

ISOLEMENT ET STRUCTURE DE TROIS BASES ANHYDRONIUM DU *STRYCHNOS USAMBARENSIS* DU RWANDA

par

M. CAPRASSE (*), C. COUNE (**), et L. ANGENOT (*)

SUMMARY

Isolation and structure elucidation of three anhydronium bases from *Strychnos usambarensis* of Rwanda

Three anhydronium bases have been isolated by Droplet Counter Current Chromatography from *Strychnos usambarensis* root barks. They were identified as melinonine F, dihydro-5,6 flavopereirine and the novel normelinonine F through their spectroscopic data and comparison with authentic samples.

INTRODUCTION

Trois bases anhydronium, dérivées de la β -carboline, mélinonine F, normélinonine F et dihydro-5,6 flavopérierine ont été isolées par «DCCC» (Droplet Counter-Current Chromatography) à partir de fractions alcaloïdiques polaires du *Strychnos usambarensis*.

Si la normélinonine F est isolée pour la première fois dans le règne végétal, la mélinonine F et la dihydro-5,6 flavopérierine avaient déjà été identifiées, respectivement dans le *S. melinoniana* originaire d'Amérique du Sud (1) et le *S. usambarensis* (2).

La similitude de structure de la mélinonine F avec d'autres bases anhydronium telles que alstonine, serpentine et sempervirine pour lesquelles une activité antitumorale spécifique a été récemment décrite (3), nous a incités à étu-

dier son comportement vis-à-vis de cellules cancéreuses en culture. La mélinonine F possède certaines propriétés antimitotiques. Ces effets ne s'exercent cependant qu'à concentration relativement élevée (4, 5). Simultanément, nous avons étudié l'interaction de la mélinonine F et de la normélinonine F avec le DNA, cible habituelle de nombreux dérivés antitumoraux dans la cellule (6). Des essais semblables sont actuellement effectués sur la dihydro-5,6 flavopérierine et la sempervirine.

Nous décrivons ici la purification des alcaloïdes, la détermination de structure de la normélinonine F et les caractéristiques spectroscopiques complémentaires des deux autres. Les spectres RMN ^1H et ^{13}C de ces produits ainsi que du Nb-méthylharmaline de structure proche ont été réalisés.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Mélinonine F et normélinonine F

La séparation de ces deux alcaloïdes de structure proche fut extrêmement laborieuse. Elle a nécessité le recours à plusieurs techniques de purification, notamment la «DCCC» et la chromatographie préparative sur papier.

Une comparaison CCM avec le produit de référence a permis d'identifier rapidement la mélinonine F (fig. 1a).

Le second alcaloïde, fluorisant également en bleu à 365 nm montre un spectre UV semblable. Les fragments observés sur le spectre de

(*) Laboratoire de Pharmacognosie, Institut de Pharmacie, Université de Liège, Belgique.

(**) Adresse actuelle: Secrétariat technique de la Commission Européenne de Pharmacopée. Conseil de l'Europe. 67006 Strasbourg.

masse caractéristiques d'un dérivé de β -carbo-line ($m/z = 182, 181, 168, 154$) sont identiques. L'ion moléculaire ($m/z = 182 = M^+$) inférieur de 14 unités de masse à celui de la mélinonine F nous a permis de lui attribuer la structure décrite sur la figure 1b. Celle-ci a été confirmée par comparaison CCM avec le produit de méthylation du norharmane et par RMN 1H .

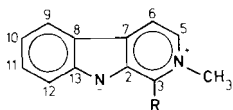


Fig. 1

a : R = CH₃, mélinonine F
b : R = H, normélinonine F

Dihydro-5,6 flavopérérine

La dihydro-5,6 flavopérérine (fig. 2) a été isolée pour la première fois en faible quantité à partir du même matériel végétal en utilisant

les techniques classiques de purification (2). Une chromatographie «DCCC» d'une nouvelle fraction d'alcaloïdes quaternaires des racines du *S. usambarensis* a permis d'obtenir une quantité plus importante de produit très pur, identifié par comparaison CCM avec l'alcaloïde de référence.

