

SUR LES ALCALOÏDES DES *RAUWOLFIA* DE MADAGASCAR

G. COMBES,* L. FONZES** et F. WINTERNITZ**

**E.N.S.C. de Montpellier et *Laboratoires de Recherches Diamant, Plaine Saint Denis

(Reçu le 11 Mai 1966)

Résumé—L'étude du *Rauwolfia discolor* M. Pichon a permis d'isoler sept alcaloïdes dont la Tabernaemontanine signalée pour la première fois dans ce genre de plantes. Un alcaloïde nouveau pour lequel nous proposons le nom de Tétraphyllinine a été trouvé et sa structure déterminée.

Abstract—Seven alkaloids were isolated during the study of *Rauwolfia discolor* M. Pichon. For the first time, tabernaemontanine was encountered in this genus. A new alkaloid, tetraphyllinine, was found and its structure established.

INTRODUCTION

DANS une note préliminaire, Combes et ses collaborateurs¹ avaient montré que le *Rauwolfia discolor* M. Pichon contenait deux alcaloïdes en quantités importantes $C_{22}H_{26}O_4N_2$ (I) et $C_{23}H_{28}O_5N_2$ (II) qui pouvait être, respectivement, la Tétraphylline et la Réserpine. Quéval² par comparaison avec des échantillons authentiques a pu, sans ambiguïté, identifier ces deux composés. Il a également montré, par chromatographie sur papier, la présence de nombreux autres alcaloïdes.

Nous avons repris et poursuivi ces travaux en vue d'isoler et d'étudier les alcaloïdes mineurs du *Rauwolfia discolor* et nous voulons rendre compte de l'état de nos recherches.

RESULTATS ET DISCUSSION

La séparation des alcaloïdes (voir partie expérimentale) a été faite par chromatographies successives sur colonne de gel de silice et suivie par chromatographie sur couche mince de gel de silice qui s'est révélée bien plus pratique que la chromatographie sur papier utilisée précédemment.^{1,2}

Tetraphylline (I)

Les difficultés analytiques rencontrées par Combes¹ pour caractériser cet alcaloïde provenaient du fait que la tétraphylline cristallise avec une molécule de méthanol, comme nous avons pu le mettre en évidence par le spectre de RMN. Le produit recristallisé dans le méthanol montre la présence d'un groupement méthoxy supplémentaire à 6,56 τ qui disparaît par sublimation et réapparaît par recristallisation dans le méthanol.

Isoreserpiline (III)

L'alcaloïde $C_{23}H_{28}O_5N_2$ III (R_f 0,68; Tableau 1) isolé des toutes premières fractions de la chromatographie, présente des spectres u.v., i.r. et de RMN très voisins de ceux de la réserpine. Le point de fusion 211–213° est identique à celui de l'isorésérpine. Comme

¹ R. PERNET, J. PHILIPPE et G. COMBES, *Ann. Pharm. Fr.* **20**, 527 (1962).

² P. QUEVAL, Thèse Doctorat 3ème Cycle, Université de Montpellier (1961).

réserpine et isoréserpine se différencient par l'hydrogène porté par le carbone 3, nous avons pensé isomériser la réserpine 3- β en isoréserpine 3- α . L'isomérisation conduite en milieu acide, donne un rendement de 80 % en isoréserpine, dont les constantes physiques sont identiques à celles de l'alcaloïde III isolé du *Rauwolfia discolor*. De plus, le point de fusion mélangé du méthanesulfonate de l'alcaloïde III et du méthanesulfonate d'isoréserpine ne présente pas d'abaissement. Enfin l'isoréserpine, libérée de son méthanesulfonate, se comporte comme l'alcaloïde III en chromatographie sur couche mince (R_f 0,68, fluorescence jaune).

TABLEAU 1. R_f DES PRINCIPAUX ALCALOÏDES DU *Rauwolfia discolor*

| Alcaloïdes | R_f | Fluorescence u.v. |
|-----------------------|-------|-------------------|
| Isoréserpine | 0,68 | jaune |
| Tétraphylline | 0,56 | verte |
| Tabernaemontanine | 0,51 | bleu |
| Réserpine | 0,31 | jaune |
| H 231 (Tétraphylline) | 0,28 | verte |
| Québrachidine | 0,15 | ncant* |
| H 100 | 0,10 | violet |

N.B. Les R_f des mélanges sont légèrement inférieurs aux R_f des produits purs donnés ici.

* Dragendorff positif.

