en 7
en 8



OR en 1 R=gly
OH en 3
OH en 7
OH en 8



OR en 1 R=gly
OR en 3 R=Me
OH en 7
OH en 8



OR en 1,3,7,8
R=Me

Ces spectres, à quatre maximums chacun, se ramènent à quatre schémas. Les modifications observées affectent principalement les bandes I et II. Elles sont en rapport avec les substituants en position 1 et 3 essentiellement.

Si l'hydroxyle est libre en position 1, quels que soient les substituants en 3, 7 et 8, l'intensité maximum est observée sur la bande II. Si l'hydroxyle est libre en position 3 et substitué en 1, l'intensité maximum est observée sur la bande I. Si les hydroxyles en 1 et en 3 sont substitués, les bandes I et II ont une intensité très semblable et si toutes les positions sont méthoxylées, les bandes I et II tendent à se confondre en un seul maximum.

D'autre part, on observe un effet hypsochrome de la bande III par diminution du nombre d'hydroxyles libres.

Composés.

Schéma d'oxydation

(λ max. nm)

	1.	3.	7.	8.	Bande I	Bande II	Bande III	Bande IV
I	OH	OH	OH	OH	238	265	329	385
II	OH	OCH ₃	OH	OH	234	267	325	383
III	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃	239	261	311	375
IV	OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	240	261	312	374
V	O-glu	OH	OH	OH	242	267	315	378
VI	O-prim	OCH ₃	OH	OH	240	270	312	380
VII	OH	OCH ₃	O-rut	OH	237	263	330	378
VIII	O-prim	OCH ₃	OH	OCH ₃	242	253	304	362
IX	O-prim	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	242	250	304	355
X	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	242	251	303	350

Tableau 12 : Formules et spectres UV des xanthones substituées en 1,3,7,8.

XANTHONES 1, 3, 5, 8.

D'après la littérature et l'étude des composés isolés de *G. campestris*, nous donnons dans le tableau No.13 les formules et les spectres des xanthonés tétrasubstituées en 1, 3, 5, 8.

La figure 12 résume par trois exemples l'allure de ces spectres (C, B et S).

Ces spectres ont la particularité de présenter un maximum aux environs de 275 nm. En cela, ils se distinguent de ceux des xanthonés substituées en 1,3,7,8. L'allure générale de tous ces spectres est constante. La méthylation en position 1 ou 3 n'a aucune influence appréciable sur les divers maximums. En revanche, la méthylation ou la glycosylation d'un groupe hydroxyle donne lieu à un déplacement hypsochrome de la bande III (de 3 à 7 nm) (voir tableau No. 14).

Il est donc possible de reconnaître les xanthonés substituées en 1,3,5,8: en effet, elles possèdent à la fois un maximum très intense proche de 250 nm et un autre, de plus faible intensité, très voisin de 275 nm. Bien que les bandes à chaque extrémité du spectre soient parfois difficiles à enregistrer, on observe cependant que la première bande est à une longueur d'onde plus faible et la dernière à une longueur d'onde plus haute que dans les exemples de composés substitués en 1,3,7,8.

Composés	Schémas d'oxydation				(λmax. nm)				
	1.	3.	5.	8.	Bande I	II	II'	III	IV
C	OH	OH	OH	OH	227	254	278	335	390 sh
L	OH	OH	OH	O-glu	222	252	275	328	375 sh
B	OH	OCH ₃	OH	OH	228	254	278	332	382
K	OH	OCH ₃	OH	O-glu	222	254	276	325	
Q	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	231	-	274	307	350 sh
R	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	O-glu	231	-	272	308	350 sh
S	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH	238	248	276	318	

Tableau 13: Formules et spectres UV des xanthones à schéma d'oxydation 1,3,5,8.

(sh = épaulement)

(II': bande supplémentaire ~ 275 nm)

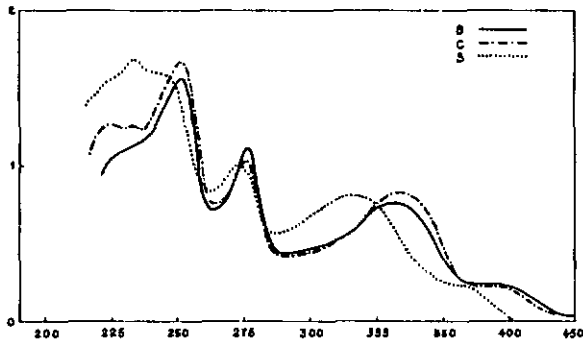


Fig. 12 Spectres UV de B, C, S

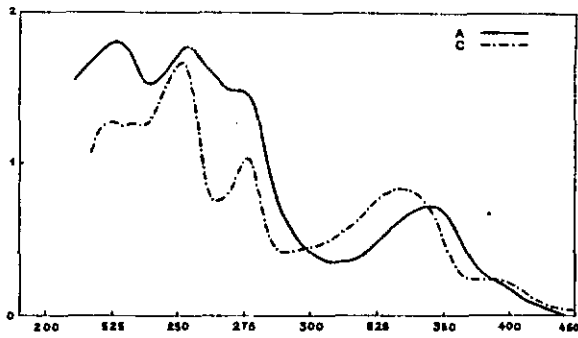


Fig. 13 Spectres UV de A et C

Tableau 14: Effet hypsochrome de la bande III ($\Delta \delta$)
par méthylation ou glycosylation

Substance	Substituants				Bande III max. (nm)	Déplacement $\Delta \delta$ (nm)
	1.	3.	5.	8.		
C	OH	OH	OH	OH	335	
B	OH	OCH ₃	OH	OH	332	C-B 3
L	OH	OH	OH	O-glu	328	C-L 7
K	OH	OCH ₃	OH	O-glu	325	B-K 7
S	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH	318	K-S 7

XANTHONES PENTA-SUBSTITUEES: 1,3,4,5,8

L'étude des xanthones pentasubstituées en 1,3,4,5,8 d'après la littérature et les composés isolés de *G. campestris* permet de faire une comparaison intéressante avec les xanthones tétrasubstituées en 1,3,5,8. En effet, une substitution supplémentaire en position 4 n'influence pas suffisamment l'allure du spectre. La figure 13 (page 60) permet de comparer les spectres de la 1,3,5,8-tétrahydroxyxanthone (ou desméthylbellidifoline, C) et la 1,3,8-trihydroxy-4,5-diméthoxyxanthone (ou corymbiférine, A). Markham [26] a signalé également la ressemblance entre les spectres des xanthones tétra- et pentasubstituées dans les cas suivants: 1,3,7,8 et 1,3,4,7,8 d'une part, 1,3,5,8 et 1,3,4,5,8 d'autre part. (Fig. 14, voir page 63).

Composés	Schéma d'oxydation					Bandes I	II	II'	III	IV
	1.	3.	4.	5.	8.					
A	OH	OH	OCH ₃	OCH ₃	OH	230	256	276 sh	347	
I	O-glu	OH	OCH ₃	OCH ₃	OH	231	254	278	330	375 sh
U	OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	-	253	276	338	
T	O-glu	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	244	-	274	-	376
P	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	239	-	-	-	

Tableau No. 15 : Formules et spectres UV des xanthones à schéma d'oxydation 1,3,4,5,8.

(II' : bande supplémentaire ~ 275 nm)

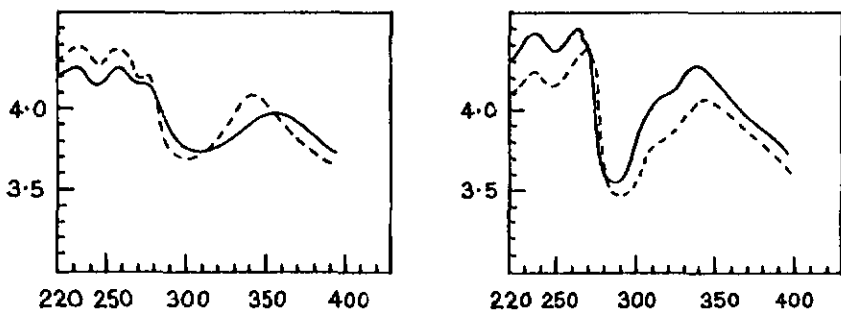
Le tableau No. 15 donne les formules et les spectres des xanthones 1, 3, 4, 5, 8 étudiées.

En ce qui concerne les bandes II, II', et III, les xanthones tétra ou penta-oxygénées sont très semblables, et se distinguent parfaitement des tétrasubstituées en 1, 3, 7, 8.

Le tableau No. 16 donne les maximums (λ , nm) caractérisant les différents schémas d'oxydation.

Nous résumons ainsi les observations faites sur ces spectres en milieu méthanolique.

Il est à remarquer qu'un composé n'ayant plus aucun groupe OH libre a un spectre difficile à caractériser, du fait qu'on ne peut déceler aucun maximum significatif.



Substitutions:

--- 1, 3, 5, 8.

— 1, 3, 4, 5, 8.

— 1, 3, 7, 8.

--- 1, 3, 4, 7, 8.

Fig. 14 Spectres UV [26]

Schéma d'oxydation

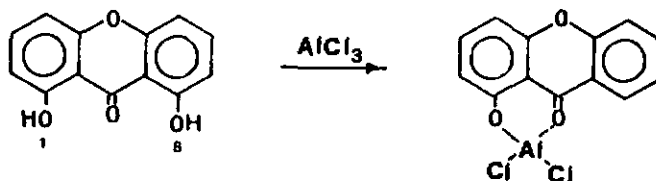
	1.3.7.8.	1.3.5.8.	1.3.4.5.8.
I	234 - 242	222 - 227	230 - 232
II	250 - 270	252 - 254	254 - 256
II'	~	274 - 278	276 - 278
III	303 - 330	325 - 336	325 - 347
IV	350 - 380	382 - 390	375

Tableau No. 16 : Maximums caractéristiques des différents schémas d'oxydation des xanthonés étudiés.

B. Modifications des spectres par addition de réactifs.

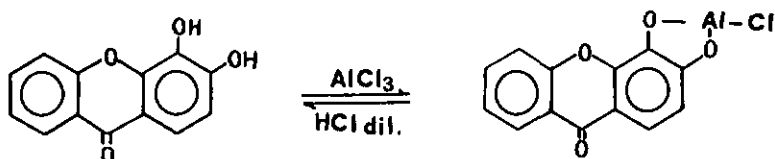
Généralités

Le chlorure d'aluminium forme des complexes avec les xanthonés possédant 1 groupe hydroxyle libre en position 1 ou 8 :



Ces complexes sont stables en milieu acide chlorhydrique dilué.

En revanche, les complexes formés en présence de groupes ortho-dihydroxyyles sont décomposés en milieu HCl dilué :



Les conséquences de la formation de ces complexes sur le spectre UV sont des déplacements bathochromes, en particulier de la bande III.

En milieu de base forte, par exemple NaOMe, la ionisation de tous les OH phénoliques entraîne d'importants changements dans le spectre. Le nombre et la position des substituants -OH détermineront ces altérations.

En milieu de base faible, par exemple NaOAc, seul l'hydroxyle en 3 ou en 6 (le plus acide des xanthonés) est complètement ionisé. On observe par conséquent les mêmes changements qu'avec NaOMe. L'acidité de groupements hydroxyyles en d'autres positions n'est décelée par NaOAc que par un léger effet hypochrome par rapport au spectre en milieu neutre [42] .

AlCl_3

Les tableaux No. 17 et 18 donnent le détail des effets bathochromes enregistrés en présence de AlCl_3 pour toutes les xanthonés

Composés

Substituants

	1	3	7	8	Bandes II	III	IV	OH en α		dihydroxyle
	I	OH	ON	OH	OH	13	31/3 [*]	-	1	8
II	OH	OMe	OH	OH	11	25/5 [*]	47	1	-	+
III	OH	OMe	OH	OMe	15	19	53	1	-	-
IV	OH	OMe	OMe	OMe	14	18	51	1	-	-
V	O-gly	OH	OH	OH	11	32/28 [*]	57	-	8	+
VI	O-gly	OMe	OH	OH	10	29/26 [*]	40	-	8	+
VII	OH	OMe	O-gly	OH	15	30	30	1	8	-
VIII	O-gly	OMe	OH	OMe	0	0	0	-	-	-
X	OMe	OMe	OMe	OMe	0	0	0	-	-	-
Variations					10-15 nm	18-32	40-57			

Tableau No. 17 : Effet bathochrome dû à $AlCl_3$ pour les xanthones 1,3,7,8.

($\Delta \lambda$ nm)

(* Effet dû à HCl)

étudiées.

- a) Les xanthones tétrasubstituées en 1,3,7,8 montrent un déplacement de 18-32 nm de la bande III avec généralement une augmentation d'intensité. Pour les 7-8-o-dihydroxy- les l'addition de HCl produit un déplacement hypsochrome de la bande III.
- b) Pour les xanthones tétrasubstituées en 1,3,5,8, $AlCl_3$ provoque une forte réduction d'intensité de la bande II, tandis que la bande III devient plus intense, et se déplace de 29-39 nm. Même situation pour les xanthones substituées en 1,3,4,5,8, avec déplacement de la bande III de 39-41 nm.

Il n'est pas possible de déceler un groupe OH libre à la fois en position 1 et 8 car le déplacement bathochrome ne peut pas être additif. Le doute sera levé par d'autres méthodes d'analyse, notamment la spectroscopie RMN.

Tableau No. 18 : Effet bathochrome dû à $AlCl_3$ pour les xanthones 1.3.5.8 et 1.3.4.5.8
 $\Delta \lambda$ (nm)

	Composés					$(\Delta \lambda = \lambda_{AlCl_3} - \lambda_{MeOH})$ (nm)				
	1	3	4	5	8	Bande II	II'	III	OH en α	
K	OH	OMe	-	OH	Oglu	13	8	29	1	-
L	OH	OH	-	OH	Oglu	15	6	34	1	-
S	OCH ₃	OCH ₃	-	OCH ₃	OH	8	14	31	-	8
B	OH	OCH ₃	-	OH	OH	8	11	38	1	8
C	OH	OH	-	OH	OH	9	11	39	1	8
Q	OCH ₃	OCH ₃	-	OCH ₃	OCH ₃	0	0	0	-	-
A	OH	OH	OCH ₃	OCH ₃	OH	19	12	41	1	8
I	Oglu	OH	OCH ₃	OCH ₃	OH	15	11	35	-	8
U	OH	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	7	10	30	1	-
			Variations tétra 1.3.5.8			8-15	6-14	29-39		
			penta 1.3.4.5.8			7-19	10-12	30-41		

NaOMe :

- a) En présence d'un hydroxyle libre en position 3, la bande III a un déplacement de 20 nm au moins dans la région de 350 nm pour les xanthones substituées en 1.3.7.8 et dans la région de 360-370 nm pour les tétra-et pentasubstituées en 1.3.(4) 5.8.
- b) Si l'hydroxyle en 5 n'est pas libre, le pic de la région 275 nm disparaît.

NaOAc :

- a) Pour les xanthones ayant un groupe hydroxyle libre en 3 (ou 6), l'effet bathochrome, en particulier de la bande III, sera semblable à celui provoqué par action de la base forte.
- b) Si la molécule possède d'autres hydroxyles libres, le spectre n'est pas modifié par NaOAc, si ce n'est un léger effet hypochrome.

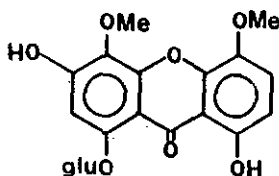
Nous donnons en détail ci-après, le cas des composés di- ou poly-substitués étudiés.

Les composés dihydroxylés rencontrés, contiennent en plus des substituants méthoxyles ou glucosyles.

Nous observons les deux situations suivantes :

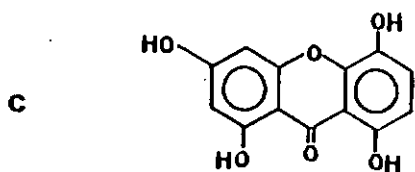
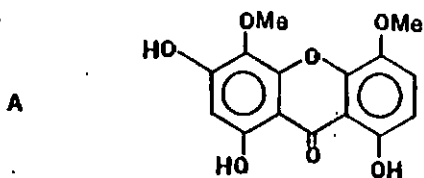
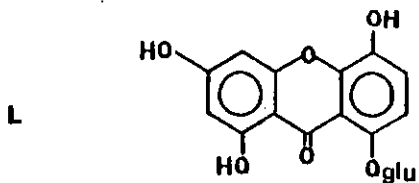
- 1) Cas de I

dihydroxy- 3,8 :



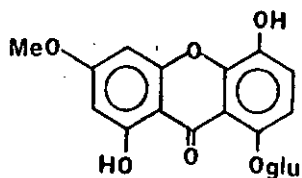
L'acidité des hydroxyles est décelée de manière identique par les spectres enregistrés en milieu de base forte et de base faible.

