

PLANTA MEDICA

ZEITSCHRIFT FÜR ARZNEIPFLANZENFORSCHUNG

Organ der Gesellschaft für Arzneipflanzenforschung e. V.

Unter Mitwirkung von Prof. Dr. Auterhoff, Tübingen; Prof. Dr. Baerheim Svendsen, Leiden; Dr. Békésy, Budapest; Prof. Dr. Borkowski, Warschau; Prof. Dr. Duquéniois, Strasbourg; Prof. Dr. Esdorn, Hamburg; Prof. Dr. Fairbairn, London; Prof. Dr. Flück, Zürich; Prof. Dr. Hegnauer, Leiden; Dr. A. Hofmann, Basel; Prof. Dr. Kaiser, Stuttgart; Dr. E. Meyer, Seeshaupt/Obb.; Prof. Dr. Mothes, Halle; Dr. B. Mukerji, Calcutta (India); Prof. Dr. van Os, Groningen; Prof. Dr. Paris, Paris; Prof. Dr. Poethke, Jena; Prof. Dr. E. Reinhard, Tübingen; Prof. Dr. Rowson, Bradford; Prof. Dr. Santavý, Olomouc; Prof. Dr. W. Schmid, Marburg; Prof. Dr. O. E. Schultz, Kiel; Prof. Dr. Shoji Shibata, Tokio; Prof. Dr. Soehring, Hamburg; Prof. Dr. Sokolow, Leningrad; Prof. Dr. Trease, Nottingham; Prof. Dr. Tyler, Lafayette.

Schriftleitung: Prof. Dr. E. Schratz, Münster/Westf., Martin-Luther-Straße 7

HIPPOKRATES VERLAG STUTTGART

Bd. 23

Mai 1973

Heft 3
S. 226-232

Sonderdruck

Faculté de Médecine, Institut de Pharmacie, Université de Liège, Liège, Belgique

ALCALOÏDES DES LOGANIACEES

Sur l'isolement d'un nouvel alcaloïde a partir du *Strychnos usambarensis*

par L. Angenot et A. Denoël¹

1ère partie – Introduction

Le *Strychnos usambarensis* Gilg entre en Afrique Centrale (Rwanda et régions limitrophes), dans la préparation d'un poison de chasse curarisant. Les écorces de racines, parties les plus toxiques de la plante, contiennent plusieurs dizaines d'alcaloïdes tertiaires et quaternaires.

Les résultats des recherches concernant l'isolement et la structure de l'usambarensine et de la 3,4 dihydro-usambarensine, alcaloïdes ditertiaires (dimères asymétriques) ainsi que de leurs dérivés monoquaternaires ont fait l'objet de diverses publications (Angenot et Bisset, 1971; Angenot et Denoël, 1972a).

Plus récemment, l'harmane fut également isolé et identifié dans la fraction d'alcaloïdes tertiaires (Angenot, Bisset et Denoël 1972b).

Enfin, nous relatons ici l'isolement d'une nouvelle base anhydronium naturelle: la 6,7 dihydro-flavopéireine.

2ème partie – Généralités sur les bases anhydronium

Les bases anhydronium ont été appelées de la sorte car elles étaient les dérivés *anhydres* d'hydroxydes de composés aromatiques.

Ces composés occupent une place intermédiaire entre une forme aromatique complètement polarisée et une forme neutre à allure quinonique. Il en résulte une grande instabilité de ce type de molécules qui se caractérisent tantôt par l'existence d'un dipôle tantôt par un benzène non aromatique. Les tendances à la formation d'un sextet aromatique d'une part et à la neutralisation des charges du dipôle d'autre part, travaillent dans des directions opposées. Il faut également rappeler que la formation d'une base anhydronium implique nécessairement une redistribution des charges, ce qui n'est possible que dans les systèmes conjugués. Les bétaines ne sont donc pas des bases anhydronium (Armit et Robinson, 1925).

¹ Avec la collaboration de Monsieur M. Remy, premier technicien.

