

CONSTITUANTS DES ECORCES DE RACINE DE *NAUCLEA POBEGUINII*

M. ZECHES, B. RICHARD, L. GUEYE-M'BAHIA, L. LE MEN-OLIVIER,*

Faculté de Pharmacie, ERA au CNRS n° 319, 51 rue Cognacq-Jay, 51096 Reims Cedex, France

et C. DELAUDE

Université de Liege, Sart-Tilman, 4000 Liege, Belgique

ABSTRACT.—Nine constituents were isolated from the root bark of *Nauclea pobeguinii*. They were the known strictosamide (**1**) as the major constituent; two quinovic acid glycosides (**2**) and (**3**); four known alkaloids, angustine (**9**), naufofine (**10**), angustoline (**13**), nauclefine (**12**); and two new alkaloids, *O*-acetyl angusatoline (**8**) and 3,14-dihydroangustine (**11**).

Dans le cadre de nos recherches sur les plantes du Zaïre, nous reportons dans cette publication l'étude des écorces de racine de *Nauclea pobeguinii*, Pobeguïn ex Pellegrin, Merrill, Rubiacées.

N. pobeguinii est un arbre peu fréquent des régions marécageuses dont l'écorce est réputée fébrifuge en médecine traditionnelle.

RESULTATS ET DISCUSSION

La présence habituelle de glucoalcaloïdes dans le genre *Nauclea* nous a amenés à extraire les alcaloïdes en deux étapes.

La poudre d'écorces de racine est d'abord épuisée en milieu neutre par le CH₂Cl₂. La solution fournit après concentration un précipité (=E.B.) qui est dissous dans un mélange CHCl₃-MeOH (95:5). La partie soluble renferme trois composés hétérosidiques **1**, **2**, et **3** séparés et purifiés par chromatographie sur colonne, suivie de chromatographie sur plaque préparative. Ils sont accompagnés d'une forte proportion de composés polaires qui n'ont pas été étudiés.

Le composé **1** majoritaire (20% de L'E.B.) est le strictosamide antérieurement isolé de *Nauclea latifolia* (1-3). Il a été identifié par ses caractéristiques physiques et spectrales et par celles de son dérivé tétraacétylé ainsi que par comparaison avec un échantillon de référence. Le spectre ¹³C rmn de **1** a été enregistré.

Les composés **2** et **3** sont des hétérosides triterpéniques. Leur structure est précisée par la préparation de dérivés.

Le composé **2** (7,5% de L'E.B.) est le β-D-glucoside de l'acide quinovique (=acide 3β-hydroxyursa-12ène-27,28-dioïque). Son hydrolyse acide donne, d'une part du D-glucose caractérisé en ccm et par la valeur positive de son pouvoir rotatoire, et d'autre part de l'acide quinovique (**4**). Celui-ci a été transformé en quinovate de diméthyle (**5**) ([α]_D +69°, CHCl₃) antérieurement décrit (4,5). L'orientation α axiale du proton H-3 est déduite de l'examen du spectre de ¹H rmn à 400 MHz de **5** (H-3: 3,2 ppm, dd, J=11 et 5Hz). La méthylation suivie de l'acétylation de **2** donne le dérivé **6** dont le spectre de masse montre lesions caractéristiques d'un hexoaldopyranose acétylé (**6**) à m/z 331, 271, 211, 169, et 109, ainsi que les ions de la partie terpénique (**6**, **7**) à m/z 496, 306, 247, et 190.

Sur le spectre de ¹H rmn à 400 MHz de **6**, la forme du signal du proton anomérique (H-1': 4,8 ppm, d, J=8Hz) permet en outre de préciser la configuration β du glucose.

Le composé **2** est vraisemblablement identique au glucoside C isolé pour la première fois des *Cinchona* (**8**) et plus récemment de *Macfadyena unguiscati* (**5**) et de *Nauclea diderrichii* (**4**).

