

PLANTES MALGACHES—III.*

ÉTUDE DES CONSTITUANTS DE *EVODIA BELAHE* BAILLON (RUTACÉES)†

JANINE RONDEST, BHUPESH C. DAS, MARIE-NOËLLE RICOCH,
CHRISTIANE KAN-FAN, PIERRE POTIER et JUDITH POLONSKY

Institut de Chimie des Substances Naturelles du C.N.R.S., Gif s/Yvette, 91

(Received 20 December 1967)

Résumé—Des écorces de *Evodia belae* Baillon (Rutacées) ont été extraits et caractérisés trois alcaloïdes furoquinoléiques déjà connus: la dictamnine (1), l'évolitrine (2), la kokusaginine (3) et deux coumarines: la marmésine (4) et la desméthyl-7 dihydroxy-2',3' dihydro suberosine (7a); cette dernier composé n'avait pas encore été trouvé dans la nature.

Abstract—From the bark of *Evodia belae* Baillon (Rutaceae), three already known furoquinoline alkaloids have been isolated and identified: dictamnine (1) évolitrine (2), kokusaginine (3); in addition, two coumarines have also been found: marmesine (4) and 7-desmethyl-2',3' dihydroxy dihydro suberosine (7a). The latter compound was not previously found in nature.

Evodia belae Baillon (Rutacées) est un arbre de 12 à 15 m de haut qui pousse sur la côte Est de Madagascar. Comme tous les arbres dont les écorces aromatiques sont utilisées par les Malgaches pour parfumer les rhums locaux, il est souvent appelé "Fatraina"; sous ce nom, il est fréquemment confondu avec l'espèce *E. fatraina* (Rutacées) et même avec *Samadera madagascariensis* (Simarubacées).³

L'identification des écorces que nous avons étudiées a été effectuée par le Dr. P. Boiteau par comparaison histologique avec un spécimen authentique d'écorce d'*E. belae* Baillon.³ Nous décrivons, dans ce mémoire, l'isolement de trois alcaloïdes furoquinoléiques et de deux coumarines.

(1). ETUDE DES ALCALOÏDES

Les alcaloïdes des écorces d'*Evodia belae* sont extraits de la manière habituelle: la poudre végétale, alcalinisée par de l'ammoniaque, est épuisée par lixiviation par de l'éther. Le rendement en alcaloïdes totaux est de 0,9 g/kg.

Plusieurs chromatographies sur alumine permettent de séparer trois alcaloïdes que nous avons identifiés à la dictamnine (1),⁴ à l'évolitrine (2)⁵ et à la kokusaginine (3).⁶ L'identité ressort de l'examen de leurs spectres u.v. et de leurs spectres de masse⁷ et de RMN, ainsi que

* Partie II: cf. ¹ P. POTIER, A. M. BUI, B. C. DAS, J. LE MEN, M.-M. JANOT et P. BOITEAU, *Ann. Pharm. Franc.* sous presse.

† 2ème Mémoire sur les constituants d'*E. belae*; 1^{er} Mémoire: cf ² J. RONDEST, B. C. DAS et J. POLONSKY, *Bull. Soc. Chim. France*, sous presse

³ P. BOITEAU, K. SEPACER et A. RAKOTO RATSIMAMANGA, *Rev. Bot. Appl.* Sous presse.

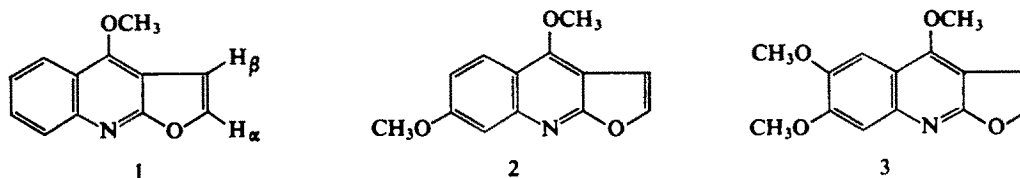
⁴ Y. ASAHINA, I. OHTA et M. INUBUSE, *Berichte* 63, 2045 (1930).

