

N° 239. — Présence d'un hétéroside générateur de gentianine dans l'*Anthocleista procera*
Leprieur ex-Bureau (Loganiacées).
Monoterpénoïdes I,

par Michel PLAT, Michel KOCH, Armand BOUQUET, Jean LE MEN et Maurice-Marie JANOT.

(Laboratoire de Pharmacie Galénique de la Faculté de Pharmacie, 4, avenue de l'Observatoire, Paris, VI^e.)
(Manuscrit reçu le 15.5.63.)

L'épuisement par le chloroforme de la poudre de feuilles d'*Anthocleista procera* LEPRIEUR ex-BUREAU préalablement alcalinisées par l'ammoniaque fournit de la gentianine. Mais, celle-ci ne préexiste pas dans la plante, elle se forme au moment de l'extraction par l'action de l'ammoniaque sur un précurseur de nature hétérosidique.

Le genre *Anthocleista* appartient à la famille des Loganiacées et comporte une trentaine d'espèces, dont quatre sont particulièrement répandues en Côte d'Ivoire: *A. nobilis* G. Don, *A. Vogelii* Planch., *A. djalonensis* A. Chev. et *A. procera* Leprieur ex-Bureau.

Toutes les espèces sont désignées par les indigènes sous un même nom vernaculaire, mais très variable, selon l'extrême diversité des dialectes (environ une vingtaine). Les *Anthocleista* sont couramment prescrits par les guérisseurs locaux comme abortifs, diurétiques et purgatifs énergiques.

Des essais préliminaires effectués dans les mêmes conditions générales d'extraction des alcaloïdes montrent que seul l'*Anthocleista procera* contient une quantité notable d'alcaloïde et pour cette raison cette espèce a été, tout d'abord, étudiée.

Extraction et structure de « l'alcaloïde »
de l'*Anthocleista procera* Leprieur ex-Bureau.

Les feuilles, les tiges et les racines ont été respectivement épuisées avec de l'éther de pétrole, puis, après alcalinisation par l'ammoniaque, avec de l'éther, puis du chloroforme. Les deux derniers solvants permettent d'obtenir un résidu alcaloïdique, soit au total: tiges 0,08 %; racines 0,7 %; feuilles 1,1 %.

C'est donc sur les feuilles, beaucoup plus riches en alcaloïdes, qu'a été entreprise l'extraction.

Après alcalinisation par l'ammoniaque, la poudre fine d'*Anthocleista* est lixiviée par le chloroforme et les extraits chloroformiques, concentrés sous vide, sont épuisés par une solution aqueuse d'acide sulfurique à 2 %: les solutions acides alcalinisées à nouveau par l'ammoniaque sont extraites par de l'éther. L'extrait brut alcaloïdique, soumis à la chromatographie en couche mince, se révèle être formé d'un unique constituant (I) qui, purifié par trois cristallisations successives dans l'éther, se présente sous forme de fines aiguilles cotonneuses, sublimables à 110° (sous 0,01 mm Hg) (Rdt = 1 %). $F = 80-81^\circ$ (microscope Köfler); $(\alpha)_D^{20} = 0^\circ$ (CHCl_3 ou éthanol; $c = 1$). La masse moléculaire, établie par spectrométrie de masse, est de 175 et permet, compte tenu de l'analyse élémentaire, de fixer la formule brute: $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{O}_2\text{N}$. La recherche des groupements méthoxyle ou méthylimino se montre négative et ce fait est confirmé par le spectre de résonance protonique qui ne montre pas de pics correspondant à un groupe méthyl lié à un hétéroatome. Le spectre infrarouge de (I) ne présente aucune absorption vers $3\ 300\ \text{cm}^{-1}$, ce qui, joint au manque de réactivité vis-à-vis des réactifs acétylants, exclut la présence d'un NH ou d'un OH libre.

