

LES CONSTITUANTS FLAVONOÏDES DE *CEPHALANTHUS SPATHELLIFERUS*

OLGA ARAUJO LIMA* et JUDITH POLONSKY

Institut de Chimie des Substances Naturelles, C.N.R.S., 91190 Gif-sur-Yvette, France

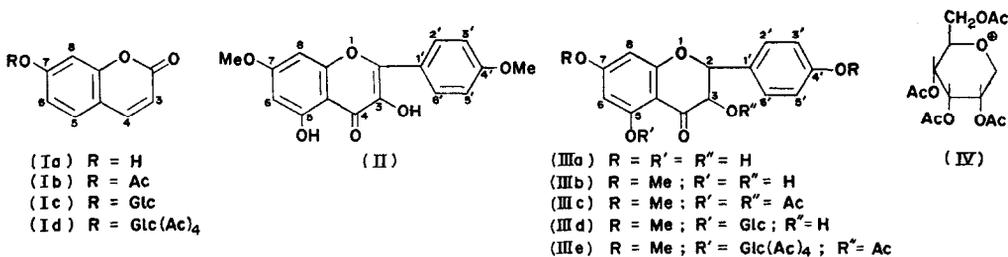
(Revisé Reçu le 25 septembre 1972. Accepté le 26 octobre 1972)

Key Word Index—*Cephalanthus spathelliferus*; Rubiaceae; flavonoïdes; coumarins; 7,4'-dimethylaromadendrin-5-glucoside.

Abstract—We have isolated from *Cephalanthus spathelliferus* (Rubiaceae) five compounds: umbelliferone, skimmin, 7,4'-dimethylkaempferol, 7,4'-dimethylaromadendrin and its 5-glucoside. The latter two are new compounds.

Résumé—Nous avons isolé à partir de *Cephalanthus spathelliferus* (Rubiaceae) cinq composés: umbelliférone, skimmine, diméthyl-7,4'-kaempférol, diméthyl-7,4' aromadendrine et glucosido-5 diméthyl-7,4' aromadendrine. Les deux derniers composés n'avaient pas été trouvés dans la nature jusqu'à présent.

Cephalanthus spathelliferus est un arbre de la famille des Rubiacées qui pousse à Madagascar ou il est connu sous le nom de 'Sohihy' et dont les écorces amères sont utilisées comme 'bilahy' et pour manufacturer les rhums du pays. Nous décrivons dans cette Communication l'isolement et l'identification des constituants de cette plante.



Les écorces broyées sont dégraissées à l'éther de pétrole, puis extraites par l'alcool. En concentrant les extraits alcooliques, fortement colorés en rouge, il se forme un précipité cristallin que l'on sépare par filtration. Après plusieurs cristallisations et sublimation on obtient le composé Ia, donnant par acétylation le monoacétate Ib. Il a été identifié à l'umbelliférone par comparaison directe avec un échantillon authentique.

Le filtrat alcoolique est dilué par l'eau et épuisé, en continu, par du chloroforme. L'extrait chloroformique cristallise dans le méthanol; après des recristallisations on obtient l'*O*-méthyl-7,4' aromadendrine (*O*-méthyl-7,4' dihydrokaempférol) IIIb. Sa structure ressort des résultats suivants: elle donne une coloration rouge-brune avec FeCl₃ et une coloration rose avec Mg-HCl. Son spectre de RMN révèle la présence de deux méthoxyles et l'obtention d'un diacétate IIIc montre la présence de deux hydroxyles.

* Boursier du Centre International des Stages. Adresse actuelle: Rua Jardim Botânico No. 1024, ZC/20-20,000, Rio de Janeiro, GB-Brésil.

La comparaison des spectres de RMN du composé IIIb effectué, d'une part, dans un mélange de CDCl_3 et CD_3OD et, d'autre part, dans le diméthylsulfoxyde (DMSO) apporte des renseignements utiles quant à sa structure et montre notamment qu'il s'agit d'un flavanonol. Le premier spectre révèle deux doublets (J 12 Hz) centré à 4,52 et 5,06 ppm (système AB) que l'on peut assigner à un groupement $-\text{O}-^3\text{CH}-^2\text{CH}-\text{O}-$, deux doublets (J 2 Hz) à 6,03 et 6,10 ppm attribuables aux protons H_6 et H_8 et enfin un groupe de signaux centré à 7,20 ppm dûs aux protons 2', 3', 5' et 6' (Tableau 1).