Alcaloïde H 219 (Tabernaemontanine) $C_{21}H_{26}O_3N_2$

Cet alcaloïde dont nous avons obtenu 60 mg se présente sous la forme de cristaux blancs facilement sublimes, il a un R_f de 0,51 et une fluorescence bleu, son point de fusion est de 219–221°. Son spectre u.v. est caractéristique des 2-acyl indoles avec ses maxima à 240 et 350 m μ . Son spectre i.r. montre un N—H indolique et deux bandes à 1714 et 1637 cm⁻¹ que l'on aurait pu attribuer à une absorption CH₃O—OC—C=C—O—C si le spectre u.v. n'avait été en contradiction avec cette interprétation. En orientant nos recherches vers les dérivés 2-acyl indoliques, nous avons constaté l'identité des spectres u.v. et i.r. de notre produit avec ceux de la tabernaemontanine.³ De plus, le spectre de RMN semble correspondre avec les valeurs données par Cava.⁴ En particulier les protons de l'ester méthylique absorbent à des champs anormalement élevés, ce qui serait en faveur de la structure tabernaemontanine où il existe une interaction entre ces protons et les doubles liaisons du noyau aromatique.⁴ Enfin, le point de fusion 219–221° comparé à 216–219° pour la tabernaemontanine et le pouvoir rotatoire oscillant entre —54° et —62° pour —57° ne laissent guère de doute sur leur identité.

La confirmation de ces résultats a été obtenue par comparaison directe avec un échantillon authentique; en effet le point de fusion mélange ne présente pas d'abaissement et les spectres de Debye-Scherrer sont parfaitement superposables. De plus, les spectres de masse des deux composés sont identiques. Cependant, comme on peut le noter, le spectre de masse de la tabernaemontanine montre une assez nette différence avec celui de la vobasine⁵ (Fig. 1).

³ *Physical Data of Indole and Dihydroindole Alkaloids*. Lilly Research Laboratories, Indianapolis.

⁴ M. P. CAVA et S. K. TALAPATRA, *Tetrahedron Letters* 2, 53 (1963).

⁵ H. BUDZIKIEWICZ, C. DJERASSI, F. PUISIEUX, F. PERCHERON et J. POISSON, *Bull. Soc. Chim. Fr.* 1899 (1963).

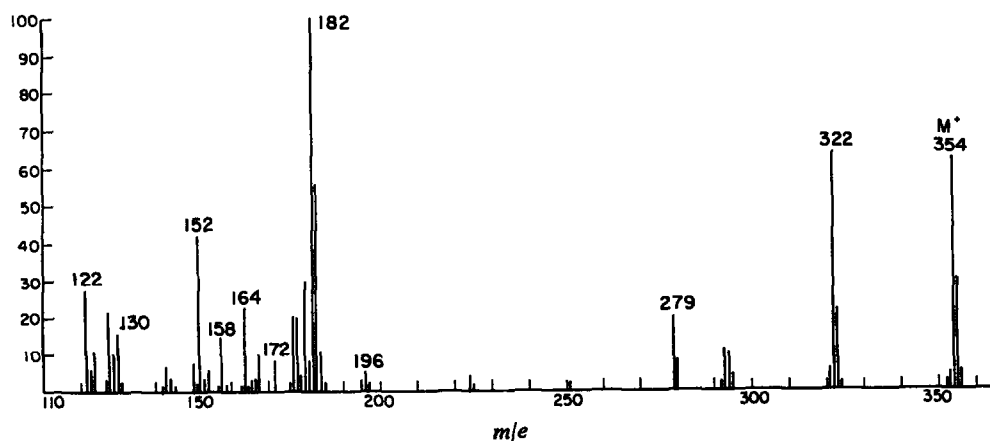


FIG. 1. SPECTRE DE MASSE DE LA TABERNAEMONTANINE.
Energie d'ionisation, 150 eV; courant d'ionisation, 100 A.

