

Flavonoïdes de *Piper marginatum*

Isolement d'un nouvel heteroside flavonique le marginatoside¹

Flavonoids from *Piper marginatum*

Isolation of a new Flavonoid, the Marginatoside

F. Tillequin, M. Paris, H. Jacquemin et R. R. Paris

Laboratoire de Matière Médicale, Faculté de Pharmacie, Université Paris, France.

Key Word Index: *Piper marginatum*; Vitexin; Marginatoside; Flavonoids.

Abstract

The two major flavonoïds from *Piper marginatum* leaves, vitexin and marginatoside, were isolated. Marginatoside is a new glycoside the structure of which is 6"-O- β gentiobiosyl vitexin.

Introduction

Piper marginatum JACQ. est une Piperacée sud américaine arbustive à rameaux noueux et grêles, à feuilles alternes, ovales, acuminées dont la base est largement cordée et le pétiole court [1]. Une étude chimique préliminaire réalisée dans notre laboratoire [2] a montré la présence de C-glycosyl flavones en

quantité notable dans les feuilles de cette espèce.

Résultats

Afin d'étudier les flavonoïdes, les feuilles broyées sont extraites par l'eau bouillante. La solution aqueuse obtenue est épuisée successivement par l'éther éthylique, l'acétate d'éthyle et le butanol-1 [3].

Le fractionnement par chromatographie sur colonne de silice de l'extrait butanolique conduit à l'isolement de deux flavonoïdes purs.

Le flavonoïde F1 : (10% des flavonoïdes totaux) cristallise dans le méthanol, F = 257°C. L'examen de son spectre de masse permet de déterminer sa masse moléculaire, M⁺ = 432 et sa formule brute C₂₁H₂₀O₁₀.

Son spectre IR montre des bandes d'absorption caractéristiques à 3400-

¹ Piperacées de Guyane: 2

1: Sur une Piperacée de Guyane, le *Piper marginatum* JACQ. S. FOUNGBE, F. TILLEQUIN, M. PARIS, H. JACQUEMIN et R. R. PARIS, Ann. Pharm. Franç. 34, 339 (1976).

O. R. S. T. O. M. 30 JUIN 1978

Collection de Référence

n° 9290 B.B.V.

3200 cm^{-1} (hydroxyles), 1655 cm^{-1} (carbonyle) et 1610 cm^{-1} (noyau aromatique).

Son spectre UV présente deux maximums d'absorption à 270 nm (bande II) et 334 nm (bande I) ; ce dernier étant caractéristique d'une flavone. Les déplacements bathochromes observés par addition de trichlorure d'aluminium, d'acétate de sodium et de méthylate de sodium indiquent la présence de trois hydroxyles libres en 5, 7 et 4' [4].

Son spectre de RMN montre un signal à 13, 10 p.p.m (1H,s), disparaissant par addition d'eau lourde, ce qui confirme l'existence d'un hydroxyle libre en 5. Un système $A_2 B_2$ à 8,03 p.p.m (2H,d, $J = 9\text{Hz}$) et 6,90 p.p.m (2H,d, $J = 9\text{Hz}$) caractéristique des quatre protons en 2', 6' et 3', 5' indique un noyau B substitué en 4'. Un singulet à 6,75 p.p.m (1H) est attribuable au proton en 3. Un second singulet à 6,30 p.p.m (1H) caractéristique d'un proton en 6, indique l'existence d'un substituant en 8. Un doublet centré sur 4,80 p.p.m (1H, $J = 10\text{Hz}$) est attribuable au proton en 1'' d'un glucose en 8 réalisant un couplage diaxial avec le proton en 2''. L'ensemble de ces données permet d'attribuer au flavonoïde considéré la structure de la 8-C- β glucosyl apigénine ou vitexine. Cette identification est confirmée par comparaison des données spectrales avec celles publiées dans la littérature [5], [6], par son isomérisation en isovitexine par chauffage en milieu acide et par comparaison avec un échantillon authentique.

