

ISOLEMENT ET ANALYSE STRUCTURALE DU COLLYBOLIDE, NOUVEAU SESQUITERPENE EXTRAIT DE COLLYBIA MACULATA ALB. ET SCH. EX FRIES (BASIDIOMYCETES)^a

A.-M. BUI, A. CAVÉ, M.-M. JANOT, J. PARELLO^b et P. POTIER*
Institut de Chimie des Substances Naturelles du C.N.R.S., 91190—Gif-sur-Yvette, France

Avec Appendice:

ETUDE RMN DU CARBONE 13 DE QUELQUES LACTONES

en collaboration avec U. SCHEIDEGGER
Varian Research Laboratory, Zürich, Suisse

(Received in France 10 December 1973; Received in the UK for publication 7 January 1974)

Résumé—De *Collybia maculata* Alb. et Sch. ex. Fries ont été isolés deux sesquiterpènes nouveaux, collybolide 1 et isocollybolide 2, artefacts issus d'acides carboxyliques qui restent à isoler. La structure du collybolide est établie par corrélation avec celle, connue, de l'isocollybolide, et leur réactivité est étudiée. Les spectres de RMN permettent d'effectuer l'analyse conformationnelle complète des produits isolés.

Résumé de l'appendice—L'analyse des spectres de RMN du carbone 13 d'une série de lactones (β -, γ -, δ - et ϵ -lactones) dans différents solvants fait apparaître une très nette différence des déplacements chimiques du carbone du groupement carbonyle. La distinction est particulièrement nette entre les γ -lactones (+ 13.5 à + 16 ppm/CS₂) et les δ -lactones (+ 20 à + 22 ppm).

Abstract—From *Collybia maculata* Alb. et Sch. ex. Fries two sesquiterpenes of a new type have been isolated, collybolide 1 and isocollybolide 2, artefacts resulting from carboxylic acid precursors as yet not isolated. The structure of collybolide is established by correlation with that of isocollybolide, already known, and their reactivity has been studied. NMR spectra allow the conformational analysis of all products isolated.

Summary of appendix—A series of lactones (β -, γ -, δ - and ϵ -lactones) in various solvents has been studied through ¹³C NMR spectroscopy. The chemical shift of the carbonyl carbon appears characteristic of the type of lactone. The distinction is particularly clear between γ -lactones (+ 13.5 to + 16 ppm/CS₂) and δ -lactones (+ 20 to + 22 ppm).

Lors de leurs recherches sur la présence de l'urée parmi les Champignons Supérieurs, Goris et Mascré¹ isolent de *Collybia maculata* Alb. et Sch. (ex. Fries) (Basidiomycètes), un composé, F 201–202^o, qu'ils retrouvent également chez un autre champignon supérieur, *Hebeloma firmum* Ricken non Fries = *Hebeloma truncatum sensu* Lange. Reprenant ces travaux en 1957, l'un de nous modifie la technique d'extraction de ce produit et lui attribue le nom de collybolide.² Cependant, des ambiguïtés subsistent quant à la formule brute et ce

n'est qu'en 1961 que, grâce à l'utilisation de la spectrométrie de masse, la formule brute du collybolide est définitivement établie: C₂₂H₂₀O₇ (M⁺: 396).³

L'analyse structurale systématique du collybolide, entreprise dès 1968, permet d'attribuer à ce composé la structure 1, correspondant à celle d'un ester benzoïque d'alcool sesquiterpénique à squelette nouveau. L'utilisation des hypothèses biogénétiques, faisant dériver l'alcool précédent d'un précurseur de type farnésol, avait été à l'origine d'une structure partielle proposée en 1970 pour le collybolide (1' ou 1'') (Ref 4 et références citées) mais qui se révéla par la suite, inexacte. La structure 1 que nous proposons maintenant, diffère de la précédente par la position des deux fonctions lacto-

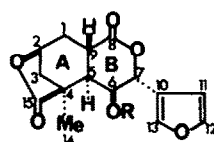
^aDédié à Monsieur le Professeur E. Lederer pour son 65^{ème} anniversaire.

^bAdresse permanente: C.N.R.S., ER n° 140, U.S.T.L., 34060—Montpellier, France

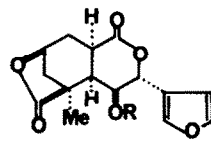
nes et du groupement ester benzoïque, mais respecte les éléments essentiels des structures 1' et 1'' et, en particulier, la jonction A/B trans.

Les préparations de collybolide contiennent un isomère, présent en faible quantité, l'isocollybolide, F 193°,⁵ dont la structure a pu être récemment établie grâce aux rayons X⁶ et correspond à la formule 2, (fusion A/B cis).

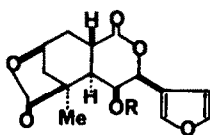
Compte-tenu des hypothèses biogénétiques admises, au moins six formules planes sont possibles pour représenter le collybolide et l'isocollybolide (A, B, C, D, E, F). En fait, des deux produits corres-



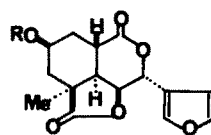
1 Collybolide



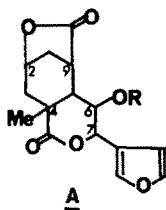
2 Isocollybolide



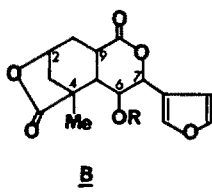
3 Epicollybolide



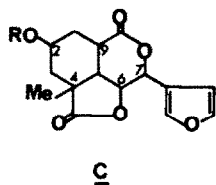
4a: Néocollybolide

4b: (R = H; Collybolidol α)

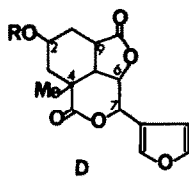
A



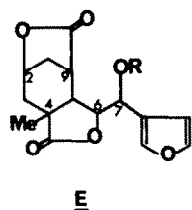
B



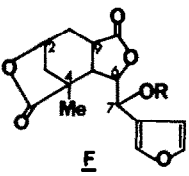
C



D



E



F



pondent à la formule plane B. Toutefois, le traitement du collybolide et de l'isocollybolide en milieu acide ou basique permet d'obtenir deux nouveaux isomères: l'épi-collybolide 3 et le néocollybolide 4. Ce dernier correspond à l'une des structures, 1', proposées antérieurement pour le collybolide.⁴

Analyse structurale du collybolide

Nous utiliserons éventuellement les abréviations suivantes: C, collybolide; IC, isocollybolide; NC, néocollybolide; EC, épi-collybolide.

