

CONTRIBUTION À L'ÉTUDE STRUCTURALE DES COMPOSÉS DE *CENTAUREA DIMORPHA*

N. DAMAK, H. GHORBEL, A. BAHROUN, M. DAMAK *,
A. Mc KILLOP **, M. SIMMONDS ***

* *Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, Faculté des Sciences de Sfax, BP 763, 3038 Sfax, Tunisie*

** *School of Chemical Sciences, University of East Anglia, Norwich NR 4 7TJ, England*

*** *Jodrell Laboratory, Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Surrey TW 9 3AB, England*

(Soumis en mai 1998, accepté en juin 1999)

ABSTRACT: Three extracts from flowers and stems of *Centaurea dimorpha* showed anti-Giardia, anti-oxydant, anti-inflammatory and anti H.I.V. activities. Two lignans, one alcane and four triterpens have been isolated from flowers and leaves of *Centaurea dimorpha* (Asteraceae). By means of spectroscopic methods (MS, IR, UV, ^1H and ^{13}C NMR and NOE difference sequence), their structures were established as arctigenin, arctigenin-4'-glucoside, tricosane, β -amyrin, taraxasterol, sitosterol-3-O- β -D-glucoside and poriferasterol.

Key Word Index: *Centaurea dimorpha* ; Asteraceae ; flowers ; leaves ; stems ; lignans ; alcane ; triterpens.

RÉSUMÉ: Les extraits bruts des fleurs et des tiges de *Centaurea dimorpha* ont montré des activités anti-Giardia, antioxydantes, anti-inflammatoires et anti H.I.V. Deux lignines, un alcane et quatre triterpènes, ont été isolés à partir des fleurs et des feuilles de *Centaurea dimorpha* (Asteracées). Leurs structures ont été établies grâce aux données spectroscopiques (Masse, IR, UV, RMN du ^1H et du ^{13}C et NOE différence). Il s'agit de l'arctigénine, le 4'-glucoside arctigénine, le tricosane, la β -amyrine, le taraxastérol, le 3-O- β -D-glucoside sitostérol et le poriferastérol.

I- INTRODUCTION

Le genre *Centaurea*, de la famille des asteracées est assez bien représenté dans la flore de Tunisie. Il comprend plusieurs espèces [1,2], telles que *Centaurea alexandrina*, *Centaurea cyanus*, *Centaurea jacea*... Les études chimiques entreprises sur un certain nombre de ces espèces ont montré essentiellement la présence de lignines, de flavonoïdes et de triterpènes. L'espèce *Centaurea dimorpha*, qui n'a jamais fait l'objet d'études chimiques auparavant, a été choisie, pour ses vertus thérapeutiques, rapportées par la médecine populaire et suite à un screening sur les plantes tunisiennes à alcaloïdes [3]. En effet, la plante est connue pour ses propriétés astringentes et diurétiques.

* A qui toute correspondance peut être adressée.

II- RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

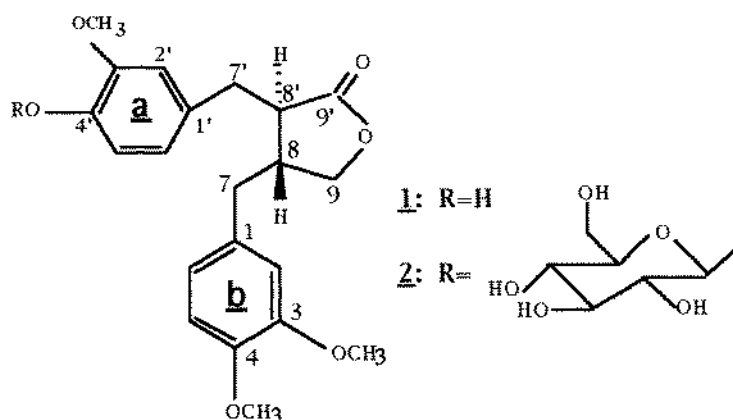
La chromatographie, aussi bien sur colonne à moyenne pression que sur CCE des extraits bruts, a permis d'isoler pour la première fois de *Centaurea dimorpha* sept composés tous identifiés à des produits connus. Il s'agit de deux lignines et un alcane isolés des fleurs et de quatre triterpènes isolés des feuilles.