Le composé **3** (4,2% de L'E.B.) est l'α-L-fucoside de l'acide quinovique. Son hy-

TABLEAU 1. Rmn ^1H à 400 MHz (CDCl_3) de **7**

H-1'	d	4,47 ppm	$J_{1'-2'}=8\text{ Hz}$
H-2' et H-4'	m	5,22	$J_{2'-1'}=8; J_{2'-3'}=11$ $J_{4'-3'}=3; J_{4'-5'}=0$
H-3'	dd	5,01	$J_{3'-2'}=11; J_{3'-4'}=3$
H-5'	q	3,78	$J_{5'-6'}=7; J_{5'-4'}=0$
$\text{CH}_3\text{-6'}$	d	1,17	$J_{6'-5'}=7$
H-3	dd	3,03	$J_{3-2\beta}=12; J_{3-2\alpha}=5$
H-12	s large	5,67	
CO O-CH_3	s	3,65	
"	s	3,63	
O-CO-CH_3	s	2,15	
"	s	2,0	
"	s	1,95	
CH_3	s	0,9	
"	d	0,87	$J=7\text{ Hz}$
"	s	0,85	
"	d	0,82	$J=7\text{ Hz}$
"	s	0,79	
"	s	0,7	

drolyse acide scinde la molécule en acide quinovique (**4**) caractérisé comme précédemment et en L-fucose identifié par comparaison en ccm avec un échantillon de référence et par son pouvoir rotatoire négatif. Le dérivé diméthylé et triacétylé **7** a été préparé. Sur son spectre de masse (M^+ 786, $\text{C}_{44}\text{H}_{66}\text{O}_{12}$) les ions à m/z 273, 213, 171, et 151 sont issus d'un desoxy-6' hexose acétylé (**6**). Sur le spectre de ^1H rmn à 400 MHz (Tableau 1) les protons de la partie osidique ont été attribués par des expériences d'irradiation. Les constantes de couplage observées indiquent une orientation axiale pour les protons H-1', -2', -3', et -5' et équatoriale pour le proton H-4'. Un méthyle doublet résonnant à 1,17 ppm est attribué au $\text{CH}_3\text{-6'}$ du sucre. Cette structure correspond à l' α -fucopyranose (**9**). Le composé **3** est un isomère du D-quinovoside de l'acide quinovique isolé de divers *Cinchona* (**10,8**) et du rhamnoside du même acide isolé de *Cinchona pubescens* (**11**). Enfin, **3** pourrait être identique au fucoside isolé de *Macfadyena unguis-cati* (**5**); aucune comparaison directe n'a été effectuée.

Les marcs provenant de l'épuisement au CH_2Cl_2 sont ensuite extraits en milieu alcalin selon la méthode habituelle (**12**) pour fournir les alcaloïdes totaux (3,14 g/kg). Ceux-ci sont séparés par chromatographie liquide sous pression et purifiés par chromatographie préparative sur couche mince. Sept alcaloïdes sont isolés dans l'ordre de polarité croissante suivant: O-acétyl angustoline (**8**) (1% des A.T.), angustine (**9**) (2%), naufoline (**10**) (0,5%), dihydro-3,14 angustine (**11**) (0,8%), nauléfine (**12**) (0,5%), angustoline (**13**) (1%) et strictosamide (**1**) (20%). Les alcaloïdes connus **9, 10, 12**, et **13** sont identifiés par comparaison de leurs caractéristiques physiques et spectrales avec les données de la littérature (**13-15**). Les structures des alcaloïdes nouveaux **8** et **11** sont déduites de l'analyse spectrale.

L'alcaloïde **8** est la O-19-acétyl angustoline. Il possède un squelette indolopyridinoquinolizidone caractérisé par un ion moléculaire impair M^+ à m/z 373 ($\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{O}_3\text{N}_3$) soit 42 unités de masse de plus que l'angustoline **13**, par un spectre uv visible très complexe (λ max 220, 252, 290, 302, 375, et 395 nm), et par un spectre ^1H rmn sur lequel apparaissent trois protons singulets à bas champ: H-17 (9,6 ppm), H-21 (8,85), H-14 (6,8).

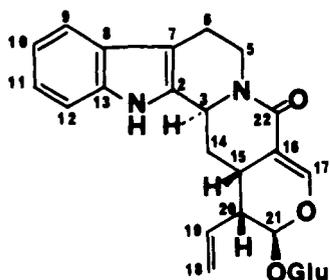
Le groupement O-acétyle est visible sur les spectres ir (ν max = 1730 et 1230 cm^{-1}) et de ^1H rmn (s, 3H, 2,13 ppm) La position en C-19 de ce groupement est déduite de la forme du signal du $\text{CH}_3\text{-18}$ (doublet) et du déblindage de H-19 à 4,5 ppm.

