

CINQ ALCALOIDES NOUVEAUX DE *STRYCHNOS HENNINGSII*

MICHEL KOCH*, ETIENNE FELLION et MICHEL PLAT†

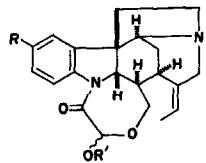
Laboratoire de Pharmacie Galénique, Faculté de Pharmacie, 4, Ae de l'Observatoire, 75006-Paris, France

(Received 30 June 1975)

Key Word Index: *Strychnos henningsii*; Loganiaceae; indole alkaloids; tsilanimbine; *N*_a-desacetyl-17-O-acetyl-18-hydroxyisoretuline; 18-hydroxyisoretuline; *N*_a-desacetylisoretuline; *N*_a-desacetyl-18-hydroxyisoretuline.

Abstract—Five new alkaloids have been isolated from the leaves and stems of *Strychnos henningsii*: tsilanimbine, *N*_a-desacetyl-17-O-acetyl-18-hydroxyisoretuline, 18-hydroxyisoretuline, *N*_a-desacetylisoretuline and *N*_a-desacetyl-18-hydroxyisoretuline. The two latter, unknown as natural products, have already been obtained by degradation of strychnine.

Strychnos henningsii Gilg est une espèce très largement répandue en Afrique et à Madagascar. Une douzaine d'alkaloïdes ont déjà été isolés d'échantillons d'origines diverses [1]. Notre étude porte sur un lot de feuilles et rameaux d'un *Strychnos henningsii* malgache, connu localement sous le nom vernaculaire de tsilanimboana, et dont Sarfati *et al.* [2] ont déjà extrait quatre alcaloïdes: tsilanine 1, méthoxy-10 tsilanine 2, *O*-déméthyl tsilanine 3 et méthoxy-10, *O*-déméthyl tsilanine 4.



Tsilanine (1)	: R = H ; R' = Me
Méthoxy-10 tsilanine (2)	: R = OMe ; R' = Me
<i>O</i> -Déméthyl tsilanine (3)	: R = H ; R' = H
Méthoxy-10, <i>O</i> -déméthyl tsilanine (4)	: R = OMe ; R' = H

Le premier d'entre eux cristallise dans l'acétone en prismes, F 177-178°. De formule brute C₁₉H₂₄N₂O = 296 déduite de son spectre de masse, il présente un spectre UV de type dihydroindole: $\lambda_{\text{max}}^{\text{nm}}$ (log ε) 245 (3,90), 300 (3,45). Le spectre IR ne montre pas d'absorption dans la zone des groupements carbonyle, mais en présente une, importante, vers 3300 cm⁻¹, suggérant l'existence de groupements NH et OH. Le spectre de RMN (cf partie expérimentale) confirme la présence d'un noyau indole et révèle celle d'un groupement éthylidène (doublet (3 protons) centré sur 1,54 δ (J 6,5 Hz) quadruplet mal résolu (1 proton) centré sur 5,45 δ (J 6,5 Hz)). L'ensemble de ces éléments suggère une structure de *N*_a-désacétyle rétuline ou isorétuline, en accord avec la fragmentation observée en spectrométrie de masse (Tableau 1) [4]. Cette hypothèse est confirmée par identification de la base naturelle à la *N*_a-désacétyle isorétuline 6, préparée à partir de la strychnine selon les protocoles antérieurement décrits [5,6].

Le second alcaloïde, de formule brute C₂₀H₂₆N₂O₂ = 326 déduite de son spectre de masse, n'a pas pu encore être obtenu à l'état cristallisé. Il s'agit d'un alcaloïde nouveau que nous nommons tsilanimbine. Son spectre UV [$\lambda_{\text{max}}^{\text{nm}}$ (log ε) 244 (3,90), 313 (3,55)] suggère l'existence d'un chromophore méthoxy-5 dihydroindole: très proche de celui de l'akuammine, il est très différent de celui de la *N*_a-désacétyle strychnospermine qui présente un chromophore méthoxy-6 dihydroindole [7]. Cette hypothèse est en accord avec le spectre de RMN qui présente les signaux d'un méthoxyde aromatique (s, 3 protons, à 3,71 δ), et de trois protons aromatiques (m, 3 protons, entre 6,45 et 6,55 δ) et le spectre de masse, où les pics caractéristiques du noyau dihydro-indole se retrouvent allourdis de 30 unités de masse à *m/e* 160, 173 et 174. On observe également sur ce spectre les pics caractéristiques de la fragmentation des alcaloïdes de type rétuline (Tableau 1), ainsi que des pics à *m/e* 311 (M-15:perte d'un groupement méthyle), 309 (M-17) et 295 (M-31): alcool primaire. Le spectre de RMN permet de préciser