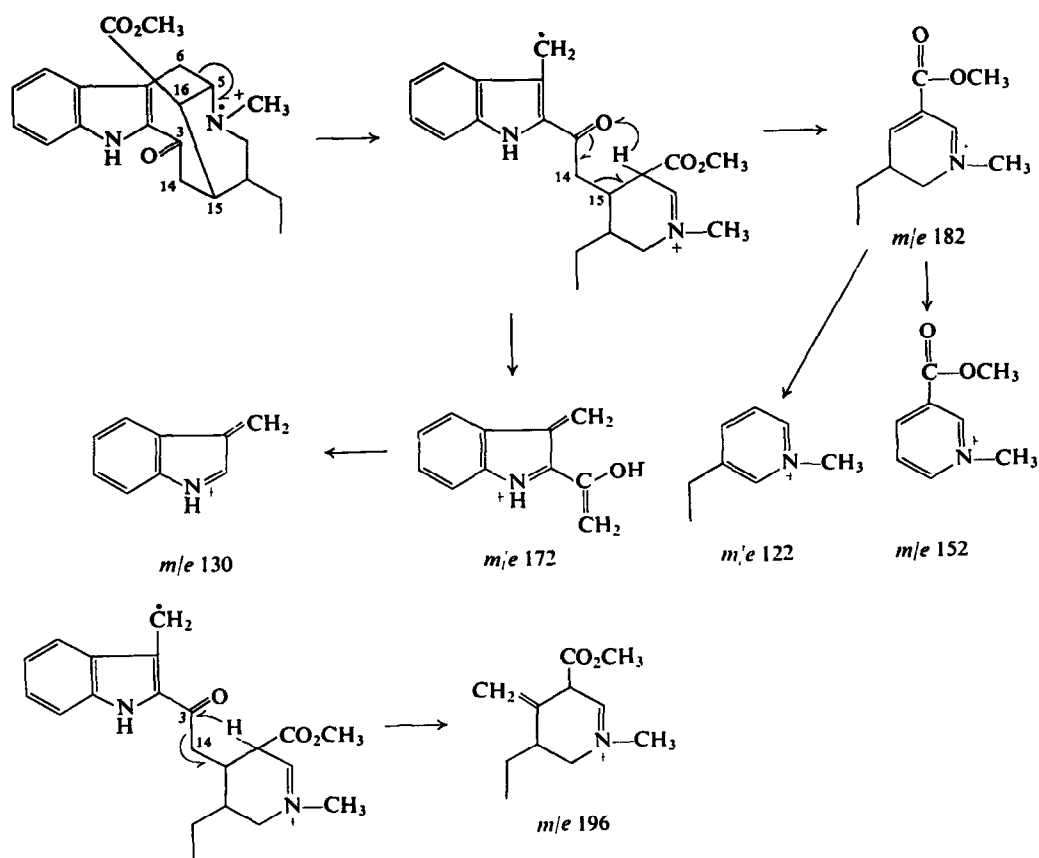
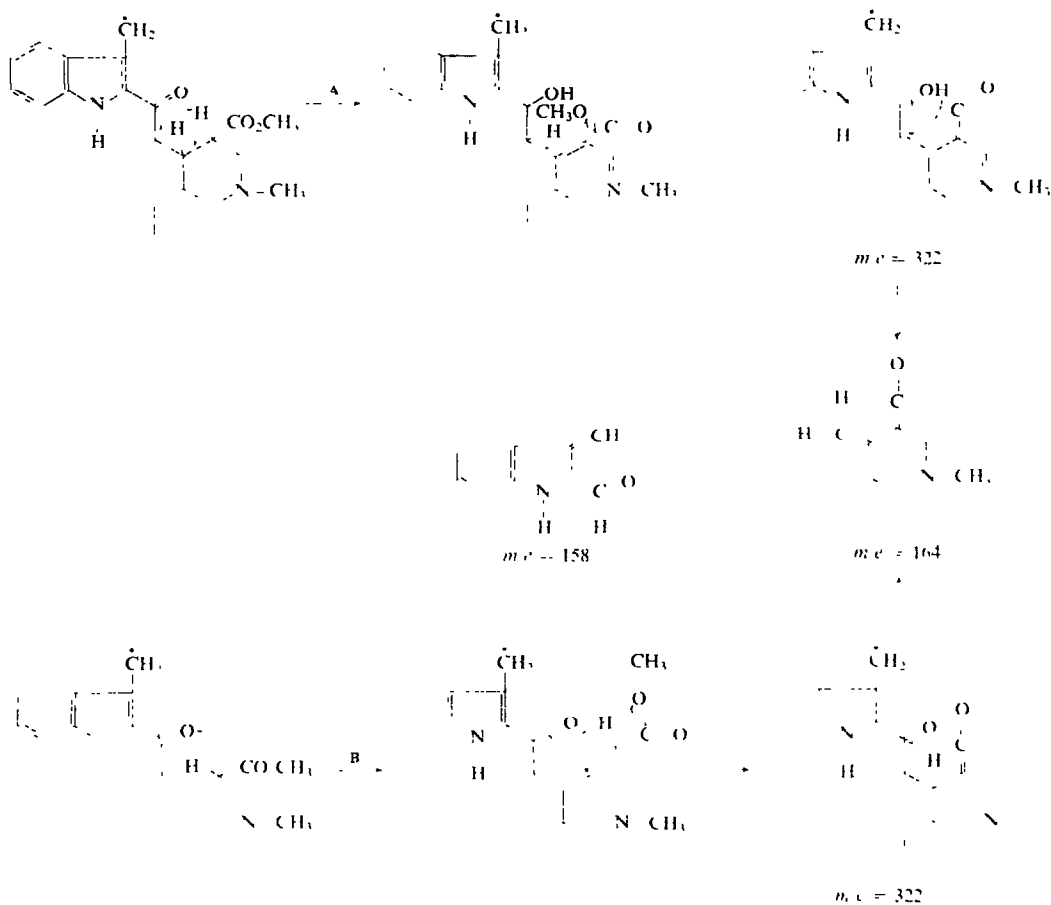