L'existence d'une relation de diastéréoisomérisie entre C et IC, ce dernier de structure connue,⁶ repose sur l'analyse comparée des spectres de RMN de ces deux composés ainsi que sur une corrélation

chimique simple: IC s'isomérisé en C en présence d'acide trifluoroacétique.

Structure plane du collybolide

La présence, dans la molécule de collybolide, d'un cycle furannique monosubstitué en β se traduit par le signal de H₁₁ à 6.51 (C) et à 6.43 (IC). Bien que masqués par les signaux des protons aromatiques de l'ester benzoïque, les protons furanniques H₁₂ et H₁₃ ont été localisés vers 7.5 (Tableaux 1 et 2), grâce à des expériences de double résonance.

Les signaux du spectre de l'isocollybolide, de structure connue, ont pu être identifiés grâce aux découplages suivants: * (H₁₃) \rightarrow H₇; (H₆) \rightarrow H₇; (H₅) \rightarrow H₆; (H₅) \rightarrow H₉; (H₂) \rightarrow H_{1e}, H_{1a}, H_{3e} et H_{3a}. Ces expériences ont permis de vérifier, dans le cas de l'isocollybolide, l'enchaînement suivant (Schéma 1):

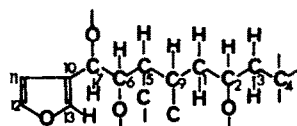


SCHÉMA 1

Les protons du groupement ester benzoïque apparaissent entre 7.3 et 7.8 (3 protons) et entre 7.9 et 8.2 (2 protons).

La présence d'un groupement ester benzoïque et d'un cycle furannique, corroborée par l'examen des autres données spectrales, en particulier infra-

*Les protons irradiés sont indiqués entre parenthèses.

Tableau 1. Tableau des déplacements chimiques δ ppm (CDCl₃) Ref TMS interne

	Isocollybolide	Collybolide	Epicollybolide	Néocollybolide	Collybolidol	Tétrahydrocollybolide 5a
Me	1.29	1.20	1.39	1.37	1.32	1.30
3e	2.22	2.27	2.34	2.71	2.44	2.31
3a	2.03	1.79	1.87	1.73	1.5	1.87
2	4.84	4.79	4.82	5.48	4.35	4.85
1e	2.45	2.69	2.73	2.56	2.30	2.74
1a	2.75	1.80	1.87	1.73		1.88
9	3.24	3.38	3.39	2.91	3.18	3.34
5	2.63	2.14	2.39	2.29	2.20	2.14
6	5.62	5.71	5.98	4.87	4.84	5.49
7	5.87	5.63	5.60	5.30	5.30	4.37
11	6.43	6.51	6.27	6.53	6.52	
12			7.22	7.43	7.48	
13	7.3-7.5	7.3-7.5	7.41	7.60	7.60	3.65-4.15

Tableau 2. Constantes de couplage (J en Hz)

	Isocollybolide	Collybolide	Epicollybolide	Néocollybolide	Collybolidol
3e-3a	12.5	12.0	11.8-12	15.2	15
1e-3e		1.6	1.6		
2-3e	5.0-5.5	6	6.2	2.6	
2-1e	4.5	4.5	4.2	3	
2-3a	1.0	0	0	3.6	2
2-1a	1.0	0.7	0	2.3	
1e-1a	15.5	14.0-14.2	14	14.0	14
1e-9	9.5-9.0	6	6	3.0	3
1a-9	7.5	11.5-11.7	11.4-11.8	11.8	12
9-5	9.0-9.1	13.5-13.7	13.9-14.0	13.4	13
5-6	2.5	2.0	1.6	5.6	5.5
6-7	5.0	1.0-1.2	2.4-2.5	6.6	6.5
7-13	1.2	1.2	0	0	0
13-11	1.0	1.0	0.8-0.9	0.9	0.9
12-11	2.0	1.7	1.8	1.9	2.0
12-13			1.5-1.7		1.6

rouge,⁴ rend compte de trois atomes d'oxygène sur les sept que compte la molécule de collybolide. Les quatre autres atomes d'oxygène appartiennent à deux fonctions lactones, l'une γ -, l'autre δ -, mises en évidence sur les spectres infra-rouge de C et également de IC.

D'autre part le spectre du carbone 13 du collybolide (CHCl₃) présente trois signaux à +15.4, +21.6 et +26.0 ppm (par rapport à CS₂) correspondant respectivement aux ¹³C des >C=O de la γ -lactone, de la δ -lactone et de l'ester benzoïque. Il a été établi au cours de cette étude que la RMN du carbone 13 permet une distinction entre les lactones de taille différente (voir Appendice). Ce critère devrait pouvoir s'appliquer à la détermination de la structure de nombreuses substances naturelles ayant une ou plusieurs fonctions lactone. Dans le cas du collybolide, la présence d'une γ -lactone et d'une δ -lactone est établie sans ambiguïté. De plus, l'apparition sur le spectre du carbone 13 du collybolide de 22 signaux distincts permet de confirmer

la formule brute de ce composé. La présence d'un groupement méthyle se traduit par un signal à champ fort (+174.6 ppm) correspondant au carbone 14; les autres signaux, bien qu'en accord avec la structure 1, n'ont pas reçu d'attribution définitive.

Les découplages en RMN du proton ont permis dans le cas du collybolide de déceler le même enchaînement d'atomes que celui figurant sur le Schéma 1.

L'attribution rigoureuse des signaux des protons 1a, 1e, 3a et 3e du collybolide a été faite sur la base de la mesure des constantes de couplage de ces protons avec H₂, en mettant à profit des effets spécifiques de solvation⁸ (mélanges en proportions variables de C₆D₆ et CDCl₃), ainsi que grâce à l'observation d'une constante de couplage de faible amplitude entre H_{1e} et H_{3e} (couplage en M).⁹

L'étude structurale par les rayons X de l'isocollybolide⁹ a montré que la substitution de la γ -lactone en positions 2 et 4 du cycle A (cyclohexane) conduit à un changement de conformation chaise normale

vers une conformation super-chaise. Ce changement se reflète fort bien dans le spectre de RMN de l'isocollybolide. On peut remarquer les faibles valeurs des constantes de couplage 2,1a et 2,3a (< 1 Hz) (Tableau 2), en accord avec la déformation du cycle A de l'isocollybolide. L'observation, dans le cas du collybolide, de deux constantes $J_{2,1a}$ et $J_{2,3a}$ très faibles est en faveur de la substitution de la γ -lactone en positions 2 et 4 du cycle A comme dans le cas de l'isocollybolide. Le même phénomène est observé pour l'épicollybolide 3, alors que pour le néocollybolide 4, de structure plane différente, les valeurs des constantes de couplage (Tableau 2) reflètent une conformation normale du cycle A.