Le spectre de RMN mesuré dans le DMSO se distingue essentiellement du premier par l'apparition d'un doublet (J 6 Hz) à 5,78 ppm, dû au proton OH en position 3 couplé avec le proton porté par le même carbone, par la transformation d'un des doublets du système AB (celui à 4,52) en quadruplet (J 6 Hz) et par l'apparition d'un signal (1 H) à 11,08 ppm attribuable à un OH phénolique fortement chélaté. Après échange avec de l'eau lourde le spectre devient analogue à celui mesuré dans un mélange de CDCl_3 et CD_3OD [seuls les 2 OCH_3 donnent un seul singulet (6 H) à 3,78].

TABLEAU 1. DÉPLACEMENTS CHIMIQUES DES PROTONS DE LA DIMÉTHYL-7,4'-AROMADENDRINE ET DE SES DÉRIVÉS EXPRIMÉS EN ppm

Composés	H_2	H_3	$\text{H}_6; \text{H}_8$	$\text{H}_2', \text{H}_3', \text{H}_5', \text{H}_6'$
IIIb	5,06 <i>d</i> ; J 11 Hz	4,52 <i>d</i> ; J 11 Hz	6,10 6,02 <i>d</i> ; J 2 Hz	~ 7,20
IIIc	5,28 <i>d</i> ; J 12 Hz	5,70 <i>d</i> ; J 12 Hz	6,40 6,28 <i>d</i> ; J 2 Hz	~ 7,13
IIIe	5,20 <i>d</i> ; J 12 Hz	5,62 <i>d</i> ; J 12 Hz	6,45 6,21 <i>d</i> ; J 2 Hz	~ 7,12

Le pic de résonance du proton H_3 est déplacé de 1,18 ppm vers des champs faibles dans le diacétate IIIc (voir Tableau 1). La grande constante de couplage (J 12 Hz) des protons H_2 et H_3 montre qu'ils sont *trans* di-axiaux. La fragmentation du composé IIIb en spectrométrie de masse est analogue à celle de l'aromadendrine IIIa.¹ La structure de l'*O*-méthyl-7,4' aromadendrine IIIb a été enfin confirmée par comparaison directe avec un échantillon authentique qui a été obtenu par méthylation de l'aromadendrine.²

La chromatographie des eaux-mères de l'*O*-méthyl-7,4' aromadendrine IIIb permet d'isoler les trois autres constituants. Les premières éluions fournissent, à côté de quantités supplémentaires d'umbelliférone Ia et de diméthyl-7,4' aromadendrine IIIb, un composé jaune—dont les propriétés spectrales UV, IR et de RMN indiquent la structure II de diméthyl-7,4' *kaempférol*³ pour ce composé.

Les éluions ultérieures fournissent un produit cristallisé, qui a été identifié à la glucosido-5 diméthyl-7,4' aromadendrine IIIId de la façon suivante. L'acétylation conduit au penta acétate, IIIe dont le spectre de RMN montre, en plus de cinq groupements acétoxy, deux groupements OCH_3 . Dans le spectre de masse du composé IIIId, le pic ayant le plus grand nombre d'unités de masse se trouve à m/e 298 provenant sans doute de la pyrolyse de la molécule et correspondant à la perte d'une molécule d'eau à partir de l'ion moléculaire de l'aglycone (316–18). Par contre, le spectre de masse du penta acétate IIIe montre le pic

¹ AUDIER, H. (1966) *Bull. Soc. Chim. Fr.* 3892.

² HILLIS, W. E. (1952) *Aust. J. Sci. Res.* 5A, 379.

³ ERDTMAN, H., NOVOTNY, L. and ROMANUK, M. (1966) *Tetrahedron* (Suppl., 8) Pt. 1, 71–74; SIM, K. Y. (1969) *Phytochem.* 8, 1597.

moléculaire à m/e 688 et révèle des pics caractéristiques de la partie osidique: un pic à m/e 331 et à m/e 169 correspondant respectivement à l'oxonium IV et à la perte de deux molécules d'acide acétique et d'une molécule de cétène à partir de l'ion IV.⁴ L'hydrolyse acide du composé III_d, fournit la diméthyl-7,4' aromadendrine et du glucose. La liaison du groupement glucosyle avec l'OH en position cinq ressort des faits suivants: contrairement à la diméthyl-7,4' aromadendrine III_b, III_d ne donne pas de coloration avec le FeCl₃. De plus, le déplacement chimique du proton H₃ du penta acétate III_e est tout à fait comparable à celui du diacétate III_c (voir Tableau 1).

