

ISOETINE, NOUVELLE FLAVONE ISOLEE DE *Isoetes delilei* ET DE *Isoetes durieui*

BERNARD VOIRIN et MAURICE JAY

Laboratoire de Phytochimie, Département de Biologie Végétale, UER des Sciences de la Nature,
Université Claude Bernard Lyon I, 43 Boulevard du 11 Novembre 1918,
69621, Villeurbanne, France

et

MARCELLE HAUTEVILLE

Laboratoire de Chimie Biologique, UER de Chimie-Biochimie, Université Claude Bernard, Lyon I,
43 Boulevard du 11 Novembre 1918, 69621, Villeurbanne, France

(Received 11 June 1974)

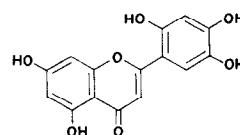
Key Word Index—*Isoetes delilei*; *Isoetes durieui*; Isoetales; Lycopsida; pteridophytes; flavonoïd; isoetin; 2',4',5,5',7-pentahydroxy-flavone.

Abstract—A new flavone isolated from *Isoetes* has been identified as 2',4',5,5',7-pentahydroxy flavone.

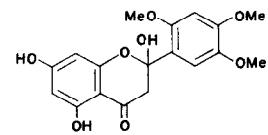
Au cours d'une révision du chimisme des Lycopodiées, nous avons isolé chez deux *Isoètes*, *I. delilei* Rothm. et *I. durieui* Bory, une nouvelle flavone naturelle, pour laquelle nous proposons le nom d'isoétine.

Obtenue à partir d'un hydrolysat de frondes, l'isoétine présente en milieu méthanolique neutre, des propriétés spectrophotométriques tout à fait particulières pour une flavone (voir en particulier bande 1): λ_{max} (256), 264, 288, 374 nm. L'emploi des réactifs classiques [1,2] permet de situer un -OH en position 5 (déplacement bathochrome de 34 nm de la bande 1 en présence de $\text{AlCl}_3 + \text{HCl-MeOH}$) et un système *ortho*-diOH sur le phényle latéral (déplacement bathochrome de 23 nm de la bande 1 en présence de $\text{NaOAc} + \text{H}_3\text{BO}_3-\text{MeOH}$). La structure est presque définitivement assise à la lecture du spectre de RMN [3,4] qui signale la présence de 5 protons aromatiques situés respectivement en 6 et en 8 pour le noyau A (d 6,15 ppm, J 2,5 Hz; d 6,45 ppm, J 2,5 Hz), en 3 pour l'hétérocycle (s 6,36 ppm), et en 3' et 6' ou en 2' et 5' pour le noyau B (s 6,61 ppm; s 7,21 ppm); en raison des règles de nomenclature, le premier mode de substitution doit être retenu. Il s'agit donc d'une flavone pentahydroxylée ce que confirme pleinement le spectre de masse [5] avec un pic

moléculaire à 302 et des ions fragments situés en valeurs m/e à 153 (noyau A diOH) et à 150 (noyau B triOH). L'ensemble des données précédentes permet donc d'attribuer à l'isoétine la structure suivante: pentaOH-2',4',5,5',7 flavone (1). Cette dernière existe à l'état naturel sous forme hétérosidique, probablement glucosyl-5' isoétine.



Isoetin (1)



(2)

La structure de l'isoétine a de plus été confirmée par confrontation spectrophotométrique et chromatographique avec le produit de synthèse. Ce dernier a été préparé en utilisant la méthode mise au point par l'un d'entre nous pour la préparation de diOH-2,5 flavanones [6] qui, par déshydration, conduisent facilement aux flavones correspondantes. La première étape consiste à effectuer la transposition de Baker-Venkataraman de la tri-(triméthoxy-2',4',5'-benzoyloxy)-2,4,6 acétophénone en modifiant les conditions expérimentales habituellement employées pour ce type de réaction de manière à éviter la double transposition généralement observée à partir des diaroyloxy-2,6

