

38. Nouveaux flavonosides de *Paeonia tenuifolia* L.

par Dušica Stošić et Momčilo Gorunović

Institut de Pharmacognosie, 8, rue Dr. Subotica, Faculté de Pharmacie, p. f. 146, YU-11000 Beograd

et Alexios-Léandros Skaltsounis, François Tillequin et Michel Koch*

Département de Pharmacognosie de l'Université René Descartes, U. A. au C. N. R. S. n° 484, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, 4, avenue de l'Observatoire, F-75006 Paris

(28. XII. 87)

New Flavonoid Glycosides from *Paeonia tenuifolia* L.

Two novel flavonoid glycosides have been isolated from the stamens of *Paeonia tenuifolia*, sexangularetin-3-*O*-yl β -D-sophoroside (1) and limocitrin-3-*O*-yl β -D-sophoroside (3). Their structures have been elucidated by spectroscopic means, mainly desorption chemical ionisation mass spectrometry and 1D and 2D high-resolution ¹H-NMR spectroscopy of their acetyl derivatives.

Introduction et résultats. – *Paeonia tenuifolia* L. (Paeoniacées) est une pivoine herbacée vivace dont l'aire de répartition s'étend en Bulgarie, Yougoslavie, Roumanie et au Sud-Ouest de l'U. R. S. S. [1] [2]. Une étude du contenu flavonoïdique des étamines de cette plante a permis l'isolement de deux nouveaux hétérosides d'hydroxy-3-flavones après extraction selon un protocole classique et séparation par chromatographie préparative sur papier.

Le premier d'entre eux, 1, n'a pas encore été obtenu à l'état cristallisé, $[\alpha]_D^{20} = -18^\circ$ (MeOH, $c = 0,1$). Il ne présente pas d'ion moléculaire apparent en spectrométrie de masse (SM) par impact électronique. Par contre, en désorption/ionisation chimique (gaz réactant: NH₃), il présente un ion moléculaire $[M + H]^+$ à 641, compatible avec la formule brute C₂₈H₃₂O₁₇. Par hydrolyse acide, il fournit du glucose et une génine identifiée par ses caractéristiques spectrales à la sexangularétine (= tétrahydroxy-3,5,7,4'-méthoxy-8-flavone) [3] [4]. Une comparaison entre les spectres UV, dans le MeOH pur et additionné de divers réactifs d'ionisation ou de chélation des fonctions phénol [5] [6], de la sexangularétine d'une part et de l'hétéroside d'autre part, révèle que, chez ce dernier, seul l'OH–C(3) de la génine est impliqué dans une liaison hétérosidique. Une structure de diglucoside en position 3 de la sexangularétine peut donc être avancée, et il reste, à ce stade, à confirmer la nature des deux hexoses et à déterminer leur mode d'enchaînement.

L'étude des spectres de ¹H-RMN de divers oligosaccharides [7] [8] a montré que l'acétylation avait pour effet de déplacer vers les bas champs les signaux des protons portés par les atomes de C initialement porteurs de OH libres tandis que les déplacements chimiques des signaux des autres protons de la molécule, en particulier de ceux impliqués dans une liaison hétérosidique, sont peu affectés. Ce phénomène n'a été que récemment mis à profit pour la détermination de structure d'hétérosides par ¹H-RMN multiimpulsionnelle à haut champ [9–11]. Il nous a paru intéressant d'utiliser ici cette technique compte tenu de sa forte sensibilité.