Une preuve supplémentaire de la position de la γ -lactone est fournie par les résultats de l'hydrogénation catalytique du collybolide qui conduit à deux types de produits (a) l'un, tétrahydrogéné 5 (Rdt: 20%), $C_{22}H_{24}O_7$ (M^+ 400) résultant de la seule hydrogénation du cycle furannique: ce produit est, en fait, un mélange 3:1 des deux épimères 5a:5b en C_{10} , (b) l'autre, hexahydrogéné 6a (Rdt: 80%), $C_{22}H_{26}O_7$ (M^+ 402) résultant à la fois de l'hydrogénation du cycle furannique et de l'hydrogénolyse de la δ -lactone; ce produit semble être également un mélange d'épimères en C_{10} . Il réagit avec le diazométhane pour conduire à un mélange 1:1 de deux esters méthyliques 6b. Le spectre IR de ce composé mon-

tre la persistance d'une fonction γ -lactone à 1785 cm^{-1} .

En conclusion, l'ensemble des données précédentes permet d'attribuer au collybolide la structure plane B identique à celle de l'isocollybolide 2.

Configuration relative du collybolide

Les valeurs des constantes de couplage $J_{2,1a}$; $J_{2,1e}$; $J_{2,3a}$; $J_{2,3e}$ et $J_{5,6}$ permettent d'établir des configurations relatives des carbones 2, 5, 6 (et 4 par suite de la dépendance configurationnelle des carbones 2 et 4). D'après l'équation, $^3J = 8.6 \cos^2 \theta - 0.1$, établie expérimentalement dans le cas de l'isocollybolide 2 (voir Fig 1), on peut évaluer les angles dièdres suivants $\theta_{5,6}$ env. 60° , $\theta_{2,1e}$ env. 44° , $\theta_{2,1a}$ env. 72° , $\theta_{2,3e}$ env. 32° et $\theta_{2,3a}$ env. 84° .* Ces valeurs rendent compte de la configuration relative des carbones 2, 4, 5, 6 de la formule 1.

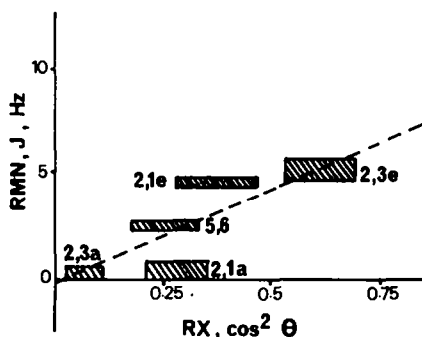
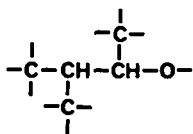


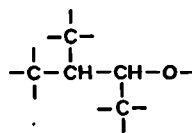
Fig 1.

*La corrélation entre constante de couplage J (RMN) et angle dièdre θ ($0^\circ \leq \theta \leq 90^\circ$) (rayons X) suivant la relation de Karplus à deux paramètres,¹⁰ $^3J = A \cos^2 \theta + B$ apparaît satisfaisante, $^3J = 8.6 (\pm 0.9) \cos^2 \theta - 0.1 (\pm 0.3)$, pour l'ensemble des constantes de couplage de l'isocollybolide correspondant au motif de type éthane substitué.



Le choix d'un ensemble de données relatives à un motif éthanique bien défini du point de vue de l'électronégativité des substituants apparaît indispensable pour l'établissement d'une corrélation entre constantes de couplage en RMN et caractéristiques structurales d'une molécule.¹¹ Il est connu d'autre part que la déformation des angles de valence et la variation de la longueur des liaisons d'un motif éthanique peut se traduire par des écarts numériques par rapport aux valeurs établies pour un motif de même structure, mais dans une conformation sans tension.¹² L'emploi de la relation expérimentale, établie pour 1C, au cas de C se trouve justifié par suite de la similitude des deux structures du moins en ce qui concerne les éléments du cycle A et du cycle de la γ -lactone, soumis à des déformations importantes.⁶ La rigidité de ces éléments permet de supposer que les coordonnées physiques de la structure doivent dépendre faiblement de l'état physique, cristal ou solution.

D'autre part, la valeur 13.5–13.7 Hz de $J_{5,9}$ est caractéristique d'une disposition trans-diaxiale des protons 5 et 9 sur le cycle A correspondant à une fusion A/B trans. Dans le cas de l'isocollybolide, A/B cis, $J_{5,9} = 9.0$ – 9.1 Hz. La Fig 1 représente la corrélation entre constante de couplage 3J (RMN) et angle dièdre θ ($0^\circ \leq \theta \leq 90^\circ$) (rayons X) suivant la relation de Karplus à deux paramètres, $^3J = A \cos^2 \theta + B$, pour l'ensemble des constantes de couplage $J_{2,1a}$, $J_{2,1e}$, $J_{2,3a}$, $J_{2,3e}$ et $J_{5,6}$ de l'isocollybolide 2, correspondant au motif de type éthane substitué,



La configuration de C_7 est difficile à établir sur la base de $J_{6,7}$. La détermination des effets Overhauser nucléaires (Tableau 3) a permis de préciser les positions respectives des protons 5, 6 et 7.

L'ensemble des résultats obtenus à l'aide des spectres de RMN du collybolide et de l'isocollyboli-

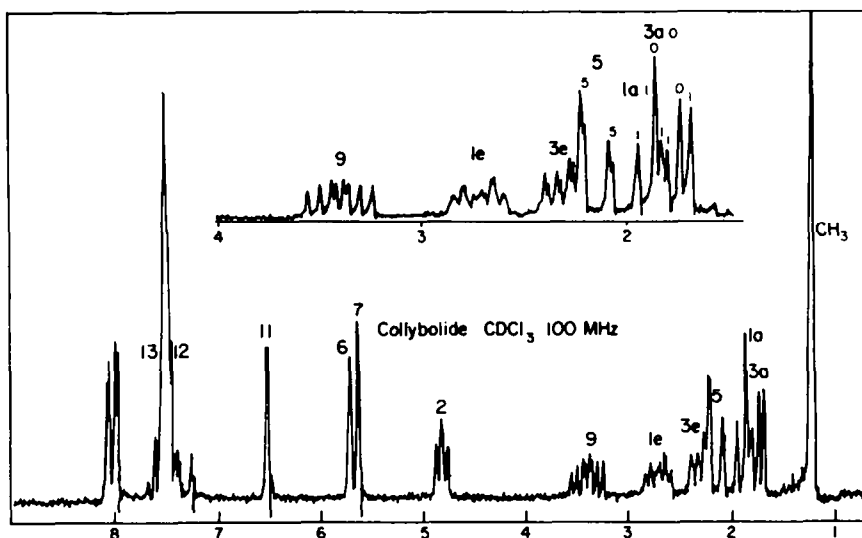
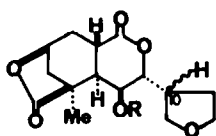
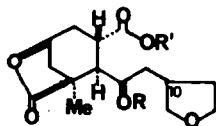


Fig 2.