acétophénones [7-10]. Le diméthylsulfoxyde choisi comme solvant nous a donné de bons résultats pour cette transformation. Le produit de transposition (**2**), traité en milieu acide, conduit par déshydratation à la diOH-5,7 triOMe-2',4',5' flavone non encore décrite. La déméthylation de cette dernière par le chlorhydrate de pyridine donne finalement l'isoétine synthétique (**1**) dont les relevés spectraux UV-visible, IR et le comportement chromatographique sont en tout point identiques à ceux du composé naturel.

Il est à noter que Hörhammer *et al.* [11], au cours de l'étude sur la *p*-oxydation 3',6' du noyau B de flavonoïdes, avaient été amenés à synthétiser la pentaOH-2',4',5,5',7 flavone dont seul le point de fusion avait alors été donné. A leur voie de synthèse, nous avons préféré une méthode plus rapide applicable à la synthèse des OH-5 flavones.

PARTIE EXPERIMENTALE

Matériel. *I. delilei* a été récolté dans la région de Montpellier (Hérault, France) et *I. durieu* aux environs de Saint-Raphaël (Var, France).

Technique: Les frondes séches (40 g de chaque espèce) sont hydrolysées par fraction de 3 g selon la technique du laboratoire [12]; les aglycones flavoniques sont extraits par Et₂O. Après évaporation du solvant, le résidu sec repris par le MeOH est chromatographié sur colonne de polyamide (Macherey Nagel SC6) avec élution par du C₆H₆ progressivement enrichi en MeCOEt puis en MeOH. L'examen en CCM de polyamide (Macherey Nagel DC11, solvant C₆H₆-MeCOEt-MeOH: 4:3:3) des diverses fractions obtenues montre que les dernières fractions contiennent le nouveau flavonoïde, l'isoétine. Ce composé cristallisé dans le MeOH apparaît comme une poudre brune. Fluorescence: en CCM polyamide: jaune-brun, en CP cellulose, solvant acide jaune, R_f CP Whatman no. 1, Forestal: 0,46; B.A.W.: 0,74; T.B.A.: 0,68; AcOH 60%: 0,40; CCM polyamide Macherey Nagel DC 11, C₆H₆-MeCOEt-MeOH: 4:3:3:0,1. λ_{max} nm: MeOH: (256), 264, (288), (306), 374; + NaOAc: 261, (313), 426 inst.; + NaOAc + H₃BO₃ instantané: 266, (292), (312), 397; + AlCl₃: 270, (296), (334), 441; + AlCl₃ + HCl: 272, (295), (324), 408; + NaOH: 262, (314), (434). SM: pics principaux en valeurs m/e: 302 (100%), 301 (5%), 285 (7%), 274 (6%), 153 (18%), 151 (8%), 150 (10%). RMN in CCl₄ après triméthysylation des -OH selon [3]. HA 100: H-3 (s, 6,36)*, H-6 (d, 6,15 J 2,5 Hz); H-8 (d, 6,45 J 2,5 Hz); H-3' (s, 6,61); H-6' (s, 7,21).

Glycoside d'isoétine:-isolement: 10 g de frondes séches d'*I. delilei* sont soumises à une extraction hydrométhanolique (1:1); l'extrait chromatographié sur papier Whatman No. 3 dans le BuOH-AcOH-H₂O (4:1:5) montre plusieurs bandes de fluorescence violette en lumière de Wood dont une de R_f 0,49. L'élution de cette dernière par le mélange MeOH-H₂O (1:1) libère un glycoside dont on assure l'ultime purification par passage sur colonne de polyamide SC6 Macherey Nagel avec élution par du C₆H₆ enrichi en MeOH; l'évaporation spontanée de

l'éluant entraîne la cristallisation de 4 mg d'un composé jaune. R_f: CP Whatman No. 1: Forestal 0,54; B.A.W. 0,49; T.B.A. 0,41; AcOH 0,42; CCM polyamide Macherey Nagel DC11 0,1. λ_{max} nm: MeOH: 256, 265, (288), 362; + NaOAc: 267, (274), 402, + NaOAc + H₃BO₃: (257), 265, 367; + AlCl₃: 267, 274, (294), 368; + AlCl₃ + HCl: spectre identique au précédent; + NaOH: 266, (272), (314), 414 stable.