La bande carbonyle à $1\ 720\ \text{cm}^{-1}$ n'est pas imputable à une fonction aldéhyde ou cétone car le borohydrure de potassium demeure sans action sur l'alcaloïde, et

l'existence d'une fonction ester (carbométhoxyle) est éliminée par le spectre de RMN (voir plus loin) ce qui conduit finalement à considérer l'hypothèse de la présence d'une δ -lactone, étant donnée la position de la bande carbonyle.

A $1\ 623$ et $748\ \text{cm}^{-1}$ se trouvent deux bandes d'insaturation, disparaissant du spectre du produit d'hydrogénation catalytique (II), $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{O}_2\text{N}$, $F = 76^\circ$, dont la masse moléculaire 177 est déterminée par spectrométrie de masse.

Les spectres de masse de (I) et (II) présentent une série de pics à m/e 39, 51, 63, 65 qui se rencontrent fréquemment lors de la fragmentation des cycles à caractère aromatique, benzénique ou pyridinique (1, 2).

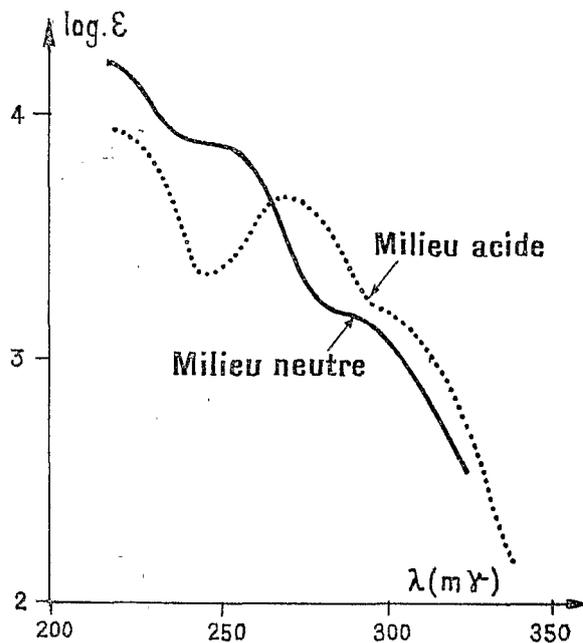


Fig. 1.

Le spectre UV (fig. 1) dans l'éthanol neutre présente trois maximums à: $\lambda\ \text{m}\mu$ ($\log\ \epsilon$): 220 (4,32); 250 (3,94); 285 (3,24). Il est fortement modifié en milieu acide chlorhydrique concentré: deux maximums à: $\lambda\ \text{m}\mu$ ($\log\ \epsilon$): 220 (3,96); 268 (3,68) séparés par un minimum très accusé à 245 (3,36) et un épaulement à 300 (3,18).

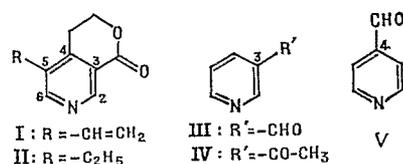
Les deux maximums de ce dernier spectre correspondent aux bandes K et B dues à l'absorption d'un cycle du type benzénicoïde et l'épaulement correspond à la bande R d'un groupement carbonyle juxtanacléaire.

D'autre part, ce spectre est très comparable à ceux

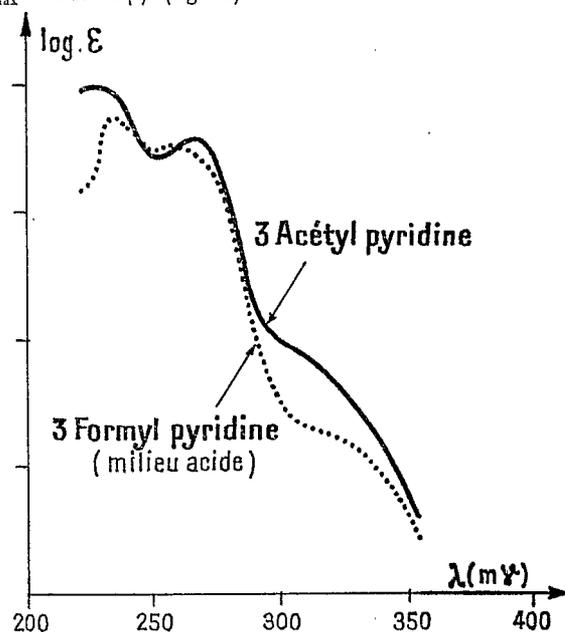
O. R. S. T. O. M. 24 AVR. 1974

Collection de Référence
n° 6799 Bot.