Schéma 1

En effet, si la fragmentation principale se fait selon le schéma indiqué par Budzikiewicz⁵ pour la vobasine, par rupture de la liaison 5-6 qui conduit, après nouvelle rupture de la liaison 14-15 à la formation de l'ion à m/e 182 et par rupture de la liaison 3-14 à l'ion de masse m/e 196, par contre, la suite de la fragmentation n'est pas identique et nous notons la présence d'un ion à m/e 152 qui peut provenir de l'ion m/e 182 par rupture de la chaîne ethyl et aromatisation (Schéma 1).



Comme pour la vobasine, la rupture de la partie carbométhoxy et l'aromatisation conduit à l'ion m/e 122; de même la partie indolique donne les ions m/e 172 et m/e 130.

A côté de la fragmentation principale, on remarquera un ion très important à m/e 322 qui provient incontestablement d'un départ de méthanol. Pour expliquer cette formation, on peut envisager les processus A ou B du Schéma 2. L'ion m/e 322 par rupture de la liaison 3-14 engendre les deux ions m/e 164 et m/e 158 comme le met en évidence la présence d'un pic métastable à m/e 83,5.

Enfin nous devons faire remarquer que c'est la première fois qu'un alcaloïde de ce genre a été isolé à partir de *Rauwolfia*.

H 231 (Tetraphyllinine) $C_{22}H_{28}O_5N_2$

Ce nouvel alcaloïde, isolé des fractions polaires de la chromatographie des alcaloïdes totaux, s'est révélé en tous points identique à l'alcaloïde obtenu par Combes¹ par extraction à la soude. Il a pour formule brute $C_{22}H_{28}O_5N_2$, un R_f de 0,32 et une fluorescence verte.

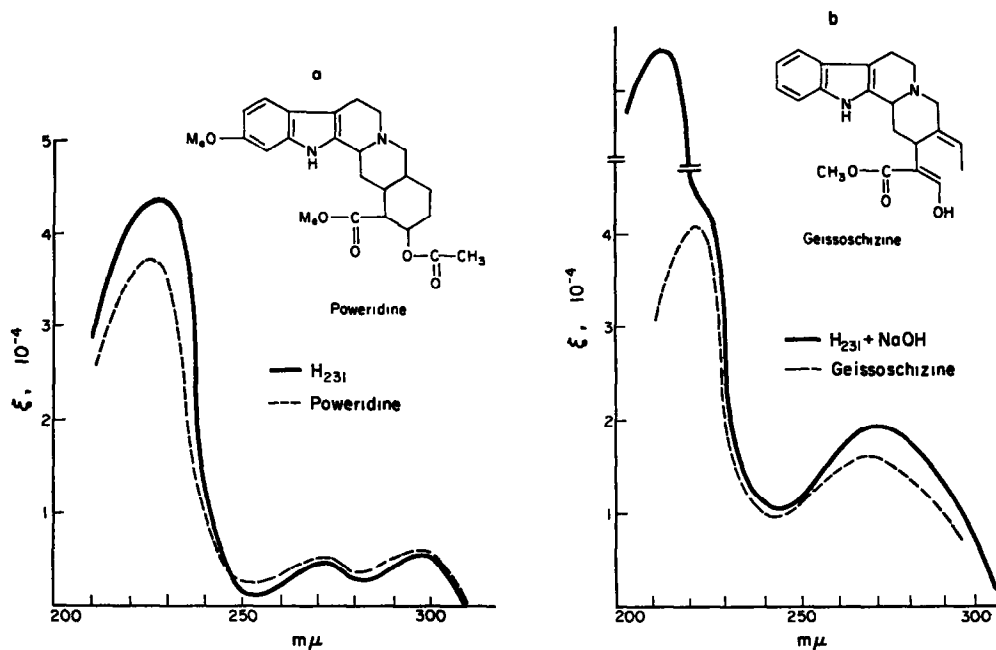


FIG. 2.