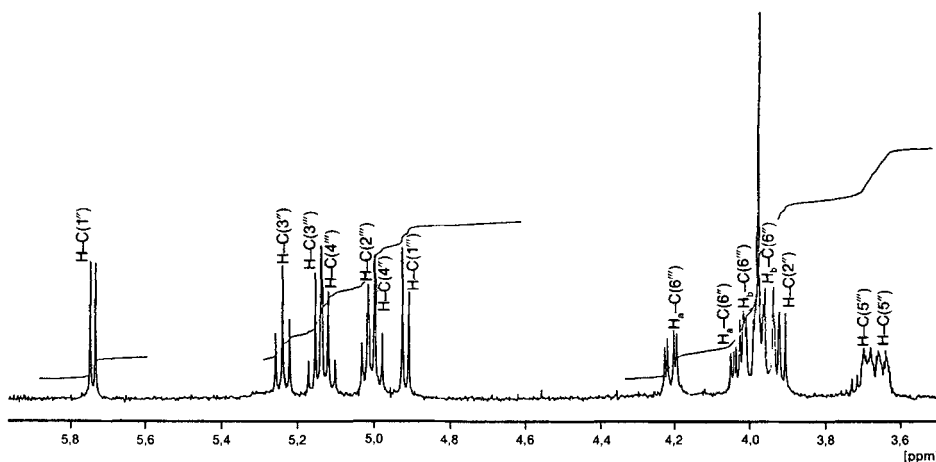


Fig. 1. Spectre de ^1H -RMN de **2** (500 MHz), région des protons glucidiques (3,60 à 5,80 ppm)

L'acétylation de l'hétéroside **1** conduit à un dérivé décaacétylé **2** caractérisé par un ion moléculaire $[M + H]^+$ à 1061 en SM par désorption/ionisation chimique. Son spectre de ^1H -RMN (500 MHz; Fig. 1), montre, sous forme nettement individualisée, entre 3,60 et 5,80 ppm, les 14 signaux attribuables aux protons méthylènes et méthynes de la partie glucidique de la molécule. Le d le plus déblindé, à 5,74 ppm, est attribuable au $\text{H}-\text{C}(1'')$ anomérique d'un β -D-glucose impliqué dans une liaison hétéroside de phénol. Des expériences de double-irradiation ont permis de déterminer que ce signal couple avec un dd centré sur 3,92 ppm, attribuable au $\text{H}-\text{C}(2'')$ dont la position à champ fort permet de déduire que le $\text{C}(2'')$ est impliqué dans une liaison hétérosidique.

La faible différence de déplacement chimique ($\Delta\delta < 0,05$ ppm) existant entre un certain nombre de signaux a cependant rendue délicate leurs attributions et celles-ci n'ont pu être effectuées sans ambiguïté qu'après RMN multiimpulsionnelle à 270 MHz en utilisant une séquence COSY 90° [12] (Fig. 2). L'examen des déplacements chimiques et des constantes de couplage des signaux des protons de la seconde unité osidique ayant confirmé une structure de β -D-glucose, une structure de sexangularétinyle-3- O β -D-sophoroside (**1**) a été attribuée à l'hétéroside nouveau étudié. Cette structure est en parfait accord avec les données obtenues en ^{13}C -RMN (voir *Partie Expér.*), en particulier avec la résonance à champ faible (82,4 ppm) du signal attribuable à $\text{C}(2'')$ [6] [7] [13] [14].

Le second hétéroside nouveau isolé des étamines de *Paeonia tenuifolia*, **3**, n'a pas été obtenu à l'état cristallisé, $[\alpha]_D^{20} = -10^\circ$ (MeOH, $c = 0,1$). Il présente des caractéristiques spectrales voisines de l'hétéroside **1** mais s'en distingue par son SM présentant un ion moléculaire $[M + H]^+$ à 671 compatible avec la formule brute $\text{C}_{29}\text{H}_{34}\text{O}_{18}$ et par son spectre UV qui indique la présence de deux substituants oxygénés sur le noyau B de la génine. Par hydrolyse acide, cet hétéroside fournit du glucose et une génine identifiée à la limocitrine (= tétrahydroxy-3,5,7,4'-diméthoxy-8,3'-flavone) par ses caractéristiques physiques et spectrales [15]. Une comparaison des spectres UV de la génine et de l'hétéroside a permis de mettre en évidence que, chez ce dernier, seul l' $\text{OH}-\text{C}(3)$ était impliqué dans une liaison hétérosidique.