effectués en milieu acide de la formyl-3 et de l'acétyl-3 pyridine (III et IV) (3) tandis qu'il est tout à fait différent du spectre de la formyl-4 pyridine (V) dans lequel



la bande B est dédoublée (B₁; $\lambda_{\max} = 256 \text{ m}\mu$ et B₂; $\lambda_{\max} = 286 \text{ m}\mu$) (fig. 2).



deux protons dont les signaux sont deux doublets avec une constante de couplage J inférieure à 1 cps (4), situés dans des champs très faibles (8,75 et 9,03 δ). Ces caractéristiques assignent à ces protons les positions 2 et 6 en α de l'atome d'azote d'un noyau pyridinique et montrent que les autres positions sont substituées. Ce même spectre définit en outre la nature de la double liaison précédemment mise en évidence par hydrogénation:

— entre 5,45 et 5,91 δ apparaît la partie AB d'un système ABX, sous forme d'un octet: $J_{AB} = 1,5 \text{ cps}$, $\delta_{AB} = 15 \text{ cps}$; $J_{AX} = 17,5 \text{ cps trans}$; $J_{BX} = 11 \text{ cps cis}$.

La partie X du système est représentée par un quadruplet situé entre 6,60 et 7,08 δ . Ce système est tout à fait

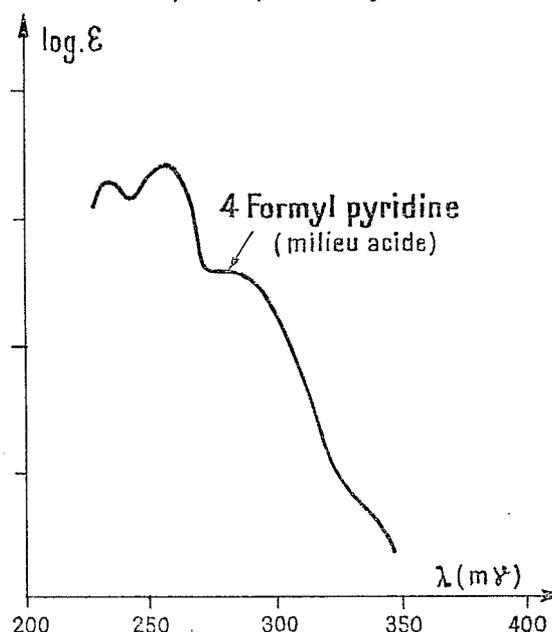


Fig. 2.

Selon toute évidence, le groupement carbonyle de l'anneau lactonique est donc fixé en 3 sur un cycle pyridinique.

caractéristique d'un groupement vinyle et l'absence d'autre couplage du proton X, ainsi que la position de l'ensemble dans des champs relativement faibles, laissent penser que

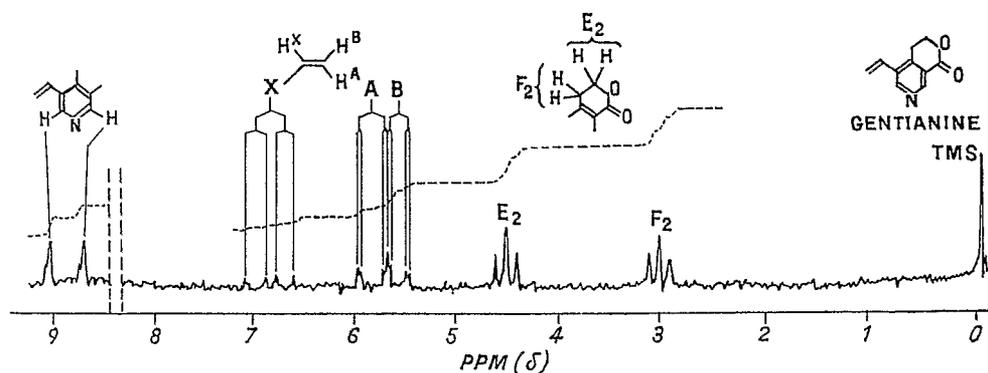


Fig. 3.