L'extraction du matériel végétal réduit en poudre fine par un mélange Et₂O-CHCl₃, après alcalinisation par l'ammoniaque, suivie d'une purification des bases totales à l'état de chlorhydrates, selon la technique habituelle, fournit 1,55% d'alkaloïdes totaux. Par chromatographies préparatives sur colonne de silice et plaques d'alumine, six alcaloïdes sont isolés, en plus des quatre déjà obtenus à partir de la même source par les auteurs précités (cf partie expérimentale).

L'un d'eux est identifié, par comparaison avec un échantillon authentique, à la rétuline 5, qui avait été isolée la première fois d'un *Strychnos henningsii* du Congo [3]. Les cinq autres n'ont pas encore été décrits à l'état naturel.

* U.E.R. des Sciences Pharmaceutiques, 1, rue Vaubénard, 14000-Caen.

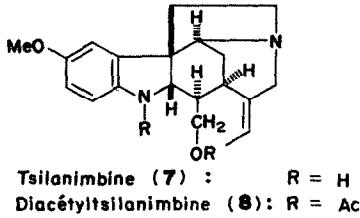
† Laboratoire de Pharmacie Chimique, U.E.R. de Chimie Thérapeutique, 1, rue J.B. Clément, 92290-Chatenay-Malabry.

Tableau 1.

Composé	Pics caractéristiques		
	A	B	M
Rétuline 5	166	293	338
<i>N</i> _a -désacétyl isorétuline 6	166	251	296
Tsilanimbine 7	166	281	326
Désacétyltsilanimbine 8	208	323	410
<i>N</i> _a -désacétyl <i>O</i> -acétyl-17 hydroxy-18 isorétuline 9	224	267	354
<i>N</i> _a -désacétyl hydroxy-18 isorétuline 10	182	267	312
Hydroxy-18 isorétuline 11	182	309	354
<i>O</i> -acétyl-17 acétyl-18 isorétuline 12	266	351	438

que le groupement méthyle précité fait partie d'un enchaînement éthylidène [*d*(3 protons, *J* 6,5 Hz) à 1,52 δ , *q* mal résolu (1 proton, *J* 6,5 Hz) à 5,43 δ].

L'acétylation de la tsilanimbine fournit un dérivé diacétylé 8, M^+ 410, UV: $\lambda_{\text{max}} \text{nm}$ ($\log \epsilon$) 254 (4,10), 282 (3,50), 296 (3,50). L'ensemble de ces arguments permet d'attribuer à la tsilanimbine la structure 7, prouvée par 'corrélation chimique: l'hydrolyse de la methoxy-10 *O*-déméthyltsilanine 4, par le méthanol chlorhydrique, dans les conditions décrites par Sarfati *et al.* [2], conduit à la tsilanimbine 7.

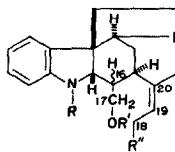


L'alcaloïde suivant, de formule brute $C_{21}H_{26}N_2O_3$ (M^+ 354), ne cristallise pas dans les solvants usuels. Son spectre UV est de type dihydroindole [$\lambda_{\text{max}} \text{nm}$ ($\log \epsilon$): 245 (3,80), 295 (3,40)]. Le spectre IR présente une bande dihydroindole à 1605 cm^{-1} , ainsi que des bandes vers 3400 cm^{-1} (OH, NH), 1735 et 1240 cm^{-1} (ester acétique). Sur le spectre de RMN qui confirme la présence

d'un noyau indolique on n'observe aucun signal d'un groupement méthyle appartenant à une chaîne éthyle ou éthylidène mais, centré sur 5,73 δ , un triplet mal résolu dû à un proton oléfinique et suggérant la présence d'une chaîne éthylidène substituée en 18. On remarque également un singulet (3 protons à 2,13 δ), confirmant l'existence d'un groupement MeCO.