La situation est analogue à I pour les composés polyhydroxylés suivants :



De plus, dans les cas de I et de A, le groupement méthoxyle voisin du OH en 3, favorise encore l'acidité de ce dernier [42] .

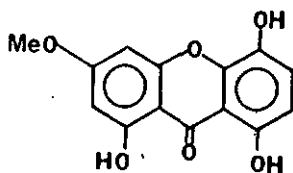
2) Cas de K



dihydroxy-1,5 :

L'acidité des hydroxyles n'est décelée par NaOAc que par un léger effet hypochromique par rapport au spectre en milieu neutre. [9] .

Cette situation se retrouve dans le cas du composé B, trihydroxylé :



(voir photographies des spectres, p. 78-84).

Notons comme remarque finale que tous les spectres ont été enregistrés en milieu méthanolique. Ce procédé offre comme désavantage le fait que l'essentiel des spectres UV de la littérature correspond à des spectres mesurés dans l'éthanol.

Cependant, Porter et Markham [36] ont montré que la présence de traces d'eau dans le réactif ou dans le solvant provoquait dans l'éthanol une inhibition partielle de la formation du complexe $AlCl_3$ avec les groupements ortho-dihydroxyliques de flavonoïdes. Cette inhibition est nulle ou insignifiante lorsque les spectres sont réalisés dans le méthanol.

La concentration des solutions a été ajustée de façon à obtenir une absorbance maximale comprise entre 0,8 et 1,2 des pics de la région comprise entre 250 et 400 nm.

C. Cas des xanthones isolées

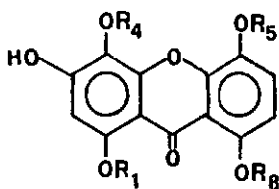
Pour les composés isolés, soit A, B, C, I, H, K et L, nous prévoyons (d'après AlCl_3) un hydroxyle libre en 1 et(ou)8. Pour H un groupe o-dihydroxyle est prévu en plus par effet hypsochrome dû à HCl. D'autre part, le déplacement bathochrome de la bande III en milieu basique (NaOMe et NaOAc) indique un groupe OH libre en 3 (et/ou 6) pour toutes les substances, sauf B et K. Si nous admettons que l'allure des spectres permet de prévoir une substitution en 1.3.5.8 et 1.3.4.5.8 il n'y a que H qui soit exclu de ce schéma. Or, pour H, le comportement chromatographique et la couleur du spot, de même que son comportement à l'hydrolyse ont déjà pu nous indiquer qu'il s'agit vraisemblablement de la mangiférine. Par spectroscopie IR, nous confirmerons ce résultat.

Pour les autres composés, si nous ajoutons aux renseignements fournis par la spectrométrie UV ceux donnés par le comportement chromatographique avant et après hydrolyse, nous pouvons indiquer :

A et I sont pentasubstitués, alors que B, C, K et L sont tétrasubstitués.

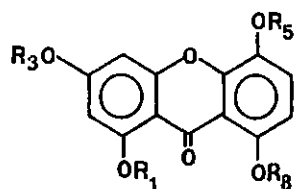
A, I, C et L possèdent un groupe hydroxyle libre en position 3, en plus d'un hydroxyle libre en 1 et/ou 8, alors que B et K n'ont des groupes hydroxyles libres possibles qu'en 5, vraisemblablement. Ces derniers sont détectables en l'absence de OH en 3, par un effet hypochrome du spectre en milieu de base faible. (Voir fig. 15, p. 74).

(Tableau No. 19 des spectres de A, B, C, I, K, L et H).



A, I

$\left. \begin{array}{l} R_1 \\ R_8 \end{array} \right\} 10H \text{ au moins}$



B, C, K, L

B, K : R₃ ≠ H

C, L : R₃ = H

$\left. \begin{array}{l} R_1 \\ R_8 \end{array} \right\} 10H \text{ au moins}$

Fig. No. 15

Nos hypothèses (selon Fig. 15) seront développées par analyse RMN.

Tableau No. 19 : Spectres UV (max. en nm, solvant MeOH)

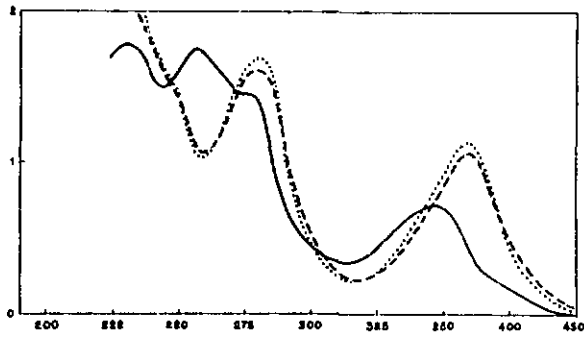
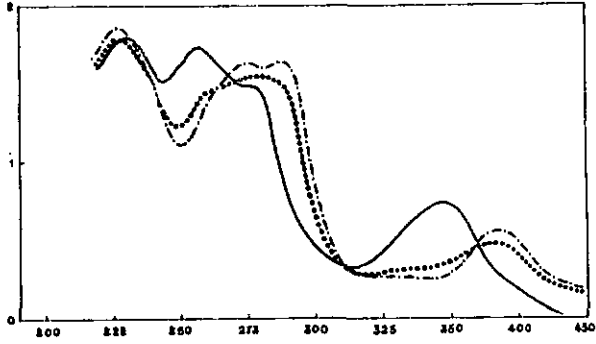
Composés	Solvant	Bande I	Bande II	Bande II'	Bande III	Bande IV
A	pur	230	256	276	347	
	+ AlCl ₃	227	275	288	386	
	+ AlCl ₃ + HCl	227	260	280	386	
	+ NaOMe	-	280	-	370	
	+ NaOAc	-	280	-	369	
B	pur	228	254	278	332	382
	+ AlCl ₃	-	262	289	370	
	+ AlCl ₃ + HCl	-	252	287	370	
	+ NaOMe	-	264	284	366	
	+ NaOAc	-	255	278	331	380
C	pur	227	254	278	335	390
	+ AlCl ₃	225	263	289	374	
	+ AlCl ₃ + HCl	225	257	287	376	
	+ NaOMe	232	260	304	359	
	+ NaOAc	233	249	270	360	

Tableau No. 19 (suite) : Spectres UV (max. en nm, solvant MeOH)

Composés	Solvant	Bande I	Bande II	Bande II'	Bande III	Bande IV
I	pur	232	254	278	331	375
	+ AlCl ₃	225	269	289	366	
	+ AlCl ₃ + HCl	225	268	287	358	
	+ NaOMe	231	273	-	368	
	+ NaOAc	230	274	-	358	
K	pur	222	254	276	325	
	+ AlCl ₃	222	267	284	364	
	+ AlCl ₃ + HCl	222	267	282	360	
	+ NaOMe	222	254	286	340	
	+ NaOAc	222	254	288	324	
L	pur	226	252	275	326	375
	+ AlCl ₃	225	267	281	350	
	+ AlCl ₃ + HCl	225	267	283	358	
	+ NaOMe	233	259	292	352	
	+ NaOAc	232	248	268	356	

Tableau No. 19 (suite) : Spectres UV (max. en nm, solvant MeOH)

Composés	Solvant	Bande I	Bande II	Bande III	Bande IV
H	pur	242	259	315	365
	+ AlCl ₃	232	270	356	406
	+ AlCl ₃ + HCl	232	267,281 sh	338	402
	+ NaOMe	238	273	305 sh	388
	+ NaOAc	-	265	305 sh	382



MeOH: — AlCl₃: -.-.- AlCl₃+HCl: NaOMe: ---- NaOa:

Fig. 16: Spectre UV de A

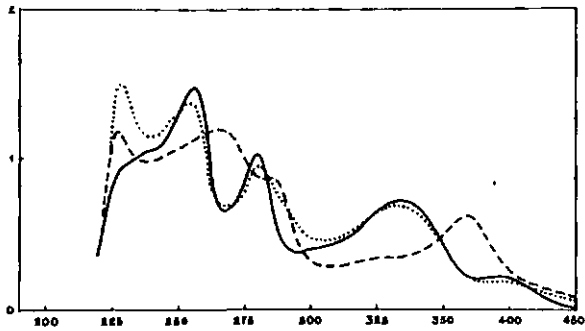
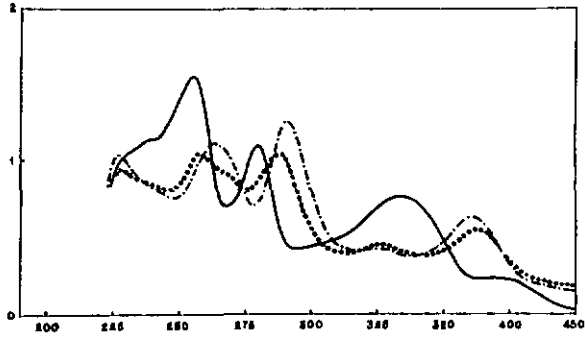


Fig. 17: Spectre UV de B

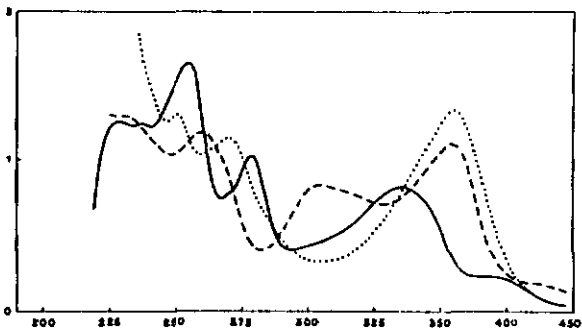
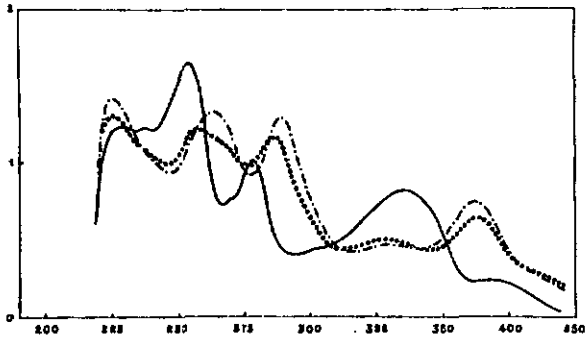


Fig. 18: Spectre UV de C

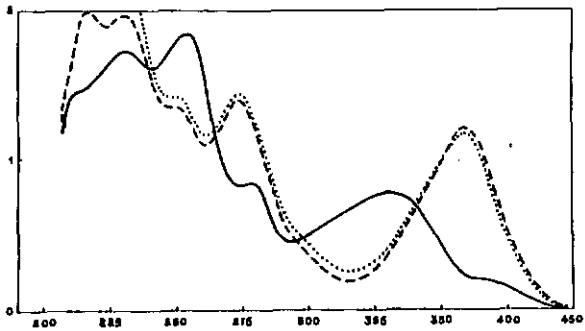
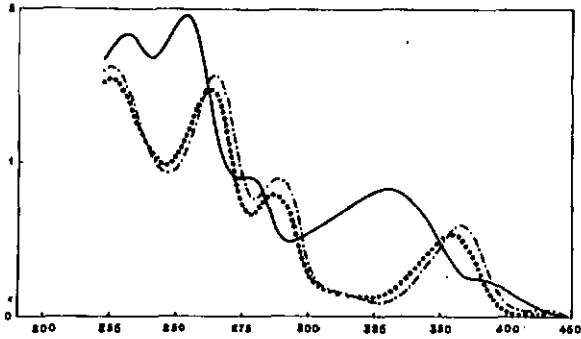


Fig. 19: Spectre UV de I

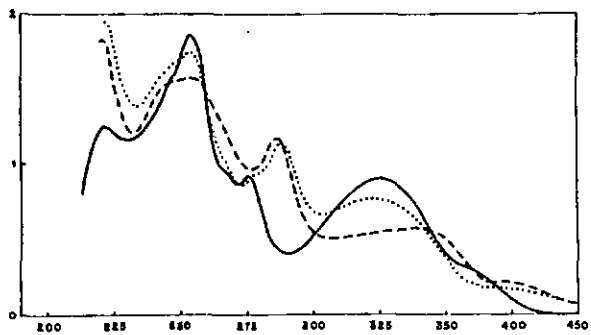
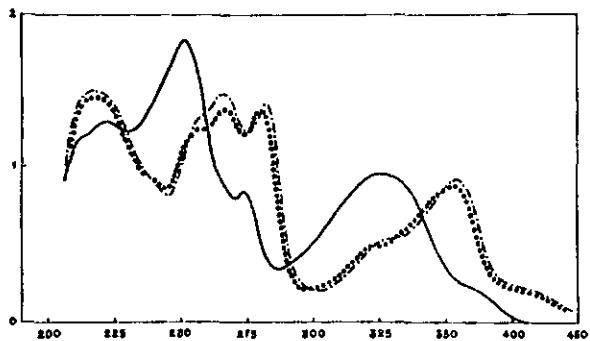


Fig. 20: Spectre UV de K

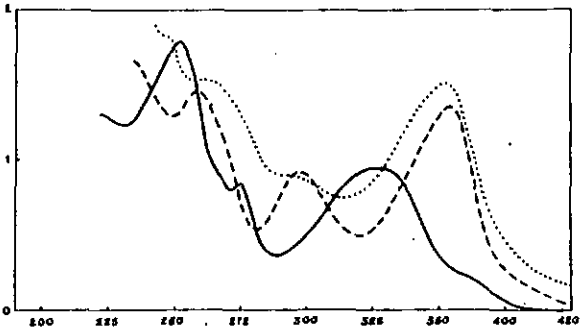
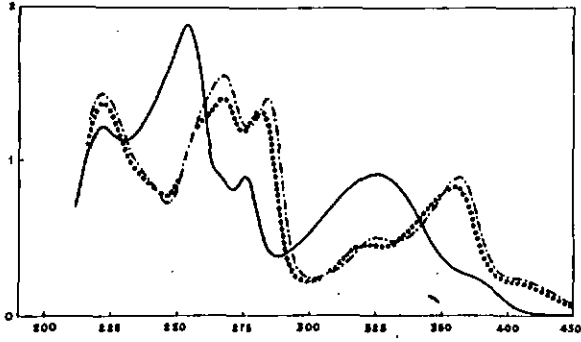


Fig. 21: Spectre UV de L.

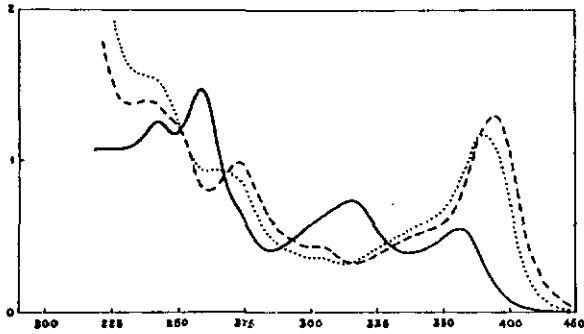
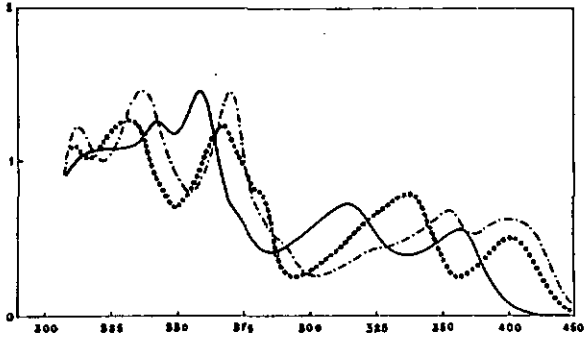


Fig. 22: Spectre UV de H

6.3. SPECTROMÉTRIE IR

La spectrométrie IR n'a été employée que relativement peu pour élucider les structures de nos polyphénols. Néanmoins, elle est grandement utile dans la reconnaissance de deux structures identiques. En général, nous comparons les spectres IR de substances isolées avec ceux de témoins authentiques : si les spectres sont superposables, l'identité est prouvée.

D'autre part, nous avons pris l'habitude de relever le spectre IR pour chaque substance nouvelle. En effet, Hostettmann a montré la présence dans la nature d'acétylglycosides [41]; il est donc nécessaire dans de tels cas, de contrôler le spectre IR avant de procéder à l'identification par spectrométrie RMN de dérivés acétylés.

Dans l'étude qui nous occupe, la présence d'isoorientine et de manjiférine (voir hypothèse p. 53, 32) est confirmée par les spectres IR (avec témoins authentiques) voir Fig. 23, 24 ci-après.