Le spectre de résonance protonique (fig. 3) (*) confirme la nature pyridinique du noyau et apporte une précision supplémentaire, car il montre que ce cycle ne porte que

(*) Les spectres ont été effectués en solution dans CDCl_3 et les déplacements sont exprimés en unités δ à partir du signal du tétraméthylsilane pris comme zéro de référence.

ce groupement est directement fixé sur le noyau pyridinique.

Si l'on remarque que l'un des protons en position α de l'azote sur le noyau est situé dans un champ anormalement faible (9,03 δ) dans le spectre de I, et qu'il reprend au contraire une position normale (8,47 δ) dans le spectre du produit dihydrogéné II, on en déduit, que ce proton

subit l'influence d'une conjugaison avec la chaîne vinylo, ce qui autorise à placer cette chaîne en 5.

Les deux triplets 1-2-1 centrés sur 3,05 et 4,50 δ représentent un cas très simple de système A_2X_2 , dans lequel $J_{AX} = J'_{AX} = 6$ cps ($J/\delta = 0,07$).

L'un des groupements méthylène de ce chaînon $CH_2 - CH_2$ est rattaché en 4 sur le noyau pyridinique (triplet à 3,05 δ), tandis que l'autre est directement relié à l'atome d'oxygène du groupement lactonique (triplet à 4,50 δ).

La conjugaison de l'ensemble de ces données spectrales conduit à la structure I pour l'alcaloïde extrait d'*Anthocleista procera*. Cette formule correspond à celle que PROSKURNINA et SCHIPANOV (5), puis GOVINDACHARI, NAGARAJAN et RAJAPPA (6, 7) ont attribué à la gentianine (*).

La gentianine est un artefact.

La gentianine a été extraite de différentes Gentianacées appartenant notamment aux genres *Gentiana* (8, 9), *Swertia* (10), *Enicostemma* (7).

L'examen des techniques expérimentales utilisées par les auteurs révèle que l'extraction a été effectuée dans tous les cas par un solvant non miscible après contact de la drogue avec une solution ammoniacale plus ou moins concentrée.

Des auteurs Japonais (11) ont montré que la gentianine pouvait se former « in vitro » par traitement avec l'ammoniaque d'un hétéroside monoterpénique issu lui aussi de *Swertia Japonica* (12): la swertiamarine (VI).

De la même manière, le gentiopicroside (VII) s'est révélé être « in vitro », un précurseur de la gentianine (13, 14).

Cependant, aucun auteur n'a véritablement répondu à la question de savoir si la gentianine est présente dans la plante elle-même ou si elle est un artefact se formant lors de l'extraction.

Dans cette intention, nous avons procédé sur une poudre de feuilles issues du même lot d'*Anthocleista procera* que celui qui avait été utilisé pour l'extraction de la gentianine, à une lixiviation par le chloroforme, en remplaçant, comme agent d'alcalinisation, l'ammoniaque par une solution aqueuse à 10 % de carbonate disodique. L'extrait chloroformique est épuisé par l'acide sulfurique à 2 % et cette solution acide aqueuse, réalcalinisée par le carbonate disodique, est extraite par de l'éther. Celui-ci est distillé et le très faible résidu obtenu (25 mg) n'est pas alcaloïdique (réaction de Dragendorff négative).

Cet essai tend à prouver que la gentianine n'est pas préformée dans les feuilles d'*Anthocleista procera*.

