

ISOLEMENT PAR DCCC (DROPLET COUNTER-CURRENT CHROMATOGRAPHY) DE LA FLUOROCURARINE A PARTIR DU STRYCHNOS USAMBARENSIS GILG DU RWANDA

par

Maryse CAPRASSE, Claude COUNE et Luc ANGENOT

SUMMARY

Isolation by DCCC (Droplet Counter-current Chromatography) of fluorocurarine from *Strychnos usambarensis* GILG of Rwanda

Fluorocurarine is isolated from the root barks of Strychnos usambarensis GILG (Rwanda) by Droplet Counter-current Chromatography (DCCC), a new technique of liquid-liquid chromatography. This quaternary alkaloid is found for the first time in an african Strychnos. M.S., C.D., ¹H NMR, ¹³C NMR are also provided.

KEY WORDS

Strychnos usambarensis — Loganiaceae — Quaternary indole alkaloid: fluorocurarine — Droplet Counter-current Chromatography

INTRODUCTION

Le *Strychnos usambarensis* étudié à Liège depuis plusieurs années a déjà fourni quantité de molécules nouvelles, essentiellement alcaloïdes indoliques tertiaires, quaternaires et bases anhydronium (1 à 7).

Cependant on constate que, en général, ces deux derniers groupes ont été jusqu'à présent très peu explorés en raison des difficultés inhérentes à leur purification. Ces substances, très polaires, s'adsorbent presque irréversiblement sur les supports solides.

En l'occurrence, plusieurs fractions alcaloïdiques polaires du *S. usambarensis* n'ont pas encore été étudiées.

Nous relatons ici l'usage d'une nouvelle technique, la chromatographie goutte à goutte à

contre-courant « Droplet Counter-current Chromatography » (DCCC), pour la purification d'un de ces extraits et l'isolement de l'alcaloïde majoritaire, la fluorocurarine.

PRINCIPE DE LA DCCC

La DCCC, nouvelle technique de chromatographie liquide-liquide, est basée sur le partage de substances entre des gouttelettes de phase mobile libérées sous pression à travers une phase stationnaire liquide non miscible.

La méthode a été mise au point par TANIMURA *et al* (8) et est déjà largement appliquée à la séparation et à la purification de divers glucosides (saponines, iridoïdes, séco-iridoïdes...).

Description de la méthode (voir fig. 1 et 2)

Une série variable de colonnes en verre de faible diamètre (1,5 à 2 mm) sont reliées entre elles par des capillaires en téflon. Leur nombre varie en moyenne de 150 à 600. Ces colonnes sont remplies par la phase stationnaire. L'échantillon dissous dans un mélange ou dans l'une des deux phases, est ensuite injecté dans la chambre prévue à cet effet.

La phase mobile est alors pompée et entraîne l'échantillon jusqu'à l'entrée du premier tube en verre où s'installe un flux régulier de gouttelettes à travers la phase stationnaire. Tout au long du déplacement de chaque gouttelette, il s'établit alors entre celle-ci et la phase stationnaire un partage du soluté (voir fig. 2).

