

Isolement et Détermination de Structure de l'Afrocurarine

The isolation and structure elucidation of Afrocurarine

M. Caprasse¹, L. Angenot^{1,3}, D. Tavernier² et M. J. O. Anteunis²

Abstract: The structure and the stereochemistry of afrocurarine (a new unsymmetrical bisindole alkaloid) previously isolated from *S. usambarensis* Gilg. are established especially from ¹H-NMR spectroscopic data.

The separation of quaternary alkaloids has always been very tedious. Ion-pair reversed-phase column chromatography applied to the purification of afrocurarine is proved very useful and seems to be a suitable technique in quaternary alkaloid research.

Introduction

Comme nous l'avons signalé antérieurement, la purification des produits polaires, et parmi eux les alcaloïdes quaternaires et base anhydronium, était sérieusement handicapée par l'adsorption irréversible de ces produits sur les supports chromatographiques classiques (1). Par conséquent, les pertes importantes enregistrées et le manque de pureté des produits récupérés (ce dernier étant à la fois dû au trop faible pouvoir de résolution des colonnes habituelles, et, notamment dans le cas du *Strychnos usambarensis*, à la présence de nombreuses molécules de polarité voisine) n'encourageaient pas les recherches dans ce domaine. L'avènement sur le marché d'appareillages plus performants (spectromètres RMN à haut champ permettant l'analyse de plus petites quantités, spectromètres de masse en désorption de champ...) et de nouvelles techniques de purification à l'échelle préparative („DCCC“, systèmes de chromatographie sur colonne „reversed phase“ sous forme de paires d'ions en moyenne pression (Labor[®]Merck...)) a engendré ces derniers temps un regain d'intérêt dans ce domaine.

Nous avons déjà mentionné l'utilisation de la chromatographie goutte-à-goutte à contre-courant („DCCC“) pour la séparation d'alcaloïdes polaires des racines du *S. usambarensis* Gilg. du Rwanda (1).

La chromatographie liquide „reversed-phase“ sous forme de paires d'ions en moyenne pression, nous a permis d'obtenir une quantité suffisante d'afrocurarine, d'une pureté satisfaisante. Nous relations dans ce travail la détermination de structure de cet alcaloïde bisindolique, notamment à l'aide de la spectrométrie RMN¹H à 360 MHz. Cette structure n'avait pas été complètement précisée lors de l'isolement préalable de l'alcaloïde, par chromatographie sur colonne de cellulose, à partir d'extraits alcaloïdiques provenant du même matériel végétal (2).

Rappelons que la dénomination afrocurarine provient de deux faits: en premier lieu, pour souligner la découverte du produit dans un *Strychnos* africain muni de propriétés curarissantes, et en second lieu, parce que l'afrocurarine donne une

coloration bleue en présence du sulfate cérique (solution à 1 % dans H₂SO₄ 10 %) et se comporte donc de la même façon que la C-curarine, alcaloïde dimère bisindolinique symétrique bien connu (2).

Resultats et Discussion

La confrontation des données spectrales (notamment RMN¹H) de l'afrocurarine et sa comparaison avec d'autres alcaloïdes bisindoliques nous a permis de lui attribuer la structure suivante (Fig. 1).

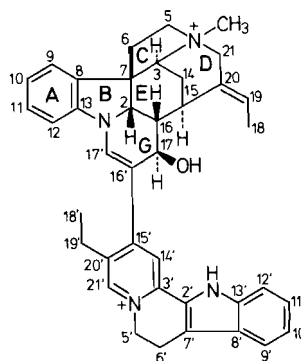


Fig. 1 Afrocurarine.

Le spectre UV de cet alcaloïde, fortement déplacé vers les grandes longueurs d'onde témoigne d'un chromophore très conjugué, en corrélation avec la coloration rouge orangé du produit. Aucune modification en milieu acide ou alcalin n'est observée (2).

Son spectre IR semblable à celui donné précédemment ne montre que des bandes d'absorption dues à la présence d'un HN/OH (3400 cm⁻¹), de liaisons C = C et C = N (1630, 1595 cm⁻¹), d'un indole non substitué (750 cm⁻¹) (2).