3ème partie – Extraction et purification

Nous avons observé le mode opératoire préconisé précédemment (Angenot et Denoël, p. 104, 1972a). Nous obtenons de la sorte deux groupes d'alcaloïdes: l'un précipitant en milieu alcalin (L I et L II) l'autre pas (P I et P II). De la fraction L II, nous avons pu séparer et purifier grâce à la chromatographie préparative sur couche mince, l'usambarensine, la 3,4 dihydrousambarensine, l'harmane, la N^b-methylusambarensine et la N^b-méthyl-3,4 dihydro-usambarensine. Ce dernier alcaloïde étant souillé d'une autre substance alcaloïque jaune, nous avons tenté de les séparer à l'aide de la chromatographie sur colonne de cellulose microcristalline (80 gr.); le solvant d'élution a été le système C de Schmid et Karrer (1952); méthyléthylcétone saturée d'eau + 2% de méthanol.

Des fractions de 20 ml sont recueillies et analysées par chromatographie. Les fractions semblables sont rassemblées et évaporées sous vide à une t° de 45° C.

Les fractions 13 à 23 contenaient de la N^b-methyl-3-4-dihydro-usambarensine. Les fractions 24 à 27 contenaient un mélange des deux alcaloïdes. Enfin la substance alcaloïdique jaune inconnue se trouvait dans les fractions 28 à 36. Après alcalinisation à pH 11 par NaOH, l'alcaloïde est extractible par le chloroforme. La solution chloroformique est distillée sous vide, le résidu repris par quelques gouttes de méthanol. Par addition d'éther, il y a apparition d'un précipité jaune microcristallin (18 mgr). Ce précipité est soumis à deux nouvelles cristallisations. L'alcaloïde pur est recueilli (8 mgr de produit jaune).

De plus, cet alcaloïde se retrouve en quantité importante parmi les fractions P I et P II ne précipitant pas en milieu alcalin (cf Angenot et Denoël, p. 104, 1972a).

4ème partie – Analyse et proposition de structure

a) solubilités

L'alcaloïde présente les solubilités caractéristiques des bases anhydronium (Schwarz et Schlittler, 1951):

- solubilité dans l'eau, le méthanol (teinte jaune),
- solubilité dans le chloroforme (teinte rouge),
- solubilité en milieu alcalin (teinte orange à rouge).

b) Chromatographie sur couche mince de Silicagel Merck (phase stationnaire)

1°) Phase mobile: n propanol-ammoniaque conc. 8:2 – R_F:0,50

2°) Phase mobile: butanol, acide acétique, eau 4:1:1 – R_F:0,60

3°) Phase mobile: acétate d'éthyle, isopropanol, ammoniaque dil. 60:25:15: R_F:0,31.

La détection de l'alcaloïde sur les chromatoplaques est aisée du fait d'une part de sa couleur jaune dans le visible, d'autre part de sa fluorescence intense en jaune vif aux U. V.

c) *Formule brute*

La formule brute obtenue par spectrométrie de masse à haute résolution correspond à $C_{17}H_{16}N_2$ pour PM 248 (M^+ tr.: 248, 1302; calc.: 248, 1313).

Cette formule indique l'absence d'oxygène et la présence de 11 insaturations.

d) *Spectrophotométrie dans l'ultra-violet et le visible*

Les spectres ont été effectués sur une solution méthanolique à l'aide d'un spectrophotomètre Perkin Elmer 124. Les spectres sont semblables en milieu neutre et acide. Par contre, en milieu alcalin, nous notons un déplacement caractéristique vers les grandes longueurs d'onde (Schwarz et Schlittler 1951). Aucune base anhydronium naturelle ne possède ces valeurs spectrales. Par contre, on les retrouve dans deux produits de synthèse intermédiaires dans la synthèse de la flavopéirine. On peut donc avancer que l'alcaloïde isolé possède le même chromophore (11 insaturations = 4 cycles et 7 doubles liaisons). Toutes ces valeurs sont reprises dans le tableau I.

Tableau I

	Alcaloïde isolé	Bromure de 3 éthyl-6-7 dihydro 12 H indolo-(2, 3a) pyridocolinium (Ban, 1961)	Nitrate de 3 éthyl 6-7 dihydro 12 H-indolo (2, 3a) pyridocolinium (Prasad et al. 1958)	Chlorure de 6, 7 dihydro 12-Hindolo (2, 3a) pyridocolinium (Prasad et al. 1958)
milieu neutre et acide				
λ_{\max} nm	218-252-315-392	218-253-315-395	213-252-316-395	217-252-314-385
λ_{\min} nm	239-275-345	243-275-345	243-275-345	239-274-341
milieu alcalin ⁺				
λ_{\max} nm	221-266-358-418	222-267-361-422	222-267-360-423	223-264-363-420
λ_{\min} nm	250-298-380	249-295-383	249-295-383	249-294-378