COMPOSÉ 1 : C'est une lignine, isolée de l'extrait méthanolique en milieu alcalin des fleurs. Sa formule brute $C_{21}H_{24}O_6$ a été établie grâce à ses spectres de masse, de RMN du 1H et du ^{13}C .

L'analyse des spectres de RMN du 1H et du ^{13}C de **1**, montre la présence d'un signal vers 5,52 ppm, disparaissant par deutériation et attribué à un OH phénolique, de six protons aromatiques relatifs à deux noyaux aromatiques **a** et **b** trisubstitués en 1,3, 4 et d'un signal en RMN du ^{13}C à 178,73 ppm, attribué à un C=O ester lactonique.

L'attribution des déplacements chimiques aux différents protons aromatiques, a été réalisée en se basant sur les constantes de couplage et sur les effets électroniques des groupements OH et OMe [4]. De plus, une séquence NOE différence a montré que le noyau **a** est directement lié au carbone 7'. En effet, l'irradiation des protons portés par le carbone 7' à 2,89 ppm, affecte les deux protons aromatiques (2' et 6') portés par le noyau **a**.

Toutes ces données spectrales, ainsi que la comparaison avec celles de la littérature [5, 6] ont montré qu'il s'agit de l'arctigénine **1**.



COMPOSÉ 2 : Il a été isolé à partir du même extrait brut des fleurs au méthanol en milieu basique. Sa formule brute $C_{27}H_{34}O_{11}$ a été établie grâce à ses spectres de masse et de RMN du 1H et du ^{13}C .

Le spectre IR présente une bande intense vers 1763cm^{-1} , caractéristique d'une fonction ester lactonique, confirmée sur le spectre de RMN du ^{13}C par la présence d'un singulet à 179,13 ppm.

De plus, sur le spectre de RMN du ^{13}C , on note la présence de six signaux à 101,92; 76,17; 76,00; 73,27; 69,75 et à 61,70 ppm, caractéristiques d'un groupement glucoside.

La partie aromatique du spectre RMN du ^1H est constituée de six signaux relatifs à six protons, répartis par trois sur deux noyaux aromatiques trisubstitués en 1, 3, 4.

Grâce à ces données, ce composé a pu être identifié au 4'-glucoside arctigénine **2**.

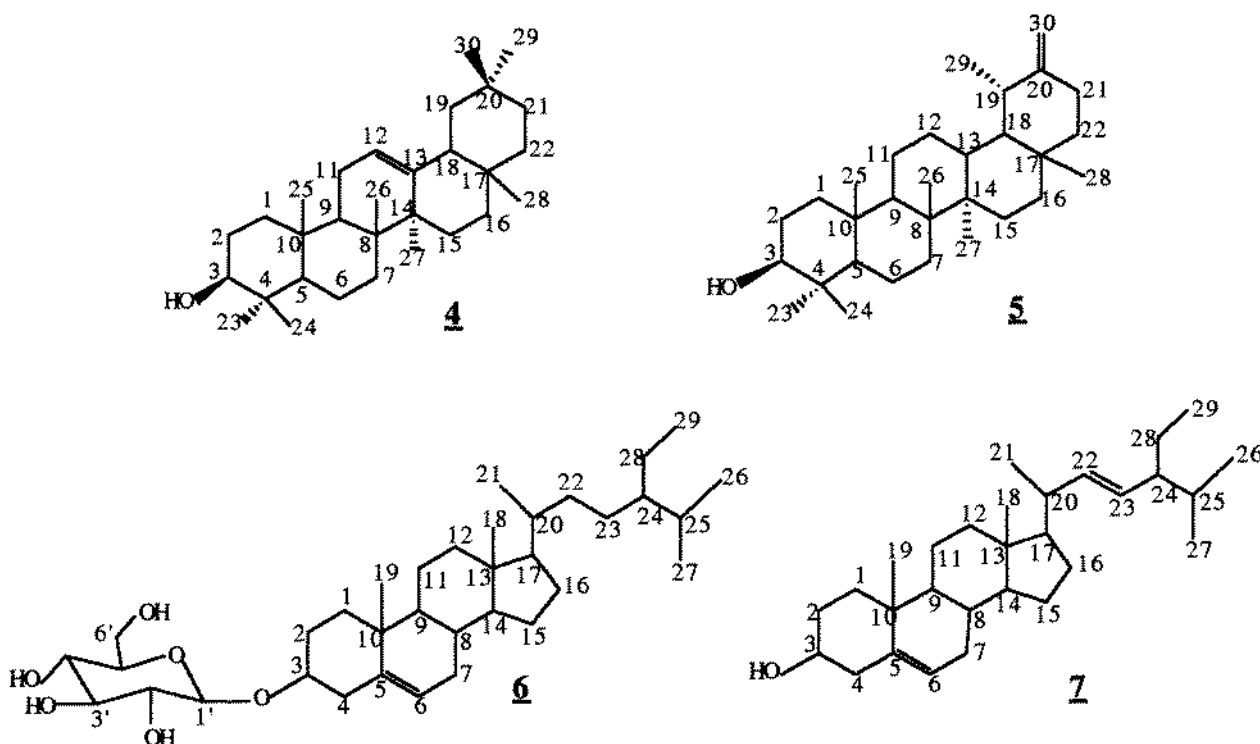
L'attribution des différents déplacements chimiques en RMN du ^1H et du ^{13}C a été réalisée par comparaison au composé **1**.