Le flavonoïde F2 : (85 % des flavonoïdes totaux) cristallise en longues aiguilles jaunes dans le mélange méthanol

acétate d'éthyle à parties égales, $F = 210^\circ \text{C}$. L'analyse centésimale permet de lui assigner la formule brute $C_{33} H_{40} O_{20}, 3H_2O$. Son comportement chromatographique [7] est celui d'un trioside. Son spectre IR montre une très intense bande d'absorption à 3500–3200 cm^{-1} (hydroxyles) et des bandes à 1660 cm^{-1} (carbonyle) et 1605 cm^{-1} (noyau aromatique). Son spectre UV, très proche de celui de la vitexine, présente des maximums d'absorption à 270 nm (bande II) et 330 nm (bande I). L'addition de trichlorure d'aluminium à la solution méthanolique provoque, un déplacement bathochrome de 22 nm de la bande I, ce qui indique la présence d'un groupement hydroxyle libre en 5.

Les déplacements bathochromes de la bande II après addition d'acétate de sodium et de la bande I après addition de méthylate de sodium indiquent des groupements hydroxyles libres en 7 et 4' [4]. Son spectre de RMN montre un signal à 13,20 p.p.m (1H,s) disparaissant par addition d'eau lourde ce qui confirme la présence d'un hydroxyle libre en 5. Il montre d'autre part un système $A_2 B_2$ à 7,97 p.p.m (2H,d, $J = 9\text{Hz}$) et 6,93 p.p.m (2H,d, $J = 9\text{Hz}$) caractéristique des quatre protons 2', 6' et 3', 5' d'un noyau B substitué en position 4' ; deux singulets à 6,75 p.p.m (1H) et 6,27 p.p.m (1H) correspondant aux protons en 3 et 6 ; enfin un massif de 5,20 à 3,00 p.p.m (31H) attribuable aux radicaux glycosyl. L'ensemble de ces données conduit à attribuer au flavonoïde F2 la structure d'un dihexoside de 8-C-glycosyl apigénine, le radical dihexosyl étant fixé sur le sucre impliqué dans la liaison C-heterosidique.

Le chauffage en milieu acide de ce flavonoïde produit du glucose et un mélange de vitexine et d'isovitexine, la présence de cette dernière s'expliquant par transposition de WESSELY-MOSER [8]. L'hydrolyse acide oxydante conduit à l'isolement de l'apigénine (UV, IR, RMN, SM). L'hydrolyse enzymatique par la β -glucosidase permet de caractériser le glucose et d'isoler la vitexine (F, UV, IR, RMN, SM).

Le spectre de RMN du dérivé acétylé de F2 présente un signal (3H,s) à 1,68 p.p.m attribuable à un groupement acétylé en 2'' [9]. L'absence de signal entre 1,80 et 1,95 p.p.m indique l'absence de groupement acétylé en 6'' [10], le radical diglucosyl est donc fixé en 6'' sur le glucose impliqué dans la liaison C-hétérosidique.

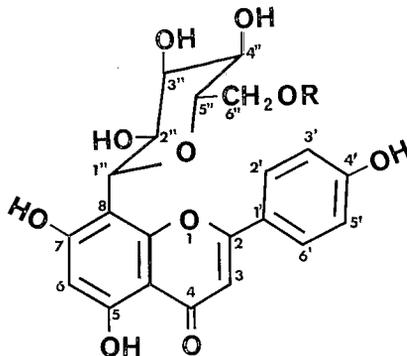
Un signal à 1,73 p.p.m (3H,s) est attribuable à un groupement acétylé en 2''' fortement déplacé vers les champs forts, l'examen du modèle Dreiding indiquant que ce groupement se situe dans la zone d'anisotropie diamagnétique du noyau B de la flavone.