Nous indiquons dans les Fig. 23 à 31 les spectres IR de toutes les molécules identifiées.

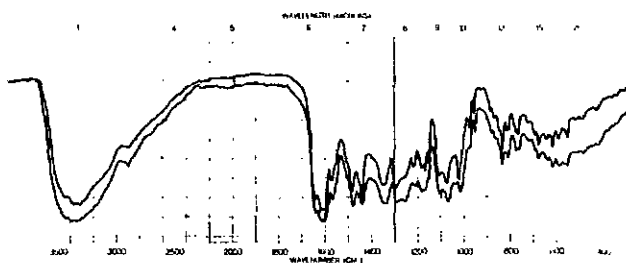


Fig. 23: Spectres IR de G et de l'isoorientine

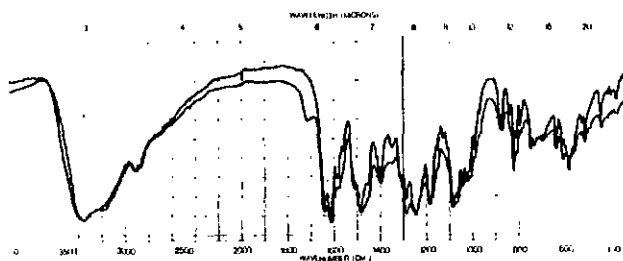


Fig. 24: Spectres IR de H et de la mangiférine

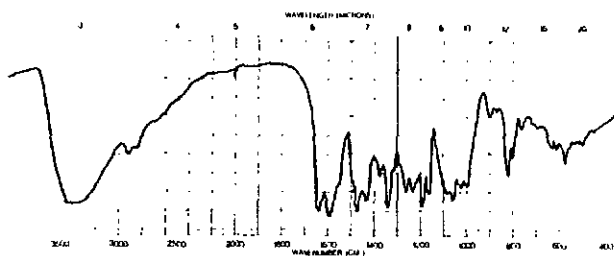


Fig. 25: Spectre IR de F

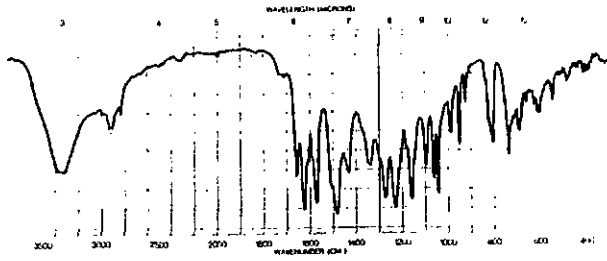


Fig. 26: Spectre IR de A

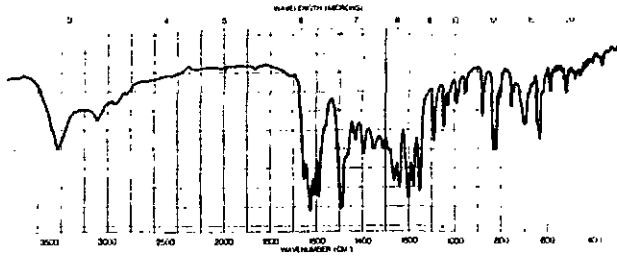


Fig. 27: Spectre IR de B

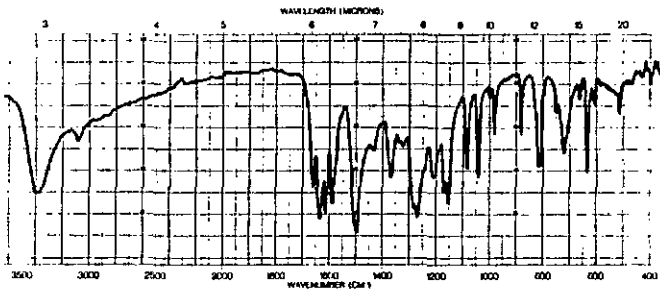


Fig. 28: Spectre IR de C

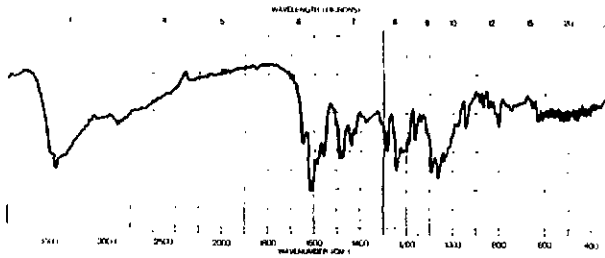


Fig. 29: Spectre IR de I

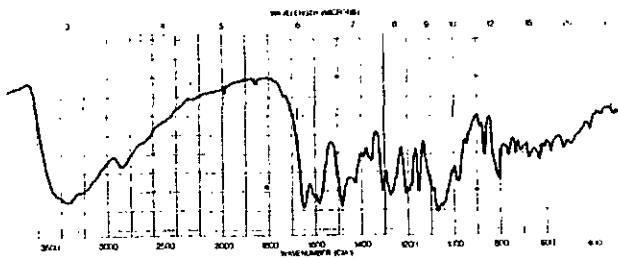


Fig. 30: Spectre IR de K

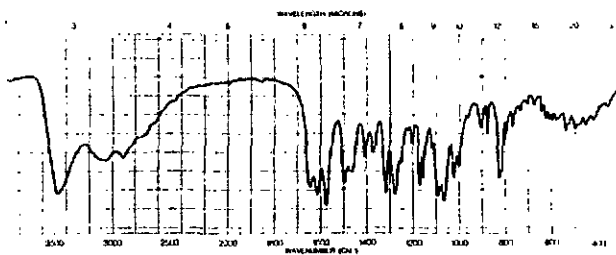


Fig. 31: Spectre IR de L

6.4. SPECTROMÉTRIE RMN

La RMN est devenue l'un des outils modernes les plus précieux pour l'élucidation ou la confirmation des structures de composés flavoniques ou xanthoniques. A l'aide de deux paramètres seulement, à savoir déplacement chimique des signaux de résonance et constante de couplage, elle nous informe avec précision sur la structure et la configuration, de sorte qu'il n'est souvent plus nécessaire de recourir aux méthodes classiques de dégradation.

Le DMSO- d_6 est de loin le solvant le plus utilisé généralement pour les flavonoïdes purs. Ses désavantages sont cependant importants : point d'ébullition élevé, ce qui rend difficile la récupération du flavonoïde, risque de décomposition de ce dernier et difficulté d'éviter l'absorption d'eau (qui produit un signal à 3,5 ppm). Nous avons cependant été amenée dans certains cas à enregistrer des spectres de composés xanthoniques dans le DMSO- d_6 .

Un grand nombre d'auteurs préfèrent l'emploi de dérivés triméthylsilylés (TMS-éther) dissous dans CCl_4 [43]. Ce système présente des avantages. Nous préférons cependant la préparation de dérivés acétylés, facile et rapide, permettant l'enregistrement des spectres dans $CDCl_3$. Cette façon d'opérer possède les avantages suivants :

- a) les protons des groupes acétoxyles donnent lieu à des spectres très lisibles (contrairement à ceux des protons-OH) en formant des singulets.
- b) il est par conséquent plus aisé de déterminer le nombre exact de groupes acétoxyles dans la molécule par intégration des pics, que ce n'est le cas pour des protons -OH aliphatiques ou phénoliques qui souvent sont perdus dans le bruit de fond.

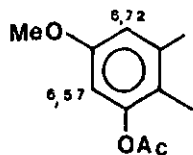
- c) on peut distinguer les groupes acétoxyles aromatiques (partie aglycone) des groupes acétoxyles aliphatiques (reste glycosidique) et par là déterminer leur nombre exact respectivement.
- d) les protons acétoxyles osidiques résonnent à des champs notablement plus élevés 1,80 à 2,10 ppm que les autres protons du reste osidique: 3,50 à 5,10 ppm [45], sans qu'il y ait de recouvrement. Ceci n'est pas le cas des protons hydroxyles du sucre.

Notre problème réside dans la détermination de structures de composés xanthoniques essentiellement. Nous pouvons appliquer à ces composés les règles suivantes:

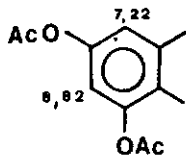
- 1) Les protons aromatiques résonnent dans le voisinage de 7 ppm. Les protons couplés en position ortho ou méta forment des spectres AB dont les constantes de couplage sont respectivement $J_{ortho} = 9$ cps et $J_{méta} = 2,5$ cps.
- 2) Les variations des δ des protons aromatiques provoquées par le remplacement d'un méthoxyle par un acétoxyle, étudiées par Rivaille [46], s'appliquent aux xanthonés, notamment au noyau benzénique substitué en 1,3, mais moins bien au noyau disubstitué en 7, 8. Les variations suivantes ont été observées:

$\Delta \delta = 0,18$ à $0,53$ ppm pour les protons en ortho
0,02 à 0,18 ppm pour les protons en méta
0,31 à 0,32 ppm pour les protons en para

$\Delta \delta$ ortho



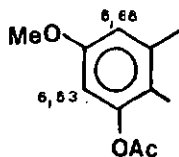
B_a



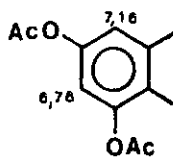
C_a

0,50 ppm (4)

0,25 (2)



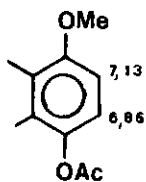
K_a



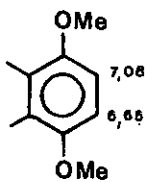
L_a

0,49

0,25



S_a



O

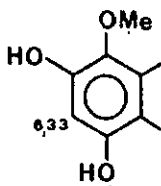
0,20

$\Delta \delta$ méta 0,05

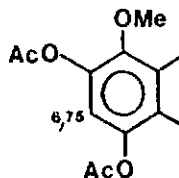
Exemples :

- 3) L'acétylation des OH phénoliques provoque un déplacement des protons aromatiques vers des champs plus bas: ainsi pour un proton ortho d'un groupe acétoxyte $\Delta \delta = + 0,5$ ppm et 0,15 ppm pour un proton en para [34].

Exemple:



A



A acétylé

- 4) Les déplacements chimiques des protons acétoxytes aromatiques se situent à 2,40 - 2,50 ppm lorsqu'ils sont voisins du C = O, [46], c'est à dire en position 1 ou 8, et à une valeur de δ inférieure à 2,40 ppm pour toutes les autres positions, en général entre 2,30 et 2,35 ppm. La présence d'un OH chélaté vers 12 - 13 ppm dans le produit non acétylé confirme d'ailleurs la position 1 ou 8.

Tableau No. 20 : Déplacement chimique δ des acétoxyles aromatiques sur le squelette xanthonique.

Substances comparées

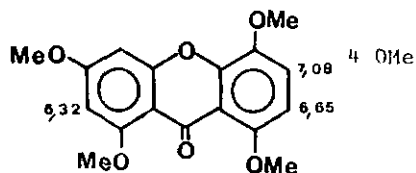
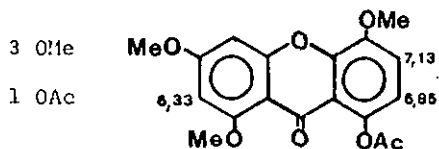
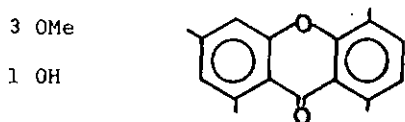
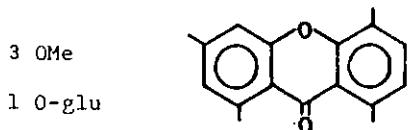
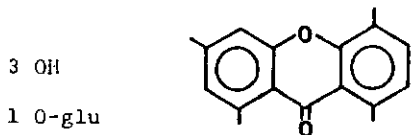
δ en ppm

	Substitution en :					OAc en :			
	1	3	4	5	8	1	3	5	8
K _a	OAc	OMe	--	OAc	O-glu	2,49	-	2,40	-
L _a	OAc	OAc	--	OAc	O-glu	2,48	2,30	2,38	-
I _a	O-glu	OAc	OMe	OMe	OAc	-	2,34	-	2,46
B _a	OAc	OMe	--	OAc	OAc	2,41	--	2,41	2,41
C _a	OAc	OAc	--	OAc	OAc	2,42	2,33	2,42	2,42
A _a	OAc	OAc	OMe	OMe	OAc	2,38	2,35	--	2,40
S _a	OAc	OMe	--	OMe	OMe	2,45	--	--	--

La valeur la plus élevée du déplacement chimique d'un acétoxyde aromatique correspond toujours à une substitution en 1 ou 8. Cependant, si les deux positions sont occupées en même temps, cette valeur baisse et peut être ramenée à la même valeur que celle correspondant à un acétoxyde en position 5 du squelette xanthonique.

- 5) L'étude d'un hétéroside xanthonique, comme pour les composés flavoniques [47], comporte notamment la méthylation totale des OH libres, suivie de l'hydrolyse acide de la chaîne sucrée et enfin l'acétylation du groupement OH ainsi libéré.

Exemple du glucoside de la desméthylbellidifoline :



S_a

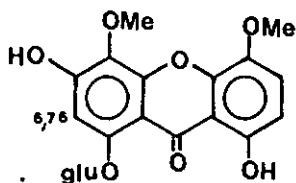
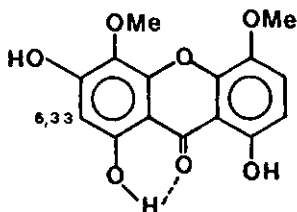
Q

La comparaison des spectres du produit final S_a et de la tétraméthoxy 1,3,5,8-xanthone permet de déterminer la position du groupement glucosidique dans la molécule initiale.

- 6) Lorsqu'il y a un seul groupe hydroxyle libre en péri de la fonction carbonyle, il est chélaté et les protons d'un tel noyau aromatique absorbent dans un champ plus haut que les protons du cycle non chélaté. Cela est dû à la forte densité électronique imposée par la chélation sur le cycle. Avec un glycoside, cet effet est encore mieux observé dans le DMSO-d₆ [53], d'où il ressort que la comparaison des spectres d'un glycoside et de son aglycone permet de déduire la position d'attache du sucre sur le squelette xanthonique, ce qui est vérifié par l'exemple de la corymbiférine et de son glucoside:

A: corymbiférine

I: glucoside correspondant



6.4.1. SUBSTANCES IDENTIFIÉES PAR RMN

Nous avons à élucider par spectrométrie RMN les structures de six composés xanthoniques A, B, C, I, K, L et d'un composé flavonique F.

La tableau No. 21 rassemble les spectres RMN des composés xanthoniques étudiés.

Tableau No. 21 Spectres RMN (δ en ppm) des xanthones

Composés	Protons aromatiques					
	H-C(2) J = 2,5 ± 0,2 Hz	H-C(4)	H-C(6) J = 9,5 ± 0,2 Hz	H-C(7)	-OCH ₃	-OCOCH ₃
C acétylé	6,82	7,22	7,45	6,93	-	2,33(3H) 2,42(9H)
L acétylé	6,78	7,15	7,31	6,96	-	2,30(3H) 2,38(3H) 2,48(3H)
S acétylé	6,33	6,56	7,13	6,85	3,88(3H) 3,95(3H) 3,98(3H)	2,45(3H)
Q	6,32	6,54	7,08	6,65	3,87(3H) 3,93(9H)	-
B acétylé	6,57	6,72	7,42	6,93	3,92(3H)	2,41(9H)
K acétylé	6,53	6,66	7,30	6,95	3,87(3H)	2,40(3H) 2,49(3H)
A ^{a)}	6,33	-	7,51	6,75	3,86(3H) 3,93(3H)	
A acétylé	6,75	-	7,20	6,88	3,99(3H) 4,10(3H)	2,35(3H) 2,38(3H) 2,40(3H)
I ^{a)}	6,76	-	7,42	6,66	3,87(3H) 3,90(3H)	
I acétylé	6,75	-	7,15	6,86	3,96(3H) 4,03(3H)	2,34(3H) 2,46(3H)

Solvant : CDCl₃ a) DMSO-d₆

en ppm par rapport au TMS pris comme référence interne.