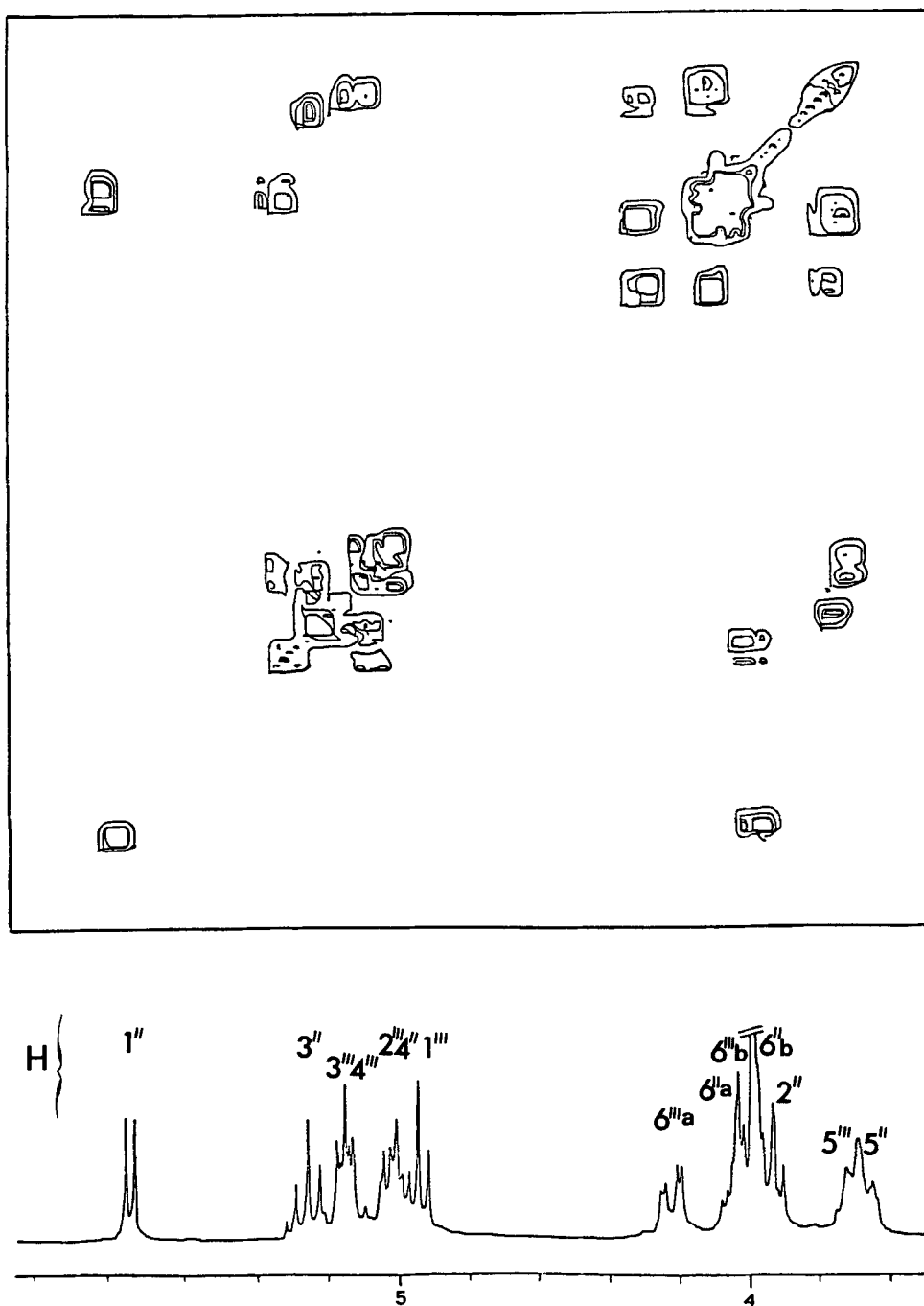
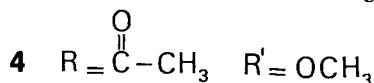
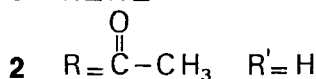
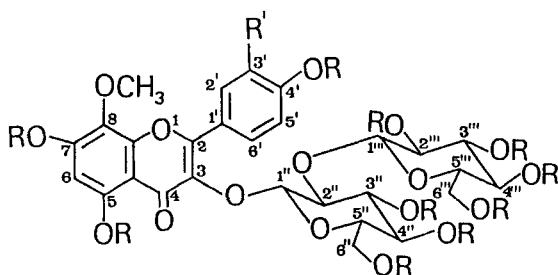