e) *Spectrophotométrie dans l'infra-rouge*

Le spectre a été effectué après pastillage dans KBr, à l'aide d'un spectrophotomètre IR - Beckman. Le spectre est caractérisé par des bandes à ν 3.400 (ν OH - solvant de cristallisation?) 1590, 1550 (C=C et C=N), 1450, 1380, 1360, 1280, 1235, 1142, 1120, 742 cm^{-1} :

f) *Spectrométrie de masse*

Le spectre de masse a été réalisé par Mr D. Carter sur un appareil AEI MS 902 de l'Université de Londres. L'échantillon a été introduit directement dans la chambre d'ionisation, à la t° de 145° et sous un potentiel d'ionisation de 70^{eV} . Le spectre est reproduit dans la figure n $^{\circ}$ 1.

Spectre de masse du 6^e alcaloïde
isolé du *Strychnos Usambarensis* - $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_2$ -

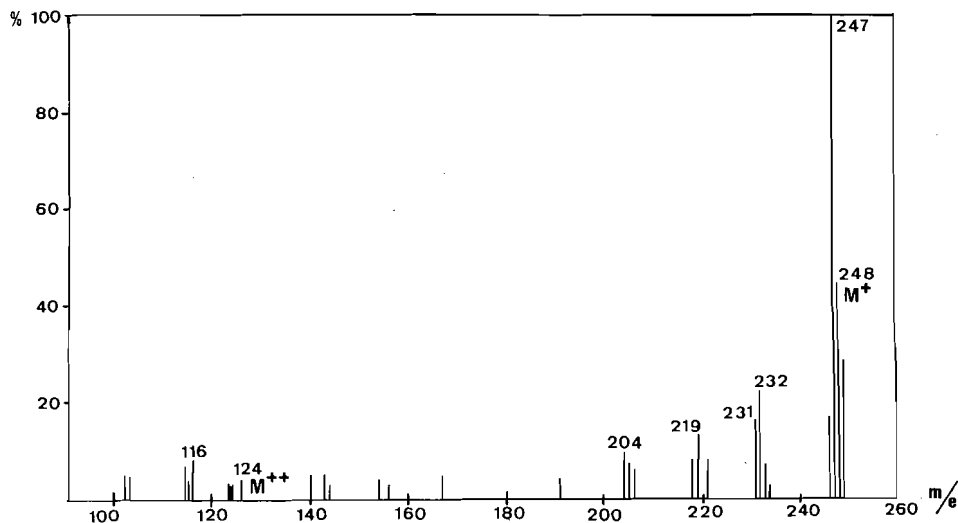


Figure I

La fragmentation est très faible et confirme une structure aromatique, hétérocyclique. Ce type de fragmentation se rapproche de celui de la dihydroindolopyridocoline (Kaschnitz et Spiteller, 1965). Le pic de base est l'ion $M^+ - I = m/e$ 247 correspondant à $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{N}_2$ (m/e tr.: 247, 1242; calc.: 247, 1235). Cet ion résulte vraisemblablement de la dégradation d'Hoffman de la molécule, rendue possible suite à la liaison saturée en 6-7. A côté de ce pic, on note de petits pics à m/e 232, [$M - \text{CH}_3$] correspondant à $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_2$ - tr.: 232, 1010, calc.: 232, 1000), 231 ($\text{C}_{16}\text{H}_{11}\text{N}_2$; tr.: 231, 0930; calc.: 231, 0922), 221 ($M^+ - \text{HCN}$), 219 ($M^+ - \text{C}_2\text{H}_5$), 124, [M^{++}], 123,5 ($M - I$ doublement positif).

g) *Comparaison avec le produit de synthèse*

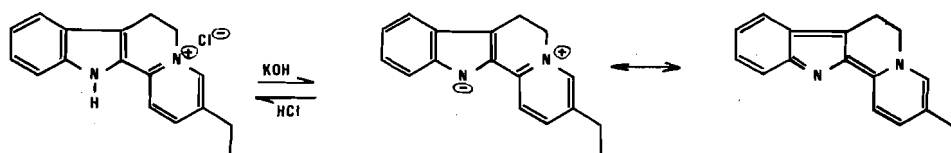
Le Prof. Yoshio Ban de l'Université de Hokkaido à Sapporo (Japon) a eu la grande gentillesse de nous confier un échantillon de perchlorate de 3-éthyl-6,7 dihydro -12 H-indolo (2,3a)-pyridocolinium ou 6,7 dihydroflavopéirine. Ce

produit, intermédiaire dans la synthèse de la flavopéirine, est obtenu en une étape à partir de 3-(2-bromoéthyl)-indole et de 2-halogenopyridine (Ban et Seo 1961).