COMPOSÉ 3: Il a été isolé de l'extrait des fleurs à l'éther de pétrole par chromatographie sur colonne. Sa formule brute est $\text{C}_{23}\text{H}_{48}$. Son spectre de masse présente le pic moléculaire à $m/z = 324$, ainsi que des pics espacés de 14 unités de masse, caractéristiques d'un n-alcane.

L'ensemble des données spectrales (Masse, UV, RMN du ^1H et du ^{13}C), ainsi que la comparaison avec la littérature [7, 12] ont montré qu'il s'agit du tricosane **3**, $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{21}-\text{CH}_3$.

COMPOSÉS 4 À 7: À partir de l'extrait brut à l'éther de pétrole des feuilles, un mélange de deux triterpènes a été séparé et identifié à la β -amyrine **4** et au taraxastérol **5** grâce à leurs caractéristiques spectrales et par comparaison avec les données de la littérature [8, 9].

De la même façon deux autres triterpènes en mélange ont été isolés à partir de l'extrait brut au chloroforme en milieu basique. Il s'agit du 3-O- β -D-glucoside sitostérol **6** et du poriferastérol **7**. Ces deux structures ont été établies grâce à leurs caractéristiques spectrales (SM, RMN du ^1H et du ^{13}C) et par comparaison avec les données de la littérature [10, 11].



III- ACTIVITÉS BIOLOGIQUES

Les extraits des fleurs à l'éther de pétrole et au méthanol en milieu alcalin, ainsi que l'extrait des tiges au méthanol ont montré respectivement des activités anti-Giardia, antioxydantes et anti H.I.V. Quelques fractions issues des extraits des fleurs ont montré des activités anti-inflammatoires et antioxydantes.

IV- PARTIE EXPÉRIMENTALE

IV-1- Généralités

Les spectres IR ont été réalisés en film entre deux lames de NaCl sur un appareil SHIMADZU type "IR-470".

Les spectres UV ont été enregistrés sur un appareil SHIMADZU type "UV-2100", en solution dans l'éthanol ou l'hexane.

Les spectres de masse par LE ont été effectués sur spectrographe "KRATOS model MS 25 magnetic sector".

Les spectres de RMN du ^1H et du ^{13}C ont été enregistrés en solution dans CDCl_3 ou dans $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ respectivement à 270 MHz et à 68 MHz avec le TMS comme référence interne ($\delta = 0$) sur un appareil Jeol.JNM-EX270.

Les analyses en HPLC ont été effectuées sur un appareil SHIMADZU type "LC-10AS".

