

# 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. Duquénois, 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. 27

Februar 1975

Heft 1

Seite 24-30

Sonderdruck

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

DE NOUVEAUX ALCALOÏDES QUATÉRNAIRES DU  
STRYCHNOS USAMBARENSIS

*New quaternary alkaloids from Strychnos usambarensis*

par L. ANGENOT

### Abstract

*We have isolated and identified three quaternary monomeric alkaloids from barks of Strychnos usambarensis roots. Besides Macusine-B, previously found in Strychnos toxifera, two new products are described: O-methyl-Macusine-B and O-methyl-dihydro-Macusine-B. It is not easy to discuss the origin of these last alkaloids that take form perhaps during the extraction. The purification is very laborious because Strychnos usambarensis contains more than sixty alkaloids.*

### Conclusions

*A partir du Strychnos usambarensis, nous avons isolé et identifié – principalement à l'aide de la spectrométrie de masse – trois alcaloïdes monomères quaternaires. A côté de la Macusine-B déjà connue se trouvent deux nouveaux produits y directement apparentés: O-méthyl-Macusine-B et O-méthyl-dihydro-Macusine-B.*

*Il est difficile de se prononcer sur l'origine de ces derniers alcaloïdes qui peuvent peut-être se former lors des procédés laborieux d'isolement. L'emploi de ces procédés est exigé vu la complexité chimique des écorces de racines de ce Strychnos dont des chromatographies révèlent la présence de plus de 60 alcaloïdes.*

### Introduction

De nombreuses publications ont déjà été consacrées à l'étude tant chimique que pharmacologique des divers alcaloïdes extraits du *Strychnos usambarensis* GILG. Nous décrivons à présent l'isolement d'alcaloïdes monomères quaternaires. Ces derniers ne sont pas responsables de l'activité curarisante élevée des extraits de racines.

*Ière partie – ISOLEMENT ET PURIFICATION*

Les alcaloïdes ont été obtenus lors de la purification de la dihydroflavopéirine présente dans les fractions d'alcaloïdes solubles en milieu légèrement alcalin (PI et PII) qui sont susceptibles de contenir les alcaloïdes quaternaires, phénoliques et les bases anhydronium (ANGENOT et DENOËL, 1972).

Ces fractions ont été chromatographiées sur une colonne de cellulose microcristalline Whatman CC31 et éluées par de la méthyléthylcétone saturée d'eau et contenant un pourcentage croissant de méthanol. De la sorte, 250 fractions de 100 ml ont été récoltées, analysées par chromatographie et réunies en 22 groupes ( $F_1$  à  $F_{22}$ ). Toute cette séparation est détaillée ailleurs (ANGENOT, 1974).

Les fractions 25 à 33 ( $F_4$ ) contenaient de la dihydroflavopéirine déjà obtenue précédemment ainsi que d'autres substances alcaloïdiques.

Pour séparer les principaux constituants de la fraction  $F_4$ , nous avons dû réaliser à nouveau une seconde chromatographie sur colonne de cellulose mais en éluant cette fois par le mélange: acétate d'éthyle-pyridine-eau 65:23:16,5 (SCHMID, H. et al., 1952).

De la sorte, 25 fractions de 20 ml ont été recueillies, analysées et réunies comme suit:

- f* 1 à 8 renfermaient un mélange d'alcaloïdes dont l'étude n'a pas été poursuivie.
- f* 9 à 18 contenaient à côté d'une base anhydronium, les alcaloïdes monoquaternaires n° 11 et 12.

Les fractions ainsi réunies ont été évaporées sous vide à température inférieure à 45° C. Le résidu a été redissous dans un peu d'eau distillée et amené à pH 12 par de la soude. A ce moment, on peut procéder à l'extraction de la base anhydronium par du chloroforme. L'étude des spectres réalisés sur cette substance a permis de l'identifier à la dihydro-flavopéirine (ANGENOT et DENOËL, 1973).