Le produit le plus polaire isolé de la chromatographie est la skimmine Ic. Son spectre de RMN (CD₃OD) montre les deux doublets (J 10 Hz), centres à 6,18 et 7,78 ppm, caractéristiques des protons H₃ et H₄. Son spectre de masse montre le pic moléculaire (pas très intense) à m/e 324 et un pic à m/e 162 correspondant au pic moléculaire de l'aglycone. L'acétylation conduit au tétra acétate Id dont le spectre de masse révèle des pics à m/e 331 et 169 correspondant à la fragmentation de la partie osidique comme cela a été observé pour le composé III_e. Le spectre de RMN du composé Id montre quatre groupement acétoxy et deux doublets (J 10 Hz) à 6,26 et à 7,60 ppm dûs aux protons H₃ et H₄. L'ensemble des propriétés du composé Ic est en bon accord avec celles décrites pour la skimmine.⁵

EXPERIMENTALE

Les spectres UV ont été mesurés dans l'EtOH. Les spectres de RMN ont été enregistrés avec un appareil Varian A 60A à 60 MHz; les déplacements chimiques δ , sont exprimés en ppm par rapport à la raie du tétraméthylsilane; les abréviations utilisées sont: s —singulet; d —doublet; J —constante de couplage en Hz. Les microanalyses des échantillons ont été déterminées par le Service Central de Microanalyse du CNRS (Gif). Les chromatographies sur couche mince (CCM) ont été effectuées sur Kieselgel GF₂₅₄ de Merck et les révélations par fluorescence à la lumière UV, par pulvérisation de SO₄H₂ à 50% suivie de chauffage, ou par pulvérisation d'une solution alcoolique de Cl₃Fe à 1%. Les spectres de masse ont été mesurés sur un spectromètre MS-9 (AEI).

Les écorces de *Cephalanthus spathelliferus*, finement broyées, sont dégraissées à l'éther de pétrole puis extraites par l'alcool spathelliferus.

Umbelliferone (Ia). En concentrant une partie des extraits alcooliques sous pression réduite, il se forme un précipité cristallin que l'on essore. Après cristallisation dans l'alcool acqueux et sublimation sous 0,1 mm on obtient des cristaux F 224–225°. (Anal. C₉H₆O₃, Calc.: C 66,67; H 3,73. Tr.: C 66,53; H 3,74%). SM. Pic moléculaire à m/e 162, autre pic important à m/e 134 (M⁺–CO). IR (Nujol). ν (C–O) 1675 cm⁻¹, ν (OH) 3160 cm⁻¹ CCM (CHCl₃ + 10% CH₃OH): R_f = 0,56.

Spectre de RMN (CD₃OD). Deux doublets (J 10 Hz) centrés à 6,16 et à 7,80 ppm caractéristiques des protons H₃ et H₄.

Acetate d'umbelliferone (Ib). C₁₁H₈O₄ après recristallisation dans l'eau on obtient des aiguilles, F 139–140°. SM. Pic moléculaire à m/e 204, autres pics à m/e 162 [M–(CH₂=C=O)] et à m/e 134 (M⁺–42–28).

RMN (CDCl₃). Groupement acétoxy: singulet à 2,33 ppm; H₃ et H₄: doublets (J 10 Hz) centrés à 6,35 et 7,68 ppm. Le composé Ia a été comparé directement avec un échantillon authentique d'umbelliferone (identité des R_f et identité des spectres IR et de RMN).

O-méthyl-7,4'-aromadendrine (III_b). Le filtrat alcoolique, obtenu après séparation de l'umbelliferone, est dilué par l'eau et épuisé, en continu, par du CHCl₃. Après addition du MeOH à l'extrait CHCl₃ on obtient un précipité cristallin. Des recristallisations dans un mélange de CHCl₃ et de MeOH fournissent le composé III_b, F 187–188°, $[\alpha]_D = +89^\circ$ (c 1; pyridine). (Anal.: C₁₇H₁₆O₆, Calc.: C 64,55; H 5,10. Tr.: C 64,58; H 5,28%). SM. Pic moléculaire (pic de base) à m/e 316, autres pics à m/e 287 (M⁺–29), m/e 167, m/e 150 et m/e 121. UV. λ_{\max} à 228 nm (log ϵ 4,24) et 292 nm (log ϵ 4,08). IR (Nujol): ν (OH) 3460 cm⁻¹ et ν (C=O) 1620 cm⁻¹. RMN (CDCl₃ + CD₃OD): 2 OCH₃: singulets à 3,88 et 3,91 ppm.

Diacétate de l'O-méthyl-7,4' aromadendrine (III_c). C₂₁H₂₀O₈. F 128–130°. SM. Pic moléculaire à m/e 400, autres pics à m/e 358 (M⁺–42), m/e 340 (M⁺–60), m/e 316 (M⁺–84), m/e 329 (M⁺–42–29), m/e 287 (M⁺–84–29). UV. λ_{\max} 237 nm (log ϵ 4,47), 248 nm (log ϵ 4,30) et 294 nm (log ϵ 4,30). IR (CHCl₃). ν (C=O) 1755 cm⁻¹, 1690 cm⁻¹ et 1620 cm⁻¹. RMN. Groupements acétoxy en position 5 et 3: singulets à 2,35 et 1,96

⁴ BUDZIKIEWICZ, H., DJERASSI, C. et WILLIAMS, D. H. (1964) *Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry*, p. 203, Holden-Day, New York.