⁵ T. OHTA et T. MIYAZAKI, *Pharm. Bull. (Tokyo)* 1, 184 (1953).

⁶ F. A. L. ANET, P. T. GILHAM, P. GOW, G. K. HUGHES et E. RITCHIE, *Australian J. Sci. Research* A5, 412 (1952).

⁷ D. M. CLUGSTON et D. B. MCLEAN, *Can. J. Chem.* 43, 2516 (1965).

de la comparaison de leurs points de fusion, de leur R_f sur chromatoplaque et de leurs spectres infra-rouges avec ceux d'échantillons authentiques.



Ces trois alcaloïdes semblent être des constituants caractéristiques de la famille des Rutacées.

(2). ETUDE DES COUMARINES

Lors de la chromatographie des alcaloïdes, on élué une substance non azotée, cristalline, $F = 186-189^\circ$. Sa formule brute, $C_{14}H_{14}O_4$ a été établie par spectrométrie de masse ($M^+ = 246$). Son spectre u.v. (λ_{\max} (nm) (ϵ): 227 (14.100), 251 (6.760), 262 (4.900), 338 (22.100)) et son spectre i.r. (bandes à 3400 cm^{-1} (OH), 1725 cm^{-1} (CO), 1640 et 1580 cm^{-1} ($-\text{C}=\text{C}-$ conjuguées)) sont caractéristiques d'une coumarine.

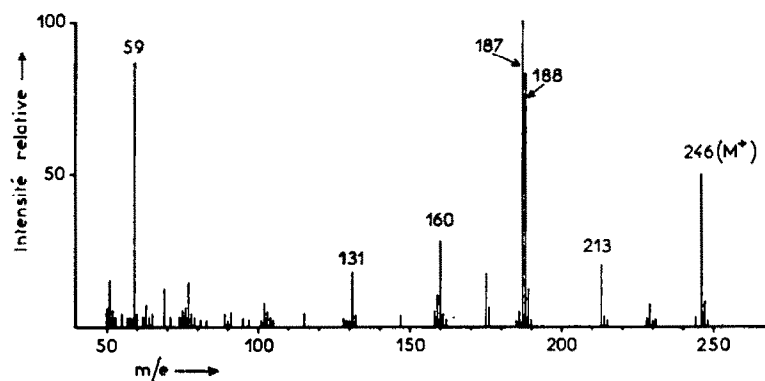


FIG. 1. SPECTRE DE MASSE DE LA MARMÉSINE, $C_{14}H_{14}O_4$.

Ce composé a pu être identifié à la marmésine (4)⁸ par comparaison avec un échantillon authentique: on n'observe pas d'abaissement du point de fusion du mélange des deux composés; ils ont, d'autre part, mêmes pouvoirs rotatoires et leurs spectres u.v. et i.r. sont identiques. Ils ont, enfin, le même spectre de masse (Fig. 1); celui-ci révèle, outre le pic moléculaire à m/e 246, des pics principaux à m/e 213, 188, 187, 175, 160 et 59 qui résultent de la fragmentation exposée dans le Schéma I.

Après deutériation par l'eau lourde, ces pics, à l'exception du pic à m/e 213, sont déplacés d'une unité de masse. Ce résultat est en accord avec la fragmentation proposée pour la formation de tous ces ions et, en particulier, de l'ion m/e 175; il permet, d'autre part, de préciser que l'hydrogène transféré lors de la formation de l'ion $M-58$ à m/e 188 est celui de l'hydroxyle de la marmésine.

⁸ A. CHATTERJEE et S. S. MITRA, *J. Am. Chem. Soc.* 71, 606 (1949).