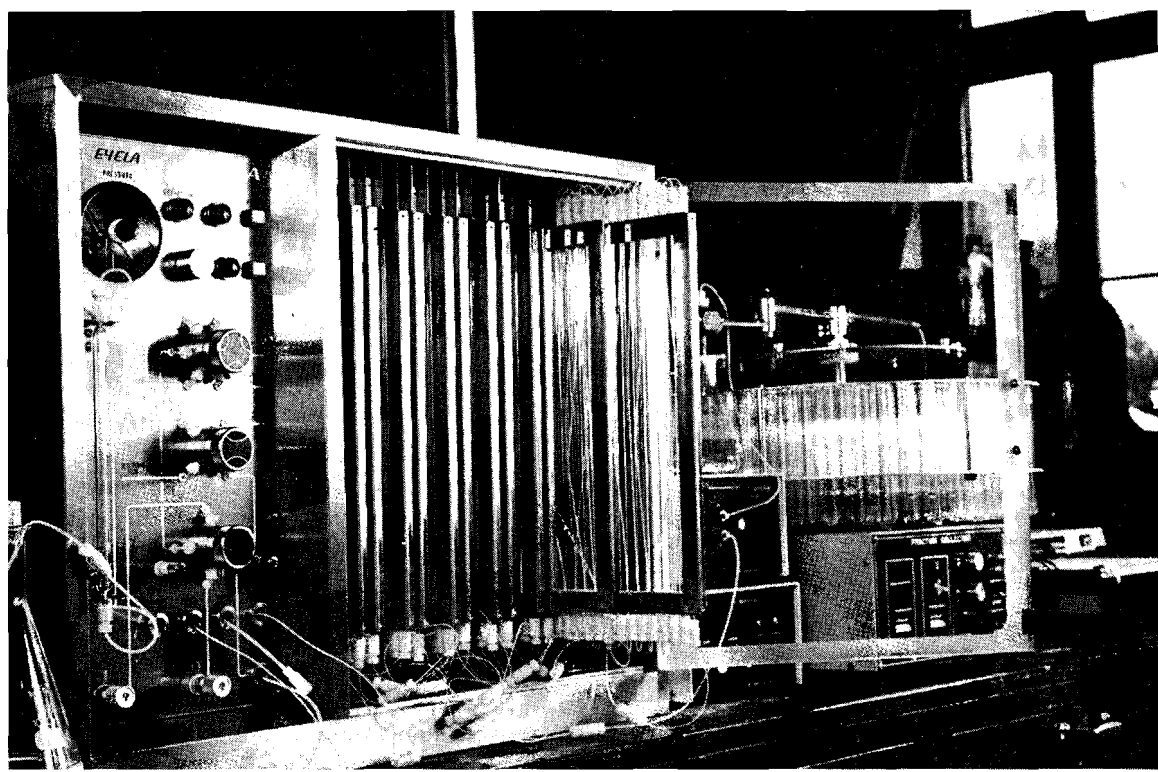


Fig. 1
Appareil de chromatographie goutte à goutte à contre-courant.

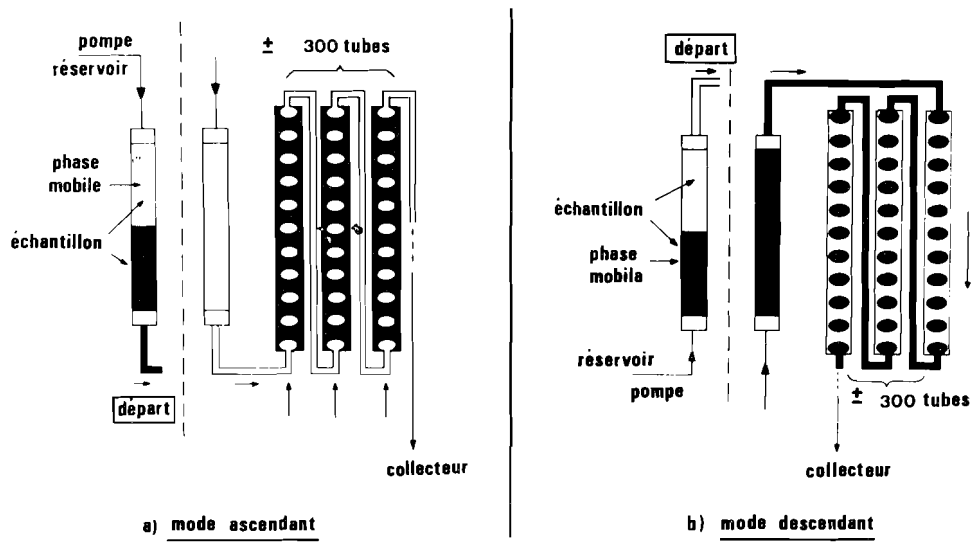


Fig. 2
Principe schématique de la méthode.

Selon la polarité des produits à séparer, il est possible d'utiliser la phase organique ou la phase aqueuse comme phase mobile. Lorsque cette dernière est plus légère, elle est amenée au bas de la première colonne (mode ascendant) et lorsqu'elle est plus lourde, elle est délivrée au dessus (mode descendant) (voir fig. 2a et 2b).