Les essais suivants confirment cette assertion: l'extraction directe, sans contact préalable avec un alcali, a été effectuée, en opérant sur des feuilles toujours issues du même lot. Il a été procédé à des lixiviations successives avec les solvants suivants: éther de pétrole, benzène, éther, chloroforme, éthanol. Dans chaque cas la réaction de Dragendorff a été pratiquée:

- sur l'extractum tel quel;
- après contact de l'extractum avec de l'ammoniaque;
- après contact de l'extractum avec de l'ammoniaque suivi d'hydrolyse chlorhydrique.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau suivant:

Solvant de lixiviation	a	b	c
Éther de pétrole	0	0	0
Benzène	0	0	0
Éther	0	0	0
Chloroforme	0	≠	≠
Éthanol	0	+	++++

(*) L'identité des deux substances a pu être établie grâce à la comparaison avec un échantillon authentique de gentianine; le point de fusion n'est pas déprimé par mélange des deux substances et les spectres IR sont superposables.

1) L'absence de réaction positive (colonne a) sur tous les extraits et le fait que la gentianine est soluble dans ces solvants montrent que la gentianine ne préexiste pas dans l'*Anthocleista*. Cet essai confirme le résultat négatif observé lors de l'extraction par le chloroforme de la plante alcalinisée par le carbonate de sodium.

2) Le fait que la réaction de Dragendorff devient positive avec l'extrait éthanolique après traitement par l'ammoniaque suivi d'hydrolyse acide, et qu'elle est négative avec les extraits éthéropétroléique, benzénique et étheré, traités de la même façon, (colonne c) montre que si l'*Anthocleista* ne renferme pas de gentianine préformée, elle renferme, par contre, un précurseur capable de l'engendrer en réagissant sur l'ammoniaque.

Ce précurseur, à l'état brut, est très soluble dans l'eau, mais il est également soluble à chaud dans l'acétate d'éthyle, ce qui permet de le séparer des holosides présents.

Ainsi purifié, ce précurseur n'est pas directement réducteur, mais le devient après hydrolyse acide.

Son spectre IR présente une forte absorption dans la région des OH vers 3 000 cm^{-1} . Par acétylation, il fournit un dérivé polyacétylé très peu soluble dans l'eau, mais soluble dans le chloroforme.

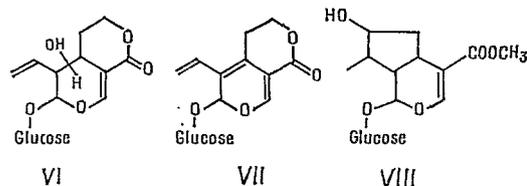
Des travaux sont en cours en vue d'isoler ce précurseur à l'état pur et d'élucider sa structure mais les caractères précités suffisent déjà à le ranger dans la classe des hétérosides.

3) La présence d'une réaction de Dragendorff légèrement positive avant l'hydrolyse chlorhydrique (colonne b) semblerait établir que l'ammoniaque entre déjà en combinaison avec l'hétéroside lui-même, mais qu'un traitement subséquent acide est nécessaire pour achever la transformation complète du précurseur en gentianine.

Il est intéressant de constater que des familles très proches du point de vue botanique contiennent des hétérosides et des alcaloïdes du groupe du diméthyl-isopropyl-cyclopentane.

Apocynacées	Rubiacées	Loganiacées	Bignoniacées
Plumériide	Asperuloside	Aucuboside	Catalposide
Plumiéricines	Génipine	Bakankoside	
Skytanthine		Loganoside	
Oléacées	Verbénacées	Gentianacées	Dipsacacées
Oleuropéine	Verbenalosite	Gentiopicroside	Gentianine
Élénolide		Swertiamarine	

L'obtention aisée de la gentianine à partir de l'hétéroside de l'*Anthocleista* tendrait à prouver que celui-ci s'apparente davantage à la swertiamarine (VI) ou au gentiopicroside (VII), plutôt qu'au loganoside (VIII) et l'on peut se demander si le genre *Anthocleista* ne constitue pas un élément de transition entre la famille des Gentianacées et celle des Loganiacées?



Les spectres de masse ont été effectués avec l'appareil « Atlas CH_4 » de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles du C.N.R.S. de Gif-sur-Yvette par M. W. VETTER et les spectres de résonance magnétique nucléaire sur un appareil « Varian A 60 » chez M. le Professeur WIEMANN que nous tenons à remercier ici.