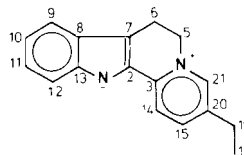


Fig. 2

Dihydro-5,6 flavopérérine.

Etant donné la relation de structure des trois bases anhydronium isolées, nous avons comparé leur spectre RMN ^{13}C (tableau I) ainsi que celui du Nb-méthylharmaline (fig. 3) aisément obtenu par synthèse (7) et dont la structure est en étroite corrélation avec celle de la

TABLEAU I
Déplacements chimiques RMN ^{13}C

	1	2	3	4	5	6
C-2	145,0	157,3	139,8	127,7 *	131,0 *	19,3
C-3	156,4	132,0	141,0	166,3	144,1	150,2 = C2
C-5	124,9	124,3	56,0	54,6	51,3	
C-6	113,3	116,6	19,1	20,3	21,2	
C-7	122,2	120,9	116,7	123,2	109,4	
C-8	128,7	131,3	124,8	124,6	126,3	
C-9	122,2	122,4	120,7	121,9 °	118,6 °	
C-10	118,7	118,5	120,9	122,0 °	118,3 °	
C-11	126,8	127,7	120,8	129,0	121,9	
C-12	116,3	115,1	112,8	113,4	111,1	
C-13	142,4	145,2	139,3	141,9 *	136,8 *	
C-14	14,2		126,2	50,1	79,5	127,0 = C3
C-15			145,1			142,7 = C4
C-18			14,5			13,9
C-19			25,2			24,5
C-20			125,2			139,4 = C5
C-21			144,1			142,7 = C6
Nb-Me	43,1	46,3		42,8	39,5	45,7 = N-Me
C-CH ₃						19,3
						Solvant
1 Mélinonine F					(base)	DMSO-d ₆
2 Normélinonine F					(base)	DMSO-d ₆
3 Dihydroflavopérérine					(chlorure)	DMSO-d ₆
4 Nb-méthylharmaline					(chlorure)	CD ₃ OD
5 Nb-méthylharmaline					(base)	DMSO-d ₆
6 N-(méthyl) méthyl-2 éthyl-5 pyridinium					(iodure)	DMSO-d ₆

*, ° valeurs échangeables dans une même colonne verticale
 δ (TMS) = δ (CD₃OD) + 49,0 ppm = δ (DMSO-d₆) + 39,5 ppm

dihydro-5,6 flavopéridine. Ces spectres ont été interprétés sur base des spectres en découplage total et non découplé, précédemment obtenus pour l'harmaine et l'harmaline (8).

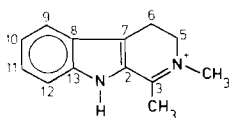


Fig. 3
Nb-méthylharmaline.

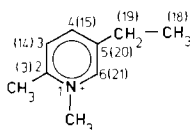


Fig. 4
N-(méthyl) méthyl-2 éthyl-5 pyridinium.

La dihydro-5,6 flavopéridine quant à elle, peut être envisagée comme l'«addition» de Nb-méthylharmaline et de N(méthyl)méthyl-2 éthyl-5 pyridinium (fig. 3 et 4).

Une différence importante dans la multiplicité des signaux existe entre les spectres non découplés des formes salifiée et base du Nb-méthylharmaline. En effet, parmi les carbones aliphatiques de la forme base, on observe trois triplets dont un très déblindé ($\delta = 79,5$ ppm) et un seul quadruplet (attribué au Nb-méthyle; $\delta = 39,5$ ppm) au lieu de deux triplets et deux quadruplets pour la forme salifiée. Lors de l'alcalinisation, on assiste donc au passage de la forme iminium à la forme énamine (fig. 5), fait déjà observé pour d'autres dérivés de la dihydro- β -carboline (9-14). Ce passage à la forme énamine n'est cependant pas observé pour la dihydro-5,6 flavopéridine vu l'aromaticité complète du cycle D supplémentaire. Cette molécule se comporte alors en milieu alcalin comme une base anhydronium tandis que le Nb-méthylharmaline n'appartiendrait pas à cette catégorie de produits, selon la définition donnée préalablement (15). De nettes divergences de comportement par rapport aux trois autres dérivés sont également observées en spectrométrie UV (effet hypsochrome en milieu alcalin $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ nm = 366, 247, 206;

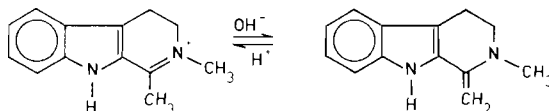


Fig. 5
Equilibre entre les formes iminium (milieu alcalin) et énamine (milieu acide) du Nb-méthylharmaline.