5 Tétrahydrocollybolide (5a: 5b/3:1)

6a: (R' = H) Hexahydrocollybolide
6b: (R' = Me)

de (déplacements chimiques, constantes de couplage et effets Overhauser nucléaires) font l'objet, respectivement, des Tableaux 1, 2 et 3.

Réactivité du collybolide en milieu trifluoroacétique

Traité par l'acide trifluoroacétique à reflux, le collybolide conduit à un mélange de collybolide (52%) et d'un dérivé isomère: l'épicollybolide (48%) 3. La présence du produit de départ dans le mélange réactionnel ne découle pas d'une transformation incomplète: le traitement, dans des conditions identiques, de l'épicollybolide conduit, en effet, au même mélange de constituants.

L'équilibration à 25–30° est beaucoup plus lente et conduit, après quelques jours, à un nouvel équilibre C 40% ⇌ EC 60%. Par chauffage à reflux de ce mélange, l'équilibre précédent C 52% ⇌ EC 48% se rétablit. Un chauffage prolongé conduit

à une décomposition des produits qui s'accompagne de la libération d'acide benzoïque.

La séparation par chromatographie sur colonne de silice permet d'obtenir EC à l'état pur et un mélange C + EC enrichi en C; le chauffage de ce mélange dans TFA conduit à une nouvelle transformation de C en EC; en continuant séparation et chauffage on peut ainsi obtenir une transformation de C en EC pratiquement totale.

Le chauffage dans TFA d'un échantillon purifié de EC conduit à un mélange de C + EC, de composition identique à celui obtenu à partir de C dans les mêmes conditions.

L'épicollybolide est un diastéréoisomère du collybolide (M^+ 396): la RMN établit la présence d'un cycle furannique monosubstitué en β et de la même séquence des protons (Schéma 1). Les valeurs des constantes de couplage $J_{2,1a}$ et $J_{2,3a}$ voisines de 0 établissent la présence de la fonction γ -lactone entre les carbones 2 et 4 du cycle A.

Les résultats de l'analyse du spectre de RMN figurent sur les Tableaux 1, 2 et 3. La comparaison des constantes de couplage du collybolide et de l'épicollybolide suggère que ce dernier est l'épimère en 7 du collybolide. Ce fait est établi également par l'observation d'une valeur de 7% de l'effet Overhauser nucléaire entre les protons portés par C₇ et C₇, cette même expérience étant négative (effet = 0%) dans le cas du collybolide. La valeur de la constante $J_{3,5} = 14$ Hz établit la fusion A/B trans.

Mécanisme de l'épimérisation

L'épimérisation au niveau de C₇ du collybolide et de l'épicollybolide dans l'acide trifluoroacétique peut s'interpréter selon le mécanisme détaillé sur Fig 3. Ce mécanisme ne fait pas intervenir d'échange entre l'hydrogène H₇ et les protons du

Tableau 3. Effets overhauser nucléaires. Solutions dans CDCl_3 , ou acide trifluoroacétique (TFA) dégazées et conservées en tube scellé.

H irradié	H observé	Néocollybolide	Collybolide	Epicollybolide	Tétrahydrocollybolide 5a
		%	%	%	%
CH_3	H6	12	13	12	
H5	H6	0	5	4	
H5	H7	0	0	7	
			†		
H6	H7	0	{8(TFA)* 7(TFA)*}	{12 8(TFA)*}	10
H7	H6	0			
H9	H7	19	0	0	
H9	H6	0	0	0	
H9	H2	0		0	
CH_3	H2	0	0		
CH_3	H7	0	-4	-2	
H12	H11		13-15	13-16	
H13	H7			5-7	
H11	H7			5	

*Ces déterminations ont été effectuées sur une solution d'acide trifluoroacétique contenant 50% de collybolide et 50% d'épicollybolide.

†Cette valeur n'a pu être déterminée dans CDCl_3 , à cause de la faible différence de déplacement chimique (0.08 ppm) entre H6 et H7. Dans TFA cette différence devient 0.18 ppm, rendant possible l'expérience de découplage.

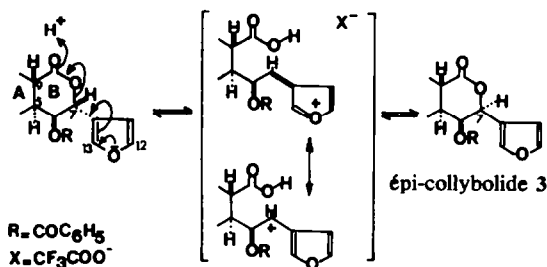


Fig 3.

milieu. L'emploi de CF_3COOD montre, en effet, qu'il n'y a pas d'incorporation de deutérium sur C, lors de l'épimérisation. Cependant dans ces conditions, l'épimérisation est suivie de l'échange successif des protons 13 et 12, mis en évidence par la disparition progressive des signaux de H₁₃ et H₁₂.

La présence du cycle furannique est indispensable à l'épimérisation en 7. La saturation de ce cycle lors de la réduction catalytique de C conduit au tétrahydrocollybolide (THC), lequel est parfaitement stable dans l'acide trifluoroacétique. Même après chauffage prolongé il ne se libère pas d'acide benzoïque comme cela se produit pour C.

Corrélation isocollybolide-collybolide: réactivité de l'isocollybolide en milieu acide

IC traité en milieu trifluoroacétique devrait également conduire à l'épimère en 7. Ce nouveau dérivé n'a pu être isolé, le milieu réactionnel conduisant rapidement à un mélange de C, EC et

d'acide benzoïque. La transformation de IC en C et EC, impliquant l'isomérisation en 9, établit une corrélation entre ces dérivés et témoigne d'une réactivité particulière de IC vis-à-vis de l'acide trifluoroacétique.

Cette réactivité semble liée à l'encombrement occasionné par les deux lactones qui occupent les trois positions axiales supérieures du cycle A de la molécule et à la possibilité offerte au carboxyle de la δ -lactone de passer de sa position axiale à une position équatoriale plus stable. Elle se manifeste dans le spectre de RMN (CDCl_3) par une modification du signal de H₉ lorsque la concentration en acide augmente.