Ces éléments sont en faveur d'une structure de *N*_a-désacétyl hydroxy-18 rétuline (ou isorétuline) dont l'une des deux fonctions alcool (en 17 ou en 18) serait acétylée. L'examen du spectre de masse permet de confirmer cette hypothèse et de préciser que c'est l'hydroxyde en 17 qui est acétylé. En effet, en plus des pics indoliques à *m/e* 130, 143 et 144, on remarque des pics à *m/e* 323 ($M-31 = M-\text{CH}_2\text{OH}$), 295 ($M-59 = M-\text{MeCOO}$), 281 ($M-73 = M-\text{MeCOOCH}_2$) et également les deux pics correspondant aux fragments A et B à *m/e* 224 et 267 respectivement (Tableau 1): par rapport aux fragments homologues de la *N*_a-désacétyl isorétuline 6, le pic correspondant à A est alourdi de 58 unités de masse (groupement acétyle + groupement hydroxyle supplémentaires) tandis que celui correspondant au fragment B est alourdi de 16 unités de masse, ce qui confirme la présence d'un groupement hydroxyle, non acétylé, en 18.

Par saponification à l'aide de potasse hydroalcoolique, l'alcaloïde conduit à la *N*_a-désacétyl hydroxy-18 isorétuline 10, identifiée à un échantillon préparé à partir de



	R	R'	R''
Rétuline 5 (16 β H)	Ac	H	H
<i>N</i> _a -désacétyl isorétuline 6 (16 α H)	H	H	H
<i>N</i> _a -désacétyl <i>O</i> -acétyl-17 hydroxy-18 isorétuline 9 (16 α H)	H	Ac	OH
<i>N</i> _a -désacétyl hydroxy-18 isorétuline 10 (16 α H)	H	H	OH
Hydroxy-18 isorétuline 11 (16 α H)	Ac	H	OH
<i>O</i> -acétyl-17 acétoxy-18 isorétuline (16 α H) 12	Ac	Ac	OAc

Tableau 2.

Eluant	No. des fractions	Poids brut (g)	Mode de purification	Poids purifiés (g)	Alcaloïde isolé
CHCl ₃	1-14	0,600	Chromatographies sur couche mince*	0,077	mélange Tsilanine
	15-25	3,700			0,115 0,418 méthoxytsilanine O-déméthyl tsilanine
CHCl ₃ -MeOH 2%	26-141	10,490			mélange: O-déméthyltsilanine + méthoxy- 10 O-déméthyl tsilanine
CHCl ₃ -MeOH 5%	142-154	0,770	Cristallisations dans l'acétone	0,650	méthoxy-10 O-déméthyltsilanine
	155-197	2,100			mélange
CHCl ₃ -MeOH 10%	198-220	2,800	Chromatographies sur couche mince†	0,048 0,165 0,075 0,020 0,009 0,170	6 7 5 9 10 11

* Support:alumine; éluant = cyclohexane-Me₂CO (1:1). † Support:alumine; éluant = Et₂O-MeOH (19:1).

la strychnine [5,6], ce qui corrobore la structure proposée et permet d'en préciser la stéréochimie.

Le quatrième alcaloïde, C₁₉H₂₄N₂O₂ (M⁺ 312), cristallise dans l'acétone en microaiguilles, F 247-250°. Il présente un spectre UV de type dihydroindole [λ_{max} nm (log ε) 244 (3,85), 296 (3,40)] et un spectre de masse semblable à celui de la N_a-désacétyl hydroxy-18 isorétuline 10, à laquelle il a été identifié.