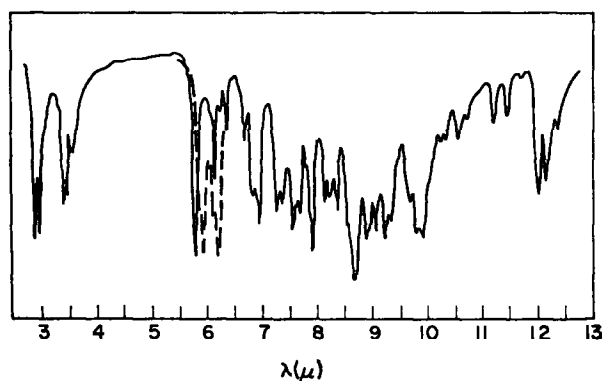


FIG. 3.

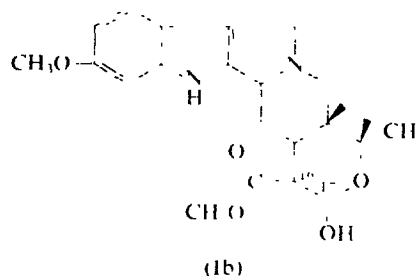
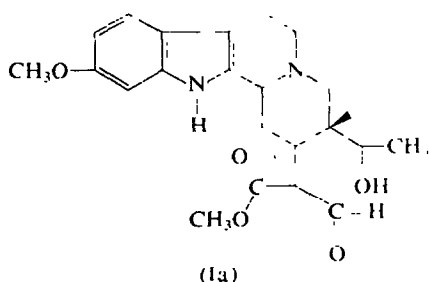
Son point de fusion a pu être élevé à 231–234°. Le caractère acide à l'extraction avait conduit Combes à le considérer comme phénolique, en fait, le spectre u.v. caractéristique d'un noyau indolique est pratiquement superposable à celui de la powéridine³ (Fig. 2a), ce qui semble indiquer que nous avons le chromophore 6-méthoxyindolique responsable de l'absorption u.v.

De plus, ce spectre est, de façon réversible, profondément modifié par addition de soude et il devient alors superposable au spectre de la geissoschizine,³ faisant ainsi apparaître une fonction éno-lisable, responsable du caractère acide de cet alcaloïde (Fig. 2b).

Le spectre i.r. montre la présence d'un N—H indolique ainsi que d'un hydroxyle, respectivement à 3509 cm^{-1} et 3401 cm^{-1} (Fig. 3). La forte absorption que l'on trouve à 1729 cm^{-1} ajoutée aux fortes bandes entre 1150 et 1250 cm^{-1} permettent de conclure à la présence d'un groupement ester. De même, une bande de moyenne intensité à 1626 cm^{-1} est caractéristique d'un indole méthoxylé en 11; de plus entre 2750 et 2800 cm^{-1} on trouve les bandes caractéristiques d'un hydrogène 3α .

Une tentative d'acétylation de l'hydroxyle par l'anhydride acétique à la température ambiante en présence de pyridine nous a conduit à la tétraphylline. Nous pourrions donc envisager la structure (1a) pour cet alcaloïde forme facilement cyclisable en tétraphylline et parfaitement éno-lisable.

Mais l'étude du spectre de RMN tout en nous confirmant la présence de deux groupements méthoxy (singulets à 6.38τ et 6.39τ) et d'un méthyl dédoublé centré à 8.82τ nous incite à adopter une forme hémiacétal (1b).



En effet, l'absence de proton aldéhydique et de proton vinylique de la forme éno-l nous oblige à rejeter la structure éno-aldéhyde. Par contre, le spectre est en bon accord avec la forme hémiacétal car on note un massif centré à 5.9τ qui pourrait être attribué au proton en 19 et un autre massif à 5.05τ pouvant provenir de l'hydrogène en 17. Cette attribution semble correcte, car par addition d'eau lourde la constante de couplage de ce proton varie, cependant la faible solubilité du produit empêche de faire une étude de RMN plus poussée permettant d'attribuer avec certitude les bandes à ces protons et de déterminer la conformation sur les carbones 16 et 17.