Les solutions alcalines sont ensuite amenées à pH 5 par HCl et traitées par une solution d'acide picrique suivant une technique déjà décrite (ANGENOT, 1974). Les picrates d'alcaloïdes quaternaires sont transformés en chlorures par passage sur résine Amberlite IRA 400. Les chlorures d'alcaloïdes 11 et 12 sont enfin séparés sur une colonne de Kieselgel 60 MERCK en éluant par le mélange de solvants chloroforme-acétate d'éthyle-méthanol dans les proportions suivantes:

40:40:20	de 0 à 400 ml
30:30:40	400 à 800 ml
20:20:60	800 à 1200 ml
méthanol pur	1200 à 1600 ml

Les fractions (20 ml) n° 1 à 33 renferment des traces d'alcaloïdes

34 à 51	alcaloïde n° 11 (40 mgr)
52 à 74	alcaloïde n° 12 (16 mgr)
75 à 80	traces d'alcaloïdes

f 19 à 25 contenaient à côté de la base anhydronium (dihydroflavopéirine) déjà présente dans les fractions 9 à 18, un autre alcaloïde monoquaternaire très peu soluble: n° 13.

Cet alcaloïde cristallise spontanément en belles aiguilles par simple évaporation à l'air libre. Suite à une légère concentration au rotavapor, on assiste à une précipitation quantitative. Le précipité est recueilli sur verre fritté G<sub>4</sub>, lavé à l'eau froide et séché sous vide. On obtient de la sorte 25 mg d'alcaloïdes.

### Ilème partie – ANALYSE DES NOUVEAUX ALCALOÏDES

Elle est basée sur l'interprétation des différents spectres et des chromatographies réalisées après méthylation ou acétylation des alcaloïdes et si possible en présence de substances de référence.

Les spectres U.V. ont été effectués en solution méthanolique sur un Perkin-Elmer 124.

Les spectres I.R. ont été enregistrés après pastillage dans KBr à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman IR 20A.

Les spectres de masse ont été pris par Mr D. CARTER sur un spectromètre AEI MS 902 à haute résolution de l'Université de Londres. Les alcaloïdes sont introduits directement dans la chambre d'ionisation à la température de 240° C et soumis à un bombardement électronique dont l'énergie est de 70 eV.

#### II. 1. Alcaloïde n° 11

Son spectre UV. ( $\lambda_{\max}$  (log  $\epsilon$ ) = 219 (4,62), 272 (3,86), 277 (3,84), 280

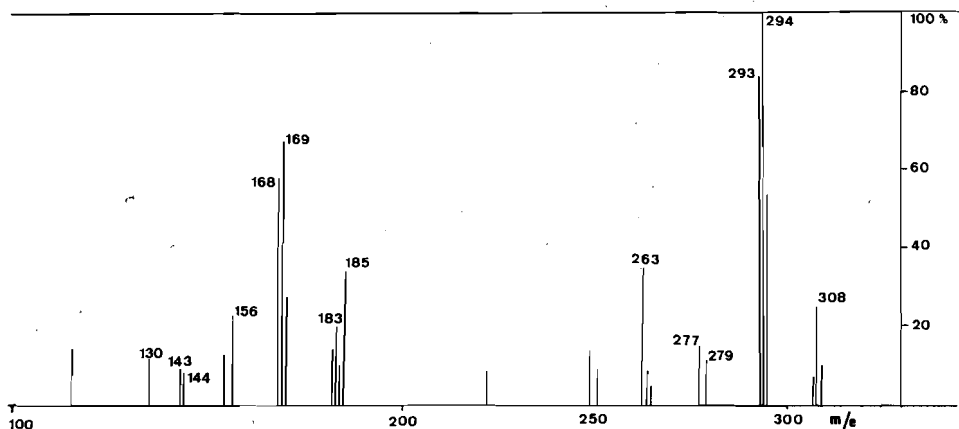


Figure 1  
Spectre de Masse de l'Alcaloïde n° 11

(3,83, 288 (3,75) nm;  $\lambda_{\text{min}}$  ( $\log \epsilon$ ) = 239, (3,30), 287 (3,62) nm est caractéristique d'une structure tétrahydro- $\beta$ -carboline non substituée sur le cycle A. Il n'y a pas de modification spectrale en milieu alcalin ni en milieu acide.