Perméthylation 1 mg du composé est perméthylé selon la technique de Brimacombe *et al.* [13]. Après chromatographie sur gel de silice dans le solvant CCl₄-Me₂CO 8:2, la bande principale de R_f 0,15 correspondant au composé perméthyle est éluée. SM: pics principaux en valeurs m/e M 576, 545, 523, 427, 415, 372 (aglycone perméthylé), 343, 329, 218 (UN glucose méthylé), 187, 181 (noyau A méthylé après RDA), 178 (noyau B méthylé après RDA), 155, 149, 111, 101, 71.

Hydrolyse acide. Après hydrolyse acide (HCl 2 N 20 min à 100°) de 1 mg de composé, et extraction des aglycones par AcOEt, on neutralise la phase aqueuse résiduelle par passage sur résine Amberlite; les sucres sont alors traités selon la technique de Oades [14] et les acétates d'alditol identifiés par CPG (support gaz chrom Q, phase ECNSS-M 3% gaz vecteur N₂, isotherme 190°); le seul sucre libéré par hydrolyse de l'hétéroside d'Isoétine présente un temps de rétention analogue à celui du glucose témoin. L'aglycone libéré et extrait par AcOEt se révèle en tout point comparable (valeurs spectrales et chromatographiques) à l'isoétine. L'hétéroside apparaît donc comme un mono-O glucoside d'isoétine. Au vu de son comportement spectrophotométrique en présence des divers réactifs, et en particulier, en l'absence de déplacement bathochrome dans l'H₃BO₃ + NaOAc le glucose peut être placé en position 4' ou 5' sur le phényle latéral. Il nous est difficile de trancher de manière absolue entre les deux termes de l'alternative, cependant aussi bien les valeurs des déplacements spectraux enregistrées sur la bande 1 en présence de NaOAc et de NaOH que, pour ce dernier réactif, l'amplitude de cette même bande, militent en faveur d'un hydroxyle libre en 4', et par conséquent, d'une glucosylation en 5'.

Synthèse. *Tri(triméthoxy-2',4',5'-benzoyloxy)-2,4,6 acétophénone.* A 2 g (11,9 mmol) de phloracétophénone dissous dans la pyridine anhydre sont ajoutés 8,2 mg (39,9 mmol) de chlorure de triméthoxy-2,4,5 benzoyle fraîchement préparé selon la méthode décrite par Haraszti [15]. Le mélange abandonné 12 h à température ambiante, est versé sur de la glace additionnée d'HCl 6 N (pH du milieu environ 6). Le précipité apparu est repris par AcOEt. Pour éliminer l'acide triméthoxy-2,4,5 benzoylique formé, l'extrait AcOEt est lavé par une solution saturée de NaHCO₃. Après évaporation du solvant, on obtient une huile incristallisable que l'on soumet directement à la transposition de Baker-Venkataraman.