Tout système de solvant formant deux phases non miscibles peut être utilisé. Il doit toutefois permettre la formation aisée de gouttelettes adéquates, ce qui dépend notamment de la différence des poids spécifiques des deux phases, de la viscosité des solvants, de la tension superficielle et du débit de la phase mobile.

Plusieurs systèmes ont déjà été proposés, en fonction de la nature des produits à séparer (9). Une méthode rapide a été mise au point pour choisir, par CCM, le système de solvants adéquat, suivant la valeur des R_f obtenus en utilisant comme éluant la phase organique des systèmes (10, 11).

Avantages et désavantages

- Étant donné l'absence de support solide engendrant une adsorption souvent irréversible des produits, c'est une méthode de choix pour la purification des substances polaires, récupérées quantitativement après l'opération. De la même façon, les extraits bruts naturels peuvent être injectés sans prépurification.
- Le volume de phase stationnaire utilisé, pouvant varier dans une large mesure, la technique est aisément applicable à l'échelle préparative : les quantités analysées pouvant atteindre 4 gr.
- L'absence d'agitation évite la formation d'émulsions particulièrement redoutables avec les saponines ou les alcaloïdes quaternaires lorsqu'on utilise, pour les séparer, la technique du contre-courant classique.
- Par rapport à cette dernière, elle a l'avantage d'être moins encombrante et de présenter un pouvoir de résolution nettement plus élevé, dépendant du nombre de colonnes utilisées. Néanmoins, le nombre de plateaux théoriques est limité à 1000 ou 1500, résolution inférieure à celle obtenue en HPLC.

— Puisque le coefficient de partage est indépendant de la quantité des substances à séparer et de la présence d'autres constituants, jusqu'à une certaine concentration, la méthode est particulièrement adaptée à la purification des substances naturelles.

Signalons également — l'application de la méthode à la séparation d'un grand nombre de produits de polarité différente en raison de l'utilisation possible selon les modes ascendant et descendant — une absence de contact avec l'oxygène de l'air évitant ainsi l'oxydation des produits instables — une modification possible du pH durant l'éluion.

Toutefois, la DCCC présente aussi certaines limites surtout liées à la formation des gouttelettes et aux facteurs dont elle dépend.

Vu ses nombreux avantages, la DCCC utilisée seule ou jumelée aux autres techniques de purification, s'avère un appoint appréciable dans un laboratoire. Elle est cependant tout-à-fait justifiée dans les cas de séparation de produits polaires.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Lors des procédés d'extraction des racines de *S. usambarensis* (1), les alcaloïdes très polaires (3^e groupe) ont été prépurifiés par chromatographie sur colonne et ainsi séparés en 22 fractions (F_1 à F_{22}) (2).

La fraction F_6 a été soumise à une première chromatographie (DCCC) utilisant la phase inférieure du système, chloroforme:méthanol:n-propanol:eau 9:12:1:8, comme phase mobile et la phase inférieure, plus polaire, comme phase stationnaire. On a obtenu de la sorte 7 sous-fractions alcaloïdiques (voir tableau 1).

La première fraction renferme une substance très vite dégradée, présentant à 365 nm une intense fluorescence jaune. Les fractions 2 à 6 consistent en un mélange de produits parmi lesquels on a pu néanmoins mettre en évidence, par CCM avec des substances de référence, la présence de N'-b-méthyl-usambarensine, N'-b-méthyl-3,4-dihydro-usambarensine et de 6,7-dihydro-flavopéridine (1, 2).

La fraction 8, quantitativement la plus importante, montre un produit nettement majoritaire, possédant une intense fluorescence jaune verdâtre à 365 nm. Une nouvelle chromatographie de cette dernière fraction, avec un système de solvants un peu différent (voir partie expérimentale) a permis d'isoler 200 mgr de fluorocurarine purissime, précédemment mise en évidence dans le curare en calébaesses et dans diverses espèces de *Strychnos* (12, 13).