En solution dans CF_3COOH on observe une modification du signal du H₉ de IC correspondant à une variation des constantes $J_{9,1a}$, $J_{9,1b}$ et $J_{9,5}$. Un tel comportement n'a pas été observé pour C et EC. Si l'acide est deutérié (CF_3COOD) on note progressivement la disparition du signal de H₉, et des modifications des signaux de H_{1a}, H_{1b} par suite du découplage de ces protons avec H₉, substitué par du deutérium; le reste du spectre de IC reste pratiquement inchangé par rapport au spectre obtenu dans CF_3COOH . A ce stade IC peut être récupéré à partir de la solution acide et caractérisé par son spectre de RMN dans CDCl_3 . Si, par contre, on soumet la solution acide à un chauffage modéré, IC se transforme en un mélange contenant de l'acide benzoïque, C et EC, ces deux derniers dérivés apparaissant dans les mêmes proportions relatives (env. 50%) que celles observées lors de l'équilibration de C et EC en milieu TFA respecti-

vement. Si l'on emploie CF_3COOD , on observe que la substitution isotopique de H_9 précède l'isomérisation de C_9 ; après équilibration on obtient un mélange de **C** et **EC** deutériés en position 9. A la différence de l'équilibration observée pour **C** et **EC**, le chauffage de **IC** en milieu TFA conduit à la libération de quantités importantes d'acide benzoïque traduisant une décomposition de la molécule dans ces conditions.

Le mécanisme de l'isomérisation en 9 doit faire intervenir la forme énolique du carboxyle de la δ -lactone, intermédiaire entre les positions axiales et équatoriales de **IC** et de **C**. La protonation de la double liaison 8-9 conduit à l'isocollybolide si l'approche du proton se fait par la face inférieure de la molécule et aux collybolide et épicollybolide si l'approche se fait par la face supérieure (Fig 4). L'étude des modèles moléculaires montre que l'approche du proton est plus facile par la face inférieure de la molécule, ce qui explique l'apparition d'isocollybolide deutérié en 9 avant l'isomérisation en **C** et **EC**.

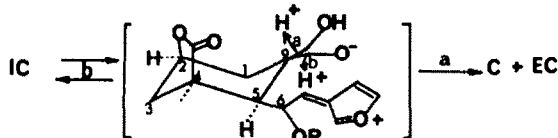


Fig 4.

Réactivité du collybolide en milieu basique: structure du collybolidol- α

Le traitement du collybolide par une solution de soude éthanolique conduit à un mélange de produits duquel on peut isoler un alcool, majoritaire, appelé collybolidol- α ;² ce produit conduit, après benzylation, au néocollybolide, isomère du collybolide.⁴ Les structures **4a** et **4b** ont pu être attribuées respectivement au néocollybolide et au collybolidol- α . Tant dans le spectre de RMN du néocollybolide que dans celui du collybolidol α , le proton H_6 apparaît à 4.84 et à 4.87 ppm, respectivement. Cette valeur est en faveur de la présence de la γ -lactone entre les carbones 4 et 6. Le néocollybolide doit donc avoir une structure plane différente de **C**, **IC** et **EC**.

La présence de l'ester benzoïque en position 2 est établie par comparaison des spectres de RMN du collybolidol- α et du néocollybolide: le proton H_2 est à 4.35 ppm dans le premier cas et à 5.48 ppm dans le second (après benzylation); les protons H_6 et H_7 restent inchangés. L'observation de constantes de couplage $J_{2,1c} = 3$ Hz, $J_{2,1a} = 2.3$ Hz, $J_{2,3c} = 2.6$ Hz et $J_{2,3a} = 3.6$ Hz est en accord avec une conformation chaise normale du cycle A. L'analyse complète du spectre de RMN du néocollybolide a été effectuée (Tableaux 1, 2 et 3). La configuration relative de tous les centres asymétriques a été établie grâce à la mesure des constantes de couplage et à des expériences d'effet Overhauser nucléaire.

Les spectres IR du néocollybolide et du collybolidol α indiquent la présence de deux fonctions lactones: γ -: 1785 cm^{-1} et δ -: 1750 cm^{-1} . D'autre part, la fusion A/B est trans: $J_{5,9} = 13$ Hz (collybolidol α) et 13.4 Hz (néocollybolide). De plus, les constantes $J_{2,1c}$, $J_{2,1a}$, $J_{2,3c}$ et $J_{2,3a}$ montrent que H_2 est équatorial et que les liaisons C_2-O et C_7-H sont cis.

L'absence d'effet Overhauser nucléaire entre H_6 et H_7 montre que le néocollybolide possède la même configuration pour le carbone 7 que le collybolide.

L'absence d'effet Overhauser nucléaire entre H_6 et H_7 traduit une conformation bateau du cycle δ -lactonique, tendant à rapprocher H_6 et H_7 (effet Overhauser de 19%). La valeur de $J_{6,7} = 6.6$ Hz semble en faveur de ce type de conformation pour laquelle l'angle dièdre $H_6-C_6-C_7-H_7$ aurait une valeur élevée de l'ordre de 150° (modèles moléculaires).

Le néocollybolide possède donc la structure **4a**.

Réactivité de l'isocollybolide en milieu alcalin

Le traitement en milieu alcalin de l'isocollybolide conduit au même collybolidol- α que le collybolide, mais en plus de la migration de la γ -lactone de C_2 en C_6 , il implique l'isomérisation en C_9 du carboxyle de la δ -lactone. Ce carboxyle passe d'une position axiale à une position équatoriale, plus stable, par rapport au cycle hydrocarboné de la molécule.

CONCLUSION

L'établissement d'une corrélation chimique entre collybolide et isocollybolide, ce dernier de structure connue par cristallographie aux rayons X, ainsi que l'étude comparative des spectres de RMN de ces deux composés, a permis d'établir de façon rigoureuse la structure du collybolide.

Bien que des courbes de dichroïsme circulaire caractéristiques (partie expérimentale) aient été obtenues pour le collybolide et l'isocollybolide, les résultats ne permettent pas d'attribuer une configuration absolue à ces deux dérivés sesquiterpéniques.

D'autre part, la réactivité chimique du collybolide et de l'isocollybolide, tant en milieu acide qu'en milieu alcalin, permet d'envisager l'obtention de nouveaux dérivés différant soit par leur configuration relative, soit par leur structure plane, par suite des possibilités d'épimérisation des carbones 7 et 9, et de réarrangement des deux fonctions lactone.

L'étude présente démontre la possibilité d'obtention d'un dérivé diastéréoisomère, l'épicollybolide, et d'un dérivé de réarrangement, le néocollybolide, à partir du collybolide et de l'isocollybolide.