L'alcaloïde **11** possède également les caractéristiques spectrales d'un squelette indolopyridinoquinolizidine et de nombreuses analogies spectrales avec l'angustine (**9**). En particulier, son spectre de ^1H nmr montre les signaux d'un enchaînement vinylic isolé et les protons pyridiniques singulets H-17 et H-21. Seul le signal du proton oléfinique H-14 de **9** n'apparaît pas sur le spectre de **11**. De plus, l'ion moléculaire de **11** (M^+ à m/z 315, $\text{C}_{20}\text{H}_{17}\text{ON}_3$) possède deux unités de masse de plus que celui de **9**. L'alcaloïde **11** est donc la dihydro-3, 14 angustine.

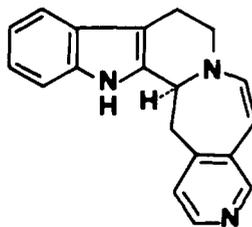
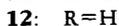
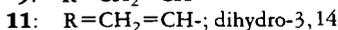
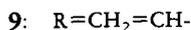
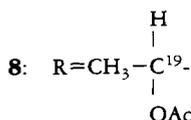
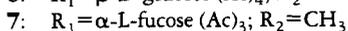
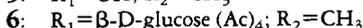
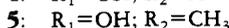
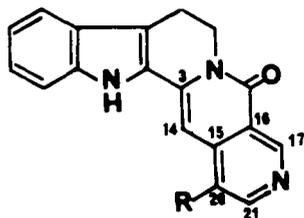
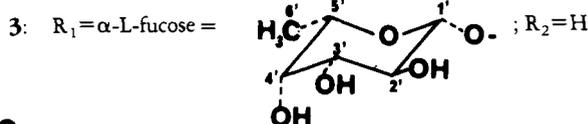
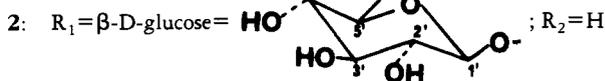
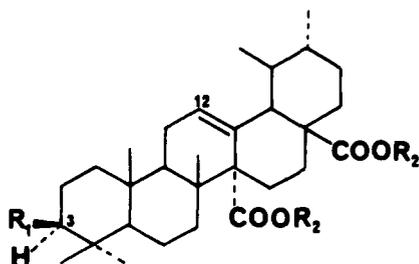
Les alcaloïdes nouveaux **8** et **11** ont été isolés en trop faible quantité pour tenter des corrélations chimiques en vue de confirmer leur structure.

La composition alcaloïdique des écorces de racines de *N. pobeguinii* est très voisine de celle rencontrée dans *N. latifolia* (2,3,14). Elle confirme la spécialisation du genre *Nauclea* dans l'élaboration d'alcaloïdes peu évolués du point de vue biogénétique, ainsi que de strictosamide, précurseur de ces alcaloïdes.

Les hétérosides de l'acide quinovique largement distribués dans la famille des Rubiacées sont également décrits dans d'autres espèces du genre *Nauclea* (*Nauclea orientalis* et *N. diderrichii*) (16,4).



1



10

PARTIE EXPERIMENTALE

APPAREILLAGE.—Les pouvoirs rotatoires sont mesurés avec un polarimètre Perkin-Elmer 241, les

spectres ir sur un appareil Beckmann Acculab 2, et les spectres uv (dans le MeOH) sur un appareil Leres spila S28. Les spectres ^1H rmn sont enregistrés en solution dans CDCl_3 à 60 MHz sur un appareil Bruker WP60 et à 400 MHz avec un appareil de l'Institut d'Electronique fondamentale, Université de Paris Sud, Orsay. Le spectre de ^{13}C rmn est obtenu sur un JEOL FX90Q et les spectres de masse sur un spectrographe JEOL D300.

MATÉRIEL VÉGÉTAL.—Les écorces de racines de *N. pobeguinii* ont été récoltées et identifiées par l'un d'entre nous (C.D.) dans la région du Pool, en bordure de fleuve, à Kinshasa, dans le cadre du projet "étude phytochimique de la flore du Zaïre" soutenu par le ministère de la coopération de Belgique. Ce matériel est authentifié par l'herbier n° 4555 L. Pauwels déposé au Jardin Botanique National de Bruxelles, Belgique.