⁵ KARRER, W. (1958) *Konstitution und Vorkommen der Organischen Pflanzenstoffe*, p. 535, Birkhauser, Basel.

ppm, respectivement. Deux groupements OCH_3 : singulet (6 H) à 3,8 ppm. Le composé IIIb a été comparé directement avec un échantillon authentique de *O*-méthyl-7,4' aromadendrine [identité des R_f en CCM (systèmes: CHCl_3 et $\text{CHCl}_3 + 10\%$ de MeOH) et identité des spectres IR]. La chromatographie des eaux-mères de l'*O*-méthyl 7, 4' aromadendrine permet d'isoler les trois autres constituants. *Exemple*. 1,7 g de produit sont chromatographiés sur une colonne d'acide silicique/célite, 4:1 (180 g). Le chromatogramme est développé par du CHCl_3 et par du CHCl_3 contenant un pourcentage croissant de MeOH.

O-méthyl-7,4' kaempférol (II). F 178–180° (cristallisation dans le CHCl_3). (Anal. $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{O}_6$, Calc.: C 64,96; H 4,49. Tr.: C 64,38; H 4,54.) SM. Pic moléculaire à m/e 314. UV: λ_{max} à 270 (log ϵ 4,40), 328 (log ϵ 4,21) et à 370 nm (log ϵ 4,45). IR (CHCl_3). Bandes à 1655 et 1630 cm^{-1} .

Glucosyl-5-*O*-méthyl-7,4' aromadendrine (IIIId). F 215–218° (cristallisation dans CHCl_3 -MeOH). (Anal. $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{O}_{11}$, 2 H_2O : Calc.: C 53,70; H 5,83. Tr.: C 54,04; H 5,49%.) UV. λ_{max} à 228 (log ϵ 3,98) et à 282 nm (log ϵ 3,74). IR (Nujol). ν (OH) 3340 cm^{-1} et ν (C=O) 1680 cm^{-1} . RMN ($\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$): 2 groupements méthoxyles singulet (6 H) à 3,83 ppm; H_6 et H_8 : deux doublets (J 2 Hz) centrés à 6,25 et 6,56 ppm. Hydrolyse du IIIId avec NH_2SO_4 dans MeOH-dioxane (1:4) donne IIIc et glucose.

Pentaacétate (IIIe). Cristaux F 142–145°. (Anal. $\text{C}_{33}\text{H}_{36}\text{O}_{16}$, Calc.: C 57,55; H 5,23. Tr.: C 57,26; H 5,39%.) UV. λ_{max} à 230 nm (log ϵ 4,50) et à 280 nm (log ϵ 4,26). IR. (CHCl_3). ν (C=O) 1750 cm^{-1} , 1690 cm^{-1} . RMN (CDCl_3). 5 groupements acétoxy: singulet (6 H) à 2 ppm et 3 singulets (3 H chacun) à 2,03; 2,06 et 2,1 ppm. 2 groupements OCH_3 : singulets à 3,78 et 3,81 ppm.

Skimine (Ic). $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{O}_8$ la fraction, élue par du CHCl_3 contenant 12% de MeOH lors de la chromatographie des eaux-mères de la diméthyl-7,4' aromadendrine, est recristallisée dans le MeOH. On obtient ainsi des cristaux F 219–221°. Tétracétate de la skimine (Id). $\text{C}_{23}\text{H}_{24}\text{O}_{12}$, F 183–184°, $[\alpha]_D -58^\circ$, 2 (c 1,03; pyridine). RMN (CDCl_3). 4 groupements acétoxy: singulet (3 H) à 2,03 ppm, singulet (6 H) à 2,06 ppm et singulet (3 H) à 2,1 ppm.

Remerciements—Nous remercions Dr. P. Botiveau (Muséum National d'Histoire Naturelle) pour nous avoir procuré les écorces de *Cephalanthus spathelliferus*, au Dr. W. E. Hillis (C.S.I.R.O., Melbourne) pour un échantillon de diméthoxy-7,4' aromadendrine, à Mmes L. Alais et A. Kornprobst pour les mesures des spectres de RMN et à MM. B. Bardey et J. P. Cosson pour l'obtention des spectres de masse dans le Service du Dr. B. C. Das.