Ce produit présente les mêmes spectres dans l'ultraviolet et le visible que l'alcaloïde isolé par nous. De plus il possède le même comportement chromatographique dans tous les systèmes expérimentés (test de l'étalon interne).

h) Conclusions

Ces diverses expériences nous permettent de proposer pour ce nouvel alcaloïde la structure reprise dans la fig. 2.



I

6,7, Dihydro-Flavopéirine

II

Ou 3 Ethyl-6:7 Dihydro - 12 H - Indolo (2:3 a) Quinolizine

Il s'agit donc d'une base anhydronium, très proche de la flavopéirine. Il est intéressant de remarquer que la synthèse de ce produit a été réalisée avant son isolement dans la nature! La liaison saturée se trouve bien dans le cycle C plutôt que dans le D car le spectre U. V. de la 3,4 dihydroindolopyridocoline (formule dans la figure III) (Kaschnitz et Spiteller, 1965) diffère nettement de celui de la 6,7 dihydroindolopyridocoline (Prasad et Swan, 1958). Quant à la chaîne éthyle, nous supposons qu'elle est en 3, par analogie biogénétique avec la flavopéirine. La structure proposée a été confirmée par l'analyse du spectre de R. M. N. réalisé sur un appareil Thomson 250 MHz (Angenot, 1973).

Chimiotaxonomie

A notre connaissance, seules 12 bases anhydronium indoliques ont été isolées à ce jour. Elles sont reprises dans la figure III.

Si on classe ces alcaloïdes d'après leur origine botanique (tableau II), on constate que toutes les bases anhydronium dérivées de la β carboline ont été isolées uniquement de 3 familles: Apocynacées, Loganiacées et Rubiacées, dont on connaît bien la parenté chimiotaxonomique, Hesse (1968).

TABLEAU DES ALCAÏRIDES INDOLIQUES DE TYPE "BASE ANHYDRONIUM"