EXTRACTION ET ISOLEMENT DE 1, 2 ET 3.—La poudre de racine (500 g) est extraite par le CH_2Cl_2 (5 litres) dans un appareil de Soxhlet. La solution organique est concentrée sous pression réduite. Un précipité (E.B.) se forme qui est recueilli par filtration (13,3 g). L'E.B. (5 g) est mis en suspension dans un mélange CHCl_3 -MeOH (95:5) et porté au reflux. Un résidu insoluble formé de composés très polaires en ccm est filtré et la solution évaporée sous pression réduite donne un extrait pesant 3,3 g. Une partie de cet extrait (1,95 g) est chromatographiée sur colonne de silice (50 g) éluée avec du CHCl_3 et des mélanges CHCl_3 -MeOH de polarité croissante. Des fractions de 50 ml sont recueillies et analysées en ccm. Les fractions 16 à 18 (124 mg) renferment le fucoside (3) à l'état pur. Les fractions 19 à 25 (617 mg) contiennent le strictosamide (1). Les fractions 29 à 31 (221 mg) donnent le glucoside (2). Les dernières fractions renferment des composés très polaires qui n'ont pas été étudiés. Les ccm sont réalisées sur gel de silice (F254 Merck ou Whatman) avec élution par un mélange CHCl_3 -MeOH (90:10). La révélation est obtenue par pulvérisation de H_2SO_4 puis chauffage à 100° .

EXTRACTION ET ISOLEMENT DES ALCALOÏDES.—Les marcs (475 g) issus de l'extraction précédente sont extraits selon la méthode habituelle (12). Les alcaloïdes totaux (1,5 g) sont séparés par chromatographie liquide sous pression sur colonne de silice H60 (200 g). L'élution est réalisée par le CHCl_3 puis par des mélanges CHCl_3 -MeOH de polarité croissante. Des fractions de 30 ml sont recueillies et groupées selon leur composition analysée en ccm. A partir de ces groupements, sept alcaloïdes sont obtenus à l'état pur par chromatographie sur plaque préparative de gel de silice (F254 Merck ou Whatman). Les solvants d'élution sont des mélanges de CHCl_3 -MeOH (95:5 à 85:15). Les chromatogrammes sont observés en lumière uv à 254 et 366 nm. La révélation avec le réactif de Dragendorff donne des taches très faiblement colorées.

Strictosamide (1).—Les caractéristiques physiques et spectrales ($[\alpha]_D$, uv, ir, sm, rmn) de 1 et de son dérivé tétraacétylé sont identiques à celles de la littérature (1-3). ^{13}C rmn de 1 (δ ppm). C-2 (134,3), C-3 (52,6), C-5 (42,7), C-6 (20,5), C-7 (107,5), C-8 (126,9), C-9 (117,4), C-10 (118,6), C-11 (120,8), C-12 (111,1), C-13 (135,7), C-14 (25,6), C-15 (23,4), C-16 (108,7), C-17 (146,5), C-18 (119,7), C-19 (133,1), C-20 (42,2), C-21 (95,9), C-22 (163,4); D-glucose: C-1' (98,9), C-2' (72,6), C-3' (76,9), C-4' (69,9), C-5' (76,7), et C-6' (60,9). Les déplacements chimiques observés sont très voisins de ceux décrits par Cordell (17).

Hydrolyse du D-glucoside de l'acide quinovique (2).—A une solution de 2 (50 mg) dans le MeOH (5 ml), on ajoute de l'acide perchlorique à 4% (2 ml).

Le mélange est chauffé à 140° en tube scellé pendant 2 h puis filtré. Le filtrat est neutralisé par la potasse à 1% et évaporé à sec. Le résidu dissout dans la pyridine et examiné en ccm présente une tache superposable à celle du D-glucose. Le précipité lavé à le H_2O est dissout dans un mélange EtOAc-CHCl_3 . La solution organique séchée sur Na_2SO_4 et évaporée fournit l'acide quinovique (4) (10 mg): ir (KBr) λ max 3580, 3450, 1680, 1470, 1390, 1300, 1120, 1100 cm^{-1} ; sm m/z (%) 486 (M^+) (2), 442 (12), 427 (20), 424 (18), 409 (15), 381 (15), 363 (15), 287 (12), 217 (50), 208 (15), 207 (20), 200 (50), 190 (40), 189 (45), 185 (80), et 146 (48).