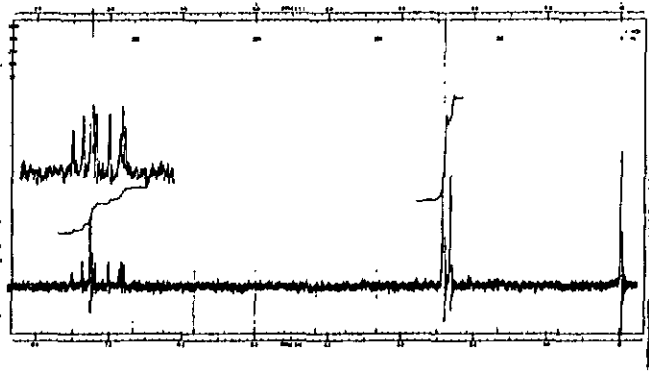


Fig. 32: Spectre RMN de C acétylé

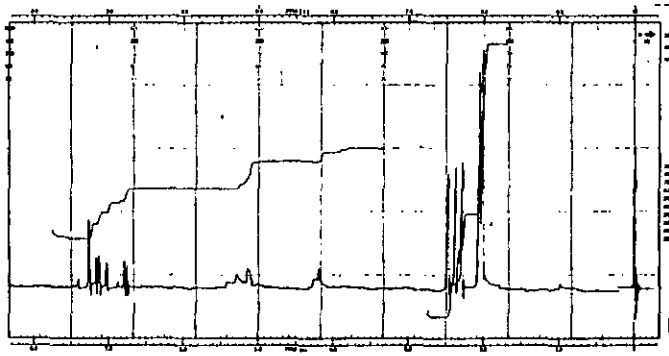


Fig. 33: Spectre RMN de L acétylé

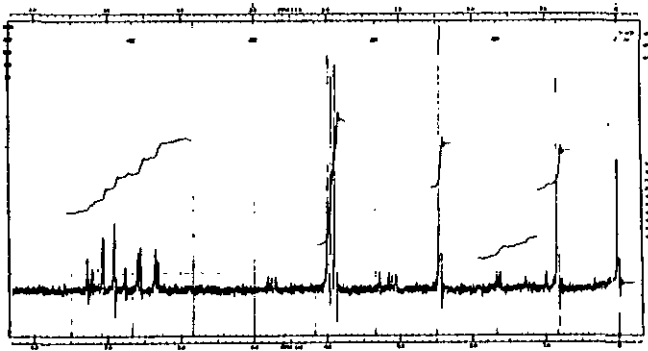


Fig. 43: Spectre RMN de S acétylé

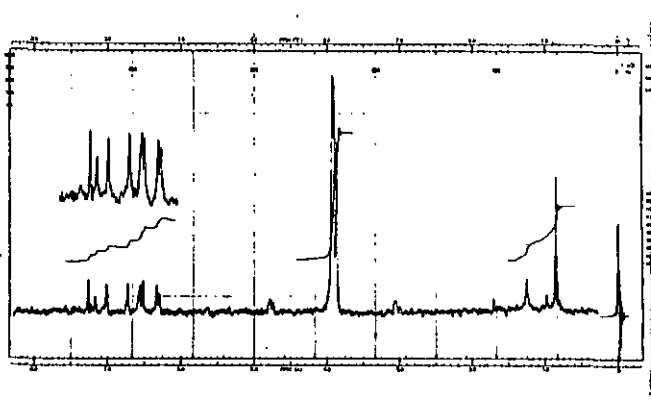


Fig. 35: Spectre RMN de Q



Fig. 36: Spectre RMN de B acétylé

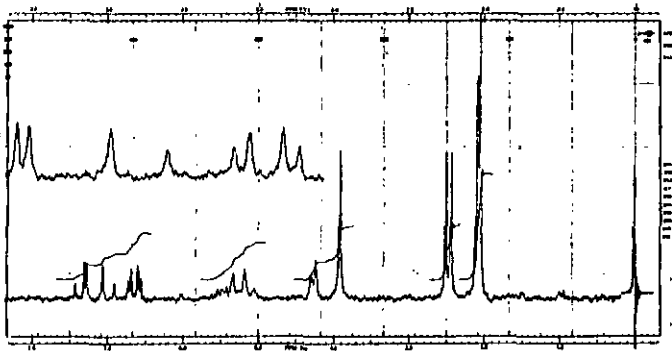


Fig. 37: Spectre RMN de K acétylé

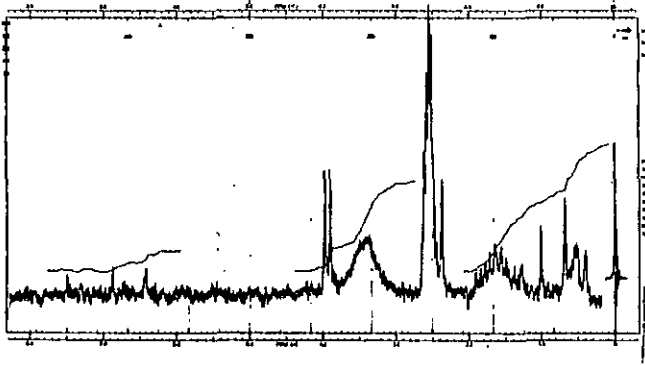


Fig. 38: Spectre RMN de A (dans DMSO)

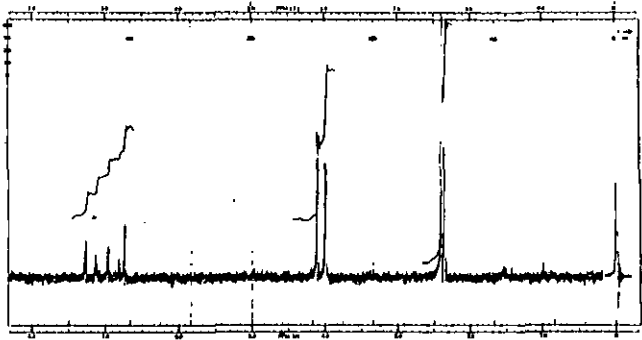


Fig. 39: Spectre RMN de A acétylé

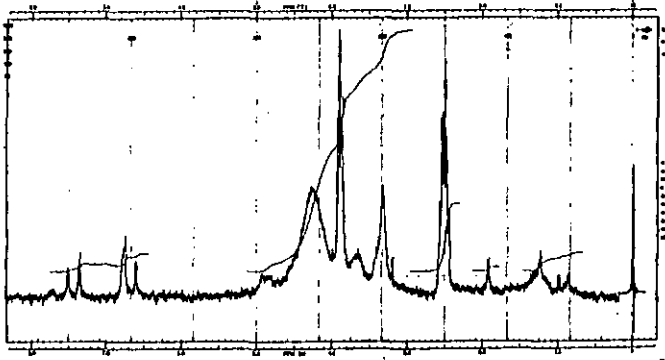


Fig. 40: Spectre RMN de I (dans DMSO)



Fig. 41: Spectre RMN de I acétylé

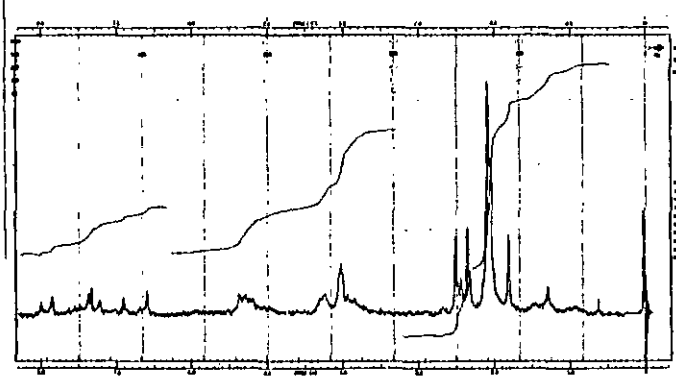
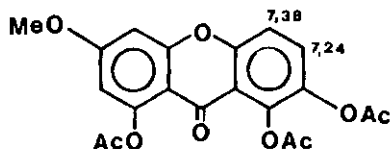
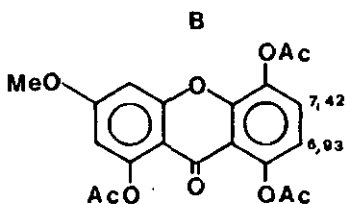
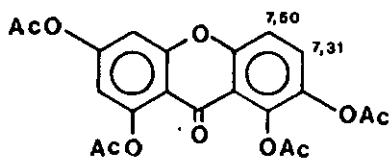
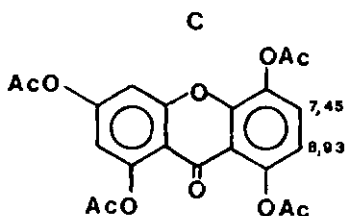


Fig. 42: Spectre RMN de F acétylé

Dans le spectre RMN du dérivé acétylé de C, on compte quatre groupes acétoxyles aromatiques : singulets à 2,33 à 2,42, confirmant l'hypothèse d'une tétrahydroxyxanthone. Le spectre RMN de B acétylé montre trois groupes acétoxyles aromatiques (singulets à 2,41) et un groupe méthoxyle (singulet à 3,92) fixé en 3, position détectée différente de OH par l'analyse UV. Pour tous les deux composés, les quatre protons aromatiques forment des spectres AB avec couplage, une fois en méta ($J = 2,5$ Hz) et une fois en ortho ($J = 9,5$ Hz), ces dernières valeurs étant pour C 6,93 et 7,45, alors que pour B, elles sont de 7,42 et 6,93 ppm. Celà doit donc correspondre aux protons en H-C (6) et H-C (7). En effet, si nous comparons les spectres RMN d'isomères xanthoniques, enregistrés dans les mêmes conditions, nous remarquons que pour un même spectre AB, de même constante de couplage, les protons en ortho en position 5 et 6 ont un déplacement chimique dans un champ plus bas que les protons en ortho en position 6 et 7.



Pour C et B, nous confirmons ainsi les hypothèses de la page 74. Le composé C est donc la tétrahydroxy 1,3,5,8-xanthone ou desméthylbellidifoline. Le composé B correspond à la trihydroxy-1,5,8-méthoxy-3-xanthone ou bellidifoline. Ces deux substances ont été isolées pour la première fois dans *Gentiana bellidifolia* Hook par Markham [24].

Le spectre RMN de A acétylé montre la présence de deux groupes méthoxyles et de trois groupes acétoxyles aromatiques dont deux à 2,38 et 2,40 ppm sont au voisinage de la fonction carbonyle [47], ainsi que trois protons aromatiques à 6,75 (singulet, position H-C(2) et à 7,20 et 6,88 ppm, spectre AB, $J = 9,5$ Hz, protons en ortho H-C(6) et H-C(7). Ainsi le composé A est la trihydroxy-1,3,8-diméthoxy-4,5-xanthone ou corymbiférine, isolée pour la première fois à partir des racines de *Gentiana corymbifera* Kirk [23].

Dans le spectre RMN du dérivé acétylé de L, on compte quatre protons aromatiques formant des spectres AB à 6,78 et 7,15 ($J = 2,5$ Hz) et à 7,31 et 6,96 ($J = 9,5$ Hz) correspondant respectivement aux protons en méta H-C(2) et H-C(4) et aux protons en ortho H-C(6) et H-C(7). Il y a au total sept groupes acétoxyles dont quatre aliphatiques entre 2,00 et 2,10 attribués au glucose, et trois aromatiques à 2,30 2,38 et 2,48 dont un seul en *para* de la fonction carbonyle. Par conséquent, le sucre ne peut être attaché au squelette xanthonique qu'en position 1 ou 8. La méthylation des groupes hydroxyles phénoliques libres par un excès de diazométhane, suivie de l'hydrolyse acide, fournit un composé S, lequel ne peut correspondre qu'à l'hydroxy-1-triméthoxy-3,5,8-xanthone ou à l'hydroxy-8-triméthoxy-1,3,5-xanthone. Or, les spectres UV mesurés diffèrent nettement de ceux du premier composé [48]; en revanche, ils sont semblables à ceux du second [26] (voir tableau No.13).

La preuve est apportée par la comparaison du spectre RMN de S acétylé avec celui de la tétraméthoxy-1,3,5,8-xanthone, composé Q : en effet, les protons aromatiques en position 2 et 4 ont le même déplacement chimique (voir tableau No. 21), alors que ceux en position 6 et 7 du composé S_a subissent un déplacement par rapport à ceux du composé Q. Ce déplacement est dû au voisinage du groupement acétoxyle en 8 sur le composé S_a. Le composé L est donc la trihydroxy-1,3,5-8-0-glucosyl-xanthone ou desméthylbellidifoline-8-0-glucoside.

Le spectre RMN de K acétylé montre un groupe méthoxyle (singulet à 3,87), qui d'après l'UV doit occuper la position 3 du squelette xanthonique. Il est alors intéressant de comparer les spectres de K et de L acétylés. Pour K acétylé, les protons aromatiques en H-C(2) et H-C(4), subissent un déplacement par rapport à ceux de L acétylé dû au remplacement d'un acétoxyle par un méthoxyle en 3. Quant aux protons en ortho H-C(6) et H-C(7), ils ont le même déplacement chimique. Restent encore pour K acétylé deux groupes acétoxyles aromatiques à 2,40 et 2,49, ce dernier se trouvant au voisinage de la fonction carbonyle, et quatre acétoxyles aliphatiques entre 2,00 et 2,15. La position d'attache du sucre ne peut donc être qu'en 1 ou 8. La méthylation de K, suivie d'hydrolyse acide, conduit au composé S, comme pour le cas de L, donc à l'hydroxy-8-triméthoxy-1,3,5-xanthone. La substance K est donc le bellidifoline-8-0-glucoside.

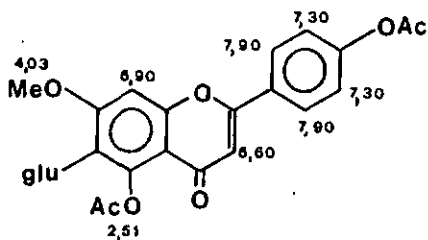
Une preuve supplémentaire à la confirmation de cette structure a été apportée par les travaux de M. D. Davoust (sous presse) qui utilise des chélates de lanthanides dans la RMN des polyphénols, ce qui permet d'accentuer certains signaux. Ainsi, en mélangeant 1 mole de la substance K et 0,4 mole de perchlorate d'euporium, l'enregistrement du spectre RMN du complexe dans le DMSO permet de confirmer la position d'attache du glucose en 8 sur le squelette xanthonique.

Dans le spectre RMN de I acétylé, on relève: quatre groupes acétoxylye aliphatiques entre 2,00 et 2,10 et deux groupes acétoxylye aromatiques (singulets à 2,34 et 2,46 ppm) dont un seul à proximité de la fonction carbonyle. La position d'attache du glucose sur l'aglucone A est donc située en 1 ou 8. Par comparaison des spectres RMN de I et de A, enregistrés dans le DMSO, il est possible de préciser que le glucose est fixé en position 1. En effet, les protons H-C(6) et H-C(7) ne sont pratiquement pas déplacés (voir tableau no 21), alors que le proton H-C(2) du glucoside subit un déplacement de l'ordre de 0,40 δ par rapport à celui de l'aglucone. La substance I est donc le corymbiférine-1-O-glucoside: l'existence d'un tel O-glucoside, prévue par Ross dans un travail consacré à *Gentiana corymbifera* Kirk [23], est démontrée ici pour la première fois.

Seul un composé flavonique, F, a été identifié par spectrométrie RMN.

Dans le spectre du dérivé acétylé de F, on compte six protons aromatiques: 6,60 H-C(3), 6,90 H-C(8), un doublet à 7,30 ($J=9$ Hz) correspond à H-C(3') et H-C(5'), alors que le doublet dans un champ plus bas, à 7,90 correspond à H-C(2') et H-C(6') [37, p.65]. Les deux groupes acétoxylyes aromatiques à 2,35 et 2,51 sont attribués respectivement aux positions 4' et 5; ce dernier étant voisin de la fonction carbonyle a en effet un déplacement chimique plus élevé. En position 7 se trouve un groupe méthoxylye (singulet à 4,03), pas de OH libre prévu par le spectre UV. Quatre groupes acétoxylyes aliphatiques apparaissent, dont trois entre 2,00 et 2,10 et un à 1,80. Ce dernier signal est caractéristique du 2" d'un 6-C-glucoside flavonique [49]. Rappelons que par chauffage en milieu acide, F peut d'ailleurs se transformer selon Wesseley-Moser [44] en isomère 8-C-glucoside.

F correspond donc à la swertisine ou dihydroxy-5,4'-méthoxy-7-C- β -D-glucopyranosyl-6-flavone.