Fig. 2. Spectre de RMN de 2, corrélation ^1H , ^1H 2D COSY 90° (270 MHz), région des protons glucidiques (3,60 à 5,80 ppm)

Par acétylation de **3**, on obtient un dérivé décaacétylé **4** caractérisé par un ion moléculaire $[M + H]^+$ à 1091 en SM. Le spectre de ^1H -RMN de **4** présente, entre 3,60 et 5,90 ppm, une série de signaux pratiquement identique à celle observée pour **2**. L'ensemble de ces données a permis d'attribuer à ce second hétéroside nouveau une structure de limocitrinyle-3-*O* β -D-sophoroside (**3**).



Discussion. – Les deux hétérosides isolés des étamines de *Paeonia tenuifolia* possèdent une génine de type hydroxy-3-méthoxy-8-flavones. Ces dérivés, peu répandus dans la nature, sont décrits ici pour la première fois chez la famille des Paeoniacées. Des diglucosides de ce type n'ont d'ailleurs été antérieurement décrits, à notre connaissance, que chez *Evodia madagascariensis* BAKER (Rutacées) [16], mais le mode d'enchaînement des sucres n'en avait pas été précisé.

La partie structurale de ce travail a été effectuée lors d'un stage à l'Université Paris V de l'une d'entre-nous (D.S.) qui remercie l'Unité des Sciences de Serbie pour une bourse d'études. Nous remercions par ailleurs le Docteur Muriel Delepierre (Département de Chimie organique de l'Université Paris V) pour son aide lors de la programmation de certaines expériences de RMN et le Docteur Georges Massiot (Département de Pharmacognosie de l'Université de Reims) pour l'enregistrement du spectre de ^{13}C -RMN.

Partie expérimentale

Généralités. $[\alpha]_D$ (MeOH): polarimètre électronique Perkin-Elmer 141. Spectres UV (MeOH; λ_{max} en nm (log ϵ)): spectrophotomètre Unicam SP800. Spectres de ^1H -RMN (δ en ppm par rapport au TMS, J en Hz): spectromètre Bruker WH 270 à 270 MHz ou AM 500 à 500 MHz. Spectre de ^{13}C -RMN: spectromètre Bruker AM 300 à 75 MHz. SM (m/z , % de l'ion de base): spectrographe Nermag R-10-10-G en impact électronique ou en désorption/ionisation chimique en utilisant NH_3 comme gaz réactant.

Extraction et isolement des flavonoïdes. Les échantillons de *Paeonia tenuifolia* étudiés ont été récoltés à Deliblatska pescara (Yougoslavie) en mai 1986. Un échantillon d'herbier est conservé au Musée de Matière Médicale de la Faculté de Pharmacie de Paris (France). L'extraction des hétérosides est réalisée selon un procédé classique [17]. Les étamines séchées et pulvérisées (140 g) sont épuisées par EtOH, puis par EtOH/ H_2O 1:1, dans un appareil de Soxhlet. Les deux extraits réunis sont concentrés sous pression réduite jusqu'à consistance sirupeuse, puis repris par 300 ml d'eau bouillante. Après refroidissement et filtration, la soln. aq. est épuisée par Et₂O (10 $\times$ 200 ml), EtOAc (10 $\times$ 200 ml) et BuOH (10 $\times$ 200 ml). L'extrait butanolique, particulièrement riche en flavonoïdes, a permis, après évaporation, reprise du résidu par EtOH/ H_2O 1:1 et chromatographie prép. sur papier Whatman n° 1 (BuOH/AcOH/ H_2O 4:1:5 (v/v)), d'isoler les hétérosides majoritaires **1** (54 mg) et **2** (18 mg).