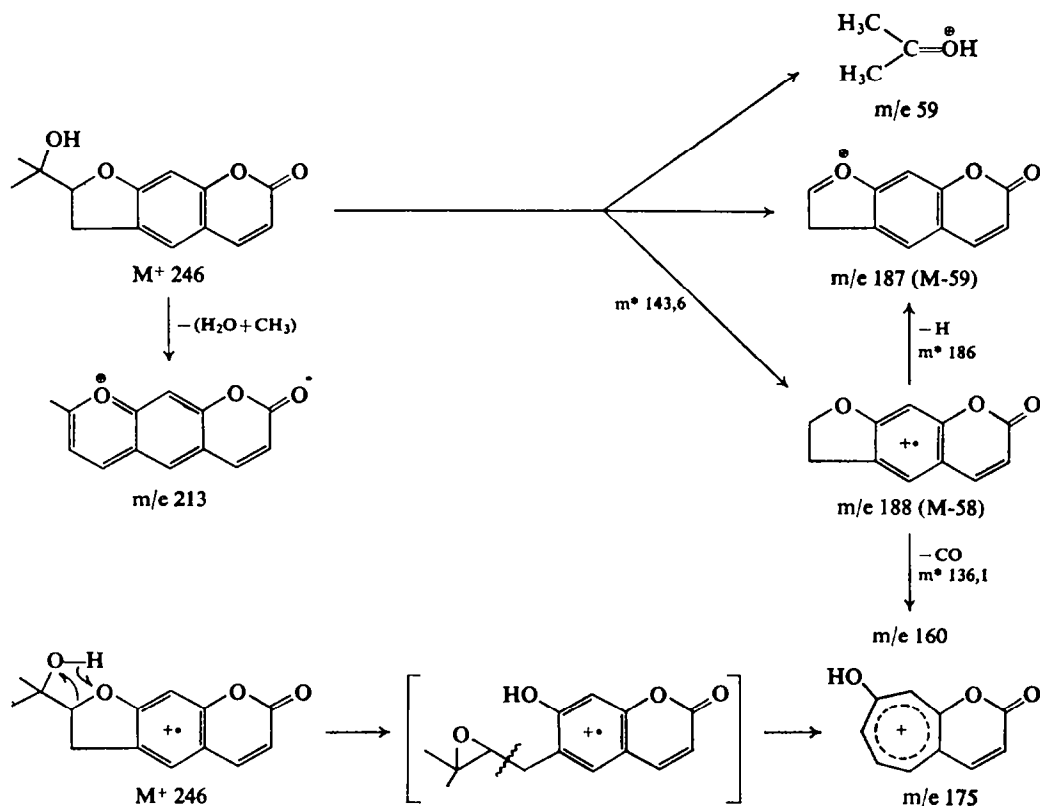
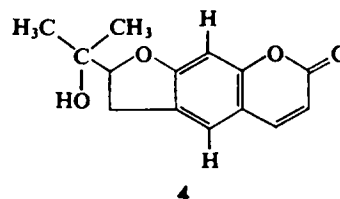
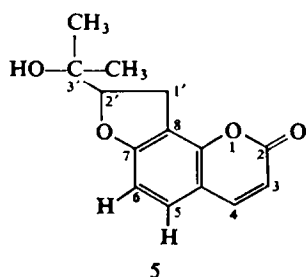


SCHÉMA I.

L'ion à $m/e 187$ pourrait provenir de l'ion moléculaire; cependant, un pic métastable à $m/e 186$ ($m/e 188 \rightarrow m/e 187$) indique qu'il provient surtout de l'ion M-58 ($m/e 188$) par perte d'un hydrogène. Cette hypothèse est confirmée par les résultats de la deutériation qui montrent que le pic à $m/e 187$ est déplacé en grande partie à $m/e 188$. La transition $m/e 189 \rightarrow m/e 188$ est aussi accompagnée, dans le spectre de la marmésine deutériée, du pic métastable correspondant ($m^* 187$).