Le spectre de masse du dérivé perméthylé de F2 [11], [12], [13] montre un ion moléculaire à $m/e = 938$ et deux séries de pics :

– l'une à m/e : 179, 193, 207, 209, 223, 237, 249, 281, 294, 325, 341, 355 caractéristique d'un système vitexinique perméthylé [6], [14],

– l'autre, de plus faible intensité, à m/e : 203 (235 – CH_3OH), 235 (glucose terminal) [15] [16], 353 et 407 (439 – CH_3OH) correspondant au diglucoside terminal, l'ion à $m/e = 353$ caractérisant une liaison 1–6 entre les deux hexoses [17].

Ces données conduisent à attribuer au flavonoïde F2 ou marginatoside, la structure de 6''-O- β gentiobiosyl vitexine.



R = H : Vitexine

R = β -Gentiobiosyl : Marginatoside

Discussion

Si la présence de C-glycosyl flavones chez les Piperacées a été mise en évidence dès 1972 [18], nous rapportons ici pour la première fois l'isolement de tels produits dans cette famille végétale.

Le marginatoside est, à notre connaissance, un nouveau produit naturel. Cependant l'un de ses isomères, la 2''-O-sophorosyl vitexine ou polygonatiine a été isolée d'une Liliacée, *Polygonatum odoratum* (MILL.) DRUCE [19].

Nous espérons que la signification chimiotaxonomique de ces résultats pourra être précisée par l'étude des flavonoïdes de diverses autres Piperacées actuellement en cours dans notre laboratoire.

Partie expérimentale

Les points de fusion ont été déterminés en tube capillaire (appareil de TORROLI). Les pouvoirs rotatoires ont été mesurés à l'aide d'un polarimètre électronique SCHMIDT.

Les spectres UV ont été effectués avec un spectrophotomètre Beckman DB. Les spectres IR ont été enregistrés sur un spectrophotomètre Beckman IR 4250. Les spectres de RMN ont été réalisés sur un appareil Varian T 60. Les spectres de masse ont été effectués à l'aide d'un spectrographe AEI MS 9 ou Varian MAT 112.

Extraction et isolement

Les feuilles pulvérisées de *Piper marginatum* (200 g) sont traitées par l'eau bouillante sous réfrigérant à reflux pendant 4h. Après séparation du marc, la solution aqueuse est épuisée successivement par l'éther éthylique, l'acétate d'éthyle et le butanol-1.

L'extrait éthéré ne contient pratiquement pas de polyphénols. L'extrait dans l'acétate d'éthyle contient le flavonoïde F1 et l'extrait butanolique les flavonoïdes F1 et F 2.

L'extrait butanolique (4 g, soit 2% m/m du matériel végétal sec) est chromatographié sur 30 fois sa masse de silice (granulométrie: 100 mesh) par le système éluant acétate d'éthyle-méthanol.

Les fractions sont étudiées en CCM:

- sur cellulose : solvant : eau/acide acétique 85/15 v/v (système I)
- sur polyamide : solvant : eau/ethanol/méthylcétone/acétylacétone 13/3/3/1 v/v/v/v (système II)

Vitexine

- Cristaux jaunes, $F = 257^{\circ} \text{C}$ (MeOH)
- $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -15^{\circ}$ (Pyridine, $C = 1$)
- CCM : $R_f = 0,15$ (système I)
- $R_f = 0,20$ (système II)
- Réaction $\text{Mg} + \text{HCl}$: positive (orangée)

- UV: λ_{max} : nm :
 - (MeOH) : 334 ; 300 (ep.) ; 270
 - (MeOH + AlCl_3) : 349 ; 303 ; 275
 - (MeOH + AcONa) : 382 ; 302 ; 280
 - (MeOH + MeONa) : 390 ; 280
- IR (pastille de KBr) : ν' : cm^{-1} : 3370, 3250, 1655, 1610, 1570, 1505, 1385, 1360, 1295, 1180, 1110, 1090, 1040, 1015 et 830
- RMN (DMSO d_6 , TMS) : p.p.m : 3,00 à 4,35 (10H, m, glucosyl) ; 4,80 (1H, d, $J = 10\text{Hz}$, H-1'') ; 6,30 (1H, s, H-6) ; 6,75 (1H, s, H-3) ; 6,90 (2H, d, $J = 9\text{Hz}$, H-3', H-5') ; 8,03 (2H, d, $J = 9\text{Hz}$, H-2', H-6') ; 13,10 (1H, s, OH-5).
- SM (80 eV) : m/e (intensités relatives) : 432 (M^+) (0,5%) ; 414 (1,5%) ; 396 (1,5%) ; 324 (16%) ; 283 (P^+) (100%) ; 254 (13%) ; 165 (26%) ; 121 (9%) ; 119 (6%) ; 118 (16%) ; 89 (10%) ; 69 (18%) ; 55 (19%).