Sexangularétinyle-3-O β-D-sophoroside (= {[O-(β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-β-D-glucopyranosyl]oxy}-3-dihydroxy-5,7-(hydroxy-4-phényl)-2-méthoxy-8-4H-benzopyran-1-one-4; **1**). $[\alpha]_D^{20} = -18^\circ$ ($c = 0,1$). UV: 275 (3,80), 361 (3,51). UV (+AlCl₃): 283 (3,83), 312 (3,63), 356 (3,66), 412 (3,48). UV (+AlCl₃ + HCl): 283 (3,80), 312 (3,60), 352 (3,64), 412 (3,43). UV (+NaOAc): 284 (3,90), 396 (3,50). UV (+NaOAc + H₃BO₃): 276 (3,77), 360 (3,49). UV (+MeONa): 284 (3,89), 334 (3,64), 412 (3,73). ¹H-RMN (270 MHz, (D₆)DMSO): 8,08 (*d*, *J* = 9, H-C(2')), H-C(6'')); 6,97 (*d*, *J* = 9, H-C(3'), H-C(5'')); 6,26 (*s*, H-C(6)); 5,73 (*d*, *J* = 7,5, H-C(1'')); 4,67 (*d*, *J* = 8, H-C(1'')); 3,86 (*s*, OCH₃); 5,50–2,75 (*m*, sophorosyl). ¹³C-RMN (75 MHz, (D₆)DMSO, écho de spin): 177,6 (C(4)); 160,0 (C(4'')); 156,0 (C(2), C(7)); 154,9 (C(5)); 148,3 (C(9)); 133,8 (C(3)); 130,6 (C(2''), C(6'')); 127,9 (C(8)); 121,2 (C(1'')); 115,4 (C(3''), C(5'')); 104,0 (C(1'')); 103,0 (C(10)); 99,7 (C(6)); 98,2 (C(1'')); 82,4 (C(2'')); 77,4 (C(5'')); 77,0 (C(5'')); 76,6 (C(3'')); 74,4 (C(2'')); 72,5 (C(3'')); 69,8 (C(4'')); 69,6 (C(4'')); 60,9 (C(6'')); 60,8 (OCH₃); 60,7 (C(6'')). SM (D-IC): 641 ([M + H]⁺).

Hydrolyse de 1. L'hétéroside **1** (10 mg) est additionné de 5 ml de HCl 2N, le milieu réactionnel est porté à reflux pendant 45 min, refroidi, puis extrait par Et₂O (3 × 5 ml). La phase aq., après neutralisation par addition de résine Amberlite IR 45 OH, permet la caractérisation du glucose par CCM. L'évaporation de Et₂O fournit la sexangularétine. UV et SM (IE): identiques aux données publiées [4]. ¹H-RMN (270 MHz, (D₆)DMSO): 12,17 (*s*, éch. D₂O, HO-C(5)); 10,16, 9,47 (2*s* larges, éch. D₂O, HO-C(7), HO-C(4'')); 8,06 (*d*, *J* = 9, H-C(2'), H-C(6'')); 6,96 (*d*, *J* = 9, H-C(3'), H-C(5'')); 6,26 (*s*, H-C(6)); 3,84 (*s*, OCH₃).