La masse de l'ion moléculaire-1 (M⁺-1 = 581) a été déterminée par spectrométrie de masse en désorption de champ (FDMS).

La fragmentation de spectre de masse (EI) montre, outre les pics caractéristiques de l'indole (m/z: 130, 143 et 144) des ions à m/z = 121, 122, 136, 167, 180 et 181 correspondant à un monomère de type strychnane, muni d'une chaîne éthylidénique et quaternarisé. Les fragments m/z 247, 232, 219, 204 sont caractéristiques de la 5,6-dihydroflavopéridine (base anhydronium découverte précédemment dans ce même *Strychnos*) (3).

¹ Laboratoire de Pharmacognosie, Institut de Pharmacie, Université de Liège, rue Fusch, 5, B-4000 Liège

² Department of Organic Chemistry, NMR Spectroscopic Unit, Rijksuniversiteit Gent, Krijgslaan, 281 (S4bis) B-9000 Gent, Belgium

³ Address for correspondence

Le pic de base m/z 272 correspondant à une vinyl-dihydroflavopéridine renforce l'hypothèse selon laquelle la 5,6-dihydroflavopéridine constitue le second monomère de l'afrocurarine. L'ion m/z 564 ($M^+ - OH$) traduit la présence d'une fonction hydroxyle libre (confirmée par acétylation du produit à froid) et les ions 50–52 ($CH_3^{35}Cl$, $CH_3^{37}Cl$) indiquent la présence d'un méthyle quaternaire.

La présence dans le spectre RMN^1H de deux singulets déblindés attribués aux protons 14' et 21' du cycle pyridinique de la 5,6-dihydroflavopéridine nous a amenés à proposer un cycle de jonction entre les deux monomères, de type tétrahydrazine semblable à celui observé dans un alcaloïde bisindolique asymétrique tertiaire récemment découvert dans plusieurs espèces de *Strychnos* asiatiques et africains, la longicaudatine (Fig. 2). On notera que ce dernier donne également une coloration bleue avec le $Ce(SO_4)_2$ (4).

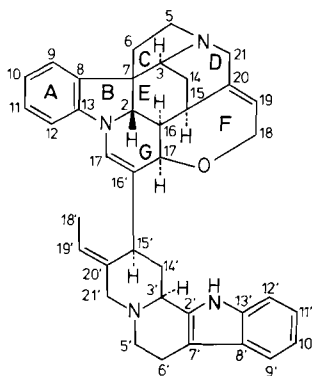


Fig. 2 Longicaudatine.

La confirmation de la structure plane proposée et la détermination de la stéréochimie reposent essentiellement sur les données du spectre RMN^1H . De nombreuses expériences de double irradiation ont permis d'attribuer la majorité des protons de l'afrocurarine et notamment tous les protons aliphatiques de la partie strychnane.

La chaîne éthylidène (CH à 6,02, CH_3 à 1,79 δ), la chaîne éthyle (Me à 1,34, CH_2 à 2,85 et 2,91 δ), le méthyle quaternaire et 11 protons aromatiques dont deux singulets sont directement mis en évidence. Seul le déblindage important du singulet à 7,2 δ attribué selon la formule plane proposée au H17' peut surprendre, comparativement à son déplacement chimique de 6,06 ppm dans la longicaudatine (4). Cependant, ce proton se situe maintenant au centre d'un système extrêmement conjugué et peut subir l'influence déblindante du noyau pyridinique proche.

De la même façon, cette très forte conjugaison pourrait être responsable de l'absence d'effet bathochrome en milieu alcalin, caractéristique des bases anhydronium.

Lors d'un traitement par $HCl 2N$ (2 h à température ordinaire), on n'observe pas d'hydrolyse, au sens strict, compte tenu de la structure de la jonction des deux monomères. Néanmoins, on remarque en CCM, la formation d'un seul produit de transformation majoritaire, contenant vraisemblablement le fragment dihydroflavopéridine libéré de sa conjugaison avec le noyau indolinique (rupture de la liaison énamine) puisque le spectre UV de ce produit montre un déplacement bathochrome

net en milieu alcalin. Dans les mêmes conditions, nous avons constaté que la longicaudatine se transformait également en un seul produit majoritaire.