Isomérisation de la vitexine

10 mg de vitexine sont additionnés de 10 ml d' H_2SO_4 2N. Le mélange réactionnel est porté à 100°C pendant 4h. Après refroidissement et neutralisation par Ba CO_3 , aucun sucre peut être caractérisé. L'extraction par l'acétate d'éthyle fournit un mélange de vitexine et d'isovitexine (comparaison avec témoins authentiques)

- CCM : $R_f = 0,15$ (vitexine) et 0,40 (isovitexine) (système I)

Marginatoside

- Longues aiguilles jaunes, $F = 210^{\circ} \text{C}$ (MeOH/EtOAc)
- $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +17^{\circ}$ (Pyridine, $C = 1$)

- CCM : R_f = 0,45 (système I)
- R_f = 0,60 (système II)
- Réaction Mg + HCl : positive (orangée)
- Analyse élémentaire :
 - trouvé : C = 48,81 % ; H = 5,59 %
 - calculé pour C₃₃ H₄₀ O₂₀, 3H₂O : C = 48,88 % ; H = 5,67 %
- UV : λ_{max} : nm :
 - (MeOH) : 330 ; 306 (ep.) ; 270
 - (MeOH + AlCl₃) : 352 ; 304 ; 274
 - (MeOH + AcONa) : 385 ; 303 ; 280
 - (MeOH + MeONa) : 388 ; 278
- IR (pastille de KBr) : ν' : cm⁻¹ : 3380, 1660, 1605, 1575, 1505, 1435, 1360, 1290, 1270, 1240, 1175, 1110, 1075, 1035, 1020 et 835
- RMN (DMSO d₆, TMS) : p.p.m : 3,00 à 5,20 (31 H, m, triglucosyl) ; 6,27 (1H,s, H-6) ; 6,75 (1H,s, H-3) ; 6,93 (2H,d, J = 9Hz, H-3', H-5') ; 7,97 (2H,d, J = 9Hz, H-2', H-6') ; 13,20 (1H,s, OH-5).

Hydrolyse acide du marginatoside

30 mg de marginatoside sont additionnés de 10 ml d'H₂SO₄ 2N. Le mélange réactionnel est porté à 100° C pendant 4h. Après refroidissement, neutralisation par Ba CO₃ et filtration, un seul sucre peut être caractérisé : le glucose (CCM sur silice : n-Bu OH/iPr OH/H₂O 5/3/1 v/v/v et CCM sur cellulose : n-Bu OH/AcOH/H₂O 4/1/5 v/v/v révélateur : phtalate d'aniline). L'épuisement du filtrat par l'éther éthylique ne permet de caractériser aucune génine. Son épuisement par l'acétate d'éthyle fournit un mélange de vitexine et d'isovitexine (comparaison avec témoins authentiques).

Hydrolyse acide oxydante du marginatoside

300 mg de marginatoside sont additionnés de 30 ml d'eau, de 6 ml de solution aqueuse de FeCl₃ à 25 % (m/v) et de 18 ml d'HCl concentré. Le mélange réactionnel est porté à 100° C pendant 4h. L'épuisement du milieu réactionnel par l'éther éthylique fournit l'apigénine (25 mg après recristallisation dans l'éther éthylique).