D'autre part, que nous ayons la forme hémiacétal ou la forme éno-l-aldéhyde, il est à noter, que nous avons probablement obtenu le précurseur biogénétique de la tétraphylline. En effet, selon l'hypothèse de Wenkert,⁶ la formation des cycles E des alcaloïdes ajmalicinaïdes se ferait par réduction et deshydratation de la forme céto-aldéhyde provenant de l'ouverture de l'acide shikimique. Nous avons donc saisi l'étape de la réduction, préalable à la formation du cycle E de la tétraphylline, ce qui semble confirmer que les hétéroyohimbines se forment bien à partir d'une forme céto-aldéhyde.

Quebrachidine

Isolée à partir des fractions polaires de la chromatographie, elle a été identifiée par ses constantes physiques. En effet, le point de fusion est de $265-275^\circ$, le spectre u.v. est très

⁶ E. WENKERT et N. V. BRINGI, *J. Am. Chem. Soc.* **81**, 1474 (1959).

caractéristique d'un dihydroindole et les valeurs des maxima ainsi que les intensités correspondent à celles données par Gorman et ses collaborateurs⁷ pour la québrachidine. Il en est de même du spectre de RMN et du spectre i.r. Enfin, le pouvoir rotatoire $[\alpha]_D^{20} + 54^\circ$ est conforme à la valeur donnée. Nous avons également préparé le dérivé diacétylé et les données spectrales sont en tous points identiques à celles de la diacétyl québrachidine.

L'alcaloïde H 100 de point de fusion mal défini, de fluorescence bleu et de R_f 0,10 est actuellement à l'étude.

PARTIE EXPERIMENTALE

Les chromatographies sur couche mince sont faites sur plaque de gel de silice G Merck. Elles sont séchées à l'étuve pendant deux heures à 120° puis réactivées à 120° pendant 30 min avant leur utilisation, leur épaisseur est de $250\ \mu$ et le solvant est la méthyléthylcétone 100 pour cent. Les plaques sont révélées en u.v. ou par pulvérisation de réactif de Dragendorff modifié.

Les spectres i.r. sont tirés en pastille de KBr sur appareil Beckman i.r. 4 à prisme CINA, les valeurs sont exprimées en cm^{-1} . Les spectres u.v. sont obtenus sur appareil Beckman DK-1 et les spectres de RMN sur appareil Varian A-60 et sauf indication spéciale dans le deutérochloroforme avec du T.M.S. comme référence interne, les valeurs sont exprimées en τ . Les spectres de masse ont été obtenus sur appareil à haute résolution C.E.C. 21-110 B. Les points de fusion ont été déterminés avec un microscope à platine chauffante et ne sont pas corrigés.

Fractionnement des Alcaloïdes Totaux

25 g d'alcaloïdes totaux sont dissous dans le minimum d'acétone et à cette solution on ajoute 50 g de gel de silice. On évapore ensuite sous vide de manière à avoir une poudre que l'on porte alors sur colonne de gel de silice (250 g dans le benzène) et on élue de la manière montrée dans Tableau 2.

TABLEAU 2. CHROMATOGRAPHIE NO. 1 DES ALCALOÏDES TOTAUX DU *Rauwolfia discolor* SUR GEL DE SILICE

| Fractions* | Solvant | Residus (g) | Alcaloïde |
|------------|-----------------------------------|-------------|-----------------------------------|
| 1 | Benzène-Acétone, 9:1 | 0,20 | isorésérpine |
| 2-5 | Benzène-Acétone, 9:1 | 4,50 | tétraphylline + tabernaemontanine |
| 6-10 | Benzène-Acétone, 9:1 | 6,70 | réserpine |
| 11-16 | Benzène-Acétone, 4:1 | 2,30 | réserpine + H 231 |
| 17-19 | Benzène-Acétone, 4:1 | 2 | réserpine + H 231 cristallisé |
| 20-24 | Benzène-Acétone, 1:1 | 1 | |
| 25-30 | Acétone | 2 | |
| 31-41 | Méthanol | } 9 | |
| 42-46 | Méthanol-NH ₄ OH, 95:5 | | 6 |

* Volume des fractions, 200 ml.

Tétraphylline

En reprenant les fractions 2 à 5 de la chromatographie No. 1 par du méthanol, la tétraphylline cristallise. On recristallise dans le mélange benzène-méthanol. Rdt. 3,5 g; F 130° puis $229-230^\circ$; R_f 0,56, fluorescence verte.

⁷ M. GORMAN, A. L. BURLINGAME et K. BIEMANN, *Tetrahedron Letters* 1, 39 (1963).