Le spectre I.R. laisse apparaître des bandes à  $\nu$  3400 (OH et NH), 2930, 1635 (C=C), 1615, 1542, 1450, 1380, 1327, 1237, 1182, 1025, 922 et 745 (benzène orthodisubstitué)  $\text{cm}^{-1}$ .

L'alcaloïde possède de plus une fonction acétylable à température ordinaire (groupe hydroxyle).

Le spectre de masse (figure n° 1) montre la fragmentation caractéristique d'un alcaloïde quaternaire = la macusine B (KHAN et al, 1967) dont la structure est reprise dans la figure n° 2.

Les principaux pics observés sur la figure n° 1 correspondent aux fragments suivants:

m/e 309: ion moléculaire  $\text{C}_{20}\text{H}_{25}\text{ON}_2$

m/e 308: base de HOFMANN

294: nor-base

277: nor-base-OH

263: nor-base- $\text{CH}_2\text{OH}$

249: rupture de la liaison 5-16, suivie du départ de la chaîne  $\text{C}_{16}$ - $\text{C}_{17}$

168 et 169: pics de la série de type »polneuridine« et non yohimbine où les pics sont à m/e 169 et 170.

Ces valeurs spectrales se rencontrent dans la littérature (BIEMANN, 1961; ANTONACCIO et al., 1962).

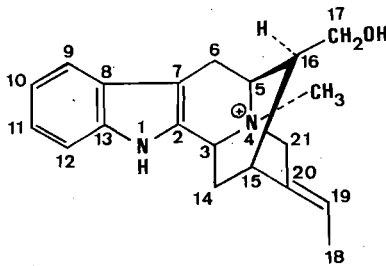


Figure 2  
Structure de la Macusine-B

La Macusine B a été rencontrée d'abord dans le *Strychnos toxifera* (BATTERSBY et al., 1960) et ensuite dans le curare en calebasse et différentes apocynacées = *Aspidosperma peroba*, *Pleiocarpa tubicina* et *Pleiocarpa pycnantha* (HESSE, 1968).

Nous avons pu nous assurer définitivement de l'identification de cet alcaloïde en comparant son comportement chromatographique en présence de Macusine-B de référence isolée du *Strychnos toxifera* (BATTERSBY et al., 1960).

Phase stationnaire = Silicagel MERCK F254

Phases mobiles a) chloroforme-acétate d'éthyle-méthanol 4:4:2 Rf 0,14

b) propanol-ammoniaque concentré 8:2 Rf 0,60

c) butanol-acide acétique-eau 4:1:1 Rf 0,56

## II. 2. Alcaloïde n° 12

Le spectre ultra-violet est identique à celui de la Macusine-B. Le spectre I.R. présente des bandes à  $\nu$  3400, 1580, 1440, 1380, 1342, 1180 et 746  $\text{cm}^{-1}$ .

Le spectre de masse (figure n° 3) ne présente qu'un décalage de 14 unités de masse par rapport au spectre de la Macusine-B.