$\lambda_{\max}^{\text{EtONa}}$ nm = 313 ép., 305, 298 ép., 253) ainsi qu'en RMN ^1H (présence, en milieu alcalin, de deux singulets très déblindés correspondant chacun à l'un des protons non équivalents fixés sur le C14 ($\delta = 3,93$ et 4,4 ppm).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Matériel étudié: écorces (*) de racines du *Strychnos usambarensis* GILG décrit précédemment (16).

Extraction et purification

— Les schémas d'extraction et de prépurification sur colonne de cellulose des alcaloïdes polaires du *S. usambarensis*, en 20 sous-fractions ($F_1 - F_{20}$) ont été expliqués ailleurs (16, 17).

— Mélinonine F et normélinonine F

Les fractions F_7 et F_8 ont été successivement soumises à une chromatographie «DCCC» (appareil Eyela modèle DCCA, Tokyo Rikakikai, Tokyo, Japan, équipé de 300 tubes (\varnothing int.: 2 mm)) utilisant la phase inférieure du système chloroforme:méthanol:eau 9:12:8 comme phase mobile et la phase supérieure plus polaire comme phase stationnaire. L'éluat a été récolté à l'aide d'un collecteur de fractions (volume moyen: 3 ml/tube). Après contrôle CCM, avec la phase mobile du mélange précité ou le système méthanol:nitrate d'ammonium 1 M:ammoniaque 2 M 7:2:1, comme éluant, différents tubes ont été regroupés en un nombre limité de fractions.

(*) Les échantillons analysés proviennent du Parc National de l'Akagera au Rwanda (Herbier ANGENOT n° 22 — Bruxelles; Butare).

Certaines sous-fractions de F₈ réunies ont été à nouveau soumises à une chromatographie «DCCC» dans les mêmes conditions opératoires.

Les fractions issues de ces chromatographies, renfermant un alcaloïde fluorisant en bleu, ont été réunies sans toutefois mélanger celles provenant de F₇ et F₈. Elles ont ensuite été soumises à une chromatographie préparative sur papier Whatmann 3 MM, respectivement dans les systèmes isobutanol:HCl:eau 50:75:135 et méthyléthylcétone saturée d'eau.

Des fractions issues de F₇, nous avons surtout obtenu la mélinonine F et de F₈, la normélinonine F, séparées dans les deux cas de l'autre alcaloïde présent en moindre quantité.

– *Dihydro-5,6 flavopérérine*

Une nouvelle prépurification sur colonne de cellulose d'un extrait brut de racines contenant le totum des alcaloïdes polaires (3^e groupe) a été réalisée selon le procédé utilisé précédemment (16, 17). L'élution par la méthyléthylcétone saturée d'eau, contenant un gradient de méthanol (2 à 100%) a également abouti à l'obtention de 20 fractions (F'₁–F'₂₀). La fraction F'₄ renfermant en majorité la dihydro-5,6 flavopérérine a été purifiée par une seule chromatographie «DCCC» dans des conditions exactement semblables à celles décrites ci-dessus.

Caractères physico-chimiques

– *Mélinonine F* (C₁₃H₁₂N₂)

Poudre jaune pâle d'intense fluorescence bleue à 365 nm donnant une coloration rose avec FeCl₃/HClO₄ après chauffage.