Les colonnes de fractionnement ont été préparées avec le gel de silice (Art 7754 Kieselgel 60 Korngröße 0,063-0,200mm, 70-230 Mesh ASTM; Merck). Les chromatographies sur couches épaisses et sur couches minces, ont été effectuées sur du gel de silice 60PF₂₅₄ (0,2mm; Merck).

IV-2-Extraction et séparation

La plante a été récoltée au mois de juin 1995 dans la région de Sfax (Tunisie). 300g des fleurs et 250g des feuilles prises séparément sont finement broyées après séchage à l'air libre et à l'ombre. La poudre obtenue est dégraissée à chaud par de l'éther de pétrole pendant 24 heures. Les deux solutions obtenues sont concentrées sous vide à sec. Ce qui a donné un résidu (7g, 2,36%) des fleurs et un autre (13g, 5,2%) des feuilles. Les deux marcs obtenus sont ensuite séchés à l'air libre puis humectés chacun par la moitié de sa masse en ammoniacque à 25%. Celui des feuilles est lixivié par le chloroforme à chaud pendant 30 heures, alors que celui des fleurs est lixivié par le méthanol à chaud pendant 52 heures. L'évaporation à sec des deux solutions a permis de recueillir un résidu pâteux (20g ; 9,66%) des fleurs et un autre (4,5g ; 1,8%) des feuilles.

Les extraits bruts obtenus, se présentent aussi bien en HPLC qu'en CCM sous forme de mélanges très complexes. Aussi, pour simplifier ces mélanges, et quelques fois les fractions qui en sont issues, plusieurs chromatographies sur colonne de silice ont été réalisées; utilisant l'hexane, puis des mélanges Hexane- CH_2Cl_2 de polarités croissantes et enfin des mélanges de CH_2Cl_2 -

MeOH de plus en plus polaires. Les fractions obtenues à partir de ces colonnes sont traitées par des chromatographies sur couche épaisse, pour séparer les produits à l'état pur. La pureté des produits obtenus a été vérifiée aussi bien par HPLC que par CCM.

Arctigénine 1: Rf (CH₂Cl₂-MeOH, 98-2 v/v) = 0,66. Rdt = 0,15%. RMN ¹H (CDCl₃, δ ppm): 6,44 (1H, d, J = 1,98 Hz, H-2); 6,52 (1H, dd, J₁ = 1,98 et J₂ = 8,25 Hz, H-6); 6,72 (1H, d, J = 8,25 Hz, H-5); 6,61 (1H, d, J = 1,98 Hz, H-2'); 6,58 (1H, dd, J₁ = 1,98 et J₂ = 7,92 Hz, H-6'); 6,80 (1H, d, J = 7,92 Hz, H-5'); 2,47-2,63 (4H, m, H-8', H-8 et CH₂-7); 2,88-2,92 (2H, m, H-7'α et H-7'β); 4,12 (1H, dd, J₁ = 6,76 et J₂ = 8,5 Hz, H-9β); 3,85-3,89 (1H, m, H-9α); 3,79 (3H, s, OCH₃-4); 3,8 (3H, s, OCH₃-3); 3,83 (3H, s, OCH₃-3'); 5,52 (1H, s, OH-4'). RMN ¹³C (CDCl₃, δ ppm) : 129,52 (C-1); 111,75 (C-2); 149,03 (C-3); 147,85 (C-4); 111,24 (C-5); 120,59 (C-6); 38,22 (C-7); 40,93 (C-8); 71,33 (C-9); 130,45 (C-1'); 111,49 (C-2'); 146,71 (C-3'); 144,56 (C-4'); 114,12 (C-5'); 122,11 (C-6'); 34,53 (C-7'); 46,61 (C-8'); 178,79 (C=O, C-9'); 55,90, 55,85 et 55,81 (3 OCH₃). SM, I, E: m/z (%) = 372 ([M]⁺, 7); 45 (100); 57 (19); 71 (9); 112 (2); 123 (2); 137 (13); 151 (12) et 177 (1).