Le dernier alcaloïde, C₂₁H₂₆N₂O₃ (M⁺ 354), cristallise dans l'acétone en petits prismes, F 245-248°. Son spectre UV (λ_{max} nm [log ε] 250 (4,10), épaul 280 (3,50), 288 (3,48)] est de type N-acyl indoline, en accord avec le spectre IR qui présente une bande amide à 1630 cm⁻¹, ainsi qu'une large bande OH vers 3400 cm⁻¹. Le spectre de RMN, assez proche de celui du produit 9, suggère de la même manière l'existence d'une chaîne éthylidène substituée en 18. Il s'en distingue surtout par la position du signal du groupement acétyle à champ plus faible (s, 3 protons, à 2,33 δ), correspondant au déplacement chimique habituel d'un groupement N-acétyle. Sur le spectre de masse, on observe, à côté de pics à m/e 336 (M-18 = M-H₂O) et 323 (M-31 = M-CH₂OH), les pics correspondant aux fragments A et B, à m/e 182 et 309 (Tableau 1).

L'ensemble de ces arguments est en faveur d'une structure d'hydroxy-18 isorétuline (ou rétuline) 11, corroborée par corrélation chimique: par acétylation de l'alcaloïde étudié ou du composé 10 on obtient le même dérivé triacétylé 12.

PARTIE EXPERIMENTALE

Extraction. 9 kg de feuilles et rameaux secs sont réduits en poudre fine, humectés par la moitié de leur poids d'une solution aqueuse ammoniacale à 10%, puis lixivés par le mélange:éther-3-CHCl₃-1 (90 l). La solution extractive est épuisée à contre-courant à l'aide d'une solution aqueuse d'acide chlorhydrique à 5% (12 l), qui, après filtration, est alcalinisée

par de l'ammoniaque et épuisée par le CHCl₃ (30 l). La solution chloroformique est lavée à l'eau, séchée sur sulfate de sodium anhydre, filtrée, puis distillée sous pression réduite jusqu'à l'obtention d'un résidu sec pesant 140 g. (Rdt = 1,55%).

Isolement des alcaloïdes. 30 g d'alcaloïdes totaux sont dissous dans 100 ml CHCl₃ et chromatographiés sur une colonne de 600 g. de silice d'activité V, montée au préalable par voie humide dans le CHCl₃. Des fractions de 500 ml sont recueillies. L'isolation et la purification des alcaloïdes sont représentées le Tableau 2.

Identification. Etude structurale. Les quatre alcaloïdes déjà décrits par Sarfati et al. dans le même matériel végétal (tsilanine 1, méthoxy-10 tsilanine 2, O-déméthyl tsilanine 3 et méthoxy-10 O-déméthyl tsilanine 4) ont été identifiés par leurs caractéristiques physiques et spectrales décrites par ces auteurs [2]. Les autres l'ont été de la manière suivante:

Rétuline 5. C₂₆H₂₄N₂O₂ = 338°. Cristallise dans Et₂O-MeOH en microprismes, F 168-170°. UV: λ_{max} nm (log ε) 254 (4,10), 280 (3,60), IR: v cm⁻¹ 3350, 1650, 1600, identifiée par comparaison avec un échantillon authentique de rétuline (F. mélange 168-170°, mélange donnant une seule tache en C.C.M., spectres IR superposables).

N_a-désacétyl isorétuline 6. C₁₉H₂₄N₂O = 296. Cristallise dans l'acétone en petits prismes, F 177-178°. UV: λ_{max} nm (log ε) 245 (3,90), 300 (3,45). IR: v cm⁻¹ 3300, 1605; pas d'absorption dans la région des groupements carbonyle. RMN: d(3p, J 6,5 Hz) à 1,54 δ; q mal résolu (1p, J 6,5 Hz) à 5,45 δ; m(4p) entre 6,50 et 6,72 δ. SM:m/e(%) pic principal): 296 (43) (M⁺), 281 (3), 279 (7), 265 (6), 251 (6), 238 (4), 168 (9), 167 (14), 166 (100), 156 (3), 154 (11), 145 (6), 144 (47), 143 (30), 136 (21), 130 (34), 122 (13), 121 (10). Identifiée par comparaison avec un échantillon préparé à partir de la strychnine, selon les données bibliographiques [5,6]. (F. mélange 177-178°, mélange donnant une seule tache en C.C.M., spectres IR Superposables).