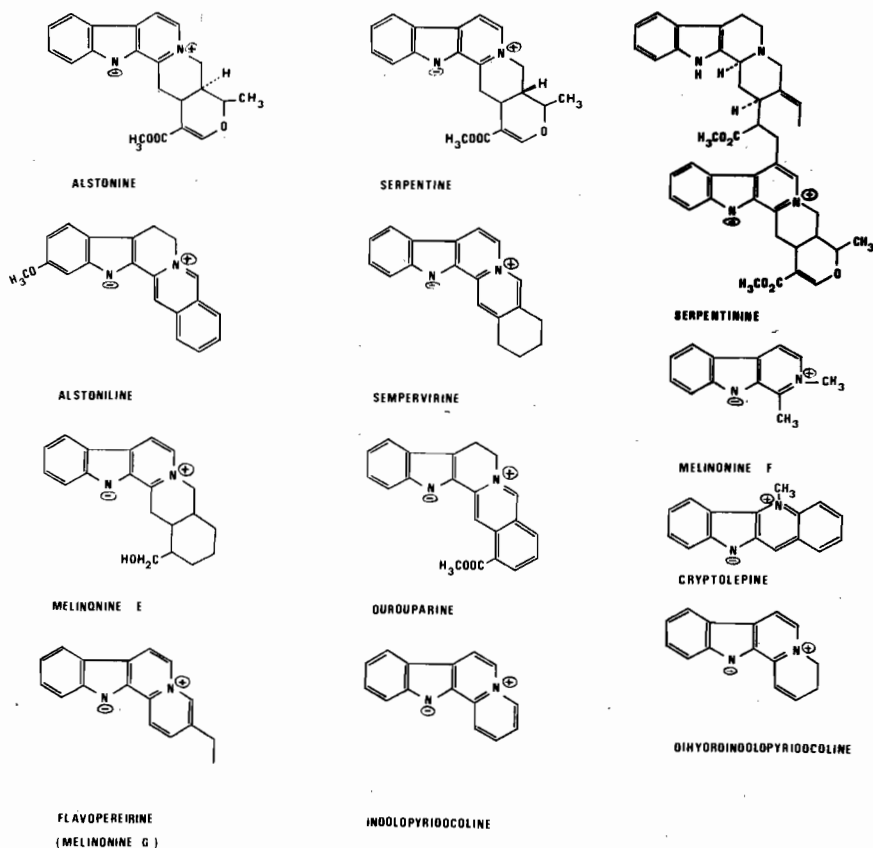


Figure III

Résumé

Les auteurs ont isolé à partir du *Strychnos usambarensis* Gilg du Rwanda, un nouvel alcaloïde de type base anhydronium: la 6,7 dihydroflavopéirine, produit déjà signalé en tant qu'intermédiaire dans la synthèse de la flavopéirine (Prasad et Swan, 1958; Ban et Seo, 1961). Auparavant des bases anhydronium n'avaient été isolées que de deux espèces de *Strychnos*: *Strychnos melinoniana* du Surinam et le *Strychnos camptoneura* du Cameroun.

Nous tenons à remercier vivement Monsieur le Docteur N. G. Bisset (Londres) pour le spectre de masse dont il s'est chargé, ainsi que pour ses encouragements et ses conseils. Monsieur

le Professeur Y. Ban (Sapporo, Japon) pour la fourniture d'un échantillon de perchlorate de 3-éthyl-6,7 dihydro-12 H-indolo-(2,3a)-pyridocolinium.

Tableau II

ALSTONINE	Apocynacées:	<i>Alstonia constricta</i> , <i>Vinca rosea</i> , <i>Rauwolfia</i> sp.
	Loganiacées:	<i>Strychnos camptoneura</i> (Verpoorte et Sandberg, 1971).
SERPENTINE	Apocynacées:	<i>Vinca rosea</i> , <i>Vinca major</i> , <i>Rauwolfia</i> sp.
	Loganiacées:	<i>Strychnos camptoneura</i> (Verpoorte et Sandberg, 1971).
SERPENTININE	Apocynacées:	<i>Rauwolfia</i> sp.
ALSTONILINE	Apocynacées:	<i>Alstonia</i> sp.
SEMPERVIRINE	Loganiacées:	<i>Gelsemium</i> sp., <i>Mostuea</i> sp.
MELINONINES E et F	Loganiacées:	<i>Strychnos melinoniana</i>
OUROUPARINE	Rubiacées:	<i>Uncaria gambir</i> (syn. <i>Ourouparia gambir</i>)
FLAVOPEREIRINE (ou MELINONINE G)	Apocynacées:	<i>Geissospermum</i> sp.
	Loganiacées:	<i>Strychnos melinoniana</i>
INDOLOPYRIDOCOLINE et DIHYDROINDOLOPYRI- DOCOLINE	Apocynacées:	<i>Gontoma kamassi</i>
	Cryptolepine	Asclépiadacées:

Bibliographie

- Angenot, L., et Bisset, N. G.: J. Pharm. Belg. n° 5, 585 (1971)
 Angenot, L., et Denoel, A.: *Planta Medica* 21, 96, (1972a)
 Angenot, L., Bisset, N. G., et Denoel, A.: (1972b sous presse)
 Angenot, L.: Thèse de Doctorat, Université de Liège (1973 sous presse)
 Ban, Y., et Seo, M.: *Tetrahedron*, 16, 5 (1961)
 Hesse, M.: *Indolalkaloïde in Tabellen*, vol I (1964) vol II (1968) Springer Verlag, Berlin
 Kaschnitz, R., et Spittler, G.: *Monatshefte für chemie*, 96 909 (1965)
 Prasad, K. B., et Swan, G. A.: J. Chem. Soc. 2024 (1958)
 Schmid, H., Kebrle, J., et Karrer, P.: *Helv. Chim. Acta*, 1864 (1952)
 Schwarz, H., et Schlittler, E.: *Helv. Chim. Acta*, 34, 629 (1951)
 Verpoorte, R., et Sandberg, F.: *Acta Pharm. Suecica* 8, 119 (1971)

Adresse des auteurs: Prof. A. Denoël, Laboratoire de Pharmacognosie, Institut de Pharmacie
 Université de Liège, rue Fusch, 5 4000 - Liège (Belgique)