TABLEAU 1
Fractionnement de F₆ par DCCC

| Eluat-Tubes (n°) | Poids (mg) | Constituant(s) majoritaire(s) |
|------------------|------------|--|
| 1 | 40-58 | 17 |
| 2 | 125-169 | 37 N'b-méthyl-3,4-dihydro-usambarensine |
| 3 | 170-187 | 19 N'b-méthyl-3,4-dihydro-usambarensine + N'b-méthyl-usambarensine |
| 4 | 188-221 | 169 N'b-méthyl-usambarensine |
| 5 | 222-262 | 45 Mélange complexe |
| 6 | 263-278 | 104 Mélange complexe dont 6,7-dihydro-flavopéridine |
| 7 | 279-309 | 340 Fluorocurarine |

La fluorocurarine (voir fig. 3) a été identifiée à l'aide des techniques spectrométriques habituelles (SM, IR, UV, ¹H RMN, ¹³C RMN).

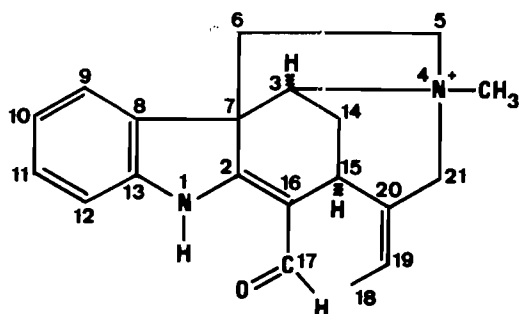


Fig. 3
Fluorocurarine

Le spectre ¹³C RMN a été interprété sur base des mesures de découplage total et « off-

resonance » en comparaison avec les spectres déjà publiés de l'isorétuline (14) et des dérivés de la tabersonine (15). De même, le spectre ¹H RMN a été interprété au moyen des mesures habituelles de simple et double résonance en comparaison avec les spectres des alcaloïdes indoliniques abondamment étudiés dans notre laboratoire (16).

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Matériel étudié : racines du *Strychnos usambarensis* GILG récolté dans le Parc National de l'Akagera (Rwanda) (1).

Extraction et purification : les schémas d'extraction et de séparation des alcaloïdes du *S. usambarensis* et plus précisément des substances polaires, ont été décrits précédemment (1, 2). Seule la fraction F₆ a retenu ici notre attention.

Procédé de DCCC : La purification des chlorures d'alcaloïdes de la fraction F₆ (740 mgr) a été effectuée sur un appareil Tokyo Rikakikai, Tokyo Japan, Modèle DCCA, équipé successivement pour les deux chromatographies, de 300 et 150 tubes.

Choix des systèmes de solvants

Phase stationnaire : phase supérieure (plus polaire) des systèmes chloroforme:méthanol:n-propanol: eau 9:12:1:8 et chloroforme:méthanol: eau 5:10:6.

Phase mobile : phase inférieure (moins polaire) des mêmes systèmes.

L'éluat a été récolté à l'aide d'un collecteur de fractions (volume moyen : 3 ml par tube). Après contrôle CCM, avec comme éluant, la phase mobile des mélanges précités ou le système méthanol:ammoniaque 2M:nitrate ammonique 1M 7:2:1, on a opéré un regroupement des tubes (voir tableau 1).

Analyse de la fluorocurarine : poudre jaune pâle, d'intense fluorescence jaune verdâtre à 365 nm, fortement lévogyre (17, 18).

UV : $\lambda_{\max}^{\text{EtOH}}$ nm (log ϵ) 207 (4,17), 243 (3,97),
292 ép. (3,55), 299 (3,6), 361 (4,17)

$\lambda_{\max}^{\text{EtONa}}$ nm (log ϵ) 212 (4,82), 249 (3,91),
270 ép. (3,64), 317 (3,73), 392 (4,26)

DC (MeOH) $\Delta\epsilon_{207\text{nm}} = -12,67$
 $\Delta\epsilon_{356\text{nm}} = -12,98$

IR $\tilde{\nu}_{\text{KBr}}^{\text{cm}^{-1}}$ 3400, 3065, 2980, 2952, 2820, 1635
(α méthylène indolénine) 1605, 1595,
1480, 1462, 1420, 1192, 1180, 976, 820,
742

SM 320°, 70 eV, m/z (ab. relat. en pourcentage
du pic de base) 307 (8-M⁺), 292 (26),
277 (19), 263 (12), 249 (14), 247 (14),
185 (28), 180 (24), 170 (33), 168 (31),
167 (41), 156 (27), 154 (27), 144 (15),
143 (14), 130 (19), 129 (21), 121 (65),
115 (21), 107 (100), 106 (71),
92 (119), 52 (52), 50 (177).