PARTIE EXPERIMENTALE

Les points de fusion (Kofler) sont corrigés. Les spectres de masse ont été enregistrés sur appareil AEI, type MS9. Les spectres de RMN ont été réalisés sur l'appareil Varian HA 100, U.S.T.L., Montpellier; les mesures

d'effets Overhauser ont été réalisées sur les solutions chloroformiques 0.1 M (dégazées sous vide poussé) des produits. Les expériences d'isomérisation en milieu acide ont été réalisées sur des échantillons de 10 à 15 mg de produit en présence de 0.5 ml d'acide trifluoroacétique deutérié ou non. Le chauffage des échantillons est réalisé en dehors de l'appareil par un courant d'air chaud. Les spectres UV et les courbes de dichroïsme circulaire sont déterminés en solution éthanolique à 95°.

Les microanalyses ont été effectuées dans le Service de Microanalyse du C.N.R.S. et correspondent aux formules moléculaires indiquées (erreur: $\pm 0.3\%$).

Extraction du collybolide 1 et de l'isocollybolide 2

1.2 Kg de *Collybia maculata* lyophilisés sont extraits par de l'acétone dans un Soxhlet pendant 8 h. La solution obtenue, distillée sous pression réduite, laisse un résidu de 64 g qui est repris par de l'eau distillée bouillante (600 + 100 + 100 ml). La partie insoluble dans l'eau est séchée (benzène et distillation azéotropique) puis reprise par de l'éther froid. L'insoluble dans l'éther (9 g) est séché 2 h dans une étuve à 110° puis chromatographié sur 270 g de silice hydratée à 15%. Les résultats de cette chromatographie sont consignés dans le Tableau 4.

Une seconde chromatographie des fractions 9 à 14 permet d'obtenir le collybolide 1 et l'isocollybolide 2; les rendements respectifs sont de 4 g/Kg et 1 g/Kg par rapport au champignon sec. *Collybolide 1*, F 210°; $[\alpha]_D + 17^\circ$ (CHCl₃, c = 1.5; DC: $[\Delta]_{240} = -3.4$. UV: λ_{max} : 233 nm (ϵ : 16,800). IR: ν (cm⁻¹): 1790 (γ -lactone); 1745 (δ -lactone); 1730 (ester benzoïque). Analyse: C₂₂H₂₀O₇ (C, H, O). Masse: M⁺ 396; pics à m/e 274 M⁺ - 122, 228, 195, 188, 175-176, 105 (C₆H₅CO), 99. *Isocollybolide 2*, F 193°; $[\alpha]_D - 17^\circ$ (CHCl₃, c = 1.7; DC: $\Delta\epsilon_{228} = -2.6$. UV: λ_{max} nm (ϵ): 233 (12,470); 276 (920); 283 (800). IR: ν cm⁻¹: 1775 (γ -lactone); 1740 (δ -lactone); 1730 (ester benzoïque). Analyse: C₂₂H₂₀O₇ (C, H, O). Masse: M⁺ 396; pics à m/e 274 [M⁺ - 122], 228, 195, 188, 175-176, 105, 99.

Hydrogénation du collybolide 1: tétrahydrocollybolide 5 + hexahydrocollybolide 6

A une solution de 500 mg de collybolide dans 200 ml d'éthanol, on ajoute 20 mg de charbon palladié à 10%. Après agitation 16 h sous atmosphère d'hydrogène (PTN), on filtre le catalyseur et évapore le solvant; le résidu (500 mg) est repris par un mélange éthanol-éther: on obtient ainsi 40 mg de "tétrahydrocollybolide" 5, constitué

en fait par un mélange 3:1 des deux épimères en C₁₀ (RMN). Les eaux-mères (460 mg) sont chromatographiées sur 15 g de silice hydratée à 25%. L'élution par le benzène conduit à 50 mg de "tétrahydrocollybolide" 5 mélangé avec de l'hexahydrocollybolide 6. L'élution par de l'éther fournit 380 mg d'hexahydrocollybolide (mélange des épimères en C₁₀) qui ne cristallise pas.

Méthylation de l'hexahydrocollybolide

430 mg d'hexahydrocollybolide 6 (mélange des épimères en C₁₀) sont dissous dans le minimum d'éthanol; on ajoute un léger excès d'une solution étherée de diazométhane. Après 15 min, on distille sous pression réduite; le résidu (430 mg) est constitué d'un mélange à parties égales des épimères en C₁₀ des esters méthyliques (M⁺ 416). Analyse: (C, H, O) C₂₂H₂₂O₇. IR: 1730 cm⁻¹ (benzoate et esters méthyliques); 1785 (γ -lactone). DC: $\Delta\epsilon_{230} = -4.4$.

Action de l'acide trifluoroacétique sur le collybolide 1 \rightarrow épicollybolide 3

1.2 g de collybolide 1 sont dissous dans 5 ml d'acide trifluoroacétique; la solution est portée à reflux 2 h. Après distillation sous pression réduite, le résidu est repris par de l'éther. On obtient ainsi 800 mg d'un mélange constitué de collybolide 1 et d'épi-collybolide 3. La chromatographie sur silice hydratée à 12% permet de séparer 440 mg de collybolide 1 et 200 mg d'épicollybolide 3. *Epicollybolide 3*, F 235°; $[\alpha]_D + 2^\circ$ (CDCl₃; c = 1). DC: $\Delta\epsilon_{230} = -5.95$. UV: λ_{max} nm (ϵ): 231 (13,500); 275 (1000); 283 (900). Analyse: C₂₂H₂₀O₇ (C, H, O). Masse: M⁺ 396; pics à m/e: 291, 274, 195, 188, 175-176, 105, 99.

Action de l'acide trifluoroacétique sur l'isocollybolide 2 \rightarrow collybolide 1 + épicollybolide 3

1.4 g d'isocollybolide 2 sont mis en solution dans 5 ml d'acide trifluoroacétique; la solution est portée à reflux 1 h 30 min. Il ne reste plus d'isocollybolide. Après distillation sous pression réduite, le résidu est repris par de l'éther; on obtient 375 mg d'un produit surtout constitué par de l'acide benzoïque. La trituration du résidu par le chloroforme permet d'extraire 855 mg d'un mélange de collybolide 1 et d'épicollybolide 3 ainsi que d'autres produits plus polaires et non identifiés.