Nous exprimons notre gratitude au Professeur CANONICA de l'Université de Milan à qui nous devons l'envoi d'un échantillon authentique de gentianine.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Extraction en milieu carbonate disodique.

Isolement de la gentianine

(extraction en milieu ammoniacal).

200 g de feuilles sèches d'*Anthocleista procera*, réduites en poudre fine sont humectées par la moitié de leur poids d'une solution aqueuse ammoniacale à 50 % puis lixivées par du chloroforme.

Le filtrat chloroformique (environ 3 l) est concentré par distillation jusqu'à un volume de 100 ml et il est épuisé par 50 ml, 25 ml et 3 fois 10 ml de solution aqueuse d'acide sulfurique à 2 %.

Les fractions acides réunies sont lavées avec 15 ml de chloroforme, puis, après alcalinisation par de l'ammoniaque, sont épuisées par 100, 50 et 3 fois 25 ml d'éther.

Après dessiccation sur sulfate de sodium anhydre, l'éther est distillé jusqu'à l'obtention d'un résidu sec pesant 2,030 g (soit un rendement voisin de 1 %).

Caractérisation par chromatographie en couche mince sur plaque (Selon la méthode de Stahl). — La silice utilisée est le Kieselgel G. Merck.

Le solvant est constitué par le mélange: acétate d'éthyle 47,5, benzène 47,5, méthanol 5. La révélation est effectuée par le réactif de Dragendorff. On observe une seule tache: $R_f = 0,68$.

Par cristallisations successives dans l'éther, on obtient de fines aiguilles blanches. $F = 80-81^\circ$ (microscope à platine chauffante Köfler) $(\alpha)_D^{20} = 0^\circ$ (CHCl_3 — éthanol $c = 1$).

Analyse $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{O}_2\text{N}$: Calc. %: C 68,56 H 5,18
Tr. : 69,20 5,3.

Le poids moléculaire déterminé par spectrométrie de masse est de 175 (Calc.: 175,18).

Spectre UV: Concentration 1.10⁻⁵.

dans l'éthanol neutre:

max. $\lambda_{\text{m}\mu} = 220$ ($\log \epsilon = 4,32$)
— $\lambda_{\text{m}\mu} = 250$ ($\log \epsilon = 3,91$)
— $\lambda_{\text{m}\mu} = 285$ ($\log \epsilon = 3,24$)

calculé pour un poids moléculaire de 175.

dans la potasse éthanolique normale:

max. $\lambda_{\text{m}\mu} = 236$ ($\log \epsilon = 4,02$)
Épaulement $\lambda_{\text{m}\mu} = 280$ ($\log \epsilon = 3,24$)

dans l'acide chlorhydrique concentré:

max. $\lambda_{\text{m}\mu} = 220$ ($\log \epsilon = 3,96$)
max. $\lambda_{\text{m}\mu} = 268$ ($\log \epsilon = 3,68$)
min. $\lambda_{\text{m}\mu} = 245$ ($\log \epsilon = 3,36$)
Épaulement $\lambda_{\text{m}\mu} = 300$ ($\log \epsilon = 3,18$).

Spectre IR: bandes à 1 720, 1 623 et 748 cm^{-1} .

Dihydrogentianine.

400 mg de gentianine sont dissous dans 10 ml d'éthanol et cette solution est ajoutée rapidement à une suspension dans 10 ml d'éthanol de 300 mg d'oxyde de platine Adams préalablement réduits par l'hydrogène.

Après 30 mn d'agitation en atmosphère d'hydrogène à température et pression ordinaires, la solution, qui a absorbé 50 ml d'hydrogène (calculé pour une double liaison hydrogénable: 51,2 ml), est filtrée sur Kieselguhr et distillée sous vide jusqu'à siccité.