Les données de la RMN confirment la structure (4) pour le composé $F=186^\circ$. Ne disposant pas de quantité suffisante de marmésine pour en mesurer le spectre de RMN, nous avons comparé celui du composé $F=186^\circ$ au spectre de la *columbianetine* (5).⁹ Les



⁹ High resolution NMR spectra catalog, spectre No. 310, Varian Associates, Palo Alto, California (1962).

deux spectres sont très semblables et ne diffèrent que par l'allure des signaux dûs aux protons benzéniques. Ceux-ci apparaissent pour la *columbianetine* (5) comme deux doublets à 6,79 et 7,29 ppm ($J=9$ Hz), alors que n'étant pas couplés entre eux, les deux protons benzéniques du composé F=186° apparaissent comme deux singulets à 6,74 et 7,56 ppm.

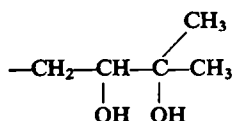
La chromatographie des substances neutres isolées des écorces de *Evodia belahe* nous a permis d'isoler, à côté du N(*p*-hydroxy-phényl)- β éthyl *p*-hydroxy-cinnamamide,² une autre substance cristallisée, F=175°, $[\alpha]_D = -47^\circ$. Nous avons pu attribuer à ce composé, isolé en très faible quantité, la structure (7a). La formule brute $C_{14}H_{16}O_5$ du composé F=175° a été déterminée par spectrométrie de masse à haute résolution. Après traitement par l'eau lourde, le pic moléculaire à m/e 264 est déplacé à m/e 267, ce qui indique la présence de trois hydroxyles.

Le spectre u.v. du composé F=175°, dont la solution éthanolique montre une forte fluorescence bleue, présente, en plus d'épaulements à 251 et 262 nm, des maximums à 226 et 333 nm. Ces derniers sont déplacés en milieu alcalin à 239 et 384 nm. Cet effet bathochrome, accompagné d'une augmentation de l'absorption, est caractéristique d'un groupement phénolique. La présence d'une telle fonction est confirmée par la préparation d'un éther méthylique. L'action du diazométhane sur le composé F=175° conduit, en effet, au mono-éther méthylique (7b), F=125–130°.

Le spectre i.r. du composé F=175° montre des bandes à 3380 et 3290 cm^{-1} (OH), à 1708 et 1678 cm^{-1} (δ lactone conjuguée) et à 1630 et 1578 cm^{-1} ($-\text{C}=\text{C}-$ conjuguées).

L'ensemble de ces propriétés laisse supposer que le composé F=175° est une coumarine possédant trois hydroxyles dont un est engagé dans un groupement phénolique.

La présence de la chaîne



ressort des données de la spectrométrie de masse. Le spectre de masse (Fig. 2) du composé F=175° présente, en effet, des fragmentations caractéristiques de la mexotocine¹⁰ et du dihydroxy-2',3' dihydroosthol (6a). Les pics à m/e 205, 175 et 59 peuvent être attribués

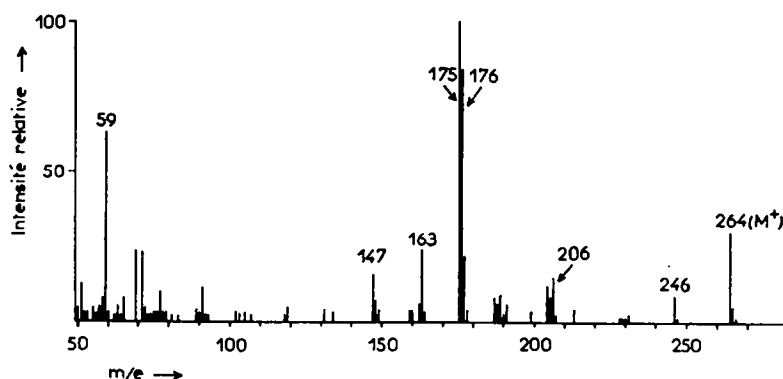
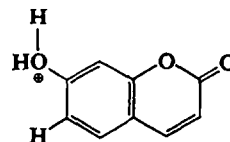
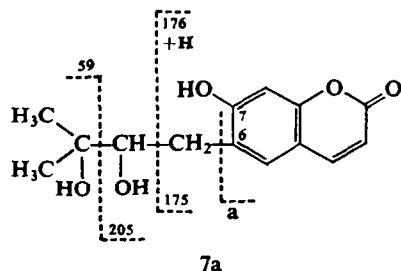


FIG. 2. SPECTRE DE MASSE DU COMPOSE 7a, $C_{14}H_{16}O_5$.