La détermination de la configuration des carbones asymétriques C_2 , C_7 , C_3 , C_{15} , C_{16} et C_{17} est basée sur des arguments biogénétiques et spectroscopiques.

Le dichroïsme circulaire habituellement utilisé en vue de préciser la configuration C_2 et C_7 (5) n'est pas de grande utilité dans ce cas précis étant donné la superposition de deux chromophores.

Nous considérerons les configurations habituellement admises pour ces molécules selon l'hypothèse biogénétique, à savoir 2β , 7β et 3α , 15α (5, 6).

La détermination de la configuration de C_{16} de l'afrocurarine sera essentiellement basée sur la comparaison des signaux RMN^1H concernés, avec ceux des dimères bisindoliques de type strychnane isolés du *S. variabilis* (iso) strychnobiline, 12'-hydroxy-(iso)-strychnobiline (Fig. 3) (7–9).

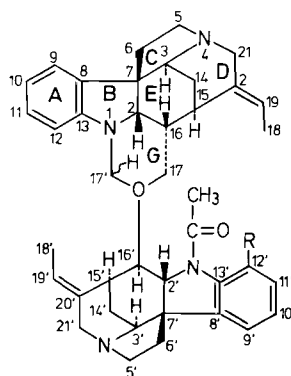


Fig. 3 R = H, H17' β ; strychnobiline
R = H, H17' α ; isostrychnobiline
R = OH, H17' β ; 12'-OH-strychnobiline
R = OH, H17' α ; 12'-OH-isostrychnobiline.

La configuration β est attribuée au H16 (type rétuline).

Une conformation bateau du cycle D telle qu'on l'observe dans tous les dérivés trychnane type „rétuline“ que nous connaissons, constitue un premier argument indirect. Cette attribution découle de l'examen des constantes de couplage à longue distance de protons H21A, H21B, H19, Me18 et H15 et ensuite des couplages géminaux $^2J_{21}$ et $^2J_{14}$ (7, 10, 11).

Le second argument, plus direct mais difficile à mesurer expérimentalement, en faveur de la configuration H16 β , est représenté par la faible valeur de la constante de couplage vicinal $^3J_{H_{15}-H_{16}}$ inférieure à 2 Hz. Pour la configuration H16 α , elle atteint 4 Hz.

Une fois cette configuration de C_{16} admise, il nous faut déduire de la très grande constante de couplage $^3J_{H_2-H_{16}}$ entre ces deux protons de configuration β , que l'angle dièdre correspondant est proche de zéro. Ceci entraîne une conformation bateau du cycle G, observée également chez les (iso)strychnobiline et dérivés ainsi que chez la geissospermine (8, 12).

En admettant une forme chaise aplatie pour le cycle E observée également chez les alcaloïdes cités ci-dessus, l'examen des modèles Dreiding peut expliquer la grande constante de couplage $^3J_{H_{16}-H_{17}}$ découlant de la position antipériplanaire de ces deux protons, ce qui entraîne par conséquent la configuration H17 α .

L'afrocurarine constitue le premier exemple d'alcaloïde quaternaire dimère asymétrique formé d'une partie strychnane (type dihydrofluorocurarine) associée par une liaison énamine à une partie corynane. Cette structure particulière permet diverses considérations.

En premier lieu, la présence de ce nouvel alcaloïde dans le *Strychnos usambarensis* renforce l'hypothèse selon laquelle la dihydroflavopéridine dériverait d'alcaloïdes de type Corynanthe (13) et constitue un argument supplémentaire en faveur de l'adoption définitive d'une numérotation biogénétique pour la dihydroflavopéridine, au lieu de la numérotation IUPAC utilisée lors de publications antérieures (2, 3, 14).