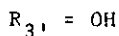
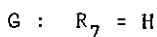
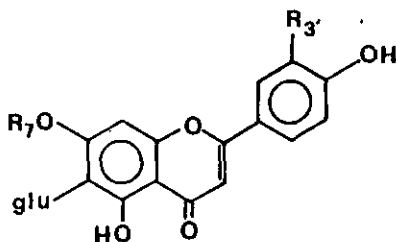
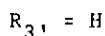
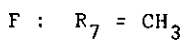


F acétylé

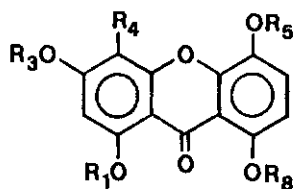
6.5. RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

A partir des extraits étherés, chloroformés et méthanoliques des feuilles de Gentiana campestris L. de Gentiana ramosa Hegetschw. et de Gentiana germanica Willd. nous avons isolé, par chromatographie préparative sur colonne de polyamide les 9 substances suivantes :

2 flavones :



7 xanthenes :



A : $R_1 = H$; $R_3 = H$; $R_4 = OCH_3$; $R_5 = CH_3$; $R_8 = H$

B : $R_1 = H$; $R_3 = CH_3$; $R_4 = H$; $R_5 = H$; $R_8 = H$

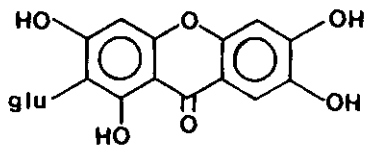
C : $R_1 = H$; $R_3 = H$; $R_4 = H$; $R_5 = H$; $R_8 = H$

I : $R_1 = \beta\text{-D-glucosyle}$; $R_3 = H$; $R_4 = OCH_3$; $R_5 = CH_3$; $R_8 = H$

K : $R_1 = H$; $R_3 = CH_3$; $R_4 = H$; $R_5 = H$; $R_8 = \beta\text{-D-glucosyle}$

L : $R_1 = H$; $R_3 = H$; $R_4 = H$; $R_5 = H$; $R_8 = \beta\text{-D-glucosyle}$

H:



La structure a été établie sur la base du comportement chromatographique, avant et après hydrolyse acide, des spectres UV, IR et des spectres RMN des dérivés acétylés.

Les glucosides xanthoniques I, K et L sont isolés pour la première fois.

I, glucoside en 1 de la corymbiférine avait été pressenti par Ross dans *Gentiana corymbifera* Kirk. [23], mais cependant jamais identifié. Quant aux glucosides en 8 de la bellidifoline K et de la desméthylbellidifoline L, ils sont nouveaux, mais les isomères possédant le glucose en 1 sont connus dans *Swertia* [50] [51] .

L'hydrolyse, suivie de méthylation des 3 glucosides xanthoniques montre 2 schémas de substitution, ce qui se retrouve par méthylation des aglucones. (voir Fig. No. 7).

Nous n'avons donc trouvé que des xanthones tétra substituées en 1, 3, 5, 8 et pentasubstituées en 1, 3, 4, 5, 8. D'autre part, il y a 1 C-glucoside xanthonique et 2 C-glucosides flavoniques.

Relevons que la substance D (voir Fig. No. 1) a été isolée et identifiée accessoirement : il s'agit de sucrose. .

Concernant les glucides libres, il faut signaler la présence du L-(+)-bornésitol dans *Gentiana campestris* et dans *Gentiana germanica* mise en évidence par Schilling (1975) [52].

6.6. DONNÉES ANALYTIQUES

Le tableau suivant résume les caractéristiques principales des substances identifiées.

Substances	R _F PA DC11-MeOH-AcOH-H ₂ O (90:5:5)	F	F dérivé acétylé
A	0.20	266-7°/MeOH	194°/EtOH
B	0.17	262°/MeOH	235°/EtOH
C	0.11	315°/MeOH	244°/EtOH
E	0.80	-	-
F	0.74	242-3°/H ₂ O	155-8°/EtOH
G	0.52	235-6°/MeOH	-
H	0.52	260°/MeOH	-
I	0.52	245°/MeOH	248°/EtOH
K	0.43	199°/MeOH	242°/EtOH
L	0.31	241°/MeOH	246°/EtOH

L'analyse élémentaire a été faite pour les nouveaux O-glucosides xanthoniques, soit sur le produit pur, soit sur le dérivé acétylé

et les résultats sont les suivants :

Substance	P.M.	Calculé		Trouvé	
		C	H	C	H
$C_{33}H_{32}O_{16}$ I acétylé	718,62	55,16%	4,77%	54,80%	5,03%
$C_{20}H_{20}O_{11} \cdot H_2O$ K	454,38	52,85%	4,88%	52,03%	4,59%
$C_{19}H_{18}O_{11} \cdot H_2O$ L	440,12	51,82%	4,54%	51,24%	4,66%
$C_{33}H_{32}O_{18}$ L acétylé	716,08	55,24%	4,42%	54,90%	4,13%

III. UTILISATION DES RÉSULTATS EN CHIMIOTAXONOMIE

7. PHYTOCHIMIE COMPARÉE DU GENRE GENTIANELLA MOENCH

Les espèces étudiées présentent une homogénéité biochimique remarquable quant au contenu des composés polyphénoliques. En effet, qualitativement, il n'y a pas de différence d'une espèce à l'autre. Les substances isolées de *G. campestris*, de *G. germanica* et de *G. ramosa* sont :

- 1) des aglucones xanthoniques : A corymbiférine, B bellidifoline, C desméthylbellidifoline.
- 2) des 0-glucosides xanthoniques : correspondant à ces aglucones, soit respectivement : I, glucoside en 1 de la corymbiférine, K, glucoside en 8 de la bellidifoline et L, glucoside en 8 de la desméthylbellidifoline.

Ces produits sont des xanthes oxygénosubstituées en 1,3,5, 8 et 1,3,4,5,8.

- 3) un C-glucoside xanthonique : H, la mangiférine
- 4) deux C-glucosides flavoniques : F et G, respectivement la swertisine et l'isoorientine
- 5) une substance E, encore non identifiée.

(voir formules p.13)

De plus, nos conditions d'analyse nous permettent d'apprécier également une homogénéité vis-à-vis d'un caractère négatif, par exemple l'absence de composés flavoniques : aglucones et O-glycosides, dans les espèces étudiées.

Le tableau suivant résume la distribution des substances identifiées dans les trois espèces étudiées. (Tableau No.22)

Tableau No. 22 : Distribution des substances identifiées au sein des espèces étudiées.

Substances	G. campestris	G. germanica	G. ramosa
A	+	+	+
B	+	+	+
C	+	+	+
E	+	+	+
F	+	+	+
G	+	+	+
H	+	+	+
I	+	+	+
K	+	+	+
L	+	+	+

Les espèces étudiées, comparées à *G. bellidifolia* et à *G. corymbifera*, contiennent des xanthones de substitutions oxygénées semblables, sauf en 1,3,4,7,8. Le tableau No.23 présente les xanthones du genre *Gentianella* avec leur schéma d'oxydation.

Tableau No. 23 :

Schéma d'oxydation des xanthones du genre *Gentianella*

Section	Espèce	schéma d'oxydation		
		1,3,5,8	1,3,4,5,8	1,3,4,7,8
Antarctophila	<i>G. bellidifolia</i> Hook.	+	+	+
"	<i>G. corymbifera</i> Kirk.		+	
Amarella	<i>G. campestris</i> L. ¹⁾	+	+	-
"	<i>G. ramosa</i> Hegetschw. ¹⁾	+	+	-
"	<i>G. germanica</i> Willd. ¹⁾	+	+	-

1) présence de mangiférine : C-glucoside xanthonique (voir p. 14)

8. DISCUSSION DES RÉSULTATS

La présence simultanée de C-glucosides flavoniques et xanthoniques avec des composés xanthoniques : aglucéones et O-glucosides substitués en 1,3,5,8 et 1,3,4,5,8 pourrait caractériser les espèces de la section Amarella.

8.1. DISTRIBUTION DES SUBSTANCES IDENTIFIÉES DANS LA FAMILLE DES GENTIANACEAE.

Étudions la répartition dans la famille des Gentianaceae des substances identifiées du genre *Gentianella*, afin d'examiner les liens qu'il y a lieu d'observer entre les genres..

La présence d'isoorientine, G, C-glucoside flavonique, dans les gentianes étudiées ici, n'offre pas un intérêt spécial, car cette substance est très répandue aussi bien dans le genre *Gentiana* [41] que dans le genre *Swertia* [50, 54] . Il faut retenir cependant que la C-glycosylation des composés flavoniques est considérée [55] comme un caractère primitif en phylogénie.

La swertisine : F, autre C-glucoside flavonique mise en évidence, est, en revanche inconnue dans le genre *Gentiana* alors qu'elle a été isolée de *S. japonica* [40] et de *S. purpurascens* [56] .

La mangiférine : H, C-glucoside xanthonique, est répandue aussi bien dans le genre *Gentiana* (*G. lutea*, *G. verna*, *G. cruciata*, *G. asclepiadea*, etc) [57] que dans le genre *Swertia* [50, 54] .

Si l'on veut différencier les genres *Gentiana* et *Gentianella*, il apparaît donc que l'isoorientine et la mangiférine ne serviront pas de critères, contrairement à la swertisine.

Quant aux composés xanthoniques, aglucones et O-glucosides, isolés des espèces du genre *Gentianella*, ils se retrouvent uniquement dans le genre *Swertia*.

A propos des O-glucosides xanthoniques, il est intéressant de remarquer que, dans *Swertia*, la glycosylation a lieu le plus souvent en position 1.

Le composé L, glucoside en 8 de la desméthylbellidifoline, ou isonorswertianoline, a été identifié pour la première fois par nos soins dans *G. campestris*, Dans différentes espèces du genre *Swertia* : *S. purpurascens* [58] , *S. racemosa* [59] , *S. randaiensis* [60] , la norswertianoline (glucoside en 1 de la desméthylbellidifoline) est présente.

Le composé K, glucoside en 8 de la bellidifoline ou isoswertianoline a été identifié en 1974 dans *G. campestris* (par nos soins) et par Ghosal dans *S. purpurascens* [58] ¹²⁾. Dans la même plante, Ghosal trouve aussi la swertianoline (glucoside en 1 de la bellidifoline), laquelle est présente aussi dans *S. japonica* [54] .

Le composé I, glucoside en 1 de la corymbiférine, pressenti en 1950 par Ross dans *G. corymbifera* [23] a été isolé pour la première fois dans *G. campestris* (1975). Le glucose est en position 1. Il s'agit d'un des rares O-glucosides pentasubstitués rencontrés à ce jour.

Le tableau No. 24 résume la distribution des substances identifiées dans la famille des *Gentianaceae*.

Nous laissons de côté la mangiférine et l'isoorientine, substances trop généralement répandues dans les végétaux.

12)1976. trouvé dans *S. perennis* [60] .

Tableau No. 24 : Distribution des substances identifiées dans la famille des Gentianaceae.

Substances	Espèces	Réf.		
A	<i>G. corymbifera</i> *	1950	Ross	[23]
	<i>G. bellidifolia</i>	1965	Markham	[26]
	<i>S. lawii</i>	1975	Ghosal	[61]
B	<i>G. bellidifolia</i> *	1964	Markham	[24]
	<i>S. japonica</i>	1969	Komatsu	[40]
	<i>S. chirata</i>	1973	Ghosal	[48]
	<i>S. purpurascens</i>	1975	Ghosal	[56]
C	<i>G. bellidifolia</i> *	1964	Markham	[24]
	<i>S. japonica</i>	1969	Komatsu	[62]
	<i>S. chirata</i>	1973	Ghosal	[48]
	<i>S. purpurascens</i>	1975	Ghosal	[56]
	<i>S. lawii</i>	1975	Ghosal	[61]
F	<i>S. japonica</i> *	1967	Komatsu	[40]
	<i>S. purpurascens</i>	1975	Ghosal	[56]
I	<i>G. campestris</i> *	1975	Kaldas	[64]
K	<i>G. campestris</i> *	1974	Kaldas	[63]
	<i>S. purpurascens</i>	1974	Ghosal	[58]
	<i>S. perennis</i>	1976	Hostettmann	[60]
L	<i>G. campestris</i> *	1974	Kaldas	[63]

* isolé pour la première fois

8.2. RÉPARTITION DES COMPOSÉS XANTHONIQUES DES GENTIANACEAE.

En considérant (selon Jossang 1972) [65] que la substitution des composés xanthoniques peut être considérée comme un caractère de distinction des genres, nous avons rassemblé dans le tableau No.25 les renseignements concernant les xanthones de quelques genres des Gentianaceae. Dans la mesure du possible, nous comparons des analyses faites sur les mêmes organes de la plante. En ce qui concerne les genres *Gentiana* et *Gentianella*, le tableau No.25 reproduit des résultats obtenus, pour la plupart, à l'Institut de chimie de Neuchâtel, il en est de même de l'espèce *S. perennis*. Pour le reste, nous nous référons à la bibliographie.

Il ressort de ce tableau les faits suivants :

- le genre *Gentiana* est caractérisé par des xanthones tri- ou tétrasubstituées en 1,3,7 ou 1,3,7,8.
- le genre *Swertia* contient des xanthones tétrasubstituées en 1,3,5,8 et 1,3,7,8; la pentasubstitution ajoute à ces schémas la position 4.
- chez *Gentianella*, nous notons l'absence de la tétrasubstitution en 1,3,7,8, alors qu'elle existe en 1,3,5,8 et que chez *G. bellidifolia*, la pentasubstitution est en 1,3,4,5,8 et 1,3,4,7,8.
- le genre *Halenia* quant à lui, présente des tétra ou pentasubstitutions lorsqu'on utilise la position 2.

D'après les schémas de substitution des composés xanthoniques, il apparaît d'emblée que les genres *Gentiana* et *Gentianella* sont différents. Ainsi, les arguments de la chimiotaxonomie complètent les critères morphologiques appuyant la séparation des deux genres.

D'autre part, nous remarquons une nette ressemblance entre les genres *Swertia* et *Gentianella*.

Tableau No. 25 : Xanthones des Gentianaceae

Genre	Espèce	Organe étudié	Schéma d'oxydation	Présence de mangiférine	Réf.	
Gentiana	alpina	feuilles	1,3,7,8		[66]	
	angustifolia	feuilles	1,3,7,8		[66]	
	bavarica	feuilles	1,3,7,8	-	[41]	
	ciliata	feuilles	1,3,7,8	-	[67]	
	clusii	feuilles	1,3,7,8		[66]	
	kochiana	plante entière	1,3,7,8		[66,68]	
	lutea	plante entière	1,3,7	+	[41]	
	verna	feuilles	1,3,7,8	+	[69]	
	Gentianella	bellidifolia	racines	1,3,5,8		[24,26]
		campestris	feuilles	1,3,5,8	+	[64,63]
corymbifera		racines	1,3,4,5,8		[23]	
germanica		feuilles	1,3,5,8	+		
ramosa		feuilles	1,3,4,5,8	+		
Halenia	asclepiadea	plante entière	1,2,3,5		[70]	
			1,2,3,4,5			
			1,2,3,4,7			

(Tableau No. 25 suite)

Swertia	bimaculata	plante entière	1,3,5,8	1,3,7,8	1,2,3,4,5 1,2,3,4,7	-	[71]
	chirata	plante entière	1,3,5,8 1,3,4,5 1,2,3,7	1,3,7,8	1,2,3,4,5 1,2,3,4,7 1,3,4,5,8	+	[46]
	decussata	plante entière		1,3,7,8			[73] [59,46]
	dilatata	plante entière		1,3,7,8		+	[59]
	gracilescens	plante entière		1,3,7,8		+	[59]
	japonica	plante entière	1,3,5,8	1,3,7,8		+	[62,50]
	lawii	plante entière	1,3,5,8	1,3,7,8	1,3,4,7,8		[61]
	nervosa	plante entière		1,3,7,8			[59]
	perennis	feuilles	1,3,5,8	1,3,7,8			[60]
	pseudochinensis	plante entière	1,3,5,8	1,3,7,8		-	[50]
	purpurascens	plante entière	1,3,5,8	1,3,7,8	1,3,4,5,8 1,3,4,7,8		[58,56]
	racemosa	plante entière	1,3,5,8	1,3,7,8			[59]
	randaensis	plante entière	1,3,5,8	1,3,7,8		+	[50]
	swertopsis	plante entière	1,3,5,8	1,3,7,8		+	[50]
	tosaensis	plante entière	1,3,5,8	1,3,7,8		+	[50]

9. CONCLUSIONS

Il faudrait étudier encore d'autres espèces de la section Amarella pour confirmer si cette section peut apparaître chimiquement comme un taxon défini. Néanmoins, nous apportons aux problèmes posés les réponses suivantes :

- 1) L'homogénéité que montre sur le plan caryologique le genre *Gentianella* va de pair avec l'homogénéité du spectre des polyphénols.
- 2) Sur la base de l'étude des schémas de substitution des composés xanthoniques, nous admettons que le genre *Gentianella* est plus étroitement apparenté à *Swertia* qu'à *Gentiana* ou *Halenia*. La swertisine (C-glucoside flavonique) renforce cette parenté par sa présence à la fois dans *Gentianella* et dans *Swertia*.