Quinovate de diméthyle (5).—A une solution de 4 (10 mg) dans le CH_2Cl_2 (5 ml), 5 gouttes de solution de CH_2N_2 dans l' Et_2O sont ajoutées. Le mélange est agité à température ordinaire pendant 15 min, puis évaporé sous pression réduite. Le résidu renferme 5 à l'état pur: $[\alpha]_D = +69^\circ$ ($c=0,37$ CHCl_3); les caractéristiques spectrales de 5 sont identiques à celles de la littérature (4,5). ^1H rmn (400 MHz- CDCl_3) δ ppm, 5,67 (s large, 1H, H-12), 3,63 (s, 3H, COOCH_3), 3,62 (s, 3H, COOCH_3), 3,2 (dd, 1H, $J=11$ et 5Hz, H-3), 0,93 (s, 3H, CH_3), 0,92 (s, 3H, CH_3), 0,88 (d, 3H, $J=6$ Hz, CH_3), 0,82 (d, 3H, $J=6$ Hz, CH_3), et 0,75 (s, 3H, CH_3).

Dérivé 6.—Le composé 2 (50 mg) est méthylé selon la technique précédente. La solution du dérivé diméthylé ainsi obtenu est additionnée de diméthylaminopyridine (50 ml) et Ac_2O (2 ml). Le mélange est agité à température ordinaire pendant une heure puis lavé à le H_2O , séché sur Na_2SO_4 et évaporé; le résidu (34 mg) renferme le dérivé 6. Ir (CHCl_3 -film) ν max 1750, 1440, 1360, 1250-1200 cm^{-1} ; sm m/z (%) 812 ($\text{M}^+ - 42$) (2), 496 (8), 482 (5), 479 (5), 437 (7), 423 (2), 377 (3), 331 (10), 303 (20), 273 (30), 247 (5), 245 (7), 215 (5), 211 (5), 190 (60), 169 (100), 145 (15), 115 (17), 109 (35), 103 (10), et 98 (25); ^1H rmn (400 MHz, CDCl_3) δ ppm, 5,68 (s large, 1H, H-12), 5,3 à 5,0 (m, 3H, H-2', H-3', H-4'), 4,48 (d, 1H,

$J=8\text{Hz}$, H-1'), 4,27 (dd, 1H, $J=13\text{Hz}$, H-6'), 4,03 (d, $J=13\text{Hz}$, H-6'), 3,79 (m, 1H, H-5'), 3,65 (s, 3H, OCH₃), et 3,63 (s, 3H, OCH₃).

α -L-fucoside de l'acide quinovique (3).— $[\alpha]_D^{25} = +37^\circ$ ($c=0,5$; EtOH); ir ν max (KBr) 3400, 1680, 1440, 1380, 1050 cm^{-1} .

Hydrolyse de 3.—Le composé 3 (50 mg) est hydrolysé de la même manière que 2. La génine présente dans le précipité est ensuite méthylée par le CH₂N₂ selon la technique précédente. Le dérivé diméthylé obtenu est identique (ccm, ir, sm, rmn) à 4. Le sucre contenu dans le filtrat est purifié par cristallisation dans le H₂O. Il donne en ccm une tache superposable à celle d'un échantillon de fucose. Son pouvoir rotatoire mesuré dans le H₂O est négatif.

Dérivé 7.—Le composé 3 (50 mg) est méthylé puis acétylé dans les mêmes conditions que 2. Le dérivé 7 obtenu est purifié par chromatographie sur plaque préparative. $[\alpha]_D^{25} = +77^\circ$ ($c=0,32$; CHCl₃); ir (CHCl₃ film) ν max 1750-1710, 1450, 1370, 1260-1220 cm^{-1} ; sm m/z (%) 786 (M⁺) (2), 496 (35), 479 (25), 437 (20), 377 (10), 306 (15), 273 (100), 247 (25), 245 (45), 213 (20), 203 (25), 190 (90), 171 (30), et 153 (85), ¹H rmn (400 MHz): cf. Tableau 1.