¹H RMN Bruker 360 MHz CD₃OD TMS
 δ 7,65 ppm-7,08 ppm (4 protons arom-
atiques), 9,58 ppm (H₁₇; s; W_{1/2} \simeq
5 Hz) 5,85 ppm (H₁₉; q; $J_{\text{H}_{19}\text{Me}_{18}}$ =
7,0 Hz) 4,6 ppm (H₃; $J_{\text{H}_3\text{H}_{14\text{A}}}$ \simeq
2,4 Hz) 4,1 ppm (H₁₅; W_{1/2} =
11,5 Hz) 4,29 ppm (H_{21\text{A}}}; d;
 $^2J_{\text{H}_{21\text{A}}\text{H}_{21\text{B}}}$ = 14,4 Hz; W_{1/2} = 7,5 Hz)
4,17 ppm (H_{21\text{B}}}; d; W_{1/2} = 2,5 Hz)
4,05 ppm (H_{5\text{A}}}; $^2J_{\text{H}_{5\text{A}}\text{H}_{5\text{B}}}$ \simeq 13 Hz)
3,98 ppm (H_{5\text{B}}}) 3,5 ppm (NCH₃; s)
2,87 ppm (H_{6\text{A}}}; $^2J_{\text{H}_{6\text{A}}\text{H}_{6\text{B}}}$ \simeq 14 Hz)
2,81 ppm (H_{14\text{A}}}; $^2J_{\text{H}_{14\text{A}}\text{H}_{14\text{B}}}$ \simeq 14,8 Hz;
 $^3J_{\text{H}_{14\text{A}}\text{H}_3}$ \simeq 2,4 Hz) 2,14 ppm (H_{6\text{B}}})
1,7 ppm (Me₁₈; dt; $^2J_{\text{Me}_{18}\text{H}_{19}}$ = 7 Hz;
couplage à longue distance \simeq 1,6 Hz)
1,57 (H_{14\text{B}}}).

¹³C RMN Bruker 90 Mz D₂O
($\delta_{\text{dioxane}} = \delta_{\text{TMS}} - 67,4$ ppm)
189,5 (C₁₇), 166,6 (C₂), 143,2 (C₁₃),
134,7 (C₂₀), 131,9 (C₈), 130,5 (C₁₁ +
C₁₉), 124,2 (C₁₀), 122,2 (C₉),
112,69 (C₁₂ + C₁₆), 74,9 (C₃),
68,8 (C₅ + C₂₁), 59,4 (C₇),
57,5 (N-Me), 44,8 (C₆), 30,7 (C₁₅),
30,3 (C₁₄), 16,6 (C₁₈).

CONCLUSIONS

La DCCC, outre ses applications déjà expéri-
mentées à la séparation de divers glucosides
(saponines, iridoïdes, séco-iridoïdes...), s'avère
également une technique de choix pour la
purification à l'échelle préparative des al-
caloïdes polaires et plus précisément des
alcaloïdes quaternaires et des bases anhy-
dronium.

La fluorocurarine est isolée pour la première
fois à partir d'un *Strychnos* africain et ses
caractéristiques spectrales ¹H RMN, ¹³C RMN,
SM, DC qui n'avaient pas été publiées précé-
demment sont maintenant précisées dans cette
publication.

Rappelons que la fluorocurarine est un
alcaloïde doué d'un pouvoir curarisant léger,
tandis que son dérivé déméthylé, norfluoro-
curarine ou vincanine, est un stimulant du
système nerveux central utilisé en U.R.S.S.