IV. PARTIE EXPÉRIMENTALE

10. TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES

10.1. CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE

Couches minces de polyamide

Les meilleures séparations ont été obtenues avec des plaques de polyamide préparées par nous-même, à l'aide de l'étendeur DESAGA. Pour une série de 5 plaques de verre, de dimensions 20 x 20 cm, nous préparons une suspensions de 8 g de polyamide dans 45 ml d'éthanol.

Type de polyamide utilisée:

Macherey-Nagel DC₁₁, év. DC_{11Ac}, DC₆

Systèmes de solvants utilisés pour l'analyse des polyphénols: (v/v):

méthanol-eau (9:1); (8:2); (6:4)

méthanol-acide acétique-eau (90:5:5)

toluène-méthanol-acide acétique (45:32:16)

Couches minces de cellulose

Nous utilisons les plaques du commerce (Merck), cellulose F₅₀, épaisseur de la couche 0,10 mm. Les séparations sont bonne principalement pour les glucosides xanthoniques et les C-glucosides flavoniques.

Systemes de solvants utilisés :

acide acétique 5%, 10%, 15%, 30%

n-butanol-acide acétique-eau (4:1:5)

isobutanol-acide acétique-eau (10:4:7)

Couches minces de gel de silice

Nous utilisons des plaques du commerce (Merck) de gel de silice 60 F₂₅₄ sur aluminium, épaisseur de la couche 0,2 mm.

Les séparations sont très bonnes pour les aglucones xanthoniques avec les solvants d'élution suivants :

chloroforme-toluène (5:2)

benzène-acétate d'éthyle (3:1) ou (4:1)

acétate d'éthyle-méthanol (5:1)

toluène-acétate d'éthyle-éthanol (7:3:1)

Pour les glucosides polyphénoliques, nous employons les solvants :

chloroforme-méthanol (7:3)

chloroforme-acétone-eau (20:80:5)

acétate d'éthyle-méthanol-eau (100:16,5:7) ou
(10,5:2:1,5)

Couches minces pour analyse des sucres (après hydrolyse acide)

Les solutions aqueuses de sucres, obtenues après hydrolyse acide des O-glucosides polyphénoliques, sont analysées sur couches minces avec succès dans les conditions suivantes :

Support : gel de silice 60 F₂₅₄, Merck ou
cellulose F₅₀, Merck

Système de solvants :

n-butanol-acide acétique-eau (4:1:5)

acétate d'éthyle-méthanol-eau-acide acétique(65:15:15:20)

n-butanol-pyridine-eau (6:4:3)

Révéléateur : phtalate d'anisidine (solution 0,1 M de p-anisidine et d'acide phtalique dans l'éthanol 96%). Coloration en vert des hexoses et en rouge-brun des pentoses.

10.2. CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHES MINCES À L'ÉCHELLE PRÉPARATIVE.

Nous utilisons des plaques du commerce (Merck) 60 F₂₅₄, 20 X 20, épaisseur 2 mm.

La solution à analyser, préparée à 5% dans MeOH, et prélevée avec une seringue de 0,10 ml, est déposée sur la plaque à l'aide de l'appareil Camag, (chromatocharger). La plaque vierge a été tout d'abord lavée avec du méthanol. Le développement est réalisé une première fois avec le système de solvants : acétate d'éthyle-méthanol-eau (100:16,5:7), puis une seconde fois avec le mélange moins polaire : acétate d'éthyle-méthanol (100:16,5). La bande intéressante est alors prélevée et désorbée avec du méthanol par extraction au Soxhlet pendant 24 h. Le mélange obtenu est concentré et ensuite purifié par filtration sur gel de séphadex LH 20.

10.3. CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE.

Nous avons utilisé des colonnes en verre de diamètre 2, 4 et 6,5 cm et de hauteur utile variant de 25 à 120 cm. Elles sont remplies à

partir d'une suspension d'un support abandonné 24 h. au moins dans le solvant d'éluion. Les colonnes sont munies d'un dispositif permettant une vitesse d'écoulement variable à pression constante. Les fractions sont recueillies par un collecteur automatique réglé à volume constant.

Avant utilisation, toutes les colonnes sont lavées avec le solvant d'éluion jusqu'à disparition de toutes traces de résidu solide dans les eaux de lavage.

L'introduction du mélange à séparer se fait à partir d'une solution dans l'éluant. Les quantités introduites dépendent de l'adsorbant et des dimensions de la colonne. Le débit varie de 15-20 ml/h pour les plus petites colonnes à 40 ml/h pour la plus grande colonne.

A titre d'exemples, nous donnons ci-après les conditions maximums réalisées dans le cas (No. 1) d'une séparation d'extraits méthanoliques et (No.2) d'une séparation d'extraits éthers ou chloroformés :

Conditions	No. 1	No. 2
dimensions de la colonne	6,5 X 120 cm	4 X 60 cm
adsorbant	PA SC 6 MN	PA SC 6 MN
éluant	MeOH 50%-90%	MeOH-AcOH-H ₂ O (90:5:5)
masse à séparer (sèche)	13-15 g	1,3 - 3 g
vitesse d'éluion	40 ml/h	20 ml/h

D'autres systèmes ont été utilisés également :

pour les aglucones : PA SC 6 MN : toluène-MeOH-AcOH (45:32:16)

gel de silice 60 Merck : toluène-acétate d'éthyle (4:1)

et pour les glucosides :

cellulose microcristalline Merck : AcOH 5%

Séphadex LH 20 : MeOH, év. H₂O.

Pour purifier les produits d'hydrolyse, de méthylation, ou simplement des fractions obtenues d'une première analyse chromatographique, la filtration sur gel de séphadex LH 20 est très appréciée avec comme éluant le méthanol.

Tous les solvants utilisés en chromatographie sont fraîchement distillés.

11. TECHNIQUE D'ANALYSE

11.1. HYDROLYSE ACIDE

La réaction se fait généralement sur un produit pur, elle peut être réalisée cependant sur un extrait brut.

Un échantillon de la substance à traiter est dissous dans MeOH, additionné de quelques ml de HCl 2N et chauffé à reflux de 2 à 4 h. La solution est alors extraite à l'éther puis au butanol. Ces extraits, concentrés et purifiés sont analysés par CCM et par UV. La phase aqueuse est utilisée pour la recherche des sucres.

11.2. HYDROLYSE ENZYMATIQUE

Plus de la moitié des O-glucosides flavoniques (et xanthoniques) sont des β -D-glucosides; il est donc possible de les hydrolyser

par la β -D-glucosidase. L'hydrolyse enzymatique est limitée par la pureté de l'enzyme.

Dissoudre 1 mg du glucoside dans 2 ml de solution tampon de pH 5 (solution aqueuse 0,5 M de NaOAc ajustée à pH 5 avec de l'acide acétique) et ajouter environ 1 mg (généralement 1 pointe de spatule de l'enzyme en poudre) de β -glucosidase (Sigma Corp. St-Louis. Mo). Le mélange est abandonné 24 h. à 37°. Ensuite concentrer la solution sous vide, purifier sur LH 20 et analyser par CCM pour détecter l'aglucone.

11.3. MÉTHYLATION

La préparation des esters méthyliques se fait par traitement d'un polyphénol en milieu méthanolique avec une solution étherée de diazométhane. Ce réactif est un gaz jaune toxique et explosif, à manier avec précautions, mais qu'il est possible de conserver en petites quantités quelques heures en solution étherée. Il a été préparé à partir de la N-nitroso -4-toluène-sulfométhylamide (Fluka purum), selon les indications de DE BOER et BACKER [72] : 3-50 mg de substance, en solution dans 5-10 ml de méthanol absolu, sont traités avec un excès de solution étherée de diazométhane (10 fois la quantité théorique requise), puis abandonnés à 4° C environ dans l'armoire frigorifique pendant 48 heures, puis 24 h. à température ambiante. On contrôle par CCM si la méthylation est complète : spot de Rf très élevé bleu sous lumière UV (PA DC₁₁ (9:1)). Si nécessaire, le mélange réactionnel est traité une nouvelle fois avec un excès de diazométhane (5 fois la quantité théorique requise).

Après évaporation du solvant, le résidu est purifié par filtration sur gel de séphadex LH 20 avec le méthanol comme éluant.

11.4. ACÉTYLATION

Les dérivés acétylés, pour l'enregistrement des spectres RMN, sont préparés à température ambiante.

Dissoudre 30 mg de substance (au moins) dans un mélange de 5 ml d'anhydride acétique fraîchement distillé et de 1 ml de pyridine anhydre (distillée et conservée sur KOH). Agiter jusqu'à dissolution complète, abandonner 24 heures à température ambiante. Évaporer ensuite le solvant jusqu'à obtention d'un liquide visqueux, sous vide à 50° C. Traiter à l'eau froide et à la glace pour précipiter l'ester. Recristalliser le produit obtenu dans l'éthanol.

Pour les C-glucosides (ex. swertisine), ajouter au mélange réactionnel, une pointe de spatule d'acétate de sodium anhydre.

Pour certains aglucones, il est nécessaire de chauffer le mélange réactionnel à reflux pendant deux heures.

11.5. SPECTROSCOPIE UV

Les spectres UV sont enregistrés sur un appareil UNICAM SP 800, en solution dans le méthanol. La concentration des solutions est ajustée de façon à obtenir une absorbance maximale comprise entre 0,8 et 1,2. Pour chaque substance, le spectre a été examiné en présence des réactifs chimiques habituels, selon les indications de MABRY, MARKHAM et THOMAS [34] .

11.6. SPECTROSCOPIE IR

Les spectres IR sont enregistrés à partir de pastilles de KBr contenant 0,3 à 0,5% de substance cristalline, sur un appareil PERKIN-ELMER, modèle 521.

11.7. RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE

Les spectres RMN sont enregistrés sur un appareil VARIAN A-60 à 37° C, dans le deutérochloroforme pour les aglycones et les dérivés acétylés, et le deutérodiméthylsulfoxyde pour les glucosides. Le relevé des spectres à 100 MHz a été fait par la maison Hoffmann-La Roche & Co. à Bâle.

La présente thèse a fait l'objet de 2 publications:

Helv. 57, 2557 (1974) [63]

Helv. 58, 2189 (1975) [64]

B I B L I O G R A P H I E

- [1] Tournefort, J.P., *Int. Rei Herb.* 80. t. 40 (1700)
- [2] Gunther, R.T., *The Greek Herbal of Dioscorides.* Oxford (1934)
- [3] Rupprius, H.B., *Fl. Jen.* ed 2.17 (1726); ed. Hall 21.(1745)
- [4] Moench, C., *Meth. Pl.* 402 (1794)
- [5] Borckhausen, M.B., in *Roemer's Archiv für Botanik* 1:23-32 (1796)
- [6] Kusnezov "Die Natürlichen Pflanzenfamilien" Ed. Engler, A. Prantl, K., IV Teil (2) pp. 80-86, Leipzig (1895)
- [7] Schustler, Fr., *Vestnik Sjezdu Cesko Bot. v. Praze*, 32-34 (1923)
- [8] Löve, D., *Hereditas* 39, 225-235 (1935) : "Cytotaxonomical" Remarks on the Gentianaceae.
- [9] Gillett, J.M., *Ann. Missouri Bot. Gard.* 44 (3), 195-269 (1957) : "A Revision of the North American Species of *Gentianella* Moench"
- [10] Toyokuni, H., *Bot. Mag. Tokyo* 74 198 (1961) "Séparation de *Comastoma*, genre nouveau, d'avec *Gentianella*".
Toyokuni, H., Further remarks to the genus *Comastoma*. *Acta Phytotax. Geobot.* 20 : 136-138 (1962).
Toyokuni, H., *Conspectus Gentianacearum Japonicum.* *Journ. Fac. Scie Hokkaidô Univ. Ser. V*, 7 (4) : 137-259 (1963)
Toyokuni, H., *Systema gentianorum novissimum.* *Symbolae Asahikawenses I* : 147-158 (1965).
- [11] Iltis, H.H., *Sida* II (2), 129-154 (1965) "The Genus *Gentianopsis* (Gentianaceae) : Transfers and phytogeographic Comments".
- [12] Hegnauer, R., "Chemotaxonomie des Pflanzen" Vol. IV pp. 176-192 éd. Birkhäuser Basel, Stuttgart (1966).
- [13] Hylander, N., *Nomenclatorische und Systematische Studien über nordische Gefässpflanzen.* Uppsala. Universität. 7, p.1-337 (1945).
- [14] Lindsey, *Americ. J. of Bot.* 27 (1940).
- [15] Nilsson, O. *Acta Univ. Upsaliensis* 185-, 1-6 (1971)
- [16] Wettstein, R.V., in *Denkschr. K. Akad. Wiss. Wien, math.-nat. Cl.* 64 : 1-73 (1896).
- [17] Favarger, C., *Bull. Soc. Bot. Suisse* 59 : 62-86 (1949)

- [17] Favarger, C. Bull. Soc. Bot. Suisse 62 : 244-257 (1952)
Favarger, C. Bull. Soc. Bot. Suisse 88 : 5-60 (1965)
- [18] Vasudevan, K.N., Bull. Soc. Bot. Suisse 85 : 57-84 (1975)
- [19] Gill, *Experientia* (1972).
- [20] Skalinska, M., Bull. Acad.Sc. et Lettres, Sér. B: Sciences nat. (1), p. 119-137. (1952).
- [21] Harborne, J.B., "Comparative Biochemistry of the Flavonoïds", Academic Press. London (1967).
- [22] Hegnauer, R., "Chemotaxonomie der Pflanzen" Vol. 1V, p. 188, éd. Birhäuser, Basel (1966).
- [23] Ross, D.J., New Zeal. J. Sci. Technol. 32B, 39 (1950).
- [24] Markham, K.R., *Tetrahedron* 20, 991 (1964).
- [25] Markham, K.R., *Tetrahedron* 21, 1449 (1965).
- [26] Markham, K.R., *Tetrahedron* 21, 3687 (1965).
- [27] Luon Minh Duc, Thèse Université de Neuchâtel, (en préparation), (1977).
- [28] Geissmann, T.A., p. 2, in "The Flavonoïds" ed. by Harborne, J.B., Mabry, T. and Mabry H., London (1975).
- [29] Bellmann, G., et Jacot-Guillarmod, A., *Helv.* 56. 284 (1973).
- [30] Hostettmann, K., Bellmann, G., Tabacchi, R., Jacot-Guillarmod, A., *Helv.* 56, 3050 (1973).
- [31] Harborne, J.B., "Phytochemical Methods" London (1973).
- [32] Wagner, H., (1957) dans cours de Chromatographie, Hostettmann, K., Univ. Neuchâtel, 1974-75.
- [33] Hostettmann, K., Jacot-Guillarmod, A., Chari, V.M., *Helv.* 59, 2592 (1976).
- [34] Mabry, T.J., Markham, K.R., Thomas, M.B., "The Systematic Identification of Flavonoïds" Springer, New-York (1970).
- [35] Hörhammer, L., Hänsel, R., *Arch. Pharmaz.* 286, 425 (1953).
- [36] Porter, L.J., Markham, K.R., *J. Chem. Soc. (C)* 344, (1970).
et Markham, K.R., Mabry, T.J., *Phytochemistry* 7, 1197 (1968).
- [37] "The Flavonoïds" Ed. by Harborne, J.B., Mabry, T.J., Mabry, H. London (1975).
- [38] Mears, J., Mabry, T.J., in "The Flavonoïds" p.58 (1975).