O-acétyl angustoline (8).—uv (MeOH) λ max: 220, 252, 290, 302 et vis. 375, 395 nm; ir (CHCl₃ film) ν max 3280, 1730, 1660, 1230 cm^{-1} ; sm m/z (%) 374 (18), 373 (M⁺) (60), 329 (18), 314 (62), 313 (100), 312 (48), 298 (15), 169 (3), et 157 (18); ¹H rmn (60 MHz-CDCl₃) δ ppm 9,6 (1H, s, H-17), 8,85 (1H, s, H-21), 8,65 (1H, s, NH), 7,8 à 7 (4H, m, aromatiques), 6,8 (1H, s, H-14), 4,5 (3H, m, H-5, H-5' et H-19), 3,2 (2H, m, H-6 et H-6'), 2,13 (3H, s, CO-CH₃), et 1,7 (3H, d, $J=7\text{Hz}$, CH₃-18).

Dihydro-3,14 angustine (11).—uv λ max (MeOH) 225, 255 (ép.), 282, 292, 385, 405 nm; (MeOH+HCl): 225, 267, 284, 292, 307 (ép.), 325, 445, ir (CHCl₃, film) ν max 3300, 1650, 1600, 1440, 1400 1320, 1170 cm^{-1} ; sm m/z (%) 316 (25), 315 (M⁺) (100), 314 (45), 300 (35), et 169 (30); ¹H rmn (60 MHz-CDCl₃) δ ppm 9,3 (1H, s, H-17), 8,82 (1H, s, H-21), 8,0 (1H, s, NH), 7,8 à 7,0 (4H, m, aromatiques), 6,8 (1H, dd, $J=12$ et 6Hz, H-19), 6 à 5,5 (2H, m, H-18 et H-18'), 5,4 à 4,4 (3H, m, H-3, H-5 et H-5'), et 3,8 à 3,0 (4H, m, H-6, H-6', H-14 et H-14').

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient la Docteur F. Hotellier qui leur a fourni un échantillon de strictosamide, Monsieur Merle (I.C.I. Pharma) pour l'enregistrement d'un spectre de ¹³C rmn, Monsieur S.K. Kan (Université de Paris Sud, Orsay) pour les spectres de ¹H rmn à haut champ, ainsi que le Docteur G. Massiot pour de fructueuses discussions.

REFERENCES

1. R.T. Brown, C.L. Chapple, et A.G. Lashford, *Phytochemistry*, **16**, 1619 (1977).
2. F. Hotellier, Thèse Doctorat es Sc. Pharm. Paris V, n° 53 (1981).
3. F. Hotellier, P. Delaveau, et J.L. Pousset, *Plantes Méd. Phytothér.*, **II**, 106 (1977).
4. A.O. Adeoye et R.D. Waigh, *Phytochemistry*, **22**, 975 (1983).
5. F. Ferrari, J. Kiyam de Cornelio, F. Delle Monache, et G.B. Marini-Bettolo, *Planta med.*, **43**, 24 (1981).
6. H. Budzikiewicz, C. Djerassi, et D.H. Williams, *Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry*, vol. 2, San Francisco: Holden Day, Inc., 1964, pp. 122 and 203.
7. H. Budzikiewicz, J.M. Wilson, et C. Djerassi, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**, 3688 (1963).
8. R. Tschesche, I. Dufhorn, et G. Snatzke, *Annalen*, **667**, 151 (1963).
9. M. Kapundu, R. Warin, C. Delaude, et H. Huls, *Bull. Soc. Chim. Belg.*, **89**, 1001 (1980).
10. J. Pelletier et J.B. Caventou, *J. Pharm.*, **7**, 112 (1821).
11. R.F. Raffauf, P.W. Le Quesne, et P.C. Ghosh, *J. Nat. Prod.*, **41**, 432 (1978).
12. M. Zeches, J. Lounkokobi, B. Richard, M. Plat, L. Le Men-Olivier, T. Sevenet, et J. Pusset, *Phytochemistry*, **23**, 171 (1984).
13. D.G. Murray, A. Szokolcai, et S.B. McLean, *Can. J. Chem.*, **50**, 1486 (1972).
14. F. Hotellier, P. Delaveau, et J.L. Pousset, *Phytochemistry*, **14**, 1407 (1975).
15. F. Hotellier, P. Delaveau, R. Besselièvre, et J.L. Pousset, *Compt. Rend. Acad. Sci., Ser. C, Paris*, **282**, 595 (1976).
16. E. Fujita, T. Fujita, et T. Suzuki, *Chem. Pharm. Bull.*, **15**, 1682 (1967).
17. G.A. Cordell, "Introduction to Alkaloids. A Biogenetic Approach." New York: Wiley, 1981, p. 662.