Saponification du collybolide 1 \rightarrow collybolidol- α 4b

Indice de saponification du collybolide: 402. 1.5 g de collybolide 1 sont dissous dans le minimum d'éthanol à

Tableau 4

Fractions	Eluant	Poids (mg)	Produits obtenus
1-6	Benzène	320	Ergosterol (200 mg)
7-8	Benzène-éther 9-1	500	Ergosterol (350 mg)
9-10	Benzène-éther 9-1	4800	Ergosterol + Collybolide
11-14	Benzène-éther 9-1	1600	Collybolide + isocollybolide
15-20	Benzène-éther 8-2	170	Mélanges
21-24	Benzène-éther 7-3	60	Mélanges
25-27	Benzène-éther 7-3	160	Mélanges
28-30	Benzène-éther 6-4	40	Mélanges
31-34	Benzène-éther 1-1	50	Mélanges
35-40	Benzène-éther 3-7	360	contenant
41-46	Benzène-éther 2-8	30	des
47-53	Ether	370	sphingosines.
54-61	Ether-méthanol 99-1	100	
62-65	Ether-méthanol 95-5	100	

95°; on ajoute 90 ml d'une solution aqueuse de soude 0.1 N. Après reflux 2 h sur bain-marie, on distille l'alcool sous pression réduite puis neutralise, après refroidissement, par une solution aqueuse de HCl N/10 (pH 7). L'extraction par de l'éther livre 10 mg. L'acidification à pH 6 suivie d'extraction par l'éther permet de séparer 20 mg d'acide benzoïque. L'acidification à pH 5, suivie d'extraction par l'éther donne 535 mg (acide benzoïque + produits polaires non identifiés). On opère ainsi de suite à pH 4, pH 2, pH 1 et isole, à chaque opération, 90, 280 et 210 mg de produits. La solution aqueuse est laissée sur bain-marie pendant 4 h et extraite à nouveau par de l'éther (200 mg) puis du chloroforme (60 mg). Ces deux dernières fractions, reprises par du méthanol, laissent cristalliser 70 mg de collybolidol- α 4b. F 244°; $[\alpha]_D - 52^\circ$ (CHCl₃; c = 1). IR: ν cm⁻¹: 3610 (OH); 1790 (γ -lactone); 1750 (δ -lactone). Analyse: C₁₅H₁₈O₆, (C, H, O). Masse: M⁺: 292; pics à *m/e*: 264, 196, 168, 140. Les produits extraits à pH 4, pH 2 et pH 1 sont rassemblés (560 mg) et chromatographiés sur 20 g de silice hydratée à 20%. Par élution au benzène, on obtient 24 mg qui, repris par le méthanol → 10 mg de collybolidol- α . Par élution à l'éther, on obtient 220 mg d'un mélange de collybolidol- α et d'un autre produit appelé collybolidol- β (isomère de 4b). Les dernières fractions livrent 320 mg qui cristallisent dans le méthanol donnent 35 mg collybolidol- β , F 252°; $[\alpha]_D - 29^\circ$ (CDCl₃; c = 0.4). IR: ν cm⁻¹: 3610 (OH); 1765 et 1725. Analyse: C₁₅H₁₈O₆, (C, H, O). (M⁺ 292).

Benzoylation du collybolidol- α 4b → néocollybolide 4a

30 mg de collybolidol- α 4b sont dissous dans quelques gouttes de pyridine anhydre. On ajoute quelques gouttes de chlorure de benzyle. Après 16 h à température ordinaire, on ajoute de l'eau et extrait par de l'éther 24 mg. Par cristallisation dans le méthanol, on obtient 4 mg de néocollybolide 4a. F 230°; $[\alpha]_D - 40^\circ$ (CHCl₃, c = 0.3). DC: $\Delta\epsilon_{242} = +1.8$. UV: ν_{\max} nm (ϵ): 230 (11,000); 275 (1000); 283 (850). IR: (cm⁻¹): 1780 (γ -lactone); 1750 (δ -lactone); 1730 (ester benzoïque). Analyse: C₂₂H₂₀O₇, (C, H, O). Masse: pics à *m/e*: 396 (M⁺): 291, 274, 195, 188, 175-176, 105, 99.

APPENDICE

ETUDE RMN DU CARBONE 13 DE QUELQUES LACTONES¹²

La présence dans les structures de substances naturelles d'une ou plusieurs fonctions lactoniques (lactones sesquiterpéniques en particulier) nous a conduits à examiner les spectres de RMN du carbone 13 d'une série de lactones dans le but d'établir une distinction entre les différentes catégories de lactones sur la base du

déplacement chimique des carbones de ces molécules, en particulier le carbone du groupement >C=O .

L'établissement de ce point devrait constituer un critère de structure pouvant dans certains cas se substituer aux critères déjà connus comme le critère IR par exemple, permettant de distinguer une γ -lactone d'une δ -lactone.¹⁴ Le déplacement chimique du carbone 13 du groupement C=O apparaît caractéristique de la taille du cycle, et la distinction est particulièrement nette entre les γ - les δ -lactones (Tableaux A1 et A2).

La résonance du C=O ne dépend que faiblement du degré de substitution des carbones voisins du cycle; la comparaison des spectres de la santonine 13, de la N-méthylparavallarine 14, du collybolide 1 (γ -lactones substituées par un méthyle en position α) et de la butyrolactone 8, γ -valérolactone 9 (γ -lactones non substituées en position α) montre que l'effet de substitution du carbone voisin du C=O par un méthyle se traduit par une variation nettement inférieure (entre 0 et 2 ppm en valeur absolue) à celle observée en série alcane par Grant et Paul (-9.4 ppm¹²). Par conséquent, le déplacement chimique du carbone du groupement C=O semble dépendre essentiellement de la taille du cycle lactonique et à un moindre degré de la substitution du cycle.

D'autre part l'emploi de différents solvants, C₆H₆, dioxanne, CHCl₃ et diméthylsulfoxyde (DMSO) montre que les variations du déplacement chimique du C=O



7



8



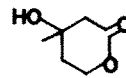
9



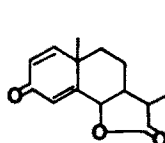
10



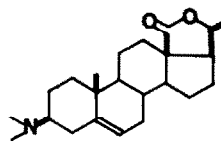
11



12



13



14

7 propylactone; 8 butyrolactone; 9 γ -valérolactone; 10 δ -valérolactone; 11 ϵ -caprolactone; 12 mévalonolactone; 13 santonine; 14 N-méthylparavallarine.

Tableau A1. Déplacements chimiques de C=O pour une série de lactones dans différents solvants. Référence : CS_2 . Les valeurs sont corrigées pour tenir compte des effets de susceptibilité magnétique, excepté pour les solutions dans le DMSO (voir partie expérimentale). x = mauvaise solubilité.

