

ATTRIBUTION COMPLETE DES SIGNAUX DU SPECTRE DE RMN ^{13}C DU GOSSYPOL A L'AIDE DES TECHNIQUES A DEUX DIMENSIONS

LILLIANE LACOMBE,

Laboratoire de Chimie des Interactions Moléculaires, CNRS UA 285, Collège de France, 11,
Place Marcelin Berthelot, 75231 Paris Cedex 05, France

ANGELIKI DALKAFOUKI, et NICOLE KUNESCH

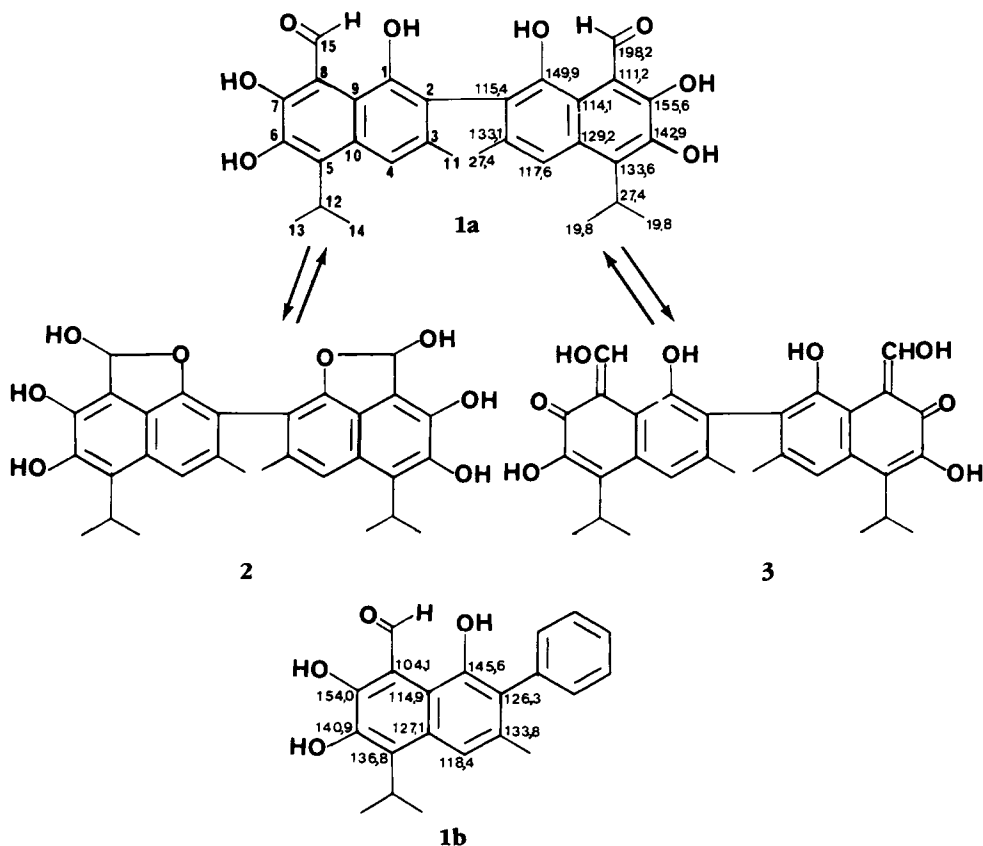
Laboratoire de Chimie des Substances Thérapeutiques Naturelles, CNRS UA 496, Centre d'Etudes Pharmaceutiques,
92296 Châtenay-Malabry Cedex, France

Le gossypol [**1a**] est un pigment jaune polyphénolique terpénique isolé principalement des graines de différents cotonniers du genre *Gossypium* (1). Des études effectuées en Chine ont montré que son administration orale induit une stérilité chez l'homme (2). Ce composé est donc l'objet de recherches actives en tant qu'anticonceptionnel masculin, bien qu'il soit toxique (3) et que son mode d'action ne soit pas encore totalement élucidé (4-6).

Des travaux récents indiquent que le gossypol ou ses dérivés possèdent de plus une activité antivirale (7), antimalarique (8,9), et une action trypanocide sur le trypanosome (10, 11).

Etant donné l'intérêt croissant du gossypol, il semble désormais utile de déterminer quels éléments structuraux sont associés à l'activité biologique.