Tsilanimbine 6. C₂₀H₂₆N₂O₂ = 326. Non encore obtenue à l'état cristallisé. UV: λ_{max} nm (log ε): 244 (3,90), 313 (3,55). IR: v cm⁻¹ 3350, 1600; pas d'absorption dans la région des groupements carbonyle. RMN: d(3p, J 6,5 Hz) à 1,52 δ; s(3p) à 3,71 δ; q mal résolu (J 6,5 Hz) à 5,43 δ; m(3p) entre 6,45 et 6,55 δ. SM:m/e (%) pic principal): 326 (84)(M⁺), 311 (4), 309 (9), 295 (8), 281 (4), 174 (29), 173 (27), 166 (100), 160 (35).

Diacétyl tsilanimbine 8. 5 mg de tsilanimbine sont dissous dans 0,5 ml Ac_2O ; la solution est chauffée pendant deux heures à 100° en atmosphère d'azote, puis distillée sous pression réduite jusqu'à siccité, les dernières traces d' Ac_2O étant éliminées par entraînement au benzène. On obtient un résidu pesant 6 mg et donnant une seule tache en CCM: diacétyl tsilanimbine 8. UV: $\lambda_{\text{max}} \text{nm} (\log \epsilon)$ 254 (4,10), épaul. 282 (3,50). SM: m/e (%) pic principal: 410 (100) (M^+), 395 (11), 351 (37), 323 (60), 284 (11), 256 (20), 208 (25), 180 (46), 174 (57), 173 (18), 160 (14).

Hydrolyse de la méthoxy-10 O-déméthyltsilanine 4. 85 mg de méthoxy-10 O-déméthyltsilanine sont dissous dans 6,8 ml de MeOH et, après addition de 1,7 ml d'HCl concentré, la solution est chauffée à reflux pendant 5 hr, dans les conditions décrites par Sarfati *et al.* [2]. Après extraction on obtient un résidu pesant 64 mg, et donnant une seule tache en CCM. Le produit obtenu est identifié à la tsilanimbine 7: mélange donnant une seule tache en CCM, spectres IR et de masse identiques.

N_a -désacétyl O-acétyl-17 hydroxy-18 isorétuline 9. $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_3 = 354$ Ne cristallise pas dans les solvants usuels. UV: $\lambda_{\text{max}} \text{nm} (\log \epsilon)$ 245 (3,80), 295 (3,40). IR: $\nu \text{ cm}^{-1}$ 3400, 1735, 1605, 1240. RMN: $s (3p)$ à 2,13 δ ; t mal résolu (1p, J 6,5 Hz) à 5,73 δ ; $m (4p)$ entre 6,60 et 7,40 δ . SM: m/e (%) pic principal: 354 (100) (M^+), 338 (18), 337 (11), 323 (30), 296 (30), 295 (100), 267 (18), 225 (14), 224 (98), 166 (26), 164 (36), 144 (100), 143 (51), 130 (46).

Saponification de 9: N_a -désacétyl hydroxy-18 isorétuline 10. 10 mg de N_a -désacétyl O-acétyl-17 hydroxy-18 isorétuline 9 sont dissous dans 1 ml de MeOH. Après addition de deux gouttes de lessive de potasse ($d = 1,33$), la solution est chauffée à reflux pendant 1 hr. Elle est ensuite diluée par 10 ml d'eau, et extraite par trois fois 10 ml d'éther. La solution éthérrée est séchée et distillée jusqu'à siccité: on obtient un résidu pesant 8 mg ($R_d = 91\%$) et donnant une seule tache en CCM. Le produit obtenu cristallise dans Me_2CO en microaiguilles, F 247-250°. Il est identifié à la N_a -désacétyl hydroxy-18 isorétuline 10, préparée à partir de la strychnine selon la méthode décrite [5,6]; il mélange 248-250°, mélange donnant une seule tache en CCM, spectres IR et de masse identiques.