Acétylation de 1. Une soln. de **1** (10 mg) dans 0,5 ml de pyridine est additionnée de 0,5 ml d'Ac₂O. Le mélange est abandonné 72 h à 20°. Après évaporation et chromatographie sur colonne de silice, le dérivé décaacétylé **2** (14 mg) est obtenu. Laque incolore. ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): 8,05 (*d*, *J* = 9, H-C(2'), H-C(6'')); 7,25 (*d*, *J* = 9, H-C(3'), H-C(5'')); 6,78 (*s*, H-C(6)); 5,74 (*d*, *J* = 7,5, H-C(1'')); 5,24 (*t*, *J* = 9, H-C(3'')); 5,15 (*t*, *J* = 9, H-C(3'')); 5,13 (*t*, *J* = 9, H-C(4'')); 5,01 (*dd*, *J* = 9,8, H-C(2'')); 4,99 (*t*, *J* = 9, H-C(4'')); 4,91 (*d*, *J* = 8, H-C(1'')); 4,21 (*dd*, *J* = 12,5, 3,5, H_a-C(6'')); 4,04 (*dd*, *J* = 12,5, 3,5, H_a-C(6'')); 4,00 (*dd*, *J* = 12,5, 2,5, H_b-C(6'')); 3,98 (*s*, OCH₃); 3,97 (*dd*, *J* = 12,5, 2,5, H_b-C(6'')); 3,92 (*dd*, *J* = 9, 7,5, H-C(2'')); 3,68 (*ddd*, *J* = 9, 3,5, 2,5, H-C(5'')); 3,64 (*ddd*, *J* = 9, 3,5, 2,5, H-C(5'')); 2,44, 2,38, 2,36 (3*s*, 3ArOAc); 2,09, 2,03, 2,01, 2,00, 1,99, 1,98, 1,90 (7*s*, 7ROAc). SM (D-IC): 1061 ([M + H]⁺).

Limocitrinyle-3-O β-D-sophoroside (= {[O-(β-D-glucopyranosyl)-(1→2)-β-D-glucopyranosyl]oxy}-3-dihydroxy-5,7-(hydroxy-4-méthoxy-3-phényl)-2-méthoxy-8-4H-benzopyran-1-one-4; **3**). $[\alpha]_D^{20} = -10^\circ$ ($c = 0,1$). UV: 257 (3,46), 275 (3,52), 364 (3,33). UV (+AlCl₃): 283 (3,57), 310 (3,32), 364 (3,37), 420 (3,34). UV (+AlCl₃ + HCl): 283 (3,60), 310 (3,35), 364 (3,46), 420 (3,38). UV (+NaOAc): 284 (3,55), 330 (3,13), 395 (3,05). UV (+NaOAc + H₃BO₃): 276 (3,49), 364 (3,28). UV (+MeONa): 283 (3,63), 348 (3,29), 422 (3,56). ¹H-RMN (270 MHz, (D₆)DMSO): 7,86 (*d*, *J* = 2, H-C(2'')); 7,69 (*dd*, *J* = 9, 2, H-C(6'')); 6,91 (*d*, *J* = 9, H-C(5'')); 6,25 (*s*, H-C(6)); 5,73 (*d*, *J* = 7,5, H-C(1'')); 4,65 (*d*, *J* = 8, H-C(1'')); 3,84, 3,79 (2*s*, 2 OCH₃); 5,60–2,70 (*m*, sophorosyl). SM (D-IC): 671 ([M + H]⁺).

Hydrolyse de 3. L'hétéroside **3** (5 mg), hydrolysé dans les conditions décrites pour **1**, permet la caractérisation du glucose (CCM) et l'isolement de la limocitrine, UV: identique aux données publiées [15]. ¹H-RMN (270 MHz, (D₆)DMSO): 12,14 (*s*, éch. D₂O, HO-C(5)); 9,86, 9,35 (2*s* larges, éch. D₂O, HO-C(7), HO-C(4'')); 7,78 (*d*, *J* = 2, H-C(2'')); 7,74 (*dd*, *J* = 9; 2, H-C(6'')); 6,97 (*d*, *J* = 9, H-C(5'')); 6,27 (*s*, H-C(6)); 3,81, 3,80 (2*s*, 2 OCH₃). SM (IE): 346 (*M*⁺, 60), 331 (100), 317 (10), 169 (12), 168 (20), 167 (25), 139 (40), 132 (65).