Il est bien établi que le gossypol existe sous plusieurs formes tautomères **1a**, **2**, et **3**, particulièrement observables en



rmn ^1H ou ^{13}C suivant les solvants utilisés pour ces analyses (12, 13). Ce fait entraîne des difficultés de séparation et d'identification des dérivés du gossypol puisque les formes hémiacétal cycliques

deux dimensions, mettant en évidence les constantes de couplage $^2J_{\text{C-H}}$ et $^3J_{\text{C-H}}$ pour compléter l'attribution des carbones quaternaires du gossypol (**1a**) (Tableau 1).

TABLEAU 1. Analyse des Spectres de Rmn ^{13}C du Gossypol (**1a**)^a

δ_{C}	carbone no.	$^1J_{\text{C-H}}$	multiplicité		$^2J_{\text{C-H}}$ et $^3J_{\text{C-H}}$	corrélations 2D
			CDCl_3	$\text{CDCl}_3/\text{D}_2\text{O}$		
198,2	15 ^b	191	d	d	5	$\text{H}_{15}, \text{H}_{12}^{\text{c}}$
155,6	7		t			
149,9	1	158	s	m affiné	*d	$\text{H}_{15}, \text{H}_{12}^{\text{c}}$
142,9	6		m			
133,6	5		m	m affiné		H_4
133,1	3		q		6	CH_3 en 11
129,2	10		dd		4,5; 1,5	
117,6	4 ^b		dq		6	
115,4	2		m			H_4, CH_3 en 11
114,1	9		m			H_4
111,2	8		dd	d	7	$\text{H}_{15}, \text{H}_{12}^{\text{c}}$
				d	18; 5	
27,4	12	130	d		18	† ^e
27,4	11	129,5	q,m			† ^e
19,8	13	129,5	q,m			† ^e
	14					

^aConcentration de **1a**: saturation dans CDCl_3 (0,2M), δ =déplacement chimique en ppm/TMS; J =constante de couplage en Hz; Abréviations: s=singulet, d=doublet, q=quadruplet, m=multiplet, dd=doublet dédoublé.

^bcarbones dont les déplacements chimiques ont déjà été attribués antérieurement (12).

^ctaches correspondant à de très faibles intensités de corrélation.

^d*constantes de couplage non directement observables étant donnée la complexité du signal.

^e†le domaine d'observation du spectre de corrélation $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ a été limité, pour le carbone 13 à la partie aromatique.

de type **2** peuvent être également isolées (1, 14).

C'est la raison pour laquelle il nous a paru nécessaire d'attribuer avec précision les valeurs de résonance des carbones, en rmn du carbone 13, du gossypol sous sa forme **1a** dans le CDCl_3 , afin de s'appuyer avec certitude sur ces données pour toute étude de relation structure-activité ou de mécanisme des réactions biologiques.

Les techniques classiques de rmn ^{13}C (spectres avec et sans découplage du proton) ne nous ont permis d'élucider qu'une partie du problème. Il a fallu recourir au spectre de corrélation $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ à

Dans les attributions qui vont suivre, nous utiliserons le fait bien connu que les constantes de couplage $^3J_{\text{C-H}}$ sont, dans les systèmes aromatiques, plus importantes (7 Hz) que les constantes de couplage 2J ou 4J (2 Hz) (15).

A la concentration utilisée, on observe dans le spectre de rmn ^1H un couplage $J_{\text{H-H}}=4$ Hz entre deux hydrogènes phénoliques dont l'un, résonnant à 15 ppm, est impliqué dans une liaison avec l'aldéhyde en 15.¹ Ceci permet de réviser

¹La numérotation des carbones utilisée ici s'appuie sur l'origine biogénétique terpénique du gossypol (20) et suit celle du squelette farnésyle.

les valeurs des déplacements chimiques attribuées antérieurement (16) aux hydrogènes des phénols: H_1 (6,40 ppm), H_6 (6,06 ppm), H_7 (15,05 ppm) et explique que les couplages entre carbones et hydrogènes phénoliques aient pu être aisément observés. Nous avons mis à profit ces couplages ^{13}C - ^1H pour l'attribution des carbones 1,6,7 porteurs des fonctions phénols et le repérage des carbones voisins 2,5,8, et 9. Dans ce but, deux spectres ont été enregistrés, l'un dans CDCl_3 , l'autre après addition d'eau lourde (Figure 1).

ments chimiques qui sont en excellente concordance avec les valeurs calculées pour le modèle **1b** en utilisant les incréments déterminés dans de cas des naphthalènes substitués (17,18). Le doublet dédoublé à 111,2 ppm correspond au carbone 8 en raison de son couplage 2J avec le proton aldéhydique dont la valeur, relativement faible pour un couplage de ce type (18 Hz), est dû à l'existence d'un groupement phénolique en *ortho* (19).