UV $\lambda_{\max}^{\text{H}_2\text{O}}$ nm (log ϵ): 196 (4,44), 232 ép. (4,41), 249 (4,45), 304 (4,22), 370 (3,66)
 $\lambda_{\max}^{\text{NaOH}}$ nm (log ϵ): 225 (4,37), 274 (4,55), 322 (3,98), 407 (3,54)

IR $\tilde{\nu}_{\max}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 3140, 1640, 1590, 1540, 1460, 1395, 1340, 1300, 1230, 1125, 780

SM 250°C, 70 eV, m/z (ab. relat. en pourcentage du pic de base): 196 (M⁺; 100), 181 (18), 168 (9), 154 (30), 140 (3)

RMN¹H 90 MHz, DMSO-d₆, TMS, base, δ (ppm): 8,15 (2H; H5+H9); 7,90 (d; 1H; H6); 7,66 (d; 1H; H12); 7,38 (t; 1H; H11); 7,00 (t; 1H; H10); 4,20 (s; 3H; Nb-Me); 3,06 (s; 3H; C-CH₃)

– *Normélinonine F* (C₁₂H₁₀N₂)

Poudre jaune pâle d'intense fluorescence bleue à 365 nm, donnant une coloration rose avec FeCl₃/HClO₄ après chauffage.

UV $\lambda_{\max}^{\text{H}_2\text{O}}$ nm (log ϵ): 196 (4,51), 231 (4,43), 251 (4,44), 306 (4,22), 374 (3,64)
 $\lambda_{\max}^{\text{NaOH}}$ nm (log ϵ): 220 (4,51), 276 (4,61), 324 (4,0), 420 (3,53)

IR $\tilde{\nu}_{\max}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 3450, 3050, 1645, 1620, 1520, 1500, 1480, 1455, 1340, 1260, 1140, 805, 775

SM 250°C, 70 eV, m/z (ab. relat. en pourcentage du pic de base): 182 (M⁺; 100), 168 (74), 154 (8), 140 (31)

RMN¹H 360 MHz, CD₃OD, TMS, chlorure, δ (ppm): 9,19 (s; 1H; H3); 8,66 (d; 1H; H5); 8,5 (d; 1H; H6); 8,42 (d; 1H; H9); 7,82 (t; 1H; H11); 7,72 (d; 1H; H12); 7,48 (t; 1H; H10); 4,55 (s; 3H; Nb-Me)

– *Dihydro-5,6 flavopérérine* (C₁₇H₁₆N₂)

Poudre jaune d'intense fluorescence jaune à 365 nm.

UV $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ nm (log ϵ): 210 (4,23), 218 (4,41), 252 (3,93), 315 (4,15), 392 (4,16) (2,16)
 $\lambda_{\max}^{\text{EtONa}}$ nm (log ϵ): 211 (4,40), 218 ép. (4,33), 252 (3,78), 263 (3,62), 315 (3,97), 403 (3,99)

IR $\tilde{\nu}_{\max}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹: 3400, 1630, 1590, 1550, 1425, 1370, 1280, 1235, 845, 760, 745 (2,16)

SM 250°C, 70 eV, m/z (ab. relat. en pourcentage du pic de base): 248 (M⁺; 44), 247 (100), 232 (22), 231 (16), 219 (13), 204 (9), 167 (5), 154 (4), 143 (5), 140 (5), 115 (13) (2,16)

RMN¹H 250 MHz, DMSO-d₆, TMS, chlorure, δ (ppm): 12,89 (s; 1H; Na-H); 8,96 (s; 1H; H21); 8,45 (2H, H14+H15); 7,71 (d; 1H; H11); 7,54 (d; 1H; H12); 7,37 (t; 1H; H11); 7,18 (t; 1H; H10); 4,9 (t; 2H; H5); 3,27 (t; 2H; H6); 2,78 (q; 2H; H19); 1,28 (t; 3H; CH₃-18).

— Synthèse du Nb-méthylharmalane

Le Nb-méthylharmalane a été obtenu par action de l'iodure de méthyle sur l'harmalane, préparé par oxydation au P₂O₅, de l'acétyltryptamine (7).

REMERCIEMENTS

Nous tenons à exprimer nos plus vifs remerciements au Dr. D. TAVERNIER (Rijksuniversiteit Gent) pour la réalisation du spectre RMN¹H de la normélinonine F, au Centre de RMN de l'Université de Liège (directeur: G. LLABRES) où ont été pris les autres spectres RMN et au Dr. J. DELARGE (Service de Chimie pharmaceutique du Prof. C. L. LAPIÈRE, Université de Liège) pour l'obtention d'un échantillon de méthyl-2 ethyl-5 pyridine.