Tabernaemontanine

Le méthanol de lavage de la tétraphylline est concentré sous vide et le résidu (1 g) est chromatographié comme démontré dans Tableau 3. Par addition de méthanol aux fractions 21-37, la tabernaemontanine cristallise. Rdt. 0,060 g; F 219-221°; R_f 0,51, fluorescence bleu; u.v. (95% éthanol) λ_{\max} 240 m μ (ϵ = 15 400); i.r. 3300 (N—H), 1724-1205-1253 (ester), 1637 (2-acylindole). RMN 9,04 (tr. CH₃), 7,47 et 7,42 (s. N—CH₃ et O—CH₃); $[\alpha]_D^{25}$ -57° ± 3° (c = 0,3 CHCl₃). Trouvé: C 71,26; H 7,67; N 7,94; Calc. pour C₂₁H₂₆O₃N₂: C 71,16; H 7,39; N 7,90%; Diagramme de rayons X et spectre de masse superposables à ceux de la tabernaemontanine authentique.

TABLEAU 3. CHROMATOGRAPHIE NO. 2 SUR GEL DE SILICE DES FRACTIONS RICHES EN TABERNAEMONTANINE

| Fractions* | Solvant | Résidus (g) | Alcaloïde |
|------------|----------------------|-------------|-----------------------------------|
| 1-13 | Benzène-Acétone, 9:1 | 0,30 | isorésérpine + tétraphylline |
| 14-20 | Benzène-Acétone, 9:1 | 0,35 | tétraphylline + tabernaemontanine |
| 21-37 | Benzène-Acétone, 9:1 | 0,18 | tabernaemontanine + reserpiline |
| 38-60 | Benzène-Acétone, 9:1 | 0,06 | tabernaemontanine + reserpiline |
| 61-70 | Benzène-Acétone, 9:1 | 0,05 | tabernaemontanine |
| 71-90 | Benzène-Acétone, 4:1 | 0,03 | non identifiées |
| 91-120 | Benzène-Acétone, 1:1 | 0,02 | non identifiées |
| 121-150 | Méthanol | 0,05 | non identifiées |

* Volume des fractions, ~ 20 ml.

Isoreserpiline

La fraction 1 de la chromatographie No. 1 et les fractions 1 à 13 de la chromatographie No. 2 sont réunies (0,500 g) et chromatographiées sur colonne de gel de silice (50 g) dans le benzène. Le schéma du chromatogramme est comme dans Tableau 4. Les fractions 5 à 9 recristallisent dans l'éther (0,160 g). F 211-213°; R_f 0,68, fluorescence jaune; u.v. (95% éthanol) λ_{\max} 227 m μ (ϵ 40 000), λ_{\max} 305 m μ (ϵ 11 500). RMN 8,63 (d. CH₃); 6,27 (s. CH₃ ester); 6,11 et 6,12 (s. deux O—CH₃). Méthane sulfonate F 275° dec. Trouvé: C 66,89; H 6,78; N 7,04. Calc. pour C₂₃H₂₈O₅N₂: C 66,97; H 6,84; N 6,79%.

TABLEAU 4. CHROMATOGRAPHIE NO. 3 SUR GEL DE SILICE DES FRACTIONS RICHES EN ISORESERPILINE

| Fractions* | Solvant | Résidus (g) | Alcaloïde |
|------------|-----------------------|-------------|---------------|
| 1-4 | Benzène-Acétone, 99:1 | 0,05 | |
| 5-9 | Benzène-Acétone, 19:1 | 0,30 | isorésérpine |
| 10-12 | Benzène-Acétone, 9:1 | 0,03 | |
| 13-15 | Benzène-Acétone, 1:1 | 0,10 | tétraphylline |

* Volume des fractions, 100 ml.

Isomérisation de la Reserpiline

145 mg de reserpiline sont dissous dans 30 ml d'éthanol et additionnés de 0,5 ml d'HCl concentré. La solution est portée à reflux pendant 2 hr puis concentrée sous vide et reprise par de l'ammoniaque à froid. On extrait alors au benzène, sèche sur Na₂SO₄ et chasse le

solvant sous vide. Le résidu (0,080 g) est chromatographié sur gel de silice ce qui permet d'isoler 50 mg d'isorésérpine à l'état pur.