N_a -désacétyl hydroxy-18 isorétuline 10. $\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_2 = 312$. Cristallise dans Me_2CO en petites aiguilles, F 247-250°. UV: $\lambda_{\text{max}} \text{nm} (\log \epsilon)$ 244 (3,85), 296 (3,40). Identification effectuée de la même manière que dans le cas précédent. SM: m/e (%) pic principal: 312 (100) (M^+), 294 (20), 281 (63), 267 (22), 183 (25), 182 (100), 144 (100), 143 (65), 130 (80).

Hydroxy-18 isorétuline 11. $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_3 = 354$. Cristallise dans Me_2CO en petits prismes, F 245-248°. UV: $\lambda_{\text{max}} \text{nm} (\log$

$\epsilon)$ 250 (4,10), épaul. 280 (3,50), 288 (3,48). IR: $\nu \text{ cm}^{-1}$ 3400, 1630. RMN: $s (3p)$ à 2,33 δ ; t mal résolu (1p) à 5,72 δ ; $m (4p)$ entre 7,10 et 7,30 δ . SM: m/e (%) pic principal) 354 (8) (M^+), 336 (90), 323 (62), 321 (7), 309 (19), 293 (28), 291 (29), 182 (48), 144 (100), 143 (33) 130 (43).

Acétylation de 11: O-acétyl-17 acétoxy-18 isorétuline 12. 30 mg de 11 sont traités par l' Ac_2O dans les conditions déjà décrites pour la diacétyl tsilanimbine 8. On obtient un résidu pesant 37 mg et donnant une seule tache en CCM: O-acétyl-17 acétoxy-18 isorétuline 12; ne cristallise pas dans les solvants usuels. IR: $\nu \text{ cm}^{-1}$ 1760, 1650, 1600. RMN: $s (6p)$ à 1,97 δ ; $s (3p)$ à 2,33 δ ; t mal résolu (1p) à 5,64 δ ; $m (4p)$ entre 7,05 et 7,30 δ . SM: m/e (%) pic principal) 438 (24) (M^+), 436 (15), 395 (21), 394 (13), 379 (61), 378 (100), 365 (24), 351 (19), 335 (12), 321 (6), 319 (7), 291 (25), 279 (6), 266 (10), 223 (12), 206 (8), 194 (5), 186 (9), 185 (8), 180 (8), 179 (8), 170 (13), 169 (4), 168 (8), 167 (9), 149 (80), 144 (80), 143 (17), 130 (17), 119 (21).

Acétylation de 10: O-acétyl-17 acétoxy-18 isorétuline 12. 30 mg du composé 10 préparé à partir de la strychnine (5,6), sont acétylés dans les mêmes conditions que le composé 11. On obtient 37 mg de composé 12, identique à celui obtenu par acétylation de 11: mélange donnant une seule tache en CCM, spectres IR, de RMN et de masse identiques.

Remerciements—Nous exprimons nos remerciements au Docteur P. Potier (I.C.S.N. du C.N.R.S., Gif sur Yvette) à qui nous sommes redevables du matériel végétal étudié, au Professeur Denoël (Faculté de Médecine et de Pharmacie, Liège) pour l'envoi d'un échantillon authentique de rétuline, et au Professeur M.-M. Janot, pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail.

REFERENCES

1. Bisset, N. G. et Phillipson, J. D. (1971) *Lloydia* **34**, 1 (autres références citées).
2. Sarfati, R., Pais, M. et Jarreau, F. X. (1970) *Phytochemistry* **9**, 1107.
3. Bosly, J. (1951) *J. Pharm. Belg.* **6**, 150 et 243.
4. Bisset, N. G. (1965) *Chem. Ind.* 1036.
5. Anet, F. A. L. et Robinson, R. (1955) *J. Chem. Soc.* 2253.
6. Fritz, H., Besch, E. et Wieland Th. (1963) *Liebigs Ann. Chem.* **633**, 150.
7. Hesse, M. (1964) *Indolalkaloide in Tabellen*. (vol. 1) & (1968) (vol. II), Springer-Verlag, Berlin.