Lactone	7	8	9	10	11	12	13	14
C ₆ H ₆	23.6	15.1	15.9	21.9	17.1	x	x	14.5
Dioxanne	22.2	14.1	14.9	20.9	15.8	x	x	x
CHCl ₃	22.8	13.5	14.8	20.7	16.0	20.1	14.2	13.1
DMSO	23.2	15.6	15.6	21.6	17.1	21.9	x	x

sont plus faibles (amplitude de l'ordre de 2 ppm) que la séparation entre les deux zones caractéristiques de résonance des γ - et δ -lactones. Cette étude en fonction de la nature du solvant permet d'établir un nouveau critère de distinction entre γ - et δ -lactones sur la base du déplacement chimique du carbone 13 du groupement



+ 16 ppm à champ plus faible que les δ -lactones (+ 20 à + 22 ppm) (Tableau A2).

Tableau A2

Type de lactone	β	γ	δ	ϵ
$^{13}\text{C}=\text{O}^{(1)}$	+ 22	+ 13.5	+ 20	+ 16
	à	à	à	à
	+ 24	+ 16	+ 22	+ 17

⁽¹⁾Les déplacements chimiques sont donnés en ppm par rapport à $^{13}\text{CS}_2$; les valeurs sont croissantes dans le sens d'accroissement du champ magnétique. La dispersion des résultats rend compte du nombre d'exemples étudiés dans chaque groupe et des effets des solvants (C_6H_6 , dioxanne, CHCl_3 , DMSO).

PARTIE EXPERIMENTALE

Les lactones étudiées correspondent à des échantillons "purum", Fluka, Suisse, à l'exception de la lactone 14, provenant de notre laboratoire de Gif. Les solvants sont des produits Merck de qualité spectroscopique. La concentration des solutions est comprise entre 0.5 et 1.5 M selon la solubilité des différentes lactones.

Les spectres de RMN ont été réalisés à l'aide d'un spectromètre Varian HA-100 équipé d'une unité de carbone 13 (émetteur-récepteur V-4311 à 25.144 MHz; découpleur hétéronucléaire V-3512-1; unité à balayage large V-3530; accumulateur de données CAT, C-1024) au laboratoire Varian, Suisse et au laboratoire de RMN de l'U.S.T.L., Montpellier, France. La stabilité du spectromètre est assurée par le signal de $\text{I}_2^{13}\text{CH}_2$ (CEA, Saclay; enrichissement isotopique d'environ 60%); la référence est placée dans un tube cylindrique (diamètre extérieur 2.5 mm) à disposition coaxiale avec le tube de 8 mm (Wilmad Glass Co, USA) contenant la solution étudiée. Une moyenne de 120 accumulations a été utilisée pour les concentrations élevées (lactones 7, 8, 9, 10, 11); pour les solutions plus diluées (lactones 12, 13 et 14 et 1), le nombre d'accumulations est compris entre 600 et 2000. Les valeurs des déplacements chimiques, données par rapport à $^{13}\text{CS}_2$ ($\delta_{\text{I}_2^{13}\text{CH}_2} - \delta_{^{13}\text{CS}_2} = +247.5$ ppm; solution de CS_2 à environ 25%, vol dans CHCl_3) ont été corrigées pour tenir compte des effets de susceptibilité magnétique, en employant la formule $\Delta = \delta_{\text{cor}} - \delta_{\text{obs}} = 2\pi/3 (\chi_{\text{v,cor}} - \chi_{\text{v,obs}})$ valable pour un dispositif à deux tubes cy-

lindriques coaxiaux¹⁶; les valeurs des susceptibilités diamagnétiques¹⁷ permettent de calculer le terme de correction Δ , - 1.15 ppm (dioxanne; 20°), - 0.87 ppm (CHCl_3 ; 20°), - 1.11 ppm (C_6H_6 ; température non fournie) (pour le DMSO la valeur de $\chi_{\text{v,cor}}$ n'est pas donnée à la Réf 17, et de ce fait les valeurs des déplacements chimiques du Tableau A1 n'ont pas été corrigées). Les spectres obtenus à environ 45° n'ont pas été corrigés d'éventuels effets de température.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹A. Goris et M. Mascré, *C.R. Acad. Sci.* **153**, 1082 (911)
- ²M.-M. Janot, J. Le Men et H. Pourrat, travaux non publiés
- ³Détermination effectuée par le Professeur D. Arigoni, Zürich, Suisse
- ⁴A.-M. Bui, J. Parello, P. Potier et M.-M. Janot, *C. R. Acad. Sci., Série C* **270**, 1022 (1970)
- ⁵Collybolide et isocollybolide ne semblent pas préexister dans le Champignon frais mais plutôt se former lors des opérations d'extraction. Le précurseur de ces deux produits paraît être un produit à caractère d'acide carboxylique qu'il n'a pas été possible, jusqu'ici, de séparer. La présence d'une fonction carboxylique libre en C_6 du squelette du collybolide rendrait compte de la présence simultanée des deux épimères en C_6 , collybolide et isocollybolide
- ⁶C. Pascard-Billy, *Chem. Comm.* 1722 (1970); *C. Pascard-Billy, *Acta Cryst.* **B28**, 331 (1972)
- ⁷J. Parello, U. Scheidegger et P. Potier, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **13b**, 47 (1971)
- ⁸L. M. Jackman and S. Sternhell, *Applications of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Organic Chemistry*, Vol. 5, pp. 247-248 (1969)
- ⁹A. Rassat, C. W. Jefford et B. Waegell, *Tetrahedron Letters* 233 (1964)
- ¹⁰M. Karplus, *J. Chem. Phys.* **30**, 11 (1959)
- ¹¹J. W. Emsley, J. Feeney and L. H. Sutcliffe, *High Resolution NMR Spectroscopy*, Pergamon Press, Vol. 2, 680 (1966)
- ¹²M. Karplus, *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2870 (1963); D. L. Chapman, *Ibid.* **85**, 2014 (1963); G. V. Smith et H. Kriloff, *Ibid.* **85**, 2016 (1963); P. Laszlo et P. V. R. Schleyer, *Ibid.* **85**, 2017 (1963); N. Jonnanthan, S. Gordon et B. P. Dailey, *J. Chem. Phys.* **36**, 2443 (1963)
- ¹³Travail présenté aux Journées de Chimie Organique d'Orsay, Septembre 1971; J. Parello, U. Scheidegger et P. Potier, *Bull. Soc. Chim. Fr.* **13b**, 47 (1971)
- ¹⁴L. J. Bellamy, *The Infra-red Spectra of Complex Molecules*, Methuen, London, p. 179 (1962)
- ¹⁵D. M. Grant et E. G. Paul, *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 2984 (1964)
- ¹⁶J. A. Pople, N. G. Schneider et H. J. Bernstein, *High-Resolution NMR*, McGraw-Hill, New York, p. 81 (1959)
- ¹⁷*Handbook of Chemistry and Physics*, 45th Edition, The Chemical Rubber Co., Cleveland, Ohio, USA, pp. E 63-E 67, (1964-1965)