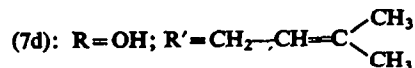
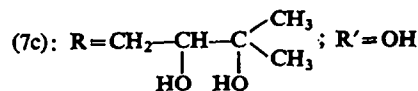
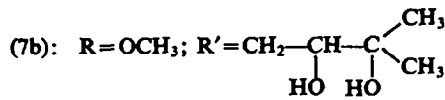
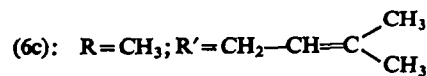
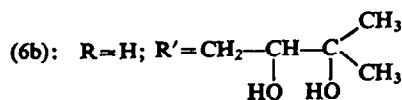
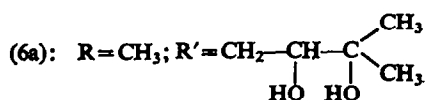
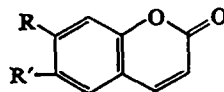
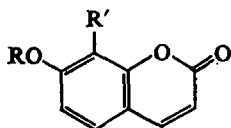
¹⁰ D. P. CHAKRABORTY, B. K. CHOWDHURY et B. C. DAS, *Tetrahedron Letters* 36, 3471 (1967).

aux ions formés par la fragmentation de la molécule montrée dans la formule (7a) (lignes pointillées). Par ailleurs, le pic à m/e 163 peut être assigné à l'ion (a) dont la formation nécessite le transfert de deux hydrogènes. On trouve également les pics à m/e 206 (M-58) et 176.



La similitude des spectres u.v. de la marmésine (4) et du composé $F=175^\circ$ permet d'envisager, pour ce dernier, la structure d'une coumarine disubstituée en position 6 et 7. La comparaison de son spectre de RMN avec celui du composé (6a), que nous avons synthétisé selon la méthode de Böhme,¹¹ confirme cette façon de voir. Les deux protons benzéniques du composé $F=175^\circ$ apparaissent, en effet, comme des singulets à 6,78 et 7,42 ppm, alors qu'ils donnent, dans le cas du composé (6a) deux doublets à 6,99 et 7,42 ppm ($J=9$ Hz), caractéristiques des protons benzéniques adjacents.

L'ensemble de ces résultats est en accord avec la formule (7a) ou éventuellement avec la formule (7c). Nous avons prouvé la structure (7a) pour le composé $F=175^\circ$ en comparant son éther méthylique (7b) avec la dihydroxy-2',3' dihydrosuberosine que nous avons synthétisée à partir de la desméthyl-7 suberosine (7d).¹²



¹¹ H. BÖHME et G. PIETSCH, *Berichte* 72, 773 (1939).

¹² F. E. KING, J. R. HOUSLEY et T. J. KING, *J. Chem. Soc.* 1392 (1954).

Les deux composés sont identiques à tous égards à leur pouvoir rotatoire près. (Identité des R_f sur chromatoplaques dans deux systèmes différents, identité des spectres de masse, des spectres i.r. en solution et des spectres u.v.) La coumarine (7a) ne semble pas avoir été décrite dans la littérature jusqu'alors.

PARTIE EXPERIMENTALE

Les points de fusion de ce travail pris avec l'appareil de Köfler ne sont pas corrigés. Les spectres u.v. ont été mesurés avec un appareil Bausch et Lomb, Spectronic 505, et les spectres i.r. des substances, en suspension dans le nujol, avec un appareil "Infracord" type 137 de Perkin-Elmer; les pouvoirs rotatoires ont été mesurés à l'aide du Quick-polarimètre électronique Jouan-Roussel; les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) ont été enregistrés sur un appareil Varian A-60, à 60 MHz; les déplacements chimiques sont exprimés en ppm par rapport à la raie du tétraméthylsilane. Les spectres de masse ont été mesurés sur un spectromètre de masse MS-9 (A.E.I.).