4'-Glucoside arctigénine 2: Rf (CH₂Cl₂-MeOH; 86-14 v/v) = 0,67. Rdt = 0,33%. UV (EtOH, λ nm) = 279, 228 et 212. IR (film, ν cm⁻¹): ν_{OH} = 3408 et ν_{C=O} = 1763. RMN ¹H (CDCl₃/CD₃OD, δ ppm): 6,51 (1H, d, J = 1,98 Hz, H-2); 6,57 (1H, dd, J₁ = 1,98 et J₂ = 8,25 Hz, H-6); 6,78 (1H, d, J = 8,25 Hz, H-5); 6,69 (1H, d, J = 1,98 Hz, H-2'); 6,63 (1H, dd, J₁ = 1,98 et J₂ = 8,25 Hz, H-6'); 6,98 (1H, d, J = 8,25 Hz, H-5'); 2,44-2,71 (4H, m, H-8, H-8' et CH₂-7); 2,91 (2H, m, H-7'α et H-7'β); 3,87-3,90 (1H, m, H-9α); 4,17 (1H, dd, J₁ = 7,09 et J₂ = 9,02 Hz, H-9β); 4,82 (1H, d, H-1"); entre 3,45 et 3,6 (6H, m, H₂-6", H-4", H-3", H-2" et H-5"); 3,04 (4H, s, 4 OH); 3,81 (3H, s, OCH₃-4); 3,85 (3H, s, OCH₃-3); 3,87 (3H, s, OCH₃-3'). RMN ¹³C (CDCl₃/CD₃OD, δ ppm) : 130,40 (C-1); 111,96 (C-2); 147,88 (C-3); 149,03 (C-4); 111,48 (C-5); 120,75 (C-6); 38,13 (C-7); 40,98 (C-8); 71,46 (C-9); 132,98 (C-1'); 113,18 (C-2'); 149,23 (C-3'); 145,13 (C-4'); 116,85 (C-5'); 122,08 (C-6'); 34,37 (C-7'); 46,57 (C-8'); 179,13 (C=O, C-9'); 56,04; 55,94 et 55,90 (3 OCH₃); 101,92 (C-1"); 73,27 (C-2"); 76,17 (C-3"); 69,75 (C-4"); 76,00 (C-5"); 61,70 (C-6"). SM, I, E: m/z (%) = 60 (100); 43 (40); 74 (8); 73 (35); 57 (42); 372 (2); 152 (2); 151 (3); 137 (4); 122 (1); 107 (2); 91 (2); 77 (2); 39 (6) et 31 (21).

Tricosane 3: Rf (cyclohexane) = 1. Rdt = 1,42%. F = 62°C (CH₂Cl₂) [7, 12].

β-Amyrine 4: Rf (CHCl₃-MeOH; 98-2 v/v) = 0,59. RMN ¹H (CDCl₃, δ ppm): 5,180 (1H, m, H-12); 0,970 (3H, s, CH₃-23); 0,791 (3H, s, CH₃-24); 0,931 (3H, s, CH₃-25); 0,997 (3H, s, CH₃-26); 1,134 (3H, s, CH₃-27); 0,831 (3H, s, CH₃-28); 0,870 (6H, s, CH₃-29 et CH₃-30). RMN ¹³C (CDCl₃, δ ppm) : 38,39 (C-1); 27,17 (C-2); 77,46 (C-3); 38,83 (C-4); 55,13 (C-5); 18,33 (C-6); 32,69 (C-7); 39,78 (C-8); 47,38 (C-9); 36,09 (C-10); 23,02 (C-11); 121,68 (C-

12); 145,15 (C-13); 41,67 (C-14); 26,14 (C-15); 26,88 (C-16); 32,76 (C-17); 47,17 (C-18); 46,77 (C-19); 31,05 (C-20); 34,77 (C-21); 36,58 (C-22); 28,03 (C-23); 15,74 (C-24); 16,76 (C-25); 17,76 (C-26); 25,96 (C-27); 28,37 (C-28); 33,51 (C-29) et 23,66 (C-30) et $m/z(\%) = 426 [M]^+$ (32); 218 (100); 207 (37) et 189 (32).