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

Reçu en mars 1983

Prof. Dr Luc ANGENOT
Service de Pharmacognosie
Institut de Pharmacie de
l'Université de Liège
Rue Fusch 5
B-4000 Liège (Belgique)

Résumé

Trois bases anhydronium dérivées de la β-carboline ont été purifiées par «DCCC» à partir des écorces de racines du *Strychnos usambarensis*. Il s'agit de

la dihydro-5,6 flavopéridine, de la mélinonine F et de la normélinonine F, isolée pour la première fois. Les identifications de ces molécules ont été déduites de leurs caractéristiques spectrales et de comparaisons chromatographiques avec des substances de référence naturelles ou semi-synthétiques.

Samenvatting

Er werden drie van B-carboline afgeleide anhydroniumbasen geïsoleerd uit wortelschors van *Strychnos usambarensis* door toepassing van „DCCC” (Droplet Counter Current Chromatography). Het gaat hier om 5,6-dihydroflavopéridine, melinonine F en normélinonine F, dat voor de eerste maal werd afgezonderd. De identificaties van deze moleculen werden afgeleid van hun spectrale kenmerken en van chromatografische vergelijkingen met natuurlijke of half-synthetische referentiestoffen.

Bibliographie

- (1) BÄCHLI, E., VAMVACAS, C., SCHMID, H. et KARRER, P., *Helv. Chim. Acta*, **40**, 1167 (1957).
- (2) ANGENOT, L. et DENOËL, A., *Planta Med.*, **23**, 226 (1973).
- (3) BELJANSKI, M. et BUGIEL, J., Demande de brevet français n° 78-07155 (1979).
- (4) BASSLEER, R., DE PAUW-GILLET, M.-Cl., MASSART, Br., MARNETTE, J.-M., WILQUET, Ph., CAPRASSE, M. et ANGENOT, L., *Planta Med.*, **45**, 123 (1982).
- (5) BASSLEER, R., MARNETTE, J.-M., WILQUET, Ph., DE PAUW-GILLET, M.-Cl., CAPRASSE, M. et ANGENOT, L., *Planta Med.* (1983) sous presse.
- (6) CAPRASSE, M. et HOUSSIER, C., *Biochimie*, **65**, 157 (1983).
- (7) SPÄTH, E. et LEDERER, E., *Chem. Ber.*, **63**, 2102 (1930).
- (8) COUNE, C., ANGENOT, L. et DENOËL, J., *Phytochemistry*, **19**, 2009 (1980).
- (9) ATTA-UR-RAHMAN, J. *Chem. Soc. Perkin I*, 731 (1972).
- (10) ZINNES, H., COMES, R. A. et SHAVEL, J., *J. Org. Chem.*, **30**, 105 (1965).
- (11) SCHUT, R. N. et LEIPZIG, T. J., *J. Heterocyclic Chem.*, **3**, 101 (1966).
- (12) PEUBE-LOCOU, N., KOCH, M., PLAT, M. et POTIER, P., *Phytochemistry*, **11**, 2109 (1972).
- (13) PEUBE-LOCOU, N., KOCH, M., PLAT, M. et POTIER, P., *Ann. Pharm. Fr.*, **30**, 775 (1972).
- (14) STAINIER, R., Oxydation vanadique de la réserpine et des alcaloïdes voisins. Application à leur dosage et étude des produits de réaction. Thèse de doctorat en sciences pharmaceutiques, Université de Liège (1972).
- (15) ARMIT, J. W. et ROBINSON, R., *J. Chem. Soc.*, **127**, 1604 (1925).
- (16) ANGENOT, L., Contribution à l'étude du *Strychnos usambarensis* GILG, principal constituant d'un poison de flèche curarisant africain. Thèse de doctorat en sciences pharmaceutiques, Université de Liège (1973). *Dissertation Abstracts International*, **34**, nr. 11 (1974).
- (17) ANGENOT, L., DUBOIS, M., GINION, C., VAN DORSSER, W. et DRESSE, A., *Arch. Intern. Pharmacodyn. Ther.*, **215**, 246 (1975).