Nous avons suivi le déroulement des réactions et contrôlé la pureté des produits à l'aide de chromatoplaques (CCM), l'adsorbant étant le Kieselgel GF₂₅₄ de Merck et la révélation des taches se faisant par fluorescence à la lampe u.v., avec des vapeurs d'iode, ou, le cas échéant, avec le réactif de Dragendorff.

Extraction des Alcaloïdes

La poudre végétale (11 kg), alcalinisée par de l'eau ammoniacale à 50% est épuisée par de l'éther jusqu'à réaction de Mayer négative, puis par du CHCl_3 ; les solutions étherées et CHCl_3 sont extraites séparément par 2% HCl , puis ces solutions acides sont à nouveau alcalinisées par NH_4OH . Enfin les alcaloïdes sont extraits par de l'éther.

Une partie de ces alcaloïdes, soit 4,4 g, est chromatographiée sur 130 g d'alumine Merck d'activité I. Les éluations sont de 390 cm^3 . Les résultats de la chromatographie sont consignés ci-dessous.

Fractions	Eluant	Poids (mg)	Produits obtenus
1-3	Benzène	490	Dictamnine + évolutrine
4	Benzène	117	Kokusaginine
11-12	Ether-méthanol 1%	218	Marmésine (voir plus loin)

Les fractions 1-3 et les eaux-mères de la fraction 4 sont chromatographiées sur 18 g d'alumine Merck d'activité II; les éluations sont de 27 cm^3 et l'on obtient les résultats suivants:

Fractions	Eluant	Poids (mg)	Alcaloïdes obtenus
2	Ether de pétrole-benzène 75%	59	Dictamnine
3-7	Benzène	268	Evolitrine
8-10	Benzène-ether	102	Evolitrine + kokusaginine

Dictamnine 1, $F=130^\circ$

Spectre de masse. Pic moléculaire à m/e 199 ($\text{C}_{12}\text{H}_9\text{O}_2\text{N}$). Pics principaux à m/e 184 ($\text{M}-\text{CH}_3$) et à m/e 156 ($\text{M}-\text{CH}_3-\text{CO}$).

Spectre de RMN (dans CDCl_3). Singulet (3H) à 4,41 ppm (OCH_3), doublets (1H) à 7,08 et 7,62 ppm, $J=3$ Hz, respectivement H_β et H_α du cycle furannique, multiplets (4H) entre 7,2 et 8,25 ppm (protons benzéniques).

Ce produit s'est avéré identique à un échantillon authentique de dictamnine (F, CCM, i.r., u.v.); il n'y a pas d'abaissement du point de fusion par mélange des deux composés.

Evolitrine 2, $F=110^\circ$

Spectre de masse. Pic moléculaire à m/e 229 ($\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{O}_3\text{N}$). Pics à m/e 214 [$\text{M}-\text{CH}_3$] et 186.

Spectre de RMN (dans CDCl_3). 2 singulets (3H chacun) à 3,91 et 4,48 ppm (2 OCH_3), 2 doublets (1H chacun), $J=3$ Hz, à 6,99 et 7,52 ppm (respectivement H_β et H_α du cycle furannique); entre 7,09 et 7,32 ppm, un doublet dédoublé et un singulet (2H) sont attribués aux protons H_6 et H_8 , tandis que H_5 résonne à 8,10 ppm (doublet, $J=9$ Hz).

Spectre u.v. $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$: 237, 242, 275 et 330 nm; ϵ = 78 200, 73 000, 24 800 et 9550 respectivement. Le spectre i.r. de ce produit est superposable à celui d'un échantillon authentique d'évolitrine.

Kokusaginine 3, F = 170°

Spectre de masse. Pic moléculaire à m/e 259 ($\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{O}_4\text{N}$). Pics à m/e 244 [$\text{M}-\text{CH}_3$], 216, 201 et 173.