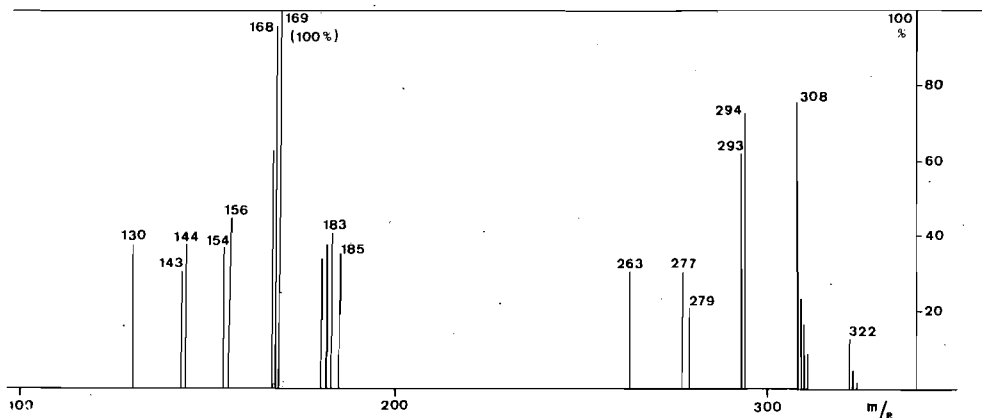


Figure 3  
Spectre de Masse de l'Alcaloïde n° 12

Ce décalage suggère la présence supplémentaire d'un méthyle sur la partie non indolique de la molécule, puisque les pics à  $m/e$  130, 143, 144, 156, 168 et 169 sont toujours présents. La seule modification de structure doit être l'apparition d'un groupe éthoxyle. L'alcaloïde en effet n'est plus acétylable à température ordinaire (absence de groupe hydroxyle). D'autre part, les méthylations exhaustives à reflux en présence de  $\text{CaCO}_3$  et de méthanol, des alcaloïdes 11 et 12 aboutissent – d'après les chromatographies réalisées tant en continu sur papier que sur couche mince de silicagel – au même produit que nous n'avons pu malheureusement obtenir à l'état cristallin.

Nous proposons donc pour l'alcaloïde n° 12, la structure (figure n° 4) de la O-méthyl-Macusine-B,  $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{ON}_2$  dont le PM est de 323.

## III. 3. Alcaloïde n° 13

Le spectre ultra-violet laisse apparaître le même chromophore principal que les

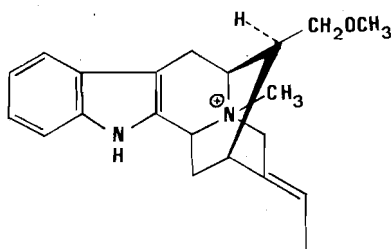


Figure 4  
Structure de la O-méthyl-Macusine-B

deux alcaloïdes précédents:  $\lambda_{\max}$  ( $\log \epsilon$ ) = 220 (4,66), 273 (3,97), 278 (3,95), 282 (3,94), 289 (3,84) nm:  $\lambda_{\min}$ , ( $\log \epsilon$ ) = 241 (3,39), 276 (3,94), 287 (3,75) nm. Le spectre I.R. est aussi très proche ( $\nu$  3300, 2870, 1640, 1463, 1380, 1325, 1282, 1228, 1180, 1155, 1087, 1000, 945, 912, 763 et 755  $\text{cm}^{-1}$ ).

Le spectre de masse (figure n° 5) montre une fragmentation quasi identique à celle de l'alcaloïde n° 12.

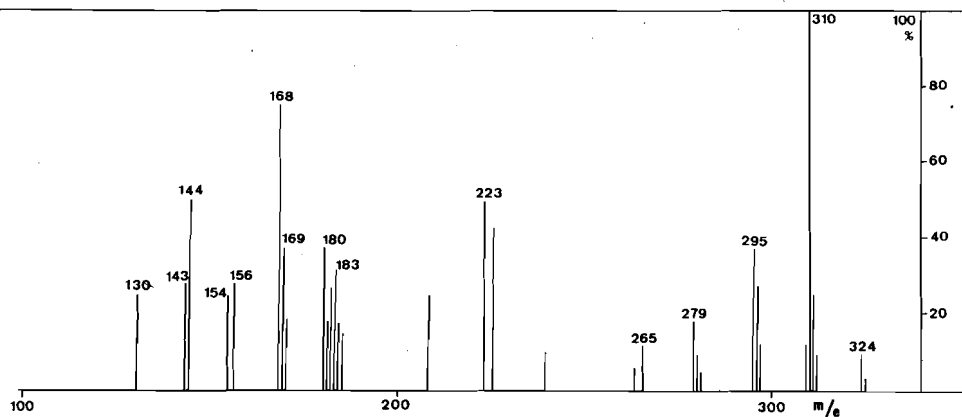


Figure 5  
Spectre de Masse de l'Alcaloïde n° 13

On observera cependant deux différences importantes:

- 1° Les pics de la partie droite du spectre sont déplacés de 2 unités de masse à partir de  $m/e$  265 jusqu'à 325 ( $M^+$ ).
- 2° Un pic important apparaît à  $m/e$  223.

Ces deux modifications spectrales peuvent s'expliquer par l'hydrogénation de la liaison éthylidène qui permet la rupture de la liaison 15-20 et la formation d'un fragment  $m/e$  223 (ANTONACCIO et al., 1962).

Cet alcaloïde aurait alors la structure (figure n° 6) de la O-méthyl-dihydro-Macusine-B,  $C_{21}H_{29}ON_2$  dont le PM est de 325.

Cette supposition est corroborée par le comportement chromatographique identique des produits de méthylation exhaustive de l'alcaloïde n° 13 et de la dihydro-nor-Macusine-B préparée par le Pr. BATTERSBY (BATTERSBY et al., 1964).

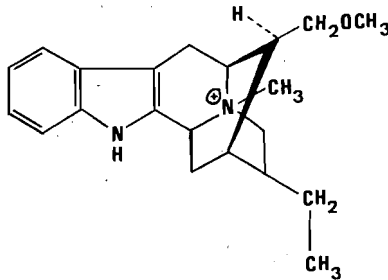


Figure 6  
Structure de la O-méthyl-dihydro-Macusine-B

#### Remerciements

Nous tenons à exprimer nos plus vifs remerciements au Professeur A. R. BATTERSBY (University of Cambridge) pour l'envoi d'échantillons de Macusine-B et de dihydro-nor-Macusine-B; au Dr N. G. BISSET et à Mr D. CARTER (University of London) qui se sont chargés des spectres de masse des différents alcaloïdes.

#### Bibliographie

- ANGENOT, L. et DENOËL, A.: *Pl. Medica*, **21**, 96 (1972)  
 ANGENOT, L. et DENOËL, A.: *Pl. Medica*, **23**, 226 (1973)  
 ANGENOT, L., Contribution to the study of *Strychnos usambarensis*, main ingredient of an african curarizing arrow poison; nr 74, 11-338, Univ. Microfilms - Ann Arbor, Michigan, U.S.A. (1974)  
 ANTONACCIO, L. D., PEREIRA, N. A., GILBERT, B., VORBRUEGGEN, H., BUDZIKIEWICZ, H., WILSON, J. M., DURHAM, L. J., DJERASSI, C.: *J. Chem. Soc.*, **84**, 2161 (1962)  
 BATTERSBY, A. R., BINKS, R., HODSON, H. F., YEOWELL, D. A.: *J. Chem. Soc.* 1848 (1960)  
 BATTERSBY, A. R., YEOWELL, D. A.: *J. Chem. Soc.* 4419 (1964)  
 BIEMANN, K.: *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 4801 (1961)  
 HESSE, M.: *Indolalkaloïde in Tabellen*, Springer Verlag, Berlin (1968)  
 KHAN, Z. M., HESSE, M., und SCHMID, H.: *Helv. Chim. Acta*, **50**, 625 (1967)  
 SCHMID, H., KEBRLE, E., u. KARRER, P., *Helv. Chim. Acta*, **35**, 1864 (1952)

Adresse de l'auteur: Dr. Luc Angenot, Laboratoire de Pharmacognosie, Institut de Pharmacie,  
Rue Fusch, 5, B-4000 Liege.