- cristaux jaunes
- UV : λ_{max} : nm
 - (MeOH) : 266, 295 (ep.), 337
 - (MeOH + AlCl₃) : 276, 300, 347, 385
 - (MeOH + AcONa) : 275, 301, 374
 - (MeOH + MeONa) : 276, 327, 390
- IR (pastille de KBr) : ν' : cm⁻¹ : 3320, 1650, 1610, 1590, 1555, 1500, 1445, 1355, 1300, 1270, 1245, 1225, 1185, 1170, 1160, 1035, 910, 830 et 810
- RMN (DMSO d₆, TMS) : p.p.m : 6,21 (1H,d, J = 3Hz, H-6) ; 6,51 (1H, d, J = 3Hz, H-8) ; 6,70 (1H,s, H-3) ; 6,90 (2H,d, J = 9,5Hz, H-3', H-5') ; 7,87 (2H,d, J = 9,5Hz, H-2', H-6') ; 12,93 (1H,s, OH-5).
- SM (80 eV) : m/e (intensités relatives) : 271 (16 %) ; 270 (M⁺) (P⁺) (100 %) ; 269 (20 %) ; 242 (27 %) ; 153 (33 %) ; 152 (20 %) ; 124 (27 %) ; 121 (25 %) ; 118 (18 %).

Hydrolyse enzymatique du marginatoside

150 mg de marginatoside sont additionnés de 35 ml d'eau (pH = 5) et de 150 mg de β-glucosidase. Après un séjour de deux semaines à l'étuve à 35-40° C, le glucose est caractérisé par CCM

et la vitexine extraite par l'acétate d'éthyle est recristallisée dans le méthanol (42 mg) ($F = 259^{\circ} \text{C}$, UV, IR, RMN, SM).

Acétylation du marginatoside :

Peracétylmarginatoside :

75 mg de marginatoside sont additionnées de 6 ml d'anhydride acétique et de 2 ml de pyridine. Après un repos de 72 h, on dilue à l'eau glacée. Le précipité recueilli est recristallisé dans l'éther éthylique (85 mg).

– Prismes blancs, $F = 119\text{--}120^{\circ} \text{C}$

– $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -6^{\circ}$ (CHCl_3 , $C = 1$)

– Analyse élémentaire :

· trouvé : $C = 54,78\%$; $H = 5,31\%$

· calculé pour $\text{C}_{59} \text{H}_{66} \text{O}_{33}$: $C = 54,36\%$; $H = 5,11\%$

– IR (pastille de KBr) : ν' : cm^{-1} : 1760 ($-\text{OCOCH}_3$)

– RMN (CDCl_3 , TMS) : p.p.m. : 1,68 (3H,s, O-Ac-2'') ; 1,73 (3H,s, O-Ac-2''') ; 1,95 à 2,13 (24H, 8s, O-Ac-glucoses) ; 2,37 (3H,s, O-Ac-4') ; 2,40 (3H,s, O-Ac-7) ; 2,42 (3H,s, O-Ac-5) ; 3,60 à 5,95 (21 H,m, H-glucoses) ; 6,66 (1H,s large, H-6) ; 6,83 (1H, s large, (H-3)) ; 7,33 (2H,d, $J = 9\text{Hz}$, H-3', H-5') ; 8,00 (2H,d, $J = 9\text{Hz}$, H-2', H-6').

Méthylation du marginatoside :

Perméthylmarginatoside

10 mg de marginatoside en solution dans 1,5 ml de D.M.F. sont additionnés sous N_2 de 300 mg de NaH lavé à l'hexane et de 3 ml de CH_3I . Après 2h de réaction, l'excès d'hydrure est détruit par CH_3OH . Après addition d'eau, le dérivé perméthylé est extrait par CHCl_3 .