Spectre de RMN (dans CDCl_3). 2 singulets à 4 ppm (6H) et à 4,40 ppm (3H) représentent 3-OCH₃; à 7,01 et 7,52 ppm se trouvent les doublets dus aux protons furanniques et 2 singulets (1H chacun) à 7,32 et 7,45 ppm sont attribuables aux deux protons benzéniques H₅ et H₈.

Ce composé est identique à un échantillon de kokusaginine authentique (F, CCM, i.r., u.v.); il n'y a pas d'abaissement du point de fusion par mélange des deux composés.

Isolement de la Marmésine 4

Comme nous l'avons vu plus haut, lors de la chromatographie des alcaloïdes sur alumine, l'éther contenant 1 % de méthanol élue une substance qui cristallise dans le mélange acétone-éther, F = 186–189°.

Spectre de masse. Pic moléculaire à m/e 246 ($\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_4$).

Spectre u.v. $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$: 227 et 338 nm; ϵ = 14 100 et 22 100 respectivement; épaulements à 251 et 262 nm, (ϵ = 6760 et 4900).

Spectre de RMN (dans CDCl_3). 2 singulets (3H chacun) à 1,24 et 1,35 ppm (méthyles tertiaires non équivalents); à 1,90 ppm un singulet élargi représente un proton d'un —OH car il disparaît par deutération avec D₂O. On note ensuite: un doublet (2H), J = 9 Hz, à 3,18 ppm (—CH₂— en position 1'); un triplet (1H) à 4,74 ppm (proton H₂); 2 doublets (H chacun), J = 9 Hz à 6,18 et 7,56 ppm caractéristiques des protons H₃ et H₄ des coumarines; 2 singulets (1H chacun) à 6,74 et 7,18 ppm (protons benzéniques H₈ et H₅).

Ce composé a été identifié à la marmésine par comparaison avec un échantillon authentique (F, CCM, i.r. [α]_D). Il n'y a pas d'abaissement du point de fusion par mélange des deux composés.

Isolement et Structure du Composé 7a

Les écorces de *Evodia belahe* Baillon broyées sont dégraissées à l'éther de pétrole, puis extraites par l'alcool aqueux. L'extrait hydroalcoolique est ensuite épuisé au CHCl_3 . Plusieurs chromatographies sur acide silicique permettent d'isoler le N(*p*-hydroxy-phényl) β -éthyl *p*-hydroxy-cinnamamide, ² F = 252°. Les eaux-mères de cette substance sont ensuite chromatographiées sur Kieselgel Merck. Exemple d'une chromatographie: 330 mg d'eaux-mères sont chromatographiées sur 30 g de Kieselgel. L'éluant est du CHCl_3 contenant 10 % de méthanol et les éluations sont de 5 cm³. Les éluations 13 et 14, soient 18 mg, sont cristallisées dans le CHCl_3 . Après recristallisation on obtient 5 mg du composé 7a, F = 175°. Il est homogène en CCM (R_f : 0-47 dans $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 15 %). [α]_D = -47° (c = 0,68, dans EtOH).

Spectre de masse. Pic moléculaire à m/e 264,0998 (calc. pour $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{O}_5$: 264,0998).

Spectre u.v. $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$: 226 et 337 nm, ϵ = 12 210 et 12 500; épaulements à 251 et 261 nm (ϵ = 3590 et 2930). $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}+\text{KOH}}$: 239 et 384 nm; ϵ = 7620 et 18 850 respectivement.

Spectre de RMN (mesuré en microcellule dans CD_3OD). 1 singulet (6H) à 1,26 ppm (2 méthyles tertiaires), multiplets entre 2,6 et 3,82 ppm (protons des hydroxyles et protons situés en 1' et en 2'), 2 doublets (1H chacun), J = 9 Hz, à 6,17 et 7,85 ppm (protons H₃ et H₄), 2 singulets (1H chacun) à 6,78 et 7,42 ppm (H₅ et H₈).