Le quadruplet ($J=6$ Hz) qui se trouve à 133,1 ppm est dû au carbone 3, par suite de sa corrélation avec les protons du

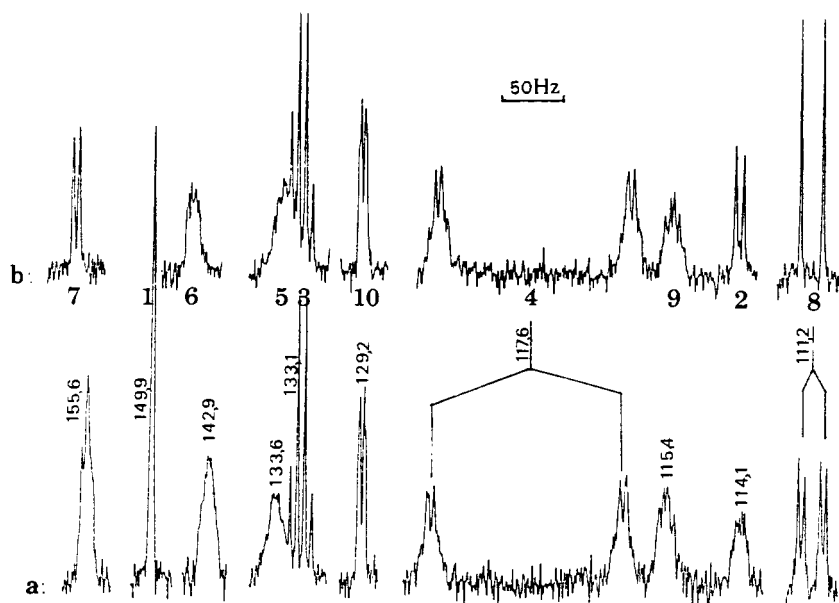


FIGURE 1. Spectre de rmn ^{13}C non découplé du gossypol [**1a**] a: dans CDCl_3 ; b: dans $\text{CDCl}_3 + \text{D}_2\text{O}$

Les signaux des trois atomes de carbone associés aux phénols apparaissent à 142,9, 149,9, et 155,6 ppm. L'un d'eux, à 149,9 ppm est un singulet (Figure 1) et ne donne aucune corrélation, tandis que les deux autres carbones sont couplés avec le proton aldéhydique en 15 et avec le proton en 12 du reste isopropyle (Tableau 1). Ceci fixe donc la résonance du carbone phénolique en 1 à 149,9 ppm.

Les deux autres carbones dont les signaux, après addition d'eau lourde (Figure 1), se simplifient en doublet ($^3J_{\text{C-H}15} = 5$ Hz, 155,6 ppm) et multiplet affiné (142,9 ppm) ont des déplace-

méthyle en 11. Le carbone résonnant à 115,4 ppm est le seul à présenter une double corrélation avec H_4 et les protons du méthyle en 11 et ne peut être que le carbone 2, tandis que la valeur de 114,1 ppm est attribuée au carbone 9 du fait de sa corrélation avec H_4 .

Le multiplet à 133,6 ppm s'affine après addition d'eau lourde (Figure 1), ce qui situe le carbone correspondant au voisinage d'un phénol. De plus, sa corrélation avec H_4 permet d'affecter cette valeur au carbone 5.

Le signal restant, situé à 129 ppm est donc celui du carbone 10. Bien qu'il apparaisse sous la forme d'un doublet dé-

doublé, dans les conditions expérimentales utilisées, nous n'avons pas pu observer de corrélation avec les protons voisins.

En conclusion, les techniques d'analyse en rmn de ^{13}C mises en oeuvre ici ont donc permis l'attribution définitive de tous les carbones du gossypol [1a]. Les valeurs consignées dans le Tableau 1 sont en bon accord avec les valeurs calculées figurant sur la formule du modèle 1b.

PARTIE EXPERIMENTALE

Le gossypol a été isolé sous forme de gossypol-acétique, des graines d'une variété cultivée de *Gossypium* selon la méthode de Carruth (21), avec un rendement de 0,65%.

Les spectres de rmn ^{13}C ont été enregistrés à 50,3 MHz sur un appareil Bruker AM200 SY équipé de l'ordinateur ASPECT 3000, dans CDCl_3 ainsi que dans CDCl_3 additionné d'une petite quantité d'eau lourde.