REMERCIEMENTS

*Nous adressons nos plus vifs remerciements à
M. le Dr. D. TAVERNIER (Rijksuniversiteit te
Gent) qui a réalisé le spectre de ¹H RMN à
360 MHz.*

M. CAPRASSE, Asp. F.N.R.S.
Institut de Pharmacie de
l'Université de Liège
Service de Pharmacognosie
(Directeur : Prof. L. ANGENOT)
Rue Fusch, 5
4000 Liège (Belgique)

Résumé

Une nouvelle technique de chromatographie
liquide-liquide, « Droplet Counter-current Chro-
matography » (DCCC), a permis d'isoler la fluoro-
curarine à partir des racines du *Strychnos usambaren-
sis* GILG (Rwanda). Cet alcaloïde quaternaire est
découvert pour la première fois dans un *Strychnos*
africain. Ses spectres de masse, de dichroïsme
circulaire, ¹H RMN et ¹³C RMN n'avaient jamais
été déterminés auparavant.

Samenvatting

Dank zij een nieuwe chromatografische vloeistof-vloeistof techniek, de „Droplet Counter-current Chromatography” (DCCC), kon het fluorocurarine geïsoleerd worden uit de wortels van *Strychnos usumbarensis* GILG (Rwanda). Dit kwaternair alkaloiide werd voor het eerst in een afrikaanse *Strychnos*soort gevonden. Het massaspektrum, het circulair dichroïsmespektrum, de ^1H NMR en de ^{13}C NMR hiervan werden voorheen nog nooit bepaald.

Bibliographie

- (1) ANGENOT, L., Contribution à l'étude du *S. usumbarensis* GILG, principal constituant d'un poison de flèche curarisant africain. Thèse de doctorat. Liège (1973). *Dissertation Abstracts International*, **34**, nr. 11 (1974).
- (2) ANGENOT, L., DUBOIS, M., GINION, C., VAN DORSER, W. et DRESSE, A., *Arch. Intern. Pharmacodyn. Ther.*, **215**, 246 (1975).
- (3) ANGENOT, L., *Planta Medica*, **27**, 24 (1975).
- (4) ANGENOT, L., DIDEBERG, O. et DUPONT, L., *Tetrahedron Lett.*, **16**, 1357 (1975).
- (5) ANGENOT, L., COUNE, C. et TITS, M., *J. Pharm. Belg.*, **33**, 11 et 284 (1978).
- (6) ANGENOT, L., *Pl. Med. Phytoth.*, **12**, 123 (1978).
- (7) ANGENOT, L., COUNE, C., TITS, M. et YAMADA, K., *Phytochemistry*, **17**, 1687 (1978).
- (8) TANIMURA, T., PISANO, J.J., ITO, Y. et BOWMAN, R.L., *Science*, **169**, 54 (1970).
- (9) HOSTETTMANN, K., *Planta Medica*, **39**, 3 (1980).
- (10) HOSTETTMANN, K., HOSTETTMANN-KALDAS, M. et NAKANISHI, K., *J. Chromatogr.*, **170**, 335 (1979).
- (11) HOSTETTMANN, K., HOSTETTMANN-KALDAS, M. et STICHER, O., *Helv. Chim. Acta*, **62**, 2079 (1979).
- (12) HESSE, M., Indolalkaloïde in Tabellen. Ergänzungswerk, Springer-Verlag, Berlin (1964).
- (13) MARINI-BETTOLO, G.B. et BISSET, N.G. in KRUKOFF, B.A., *Lloydia*, **35**, 193 (1972).
- (14) WENKERT, E., CHEUNG, H.T.A., GOTTLIEB, H.E., KOCH, M.C., RABARON, A. et PLAT, M.M., *J. Org. Chem.*, **43**, 1099 (1978).
- (15) WENKERT, E., COCHRAN, D.W., HAGAMAN, E.W., SCHELL, F.M., NEUSS, N., KATNER, A.S., POTIER, P., KAN, C., PLAT, M., KOCH, M., MEHRI, M., POISSON, J., KUNESCH, N. et ROLLAND, Y., *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 4990 (1973).
- (16) TAVERNIER, D., ANTEUNIS, M., TITS, M. et ANGENOT, L., *Bull. Soc. Chim. Belg.*, **87**, 595 (1978).
- (17) PHILIPSBORN, W.v., MEYER, H., SCHMID, H. et KARRER, P., *Helv. Chim. Acta*, **41**, 1257 (1978).
- (18) WIELAND, H., PISTOR, H.J. et BAHR, K., *Liebigs Ann Chem.*, **547**, 140 (1941).