H 231 (Tetraphylline)

Les fractions 17–19 de la chromatographie No. 1, reprises par du méthanol laissent un résidu cristallin (400 mg) d'alcaloïde de point de fusion F 231–234° (méthanol), sous forme de lamelles incolores. Trouvé: C 65,89; H 7,03; N 7,17; Exigé pour $C_{22}H_{28}O_5N_2$: C 65,89; H 7,05; N 7,00%. R_f 0,32, fluorescence verte. $[\alpha]_D^{20} -35^\circ \pm 3^\circ$ (c. 0,42 pyridine). u.v. λ_{max} 226 m μ (ϵ 43800); λ_{max} 272 m μ (ϵ 4400); λ_{max} 298 (ϵ 5400). i.r. 3509 (N—H), 2778 (C/D trans), 1724 (ester). RMN (diméthylsulfoxyde hexadeutéié) 8,82 (d. CH₃, J 6,5 c/s) 6,38 et 6,39 (s. O—CH₃); 3,05 (2 protons aromatiques système A—B) 3,5 (1 proton aromatique); 5,9 et 5,08 (deux protons mal résolus). Essai d'acétylation: Par l'anhydride acétique en présence de pyridine ou d'acétate de sodium on est conduit à la tétraphylline.

Quebrachidine et H 100

Les fractions 20–32 de la chromatographie No. 1 ainsi que les liqueurs mères des fractions 17–19, soit 12,5 g, sont réunies. On en fait une poudre par addition d'alumine comme pour la chromatographie No. 1, et on porte sur une colonne de 40 g d'alumine Woelm (activité 1) dans le benzène, l'élution se fait de la façon montrée dans Tableau 5.

TABLEAU 5. CHROMATOGRAPHIE NO. 4, SUR ALUMINE, DES FRACTIONS 17–19 DE LA CHROMATOGRAPHIE NO. 1

| Fractions* | Solvant | Residus (g) | Alcaloïde |
|------------|---|-------------|-----------------------|
| 1–2 | Benzène-CH ₂ Cl ₂ , 9:1 | 0 | |
| 3 | Benzène-CH ₂ Cl ₂ , 4:1 | 0,02 | |
| 4–5 | Benzène-CH ₂ Cl ₂ , 4:1 | 1,31 | H 100 |
| 6–7 | Benzène-CH ₂ Cl ₂ , 4:1 | 1,55 | québrachidine + H 100 |
| 8–9 | Benzène-CH ₂ Cl ₂ , 7:3 | 0,65 | québrachidine + H 100 |
| 10–12 | Benzène-CH ₂ Cl ₂ , 7:3 | 1,75 | québrachidine |
| 13–17 | Benzène-CH ₂ Cl ₂ , 7:3 | 1,20 | mélanges |
| 18–20 | Benzène-CH ₂ Cl ₂ , 6:1 | 2 | mélanges |
| 21–31 | Méthanol | 4 | mélanges |

* Volume des fractions, ~200 ml.

Les fractions 10–12 après recristallisation dans le méthanol abandonnent 260 mg de cristaux légèrement jaunes. F 265–275° déc.; R_f 0,10 pas de fluorescence mais réaction de Dragendorff positive. u.v. (95% éthanol) λ_{max} 243 m μ (ϵ 7500); λ_{max} 293 m μ (ϵ 3200). i.r. 3355 (O—H); 1730 (ester). RMN 8,22 (d. CH₃, J 6,5 c/s); 6,35 (s. O—CH₃); 3,00 (4 protons aromatiques); 4,8 (q. 1 proton éthylénique J 6,5 c/s). $[\alpha]_D^{20} +54^\circ$ (c. 0,9 éthanol). Trouvé: C 71,59; H 7,06; N 8,24. Calc. pour $C_{21}H_{24}O_3N_2$: C 71,57; H 6,86; N 7,95%. Dérivé diacétylé: i.r. 1750 et 1745 (esters); 1667 (N-acétyl) u.v. λ_{max} 252 m μ (ϵ 14100).

Remerciements—Les auteurs expriment leur reconnaissance au Professeur C. Djerassi (Stanford, U.S.A.) pour l'échantillon de tétraphylline; au Docteur Hofmann (Basel) pour la réserpine et l'isorésérpine ainsi qu'au Docteur N. Neuss (Eli Lilly Co., Indianapolis, U.S.A.) pour un échantillon de tabernamontanine. Notre gratitude s'adresse également au Professeur Maurin (Université de Montpellier) pour la détermination des diagrammes de rayons X. Pour la détermination des spectres de masse nous remercions très vivement les Docteurs P. Schulze et H. Pöhler (Friedberg (Hessen), Allemagne). Nos remerciements s'adressent également aux différents services de l'E.N.S.C. de Montpellier pour leur collaboration et en particulier au service de micro analyse et aux laboratoires de RMN (MM. J. Wylde et E. Arnal) et de spectrographie (Mme C. Laffite).