- [39] Harborne, J.B., in "Methods of Polyphenol Chemistry", ed. Pridham, J.B., p. 13-36. Pergamon Press Oxford (1963).
- [40] Komatsu, M., Tomimori, T., Ito, M., Chem. Pharm. Bull. 15 (3), 263-269 (1967).
- [41] Hostettmann, K., Thèse Université de Neuchâtel (1973).
- [42] de Barros Correa, D., Fonseca, L.G., Fonseca, Silva, E., Gottlieb O.R., Gonçalves, S.J., Phytochemistry, 9, 447 (1970).
- [43] Waiss, A.C., Lundin, R.E., Stern, D.J., Tetrahedron Letters 513 (1964) et Mabry, T.J., Kagan, J., Rösler, H., Phytochemistry 4, 177 (1965).
- [44] Wessely, F., Moser, G.H., Mh Chemie 56, 97 (1930).
- [45] Hillis, W.E., Horn, D.H.S., Aust. J. Chem. 18, 531, (1965).
- [46] Rivaille, P., Massicot, J., Guyot, M., Plouvier, V., Phytochemistry, 8, 1533 (1969).
- [47] Massicot, J., Marthe, J., Heitz, J.P., Bull. Soc. Chim. France 2712. (1963).
- [48] Ghosal, S., Sharma, P.V., Chauduri, R.K., Bhattacharya, S.K., J. Pharm. Sc. 62, 926 (1973).
- [49] Gentili, B., Horowitz, R.M., J. Org. Chem. 33, 1571 (1968).
- [50] Tomimori, T., Komatsu, M., Yakugaku Zasshi, 89, 1276 (1969).
- [51] Tomimori, T., Yoshizaki, M., Nanba, T., Yakugaku Zasshi 93, 442 (1973).
- [52] Schilling, N., Phytochemistry 15, 824 (1976).
- [53] Hostettmann, K., Miura, I., Helv. 60, 262 (1977).
- [54] Tomimori, T., Komatsu, M., Yakugaku Zasshi 89, (3) 410-417 (1969).
- [55] Harborne, J.B., in Swain, T., Comp. Phytoch. p. 292 (1966) et Harborne, J.B., Comp. Biochem. of Flav. p. 313 (1967).
- [56] Ghosal, S., Sharma, P.V., Chaudhuri, R.K., Bhattacharya, S.K., J. Pharm. Sc. 64, 80 (1975).
- [57] Goetz, M., Thèse Université de Neuchâtel (en préparation) (1977).
- [58] Ghosal, S., Sharma, P.V., Chauduri, R.K., J.Pharm.Sc. 63, 1286 (1971).
- [59] Tomimori, T., Yoshizaki, M., Namba, T., Yakugaku Zasshi 94 (5), 647-51 (1974).
- [60] Hostettmann, K., Jacot-Guillarmod, A., Helv. 59, 1584 (1976).

- [61] Ghosal, S., et al. *Phytochemistry* 14, 1393-6 (1975).
- [62] Komatsu, M., Tomimori, T., Mikuriya, N., *Chem. Pharm. Bull.* 17 (1), 155-162 (1969).
- [63] Kaldas, M., Hostettmann, K., Jacot-Guillarmod, A., *Helv.* 57, 2557 (1974).
- [64] Kaldas, M., Hostettmann, K., Jacot-Guillarmod, A., *Helv.* 58, 2188 (1975).
- [65] Jossang, P., Carbonnier, J., Mohlo, D., *Trav. Lab. Jaysinia*, 4, 143-167 (1972).
- [66] Carbonnier, J., *Trav. Lab. Jaysinia* 4, 169-194 (1972).
- [67] Goetz, M., résultats non publiés. Neuchâtel (1976).
- [68] Guyot, C.R., *Acad. Sc. Paris* 267, 423-5 (1968).
- [69] Hostettmann, K., Jacot-Guillarmod, A., *Helv.* 57, 1155 (1974).
- [70] Stout, G.H., Fries, J.L., *Phytochemistry* 9 235-6 (1970).
- [71] Ghosal, S., Sharma, P.V., Chauduri, R.K., *Phytochemistry* 14. 2671-5 (1975).
- [72] De Boer, Th.J., Backer, H.J. "Organic Syntheses", IV, p. 250, Wiley Ed. New-York (1963).
- [73] Lebreton, P., Dangy-Caye, M.P., *Plantes médicinales et phytothérapie*, Tome VII, No 2, p. 87-94 (1973).

**280. Contribution à la phytochimie du genre *Gentiana* IX¹⁾
 Etude de composés flavoniques et xanthoniques dans les feuilles
 de *Gentiana Campestris* L. 1ère communication**

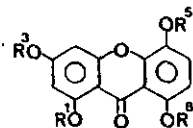
par Maryse Kaldas, Kurt Hostettmann et André Jacot-Guillarmod

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

(20. XI. 74)

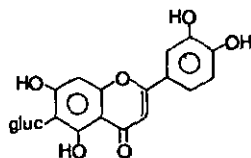
Summary. Two new xanthone-O-glycosides, the 1,3,5-trihydroxy-xanthone-8-O- β -D-glucopyranoside (3), the 1,5-dihydroxy-3-methoxyxanthone-8-O- β -D-glucopyranoside (4), have been isolated from the leaves of *Gentiana campestris* L. by means of column chromatography on polyamid. Two known xanthonones (1, 2) which are respectively the aglycones of 3 and 4 and a flavone: iso-orientine (5) have also been isolated and identified.

I. Introduction. - *Gentiana campestris* L. est l'une des nombreuses espèces de la section *Amarella*. Bien qu'appartenant au genre *Gentiana*, cette section est communément classée, ainsi qu'à huit autres, dans le sous-genre *Gentianella*.



1-4. 6.7

- 1: R¹ = R³ = R⁵ = R⁸ = H
 2: R¹ = R³ = R⁵ = H
 R⁸ = CH₃
 3: R¹ = R³ = R⁵ = H
 R⁸ = β -D-glucosyle
 4: R¹ = R³ = H, R⁵ = CH₃
 R⁸ = β -D-glucosyle



5

- 5: iso-orientine
 6: R¹ = R² = R⁴ = CH₃
 R⁸ = H
 7: R¹ = R² = R⁴ = R⁸ = CH₃

¹⁾ Partie VIII, v. Phytochemistry, sous presse.

Les études phytochimiques de ce sous-genre n'ont fait l'objet que d'un nombre restreint de mémoires, lesquels ont trait principalement à *Gentiana bellidifolia* Hook [1], *Gentiana corymbifera* Kirk [2] et *Gentiana ciliata* L. [3]. Dans la première espèce, des aglycones xanthoniques tétra-OR-substitués en 1,3,5,8 et penta-OR-substitués en 1,3,4,7,8 et en 1,3,4,5,8 (R = H, CH₃) ont été mis en évidence. Ce dernier schéma de substitution se retrouve dans *Gentiana corymbifera* Kirk, ce qui n'est pas étonnant en raison de l'appartenance de ces deux espèces à la section *Antarctophila*. En revanche dans *Gentiana ciliata* L. (section *Crossopetalum*) seules des xanthones tétra-OR-substituées en 1,3,7,8 ont été isolées.

Le présent travail a trait à la détermination des structures de quatre xanthones 1-4, dont deux, 3 et 4, sont décrites pour la première fois et d'une flavone 5, isolées à partir de feuilles de *Gentiana campestris* L. L'étude d'autres substances analogues est en cours et fera l'objet d'une communication ultérieure.

2. Résultats. - 2.1. *Isolement des composés.* Les feuilles séchées ont été extraites à chaud par des solvants de polarité croissante: ligroïne, éther, chloroforme, acétate d'éthyle, méthanol. L'extrait étheré, chromatographié sur colonne de polyamide (élution MeOH/H₂O/AcOH 90:5:5), fournit les composés 1 et 2 qui sont encore purifiés par filtration sur gel de Sephadex LH 20 (élution MeOH). Les glucosides 3, 4 ainsi que l'isoorientine 5 ont été isolés à partir de l'extrait méthanolique chromatographié sur colonne de polyamide avec comme éluant, un mélange MeOH/H₂O dont la teneur en MeOH est augmentée graduellement. MeOH à 70% donne 5, MeOH à 90% permet l'obtention de 3 et 4.

2.2. *Détermination des structures.* - *Composé 1.* Le spectre UV. est caractéristique d'une xanthone tétrasubstituée en 1,3, 5,8 qui possède au moins deux groupes hydroxyles libres dont un en position 3 et un en 1 ou 8 [4]. La valeur R_f particulièrement faible (CCM polyamide MNDC₁₁, MeOH/H₂O 9:1, R_f = 0,04) indique que 1 ne peut être que tétrahydroxylée. Le F. et les spectres UV. sont identiques à ceux de la tétrahydroxy-1,3,5,8-xanthone [5]. Le spectres RMN.^a) du dérivé acétylé montre la présence de quatre groupes acétoxyles aromatiques (singulets à 2,33 et 2,42) et de

Tableau 1. Spectres UV. (max. en nm, solvant = MeOH)

Composé	Solvant pur	Solvant additionné de:		
		AlCl ₃	NaOAc	NaOMe
1	254, 278	263, 290	250, 272	
	335, 390 sh	328 sh, 372	360	
2	255, 279	265, 291	255, 279	267, 285 sh
	334, 390 sh	325, 372	334, 390 sh	368
3	252, 275	263 sh, 267, 283	248, 266	233, 258
	328	324 sh, 362	288 sh, 354	297, 358
4	254, 276	267, 284	254, 277 sh	248, 254
	325	324, 362	288, 324	286, 344
6	238, 248	243 sh, 257	238, 248	
	276, 318	289, 348	276, 318	
7	238, 271	238, 271	238, 271	238, 271
	307, 350 sh	307, 350 sh	307, 350 sh	307, 350 sh

^a) Enregistré dans CDCl₃ (δ en ppm par rapport au TMS pris comme référence interne).

quatre protons aromatiques formant des spectres *AB* à 6,82 et 7,22 ($J = 2,5$ Hz) et à 6,93 et 7,458 ($J = 9,5$ Hz). Les valeurs obtenues diffèrent cependant de celles de la tétraacétoxy-1,3,5,8-xanthone données par *Komatsu et al.* [5]. Etant donné la très faible solubilité de ce dérivé acétylé dans CDCl_3 , il est possible que les auteurs cités aient employé un autre solvant pour l'enregistrement du spectre. De plus, la méthylation par un excès de diazométhane conduit à 7: tétraméthoxy-1,3,5,8-xanthone. Le composé 1 est donc la tétrahydroxy-1,3,5,8-xanthone qui a été identifiée pour la première fois dans *Gentiana bellidifolia* Hook [1] et par la suite dans plusieurs espèces du genre *Swertia* [6] [7].

Composé 2. Le spectre UV. indique qu'il s'agit d'une xanthone substituée en 1,3,5,8 ayant un groupe hydroxyle libre en position 1 ou 8. Le spectre RMN. du dérivé acétylé montre la présence d'un groupe méthoxyle et de trois groupes acétoxyles (voir tab. 2).

Tableau 2. Spectres RMN^{a)} (enregistrés dans CDCl_3 , δ en ppm par rapport au TMS pris comme référence interne)

Composé	Protons aromatiques		H (6) et 11 (7) $J = 9,5 \pm 0,2$ Hz	-OCH ₃	-OCOCH ₃
	H (2) et H (4) $J = 2,5 \pm 0,2$ Hz				
1 acétylé	6,82 7,22	6,93 7,45			2,33 (3H) 2,42 (9H)
2 acétylé	6,57 6,72	6,93 7,42		3,92 (3H)	2,41 (9H)
3 acétylé	6,78 7,15	6,96 7,31			2,30 (3H) 2,38 (3H) 2,48 (3H)
4 acétylé	6,53 6,66	6,95 7,30		3,87 (3H)	2,40 (3H) 2,49 (3H)
6 acétylé	6,33 6,56	6,85 7,13		3,88 (3H) 3,95 (3H) 3,98 (3H)	2,45 (3H)
7	6,32 6,54	6,65 7,08		3,87 (3H) 3,93 (9H)	

Comme le spectre UV. ne subit aucune modification par l'addition de NaOAc, le groupe méthoxyle ne peut être fixé qu'en position 3. Le composé 2 correspond donc à la trihydroxy-1,5,8-méthoxy-3-xanthone. Les spectres UV. et RMN. sont conformes aux données de la littérature [1] [5]. Enfin, la méthylation par un excès de diazométhane conduit à 7. Rappelons que 2 a été isolée pour la première fois à partir des racines de *Gentiana bellidifolia* Hook par *Markham* [1] qui lui a attribué le nom de bellidifoline.

Composé 3. L'hydrolyse acide de 3 fournit la tétrahydroxy-1,3,5,8-xanthone (1), ainsi que du glucose. Dans le spectre RMN. du dérivé acétylé, on compte quatre protons aromatiques formant des spectres *AB* à 6,78 et 7,15 ($J = 2,5$ Hz) et à 6,96 et 7,31 ($J = 9,5$ Hz), quatre groupes acétoxyles aliphatiques entre 2,00 et 2,10 δ , trois groupes acétoxyles aromatiques à 2,30, 2,38 et 2,48, dont un seul en α de la fonction carbonyle [8]. Par conséquent, le sucre ne peut être attaché au squelette

^{a)} Pour les composés 3 et 4 la partie glucosidique n'est pas reportée dans ce tableau.

xanthonique qu'en position 1 ou 8. La méthylation des groupes hydroxyles phénoliques libres par un excès de diazométhane, suivie de l'hydrolyse acide, fournit un composé (6), lequel ne peut correspondre qu'à l'hydroxy-1-triméthoxy-3,5,8-xanthonone ou à l'hydroxy-8-triméthoxy-1,3,5-xanthonone. Relevons que les spectres UV. diffèrent nettement de ceux du premier composé [7]; en revanche, ils sont semblables à ceux du second [4]. Une preuve supplémentaire est apportée par la comparaison du spectre RMN. de 6 acétylé avec celui de la tétraméthoxy-1,3,5,8-xanthonone (7): les protons en position 2 et 4 ne sont pas déplacés [9] (voir tab. 2). Le composé 3 est donc le trihydroxy-1,3,5-xanthonone-8-O-glucoside ou desméthylbellidifoline-8-O-glucoside. Mentionnons qu'un isomère, la glucosyl-1-desméthylbellidifoline a été isolée par Tomimori et al [10] dans différentes espèces du genre *Swertia*.

Composé 4. L'hydrolyse acide de 4 conduit au glucose et à la trihydroxy-1,5,8-méthoxy-3-xanthonone (2). On observe dans le spectre RMN. du dérivé acétylé la présence de quatre protons aromatiques à 6,53 et 6,66 ($J = 2,5$ Hz) et à 6,95 et 7,30 ($J = 9,5$ Hz), de quatre acétoxyyles aliphatiques entre 2,00 et 2,15, d'un méthoxyyle (singulet à 3,87) et de deux acétoxyyles aromatiques à 2,40 et 2,49. Le déplacement chimique élevé de ce dernier groupe précise qu'il se trouve au voisinage de la fonction carbonyle [8]. La position d'attache du sucre ne peut donc être qu'en 1 ou 8. La méthylation de 4, suivie de l'hydrolyse acide, conduit à l'hydroxy-8-triméthoxy-1,3,5-xanthonone (6). Le composé 4 est donc le bellidifoline-8-O-glucoside. Un isomère de ce glucoside, la swertianoline (bellidifoline-1-O-glucoside), a été identifié dans le genre *Swertia* [11].

Composé 5. L'identification a été faite par comparaison avec un échantillon authentique (comportement chromatographique, comportement à l'hydrolyse acide, F., spectres UV. et IR.) [12].

3. Discussion. - Les O-glucosides xanthoniques 3 et 4 sont nouveaux; seuls les isomères avec le glucose attaché en position 1 sont connus actuellement [11]. Relevons encore que toutes les xanthonones que nous avons isolées à ce jour dans *Gentiana campestris* L. ont le schéma de substitution 1,3,5,8, à savoir le même que celui de certaines xanthonones de *Gentiana bellidifolia* Hook [1], espèce néo-zélandaise du sous-genre *Gentianella*.

Les auteurs remercient Monsieur le Professeur Claude Favarger, Institut de Botanique de l'Université de Neuchâtel, de l'identification du matériel végétal. Ils expriment leur gratitude à Monsieur le Professeur Raphaël Tabacchi, de l'intérêt porté à ce travail et à Mesdemoiselles Manuela Léna et Odette Clerc de leur aide technique.

Partie expérimentale

1. Isolement et techniques analytiques. Le matériel végétal a été récolté dans le Jura vaudois (Chasseron), 90 g de poudre de feuilles et de tiges séchées ont été extraits à chaud par des solvants de polarité croissante [13]. Les différents extraits ont été analysés par CCM sur polyamide *Mackerey-Nagel* DC₁₈AC: (MeOH/H₂O/AcOH) 90:5:5 = solvant a; (MeOH/H₂O) 9:1 = solvant b. La chromatographie préparative sur colonne de polyamide MN SC₄ de l'extrait étheré avec le solvant a fournit 1 (55 mg) et 2 (25 mg). L'extrait méthanolique est chromatographié sur une colonne de polyamide MN SC₄ (longueur de la colonne: 100 cm; Ø int.: 6,5 cm) avec, comme éluant un mélange MeOH/H₂O 1:1 dont la teneur en MeOH est graduellement augmentée. MeOH à 70% donne 5 (18 mg); MeOH à 90% permet l'obtention de 3 (120 mg) et 4 (147 mg). La méthyla-

tion de **1** et **2** par un excès de solution étherée de diazométhane conduit à **6** et **7** qui sont séparés par filtration sur gel de Sephadex LH 20 (solvant MeOH). L'hydrolyse acide, la recherche des sucres, l'acétylation, la méthylation, ainsi que l'enregistrement des spectres UV. et RMN. ont été effectués comme décrit précédemment [13].