En second lieu, l'activité nettement moins curarisante exercée par l'afrocurarine, comparativement à d'autres alcaloïdes (tubocurarine, C-curarine, C-dihydrotoxiférine et C-calebassine) (2) peut s'expliquer par une différence de structure plane et stéréochimique. Rappelons que les alcaloïdes très curarisants sont des molécules dimères parfaitement symétriques.

D'autre part, la purification de l'afrocurarine par chromatographie sur colonne en phase inversée, sous forme de paires d'ions, en moyenne pression, constitue un exemple supplémentaire de l'intérêt considérable que cette technique peut susciter dans le domaine de la purification des alcaloïdes quaternaires.

Enfin, les méthodes élaborées que constituent la spectrométrie de masse en désorption de champ et la résonance magnétique nucléaire à champs élevés se sont avérées déterminantes dans l'élucidation de cette structure complexe.

Partie Experimentale

Matériel étudié

Racines du *Strychnos usambarensis* Gilg récolté dans le Parc National de l'Akagera (Rwanda) (13).

Extraction et purification

1) Les schémas d'extraction et de purification des alcaloïdes du *S. usambarensis* et plus précisément des substances polaires, notamment de l'afrocurarine ont été décrits précédemment (13, 1).

2) Nous avons ensuite réalisé une nouvelle pré purification sur colonne de cellulose (élution: méthyléthylcétone saturée d'eau méthanol (98:2) d'un extrait brut des racines, contenant le totum des alcaloïdes polaires (3e groupe). La fraction 11' contenant l'afrocurarine a été chromatographiée sur colonne „reversed-phase“ en moyenne pression (3–4 kg/cm²) (Lobar RP8®Merck) sous forme de paires d'ions dans le système suivant: solution aqueuse, contenant comme contre-ion l'acide d(+)-camphosulfonique-10 0,02 M, du TMAH (tétraméthylammonium hydroxyde en solution à 25 % dans l'eau) 0,02 M et amenée à pH 6,5 (tampon phosphate)-méthanol (1:1). La détection est réalisée à l'aide d'un détecteur UV (254 nm).

La fraction contenant l'afrocurarine est additionnée d'une solution saturée d'acide picrique. Le picrate dissous dans le mélange acétone-méthanol-eau (6:2:1) est converti en chlorure sur colonne d'Amberlite IRA 400.

La solution d'afrocurarine (chlorure) pure élue est ensuite évaporée sous vide et séchée à 40° C sous vide.

Afrocurarine (C₃₉H₄₂N₄O)

Poudre rouge orangé, d'intense fluorescence orangé à 365 nm, colorée en bleu turquoise par Ce(SO₄)₂ 1 % dans H₂SO₄ 10 %. UV λ_{max}^{EtOH} nm (log ε): 203 (4,52), 253 (4,07), 272 (4,10), 312 (4,18), 418 (4,14); IR ν_{max}^{KBr}: 3400, 1630, 1595, 1575, 1480, 1455, 1380, 1320, 1285, 750 cm⁻¹; SM 250° C, 70 eV, m/z (ab. relat. en pourcentage du pic de base): 107 (62), 115 (17), 121 (15), 122 (20), 130 (18), 136 (18), 137 (14), 143 (27),