Il est purifié par C.C.M. préparative (support : silice, solvant : $\text{CHCl}_3/\text{EtOAc}/\text{Me}_2\text{CO}$ 5/4/1 v/v/v, élution de la bande fluorescente bleue de plus bas R_f par l'acétone). L'éluat filtré est évaporé sous pression réduite et séché quelques heures sous vide phosphorique à 80°C (R_t : 4 mg)

– SM (70 eV) : m/e (intensités relatives) : 938 (M^+) ($< 0,2\%$) ; 407 (5%) ; 355 (P^+) (100%) ; 353 (6%) ; 341 (51%) ; 325 (19%) ; 294 (24%) ; 281 (4%) ; 249 (3%) ; 237 (6%) ; 235 (4%) ; 223 (9%) ; 209 (15%) ; 207 (12%) ; 203 (5%) ; 193 (19%) ; 179 (5%) ; 135 (16%) ; 132 (24%) ; 101 (98%) ; 88 (95%).

Remerciements

Nous remercions le centre O.R.S.T.O.M. de Cayenne (Guyane) pour la fourniture du matériel végétal nécessaire à cette étude.

Bibliographie

1. Lemeé, A.: «Flore de la Guyane française», Paul Lechevalier, Paris, 1, 470 (1955).
2. Fougbe, S., Tillequin, F., Paris, M., Jacquemin, H. et Paris, R. R.: Ann. Pharm. Franç., 34, 339 (1976).
3. Paris, R. R. et Nothis, A.: Pl. med. phytother., 4, 63 (1970).
4. Mabry, T. J., Markham, K. R. et Thomas, M. B.: «The systematic identification of flavonoïds», Springer, Berlin-Heidelberg-New York (1970).
5. Prox, A.: Tetrahedron, 24, 3697 (1968).
6. Bouillant, M. L.: «Structure et synthèse de C-glycosyl dihydroxy-5,7 flavones», Thèse es sciences (Etat), Lyon (1976).
7. Egger, K.: Planta medica, 12, 265 (1964).
8. Wessely, F. et Moser, G. H.: Monatsh. Chem. 56, 97 (1930).

9. Horowitz, R. M. et Gentili, B.: *Chem. Ind.*, 625 (1966).
10. Gentili, B. et Horowitz, R. M.: *J. Org. Chem.*, 33, 1571 (1968).
11. Brimacombe, J. S., Jones, B. D., Stacey, M. et Willard, J. J.: *Carbohydr. Res.* 2, 167 (1966).
12. Schmid, R. D., Varenne, P. et Paris, R. R.: *Tetrahedron*, 28, 5037 (1972).
13. Bouillant, M. L., Favre-Bonvin, J. et Chopin, J.: *Phytochem.* 14, 2267 (1975).
14. Bouillant, M. L., Favre-Bonvin, J. et Chopin, J.: *Bull.liaison groupe polyphénols*, 5, (1974).
15. Schmid, R. D.: *Tetrahedron*, 28, 3259 (1972).
16. Østerdahl, B. G.: *Acta Chem. Scand.*, B 30, 867 (1976).
17. Kochetkov, N. K. et Chizhov, O. S.: *Adv. Carbohydr. Chem.*, 21, 39 (1966).
18. Chopin, J. et Bouillant, M. L.: «C-glycosylflavonoïds» in Harborne, J. B., Mabry, T. J. et Mabry, H.: «The flavonoïds», Chapman and Hall, London (1975).
19. Morita, N., Arisawa, M. et Yoshikawa, A.: *Yakugaku Zasshi*, 96, 1180 (1976).

*Adresse: Laboratoire de Matière Médicale
U.E.R. de chimie thérapeutique
Faculté de Pharmacie, Université Paris XI
F-92290 Chatenay-Malabry (France)*

Planta medica

Journal of Medicinal Plant Research

Editor - in - Chief

E. Reinhard, Univ. Tübingen
Pharmazeutisches Institut
Auf der Morgenstelle
7400 Tübingen

Editorial Board

H. Ammon, Tübingen
W. Barz, Münster
E. Reinhard, Tübingen
O. Sticher, Zürich
H. Wagner, München
M. Zenk, Bochum

Hippokrates Verlag
Stuttgart

February 1978
Vol. 33

No. 1