Composé 7b

A 6 mg du composé 7a en solution dans du méthanol, on ajoute une solution étherée de diazométhane. Après 15 hr à la température ordinaire, on évapore la solution. On obtient ainsi, après cristallisation dans un mélange éther de pétrole/ CHCl_3 , 3 mg du composé 7b cristallisé, F = 125–130°. Il est homogène en CCM.

Spectre de masse. Pic moléculaire à m/e 278 ($\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_5$). Il a été identifié à la dihydroxy-2',3' subérosine (7b) que nous avons synthétisée (CCM, i.r. en solution, u.v., spectre de masse).

Synthèse du Dihydroxy-2',3' Dihydroosthol 6b¹¹

600 mg d'osthol (6c), dissous dans CHCl_3 , sont oxydés par 470 mg d'acide *p*-nitro-perbenzoïque, à 0°, pendant 24 hr. On isole de la manière habituelle 610 mg d'époxy-2',3' osthol racémique (connu aussi sous le nom de *méranzine*). 550 mg d'époxyde fournissent, après traitement par une solution aqueuse à 1 % d'acide oxalique, à reflux, pendant 1 hr, 437 mg du composé 6b, F = 118–120°.

Spectre de masse. M⁺: 278 (calc. pour $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_5$: 278). Principaux pics à m/e 263, 245, 220, 219, 189, 177 et 59.

Spectre de RMN (dans CD_3OD). Singulet (6H) à 1,26 ppm (2 méthyles tertiaires), singulet (3H) à 3,92 ppm (—OCH₃), deux doublets à 6,18 et 7,82 ppm (H₃ et H₄) et 2 doublets (1H chacun), J = 9 Hz à 6,99 et 7,42 ppm (H₆ et H₅).

Synthèse de la Dihydroxy-2',3' Dihydrosubérosine^{1,2}

1,8 g de deaméthyl-7 subérosine 7d en suspension dans l'éther sont méthylés par une solution étherée de diazométhane, pendant 15 hr, à la température ordinaire. Après évaporation, on obtient 1,8 g de subérosine, $F=86^\circ$.

1,2 g de subérosine, en solution dans CHCl_3 , sont oxydés par 970 mg d'acide *p*-nitro-perbenzoïque, à 0° , pendant 24 hr. On isole de la manière habituelle 1,3 g d'huile qui fournit, après deux cristallisations, 380 mg d'époxy-2',3' subérosine racémique, $F=108-110^\circ$. 380 mg d'époxyde sont traités par une solution aqueuse à 1 % d'acide oxalique, à reflux, pendant 1h. On obtient ainsi 242 mg du composé 7b, $F=138^\circ$.

Spectre de masse. Pic moléculaire à m/e 278 ($\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{O}_5$).

Spectre u.v. $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$: 224 et 333 nm, $\epsilon=16\cdot920$ et $15\cdot540$; épaulements à 224 et 254 nm, $\epsilon=5\cdot550$ et $4\cdot440$.

Spectre de RMN (dans CD_3OD). Singulet (6H) à 1,25 ppm (2 méthyles tertiaires), singulet (3H) à 3,90 ppm ($-\text{OCH}_3$), deux doublets (1H chacun), $J=9$ Hz, à 6,18 et 7,79 ppm (H_3 et H_4), 2 singulets (1H chacun) à 6,83 et 7,37 ppm (H_5 et H_6).

Remerciements—Nous remercions vivement MM. les Professeurs M.-M. Janot et E. Lederer pour l'intérêt témoigné à ce travail et Mme L. Alais pour l'obtention des spectres de RMN.

Nous adressons nos vifs remerciements à Mme le Professeur A. Chatterjee (Calcutta, Inde), à MM. les Professeurs E. Ritchie (Sydney, Australie), R. G. Cooke (Melbourne, Australie), F. E. King (Nottingham, Angleterre) et M. J. W. W. Morgan (Aylesbury, Angleterre) pour des dons généreux de marmésine, d'osthol, de dictamnine, de kokusaginine, de desméthyl-7 subérosine et pour un spectre infra-rouge d'évolitrine.