2. Données analytiques. *Composé 1*, recristallisé dans MeOH, F. 315° (lit. F. 317° [6]); Rf = 0,11 (solvant a); Rf = 0,06 (solvant b). Dérivé acétylé recristallisé dans EtOH, F. 244° (Lit. F. 244° [5]). Dérivé méthylé (**7**), recristallisé dans MeOH, F. 207°; Rf = 0,49 (solvant b).

Composé 2, recristallisé dans MeOH, F. 262° (Lit. F. 263° [6]); Rf = 0,17 (solvant a); Rf = 0,08 (solvant b). Dérivé acétylé, recristallisé dans EtOH F. 235° (Lit. F. 238° [5]). Dérivé méthylé (**7**), recristallisé dans MeOH, F. 207°.

Composé 3, recristallisé dans MeOH, F. 241°; Rf = 0,29 (solvant b).

$C_{19}H_{18}O_{11} \cdot H_2O$ (440,12) Calc. C 51,82 H 4,54% Tr. C 51,24 H 4,66%

Dérivé acétylé, recristallisé dans EtOH, F. 246°.

$C_{21}H_{21}O_{18}$ (716,08) Calc. C 55,24 H 4,42% Tr. C 54,90 H 4,13%

Composé 4, recristallisé dans MeOH, F. 199°; Rf = 0,36 (solvant b).

$C_{20}H_{20}O_{11} \cdot H_2O$ (454,38) Calc. C 52,85 H 4,88% Tr. C 52,03 H 4,59%

Dérivé acétylé: F. 242°.

Composé 5. Voir [12].

Composé 6, recristallisé dans MeOH, F. 208° (Lit. F. 206–207° [1]); Rf = 0,25 (solvant b).

Dérivé acétylé, recristallisé dans $CHCl_3$, F. 223°; (Lit. F. 222–224° [1]).

Composé 7, recristallisé dans MeOH, F. 207°; Rf = 0,49 (solvant b).

BIBLIOGRAPHIE

- [1] K. R. Markham, *Tetrahedron* **20**, 991 (1964).
- [2] D. J. Ross, *New Zeal. J. Sci. Technol.* **32 B**, 39 (1950); J. C. Roberts, *Chem. Rev.* **1967**, 591.
- [3] J. Carbonnier, M. Massias, M. C. Jarreau-Carbonnier & D. Molho, *Travaux lab. de la Jaysinia* **4**, 169 (1972).
- [4] K. R. Markham, *Tetrahedron* **21**, 3687 (1965).
- [5] M. Komatsu, T. Tomimori & N. Mikuriya, *Chem. pharm. Bull.* **17**, 155 (1969).
- [6] T. Tomimori, M. Yoshizaki & T. Nanba, *Yakugaku Zasshi* **94**, 647 (1974).
- [7] S. Goshal, P. V. Sharma, R. K. Chaudhuri & S. K. Bhattacharya, *J. pharm. Sci.* **62**, 926 (1973).
- [8] J. Massicot, J. P. Marthe & S. Heitz, *Bull. Soc. chim. France* **1963**, 2712.
- [9] P. Rivaille, J. Massicot, M. Guyot & V. Plouvier, *Phytochemistry* **8**, 1533 (1969).
- [10] T. Tomimori & M. Komatsu, *Yakugaku Zasshi* **89**, 1276 (1969).
- [11] T. Tomimori, M. Yoshizaki & T. Nanba, *Yakugaku Zasshi* **93**, 442 (1973).
- [12] G. Bellmann & A. Jacot-Guillarmod, *Helv.* **56**, 284 (1973).
- [13] K. Hostettmann, G. Bellmann, R. Tabacchi & A. Jacot-Guillarmod, *Helv.* **56**, 3050 (1973).

**235. Contribution à la phytochimie du genre *Gentiana*, XIII¹⁾.
Etude des composés flavoniques et xanthoniques dans les
feuilles de *Gentiana campestris* L.**

2^{ème} communication

par Maryse Kaldas, Kurt Hostettmann et André Jacot-Guillarmod

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

(29. IX. 75)

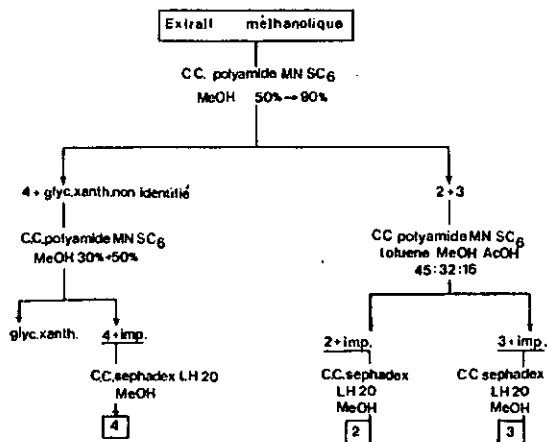
Phytochemistry of genus *Gentiana* XIII. Study of flavonic and xanthonic compounds in the leaves of *Gentiana campestris* L. 2nd communication. *Summary.* By means of column chromatography on polyamide, we have isolated from the leaves of *Gentiana campestris* L. a new xanthone-O-glucoside, the 3,4-dimethoxy-3,8-dihydroxy-xanthone-1-O- β -D-glucopyranoside (2) and its aglucone, the 3,4-dimethoxy-1,3,8-trihydroxy-xanthone (1). The C-glucosides mangiferin (3) and swertisin (4) have also been isolated and identified.

1. Introduction. - Dans une précédente communication[1], nous avons décrit quatre xanthonés isolées à partir de feuilles de *Gentiana campestris* L., substances dans le schéma de substitution 1, 3, 5, 8 correspond à celui de certaines xanthonés de *Gentiana bellidifolia* Hook [2], espèce néo-zélandaise du sous-genre *Gentianella*. Une nouvelle analogie du point de vue phytochimique est mise en évidence entre ces deux espèces, en raison de la présence dans *Gentiana campestris* L. de xanthonés penta-OR-substituées (R = H, CH₃, β -D-glucosyle) dont nous décrivons ci-après l'isolement et la détermination de structures. Il s'agit du diméthoxy-3,4-dihydroxy-3,8-xanthone-1-O- β -D-glucopyranoside (2), décrit pour la première fois et de son aglucone (1), la corymbiférine, rencontrée précédemment dans *Gentiana bellidifolia* Hook. Relevons enfin que nous avons identifié encore la mangiférine (3) et la swertisine (4).

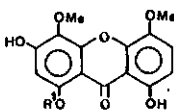
2. Résultats. - 2.1. *Isolement des composés.* L'extraction à partir de feuilles et de tiges séchées a été réalisée comme décrit précédemment [1]. La fraction étherée, chromatographiée sur colonne de polyamide (élution: MeOH/H₂O/AcOH 90:5:5),

1) Partie XII, v. Phytochemistry, sous presse.

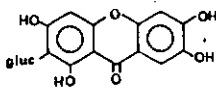
fournit le composé **1** qui est encore purifié par filtration sur gel de Sephadex LH 20 (solvant MeOH). Les composés **2**, **3** et **4** ont été isolés à partir de l'extrait méthanolique, selon le schéma indiqué dans la figure.



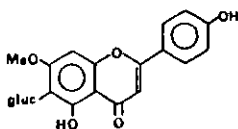
2.2. Détermination des structures. - Composé 1. Les spectres UV., enregistrés en présence des réactifs usuels, sont caractéristiques d'une xanthone possédant des groupes hydroxyles libres en 3 et en 1 ou 8. Le spectre RMN. du dérivé acétylé montre la présence de deux groupes méthoxyle et de trois groupes acétoxy aromatiques, dont deux à 2,38 et 2,40 δ sont au voisinage de la fonction carbonyle [3], ainsi que de trois protons aromatiques à 6,75 δ (singulet, position 2) et à 6,88 et 7,20 δ (spectres AB, $J = 9,5$ Hz, position 6 et 7). Toutes les données spectrales ainsi que le comportement chromatographique et le F. correspondent à la trihydroxy-1, 3, 8-diméthoxy-4, 5 xanthone (corymbiférine) isolée pour la première fois à partir des racines de *Gentiana corymbifera* Kirk (section *Antarctophila*) [4].



1 - 2



3



4

1: R¹ = H

2: R¹ = β -D-glucosyle

Composé 2. L'hydrolyse acide de **2** donne **1** ainsi que du glucose. Dans le spectre RMN. de **2** acétylé, on relève: quatre groupes acétoxyde aliphatiques entre 2,00 et 2,10 δ et deux groupes acétoxyde aromatiques (singulets à 2,34 et 2,46 δ) dont un seul à proximité de la fonction carbonyle [3]. La position d'attache du glucose sur l'aglucone **1** est donc située en 1 ou en 8. Par comparaison des spectres RMN de **2** et de **1**, enregistrés dans le DMSO, il est possible de préciser que le glucose est fixé en position 1. En effet, les protons H (6) et H(7) ne sont pratiquement pas déplacés (voir tableau 2), alors que le proton H-C(2) du glucoside subit un déplacement de l'ordre de 0,4 δ par rapport à celui de l'aglucone.

Composé 3. L'identification a été faite par comparaison avec un échantillon authentique de mangiférine, isolé précédemment dans notre laboratoire [5] (comportement chromatographique, F. spectres UV. et IR.).

Composé 4. Les spectres UV., caractéristiques d'un composé flavonique, indiquent la présence de deux groupes hydroxyle libres en 5 et en 4', la position 7 étant substi-

Tableau 1. Spectres UV. (max. en nm, solvant = MeOH)

Composé	Solvant pur	Solvant additionné de			
		AlCl ₃	AlCl ₃ /HCl	NaOAc	NaOMe
1	230, 256	227, 275	227, 260 sh	227, 250 sh	225, 250 sh
	276 sh, 347	288, 386	280, 386	280, 369	280, 370
2	231, 254	225, 269	225, 268	248	231, 248
	278, 330, 375 sh	289, 366	287, 359	273, 367	273, 367
3	259, 270 sh	270, 287 sh	267, 278 sh	265	273
	315, 365	356, 400	338, 402	300 sh, 382	300 sh, 388
4	222, 272	222, 281, 302	222, 282, 302	226, 272	222, 272
	334	350, 376	346, 376	380	388

Tableau 2. Spectres RMN. (δ en ppm par rapport au TMS pris comme référence interne)

Composé	H-C(2)	H-C(6) ($J = 9,5$ Hz)	H-C(7) ($J = 9,5$ Hz)	-OCH ₃	-OCOCH ₃
1 ^{a)}	6,33	6,75	7,51	3,86	
				3,93	
2 ^{a)}	6,76	6,66	7,42	3,87	
				3,90	
1 ^{b)} acétylé	6,75	6,88	7,20	3,99	2,35
				4,10	2,38
					2,40
2 ^{b)} acétylé	6,75	6,86	7,15	3,96	2,34
				4,03	2,46

^{a)} Solvant: DMSO. ^{b)} Solvant: CDCl₃.

tuée. Dans le spectre RMN. de 4 acétylé on compte six protons aromatiques (6,60 δ H-C(3); 6,90 δ , H-C(8); 7,30 δ , $J = 9$ Hz, H-C(3'), H-C(5'); 7,93 δ , $J = 9$ Hz, H-C(6')), un groupe méthoxyle (à 4,03 δ position 7), deux groupes acétoxy aromatiques à 2,51 δ (position 5) et 2,35 δ (position 4'), quatre groupes acétoxy aliphatiques dont trois entre 2,00 et 2,10 δ et un à 1,80 δ . Ce dernier signal est caractéristique d'un 6-C-glucoside flavonique [6]. Par chauffage en milieu acide, 4 peut d'ailleurs se transformer, selon *Wessely-Moser* [7] en isomère 8-C-glucoside de Rf différent²⁾. Le composé 4 est donc la dihydroxy-4',5-méthoxy-7-,6-C- β -D-glucopyranosyl-flavone (swertisine) dont la structure a été établie par *Komatsu* [8] à partir de *Swertia Japonica*.

3. Discussion. - La substance 2 est le premier O-glucoside de la corymbiférine connu. Mentionnons toutefois que dans un travail consacré à *Gentiana corymbifera* Kirk, Ross [4] concluait à l'existence d'un O-glucoside de ce type, sans toutefois procéder à l'isolement et à la détermination de structure. La swertisine (4) avait déjà été signalée dans le genre *Swertia* [8]; sa présence dans *Gentiana campestris* L. confirme l'analogie du point de vue phytochimique, entre les genres *Swertia* et *Gentiana* [9]. La mangiférine (3) a déjà été identifiée dans le genre *Gentiana* (*Gentiana lutea* L. [5] et *Gentiana verna* L. [10]) ainsi que dans le genre *Swertia* [9].

Les auteurs remercient M. le Professeur Cl. Favarger pour l'identification du matériel végétal et M. le Professeur R. Tabacchi de l'intérêt qu'il a porté à ce travail. Ils expriment leur gratitude au Fonds National Suisse de la Recherche Scientifique pour son support financier (crédit no 2.1600.74) ainsi qu'à la maison F. Hoffmann-La Roche à Bâle (laboratoire du Prof. W. Boguth) pour le relevé du spectre RMN. 90 MHz.

Partie expérimentale

1. Isolement et techniques analytiques. Le matériel végétal a été récolté dans le Jura vaudois (Chasseron). 90 g de poudre de feuilles et de tiges séchées ont fourni 25 mg de 1, 27 mg de 2, 25 mg de 3 et 42 mg de 4. Les différents extraits ont été analysés par CCM. sur polyamide *Macherey-Nagel* DC 11, (MeOH/H₂O/AcOH 90:5:5) = solvant A, (MeOH/H₂O 9:1) = solvant B, (toluène/MeOH/AcOH 45:32:16) = solvant C. Les séparations sur colonne ont été réalisées à l'aide de polyamide MN SC 6 et de Sephadex LH 20. L'hydrolyse acide, la recherche des sucres, l'acétylation, l'enregistrement des spectres UV. et RMN. ont été effectués comme décrit précédemment [11].

2. Données analytiques. Composé 1. F. 266-267°, recristallisé dans MeOH (lit 268° [2]), Rf: 0,20 (solvant A), Rf: 0,13 (solvant B), Rf: 0,81 (solvant C).

Dérivé acétylé: F. 194°, recristallisé dans EtOH. (lit. F. 202° [2]).

Composé 2. F. 245°, recristallisé dans MeOH, Rf = 0,52 (solvant A), Rf = 0,45 (solvant B), Rf = 0,81 (solvant C).

Dérivé méthylé: UV. (MeOH) 244, 274, 376. Rf = 0,78 (solvant B).

Dérivé méthylé hydrolysé: UV. (MeOH) 253, 276, 338, + AlCl₃ 260, 286, 368. Rf = 0,51 (solvant B).

Dérivé acétylé: F. 248°, recristallisé dans EtOH.

C₂₃H₃₂O₁₆ (718,62) Calc. C 55,16% H 4,77% Tr. C 54,80% H 5,03%

Composé 3. Voir [5].

Composé 4. F. 242-243°, recristallisé dans H₂O (lit. 243° [8]). Rf = 0,46 cellulose *Merck*, solvant AcOH 15%; Rf = 0,72 (solvant B).

²⁾ Les deux isomères 6-C et 8-C-glucoside ont des spectres UV. identiques.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] *M. Kaldas, K. Hostettmann & A. Jacot-Guillarmod*, *Helv.* **57**, 2557 (1974).
 - [2] *K. R. Markham*, *Tetrahedron* **21**, 3687 (1965).
 - [3] *J. Massicot, J. P. Marthe & S. Heitz*, *Bull. Soc. chim. France* **1963**, 2712.
 - [4] *D. J. Ross*, *New Zeal. J. Sci. Technol.* **32B**, 39 (1950).
 - [5] *G. Bellmann & A. Jacot-Guillarmod*, *Helv.* **56**, 284 (1973).
 - [6] *B. Gentili & R. M. Horowitz*, *J. org. Chemistry* **33**, 1571 (1968).
 - [7] *F. Wessely & G. M. Moser*, *Mh. Chem.* **56**, 97 (1930).
 - [8] *M. Komatsu, T. Tomimori & M. Ito*, *Chem. pharm. Bull.* **15** (3), 263–269 (1967).
 - [9] *S. Ghosal, P. V. Sharma, R. K. Chaudhury & S. K. Bhattacharya*, *J. pharm. Sci.* **64**, 80 (1975).
 - [10] *K. Hostettmann & A. Jacot-Guillarmod*, *Helv.* **57**, 1155 (1974).
 - [11] *K. Hostettmann, G. Bellmann, R. Tabacchi & A. Jacot-Guillarmod*, *Helv.* **56**, 3050 (1973).
-