L'expérience de corrélation ^{13}C - ^1H à deux dimensions a utilisé la séquence d'impulsion suivante: $90^\circ[^1\text{H}]-\frac{1}{2}\tau_1-180^\circ[^{13}\text{C}]-\frac{1}{2}\tau_1-\tau_1-90^\circ[^1\text{H}]-90^\circ[^{13}\text{C}]-\tau_2-\text{BB}[^1\text{H}]\text{FID}[^{13}\text{C}]-\tau_2$ (22) et un programme de phase permettant une détection en quadrature dans les deux dimensions (23), ainsi que des délais τ_1 (70 ms) et τ_2 (35 ms) adaptés à l'observation de constantes de couplage $J_{\text{C-H}}$ de l'ordre de 7 Hz.

Les largeurs spectrales ont été respectivement en proton et en carbone 13, 10 ppm et 166 ppm.

La matrice finale de 256 sur 2048 points a été obtenue grâce à 192 acquisitions de 128 spectres ayant 2048 points chacun. Elle a été traitée par multiplication gaussienne dans les deux dimensions avant transformation.

BIBLIOGRAPHIE

1. R. Adams, T.A. Geissman, et J.D. Edwards, *Chem. Rev.*, **60**, 555 (1960).
2. National Coordinating Group on Male Antifertility Agents, *Chin. Med. J.* (Peking, Engl. Ed.), **4**, 417 (1978).
3. L.C. Berardi et L.A. Goldblatt, "Toxic Constituents of Plant Food-Substances." I.E. Liener, Academic Press, New York, 1969, p. 255.
4. T. Lin, E.P. Murono, J. Osterman, H.R.

- Nankin, et P.B. Coulson, *Fertility and Sterility*, **35**, (5), 564 (1981).
5. K. Wichmann, K. Käpyaho, R. Sinervita, et J. Jänne, *J. Reprod. Fert.*, **69**, 259 (1983).
6. R.J. Aitken, J. Liu, F.S.M. Best, et D.W. Richardson, *Intern. J. of Andrology*, **6**, 157, (1983).
7. K. Wichmann, A. Vaheri, et T. Luukkainen, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **142**, 593 (1982).
8. J.E. Heidrich, L.A. Hunsacker, et D.L. Vander Jagt, *IRCS, Med. Sci.*, **11**, 304 (1983).
9. D.L. Vander Jagt, B.R. Baack, N.M. Campos, L.A. Hunsacker, et R.E. Royer, *IRCS, Med. Sci.*, **12**, 845 (1984).
10. E.E. Montamat, C. Burgos, N.M. Gerez de Burgos, L.E. Rovai, A. Blanco, et E.L. Segura, *Science*, **218**, 288 (1982).
11. A. Blanco, A. Aoki, E.E. Montamat, et L.E. Rovai, *J. Protozool.*, **30**, 648 (1983).
12. F.G. Kamaev, N.I. Baram, A.I. Ismailov, V.B. Leont'ev, et A.S. Sadykov, *Izv. Akad. Nauk SSSR, (Engl. Ed.)*, **5**, 938 (1979).
13. R.D. Stipanovic, A.A. Bell, et C.R. Howell, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **50**, 462 (1973).
14. H.H.S. Fong, "Natural Products and Drug Development." Alfred Benson Symposium 20, Ed. by P. Krogsgaard-Larsen, S. Brogger Christensen, H. Kofod, Munksgaard, Copenhagen, 1984.
15. F.J. Weigert et J.D. Roberts, *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 2967 (1967).
16. R.D. Stipanovic, A.A. Bell, M.E. Mace, et C.R. Howell, *Phytochemistry*, **14**, 1077 (1975).
17. J. Seita, J. Sandström, et T. Drakenberg, *Org. Magn. Reson.*, **11**, (5), 239 (1978).
18. E. Breitmaier, W. Voelter, " ^{13}C NMR Spectroscopy," 2nd ed. Verlag Chemie, Weinheim, 1978, pp. 213-214.
19. J.B. Stothers, "Carbon-13 NMR Spectroscopy," Academic Press, London, 1972, p. 355.
20. P. Heinsteint et H. El-Shagi, *J. Nat. Prod.*, **44**, 1 (1981).
21. F.E. Carruth, *J. Am. Chem. Soc.*, **40**, 647 (1918).
22. R. Freeman et G.A. Morris, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 684 (1978).
23. A.A. Bax et G.A. Morris, *J. Magn. Reson.*, **42**, 501 (1981).

Received 19 June 1986