Taraxastérol 5: Rf (CHCl₃-MeOH 98-2 v/v) = 0,59. RMN ¹H (CDCl₃, δ ppm) entre autres: 3,2 (1H, dd, H-3); 4,6 (2H, m, H₂-30). RMN ¹³C BB (CDCl₃, δ ppm): 38,72 (C-1); 27,35 (C-2); 78,99 (C-3); 38,39 (C-4); 55,31 (C-5); 18,25 (C-6); 34,01 (C-7); 39,32 (C-8); 50,44 (C-9); 37,09 (C-10); 21,42 (C-11); 25,46 (C-12); 39,32 (C-13); 41,99 (C-14); 26,61 (C-15); 38,83 (C-16); 34,50 (C-17); 48,60 (C-18); 39,12 (C-19); 154,60 (C-20); 26,14 (C-21); 38,25 (C-22); 27,99 (C-23); 15,34 (C-24); 16,24 (C-25); 15,85 (C-26); 14,73 (C-27); 19,46 (C-28); 25,59(C-29) et 107,11 (C-30) et $m/z(\%) = 426 [M]^+$ (32); 218 (100); 208 (25); 207 (37) et 189 (32).

3-O-β-D-glucoside sitostérol 6: Rf (CHCl₃-MeOH; 85-15 v/v) = 0,56 [10, 12].

Poriferastérol Z: Rf (CHCl₃-MeOH; 85-15 v/v) = 0,56. RMN ¹³C BB (CDCl₃/CD₃OD, δ ppm): 37,38 (C-1); 29,45 (C-2); 73,76 (C-3); 38,83 (C-4); 140,41 (C-5); 122,31 (C-6); 32,02 (C-7); 32,02 (C-8); 50,09 (C-9); 36,72 (C-10); 21,25 (C-11); 39,81 (C-12); 42,35 (C-13); 56,98 (C-14); 25,34 (C-15); 29,03 (C-16); 56,02 (C-17); 12,03 (C-18); 19,42 (C-19); 40,64 (C-20); 21,16 (C-21); 134,48 (C-22); 129,43 (C-23); 51,40 (C-24); 29,84 (C-25); 18,86 (C-26); 21,29 (C-27); 26,25 (C-28) et 12,30 (C-29) et $m/z(\%) = 41$ (94); 55(100); 69 (66) et 83 (51).

BIBLIOGRAPHIE

- [1] G. Pottier-Alapetite. *Flore de la Tunisie*. Imprimerie Officielle de la République Tunisienne, 1981, p.1064.
- [2] T.G.Tutin, V.H.Heywood, N.A.Burges, D.M.Moore, D.H.Valentine, S.M.Walters et D.A.Webb. *Flora europea*. Cambridge University Press Cambridge London. New York Melbourne, 1976, 4, p.263-301.
- [3] R. Jarraya, M. Chaieb et M. Damak. *Plantes médicinales et phytothérapie*, 1993, Tome 26, p.177-189.
- [4] L.M.Jackman et S.Sternhell, *Applications of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Organic Chemistry*, 2nd Edn., Pergamon Press, Oxford, 1969, p.202.
- [5] A.Estévez-Braun, R. Estévez-Reyes and A.G.González, *Phytochemistry*, 1996, 43, 885-886.
- [6] P.K.Agrawal et R.S.Thakur, *Org. Magn. Reson*, 1985, 23, 389-418.
- [7] L.B.Alemamy, *Magn. Reson.. Chem.*, 1989, 27, 1065-1073.
- [8] S. B. Mahato and A. P. Kundu, *Phytochemistry*, 1994, 37, 1517-1575.
- [9] R. C. Heupel. *Phytochemistry*, 1985, 24, 2929-2937.
- [10] F. Nicotra, F.Ronchetti, G. Russo, L. Toma, B. M. Ranzi, *Org. Magn. Reson.*, 1985, 23, 134.
- [11] J. Sakakibara, T. Kaiya, H. Fukuda, T. Ohki, *Phytochemistry*, 1983, 22, 2553-2555.
- [12] H. Ben Salah, M. Bouaziz, A. Bahroun, M. Damak, A. McKillop, M. Simmonds, *Bull. Soc. Chim. Tunisie* (sous presse).