Dihydroxy-5,7 triméthoxy-2',4',5' flavone. (a) 1 g de l'huile précédemment obtenue, séchée sous vide en présence de P₂O₅, est dissoute dans 10 cm³ de DMSO et additionnée d'environ 6 g de NaOH pulvérisée sous éther anhydre. Le mélange, laissé sous agitation à température ambiante pendant 5 min, est versé sur glace puis abandonné pendant 20 mn avant d'être neutralisé par AcOH à froid. La solution verdâtre obtenue est extraite par AcOEt; cet extrait est lavé par une solution saturée de NaHCO₃ puis à l'eau jusqu'à neutralité. Une chromatographie dans le solvant C₆H₆-AcOEt-Me₂CO 7:1:2 sur gel de silice montre la présence d'un produit majeur de R_f 0,46 réagissant immédiatement en rouge violet à la benzidine bisdiazotée, de manière analogue aux dihydroxy-2,5 flavanones synthétisées ultérieurement [6]. La cristallisation de ce produit (**2**) s'avérant difficile, nous avons effectué un traitement de déshydratation du résidu sec obtenu à partir de l'extrait AcOEt. (b) Ce résidu sec est additionné de 20 cm³ de H₂SO₄ et de AcOH (1:4) et

* Déplacements chimiques en ppm (échelle δ) par rapport au TMS.

porté au bain marie bouillant pendant 10 mn. Le milieu devenu rouge-orangé est refroidi puis neutralisé par NaOH 5 N; le précipité formé, essoré, lavé à l'eau puis cristallisé deux fois dans AcOH donne 300 mg de dihydroxy-5,7 triméthoxy-2',4',5' flavone F295-305° (dec.); Analyse C₁₈H₁₆O₇ calc. C 62,79%; H 4,68%; tr. C 62,61%; H 4,66%; λ_{max} nm: MeOH: 255, (261), 285, 362; log ε 255 = 4,32, log ε 362 = 4,29; + AlCl₃: 265, 293, 402; + NaOAc: (260), 265, 369. SM principaux pics en valeurs *m/e*: 344 (100%), 329 (10%), 315 (5%), 313 (3%), 301 (8%), 192 (M-noyau A, 5%), 153 (M-noyau B, 20%).

Pentahydroxy-2',4',5,5',7-flavanone (1): 200 mg du composé précédent sont traités par le chlorhydrate de pyridine sous vide à 180-200° pendant 1 hr. Le précipité obtenu après addition d'eau est cristallisé 2 fois dans le mélange C₆H₆-MeOH (1:1) et donne 78 mg d'isoétine (rendement 45%). Spectres UV-vis., IR sont identiques à ceux de l'isoétine naturelle.

BIBLIOGRAPHIE

- Jurd, L. (1962) in: *The Chemistry of Flavonoids Compounds* (Geissman, T. A., ed.), p. 107, Pergamon Press, Oxford.
- Markham, K. R. and Mabry, T. J. (1968) *Phytochemistry* **7**, 1197.
- Mabry, T. J., Kagan, J. et Rösler, H. (1965) *Phytochemistry* **4**, 487.
- Mabry, T. J., Markham, K. R. et Thomas, M. B. (1970) *The Systematic Identification of Flavonoids*, Springer, New York.
- Audier, H. (1966) *Bull. Soc. Chim. Fr.* 2892.
- Hauteville, M., Chadenson, M. et Chopin, J. (1973) *Bull. Soc. Chim. Fr.* 1784.
- Baker, W. (1933) *J. Chem. Soc.* 1381.
- Looker, J. H. et Hanneman, W. W. (1962) *J. Org. Chem.* **27**, 3261.
- Pandit, S. S. et Sethna, S. (1950) *J. Indian Chem. Soc.* **27**, 1.
- Srimannarayana, G. et Rao, N. V. S. (1968) *Indian J. Chem.* **12**, 6.
- Hörhammer, L., Wagner, H., Rösler, H., Keckelsen, M. et Farkas, L. (1965) *Tetrahedron* **21**, 969.
- Lebreton, Ph., Jay, M., Voirin, B. et Bouchez, M. P. (1967) *Chim. Anal. Fr.* **49**, 375.
- Brimacombe, J. S., Jones, B. D., Stacey, M. et Willard, J. J. (1966) *Carbohydrate Res.* **2**, 167.
- Oades, J. M. (1967) *J. Chrom.* **28**, 246.
- Haraszti, J. (1931) *Chem. Abstr.* **25**, 5154.