Acétylation de 3. L'hétéroside **3** (8 mg), acétylé dans des conditions identiques à celles décrites pour **1**, permet d'obtenir le dérivé décaacétylé **4** (11 mg). Laque incolore. ¹H-RMN (500 MHz, CDCl₃): 7,70 (*dd*, *J* = 9, 2, H-C(6'')); 7,68 (*d*, *J* = 2, H-C(2'')); 7,16 (*d*, *J* = 9, H-C(5'')); 6,81 (*s*, H-C(6)); 5,82 (*d*, *J* = 7,5, H-C(1'')); 5,27 (*t*, *J* = 9, H-C(3'')); 5,15 (*t*, *J* = 9, H-C(3'')); 5,11 (*t*, *J* = 9, H-C(4'')); 5,01 (*t*, *J* = 9, H-C(4'')); 4,98 (*dd*, *J* = 9, 8, H-C(2'')); 4,95 (*d*, *J* = 8, H-C(1'')); 4,16 (*dd*, *J* = 12,5, 3,5, H_a-C(6'')); 4,10 (*dd*, *J* = 12,5, 3,5, H_a-C(6'')); 4,00 (*dd*, *J* = 12,5, 2,5, H_b-C(6'')); 3,98 (*s*, OCH₃); 3,95 (*dd*, *J* = 12,5, 2,5, H_b-C(6'')); 3,93 (*s*, OCH₃); 3,89 (*dd*, *J* = 9, 7,5, H-C(2'')); 3,70 (*ddd*, *J* = 9, 3,5, 2,5, H-C(5'')); 3,67 (*ddd*, *J* = 9, 3,5, 2,5, H-C(5'')); 2,45, 2,38, 2,36 (3*s*, 3ArOAc); 2,09, 2,03, 2,01, 2,00, 2,00, 1,99, 1,90 (7*s*, 7ROAc). SM (D-IC): 1091 ([M + H]⁺).

BIBLIOGRAPHIE

- [1] F. C. Stearn, 'A Study of the Genus *Paeonia*', Royal Horticultural Society, London, 1946.
- [2] A. Cullen, V. H. Heywood, 'Paeoniaceae', in 'Flora europaea', Eds. T. G. Tutin, V. H. Heywood, N. A. Burges, D. H. Valentine, S. M. Walters et D. A. Webb, Cambridge University Press, Cambridge, 1964, Vol. 1, pp. 243–244.
- [3] A. Grouiller, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **1966**, 2405.
- [4] H. Combier, K. Markham, H. Audier, P. Lebreton, T. Mabry, M. Jay, *C. R. Acad. Sci. Paris* **1968**, 266D, 2495.
- [5] T. J. Mabry, K. R. Markham, M. B. Thomas, 'The Systematic Identification of Flavonoids', Springer-Verlag, Berlin–New York, 1970.
- [6] K. R. Markham, 'Techniques of Flavonoid Identification', Academic Press, London–New York, 1982.
- [7] K. Bock, H. Thøgersen, *Annual Rep. NMR Spectrosc.* **1982**, 13, 1.
- [8] L. D. Hall, in 'The Carbohydrates', Eds. W. Pigman et D. Horton, Academic Press, New York, 1980, Vol. 1B, p. 1299.
- [9] C. Lavaud, 'Détermination de structure de saponines par RMN multiimpulsionnelle. Application aux saponines de Luzerne', Thèse Sci. Pharm., Université de Reims, 1986.
- [10] G. Massiot, C. Lavaud, D. Guillaume, L. Le Men-Olivier, G. Van Binst, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1986**, 1485.
- [11] W. K. Andersen, A. A. Omar, S. B. Christensen, *Phytochemistry* **1987**, 26, 291.
- [12] R. Benn, H. Günther, *Angew. Chem.* **1983**, 95, 381.
- [13] J. B. Harborne, T. J. Mabry, 'The Flavonoids, Advances in Research', Chapman and Hall, London, 1982.
- [14] T. S. Wu, H. Furukawa, *Phytochemistry* **1983**, 22, 1061.
- [15] R. M. Horowitz, B. Gentili, *J. Org. Chem.* **1961**, 26, 2899.
- [16] J. Gleye, C. Moulis, M. N. Doazan, *Pl. Med. Phytother.* **1983**, 17, 92.
- [17] G. Nétien, P. Lebreton, *Ann. Pharm. Fr.* **1964**, 22, 69.