144 (44), 157 (10), 158 (12), 167 (20), 168 (20), 180 (22), 181 (18), 182 (14), 204 (62), 205 (24), 219 (40), 231 (25), 232 (26), 233 (23), 246 (37), 247 (35), 259 (22), 261 (30), 272 (100), 273 (31), 287 (18), 308 (9), 400 (10), 424 (22), 425 (22), 438 (24), 452 (28), 453 (41), 466 (7), 480 (9), 492 (8), 507 (12), 524 (12), 550 (22), 564 (2), 581 (M⁺-1), 0,3), 582 (M⁺, 0,1); RMN¹H Bruker 360 MHz, D₂O δ (ppm): 8,42 (H14'; s), 7,82 (H21'; s), 7,79–7,12 (8H benz.), 7,20 (H17'; s), 6,02 (H19; q), 4,7 (H5'; t; Σ³J = 14,6 Hz; W^{1/2} ≈ 3,5 Hz), 4,65 (H17; d; ³J_{H17-H16} = 10,2 Hz; W^{1/2} ≈ 1 Hz), 4,39 (H3; s él.; W^{1/2} ≈ 6 Hz); 4,32 (H2; d; ³J_{H2-H16} = 11,5 Hz; W^{1/2} ≈ 2 Hz), 4,31 (H21A; d; ²J_{H21A-H21B} ≈ 16 Hz; W^{1/2} ≈ 7 Hz), 3,99 (H21B; d; W^{1/2} ≈ 3 Hz), 3,9 (H5A + H5B; m), 3,35 (H15; m; W^{1/2} ≈ 7 Hz), 3,35 (H6'; t), 3,31 (Nb-Me; s), 2,91 (H19'A; q; ²J_{H19'A-H19'B} ≈ 15 Hz), 2,85 (H19'B; q), 2,74 (H6A; m), 2,44 (H14A; m; ²J_{H14A-H14B} ≈ 15 Hz), 2,34 (H6B; m), 2,07 (H16; t; ³J_{H16-H15} ≈ 2 Hz), 1,93 (H14B; m), 1,79 (Me18; d; ³J_{Me18-H19} ≈ 7,5 Hz), 1,34 (Me18'; t; ³J_{Me18'-H19} = 7,5 Hz); DC MeOH: Δε_{272 nm} = +2,0; Δε_{317 nm} = +3,1; Δε_{375 nm} = +1,6.

Remerciements

Nous tenons à exprimer nos plus vifs remerciements au Dr R. Verpoorte (Gorlaeus Laboratoria, Rijksuniversiteit Leiden) pour l'envoi d'un échantillon de longicaudatine et l'obtention des spectres FDMS, au Dr C. Houssier (Laboratoire de Chimie-Physique de l'Université de Liège) qui a pris les spectres de dichroïsme circulaire, au Dr M. Tits (Laboratoire de Pharmacognosie de l'Université de Liège) pour l'aide qu'elle nous a apportée dans la réalisation de ce travail.

M. C. remercie le Fonds National de la Recherche Scientifique qui lui a accordé un mandat d'aspirant.

References

- (1) Caprasse, M., Coune, C., Angenot, L. (1981) J. Pharm. Belg. 36, 243.
- (2) Angenot, L., Dubois, M., Ginion, Ch., Dorsser, W. van, Dresse, A. (1975) Arch. Intern. Pharmacodyn. Ther. 215, 246.
- (3) Angenot, L., Denoël, A. (1973) Planta Med. 23, 226.
- (4) Bisset, N. G., Verpoorte, R. (septembre 1982) comm. personnelle.
- (5) Klyne, W., Swan, R. J., Bycroft, B. W., Schmid, H. (1965) Helv. Chim. Acta 49, 833.
- (6) Klyne, W., Buckingham, J. (1974) Atlas of Stereochemistry. Absolute Configurations of Organic Molecules, Chapman and Hall, London.
- (7) Tits, M. (1982) Contribution à l'étude chimique du *Strychnos variabilis*, plante toxique du Bas-Zaïre. Thèse de doctorat en sciences pharmaceutiques. Université de Liège.
- (8) Tits, M., Angenot, L., Tavernier, D. (1983) J. Nat. Products, 46, 638.
- (9) Tits, M., Tavernier, D., Angenot, L. (1979) Phytochemistry 18, 515.
- (10) Tavernier, D., Anteunis, M. J. O., Tits, M., Angenot, L. (1978) Bull. Soc. Chem. Belg. 87, 595.
- (11) Tits, M., Tavernier, D., Angenot, L. (1980) Phytochemistry 19, 1531.
- (12) Chiaroni, A., Riche, C. (1979) Acta Cryst. B35, 1820.
- (13) Kan Fan, C., Husson, H.-Ph. (1980) Tetrahedron Letters 21, 4265.
- (14) Angenot, L. (1974) Contribution à l'étude du *S. usambarensis* Gilg, principal constituant d'un poison de flèche curarisant africain. Thèse de Doctorat en sciences pharmaceutiques, Université de Liège, 1973. Dissert. Abstr. Intern. 34, nr 11.