Le résidu (396 mg) est purifié par deux cristallisations dans l'éther. La dihydro gentianine se présente sous la forme de petits cristaux incolores: $F = 76^\circ$ $(\alpha)_D^{20} = 0^\circ$ (CHCl_3 ou éthanol $C = 1$).

Spectre IR: bande à 1 720 cm^{-1} , pas de bande à 1 623 et 748 cm^{-1} .

Poids moléculaire déterminé par spectrométrie de masse = 177. (Calc.: 177,20).

200 g de poudre fine de feuilles séchées d'*Anthocleista procera* sont humectés par 100 ml d'une solution de carbonate disodique cristallisé à 10 %, puis lixivés par le chloroforme.

Le filtrat chloroformique (environ 3 l) est réduit par distillation à un volume de 100 ml. Cet extractum est épuisé successivement par 50, 25 et 3 fois 10 ml d'acide sulfurique à 2 % dans l'eau.

Les fractions acides réunies sont lavées avec 15 ml de chloroforme, puis, après alcalinisation par une solution saturée de carbonate disodique, sont épuisées par 100, 50 puis 3 fois 25 ml d'éther.

Après dessiccation sur sulfate de sodium anhydre, l'éther est distillé à sec. On obtient un résidu de 25 mg ne donnant pas la réaction de Dragendorff.

Extraction de la plante non alcalinisée.

100 g de poudre fine de feuilles séchées d'*Anthocleista procera* sont mis à macérer 12 h avec 500 ml d'éther de pétrole, puis lixivés. On pratique une nouvelle macération de 12 h suivie de lixiviation par 500 ml du même solvant.

Les marcs sont séchés, puis traités successivement de la même manière par 2 fois 500 ml de benzène, d'éther, de chloroforme et enfin d'éthanol. Les solutions provenant de la lixiviation par chaque solvant sont distillées jusqu'à l'obtention d'un volume de 50 ml et chaque extractum ainsi obtenu est traité de la manière suivante:

Sur une prise d'essai de 10 ml, on pratique la réaction de Dragendorff. Le reste de l'extractum est distillé à sec, sous vide. Le résidu est redissous dans 20 ml de méthanol. On ajoute 20 ml d'ammoniaque concentré et on abandonne quatre jours à la température du laboratoire.

Sur une prise d'essai, on pratique la réaction de Dragendorff, puis, la solution est distillée sous vide jusqu'à consistance visqueuse. On ajoute alors 10 ml de solution aqueuse à 50 % d'acide chlorhydrique concentré et on porte à l'ébullition à reflux pendant 30 mn. Sur une prise d'essai de la solution d'hydrolyse obtenue, on effectue la réaction de Dragendorff.

Seule la solution acide provenant de l'hydrolyse de l'extractum éthanolique de la plante donne une réaction de Dragendorff fortement positive. Le reste de cette solution acide est filtré, alcalinisé par l'ammoniaque puis épuisé par 100, puis 3 fois 50 ml d'éther.

L'éther est séché sur le sulfate de sodium anhydre puis distillé à sec: on obtient un résidu de 0,810 g qui conduit par deux cristallisations dans l'éther à la gentianine pure: $F = 80-81^\circ$: point de fusion non modifié par mélange avec un échantillon authentique de gentianine, spectres IR identiques.

BIBLIOGRAPHIE.

- (1) J. H. BEYNON, *Mass Spectrometry*, Elsevier's, 1960, p. 403.
- (2) K. BIEMANN, *Mass Spectrometry, Organic Chemical applications*, MacGraw-Hill, 1962, p. 125.
- (3) E. LAVIRON, *Bull. Soc. chim.*, 1961, p. 2341.
- (4) J. A. POPLER, W. G. SCHNEIDER et H. J. BERNSTEIN, *High Resolution Nuclear Magnetic Resonance*, MacGraw-Hill Éditeur, 1959, p. 266.
- (5) N. V. PROSKURNINA et V. V. SCHPANOV, *Zh. obschei. Chim.*, 1956, 16, 936.
- (6) T. R. GOVINDACHARI, K. NAGARAJAN et S. RAJAPPA, *Chem. Ind.*, 1956, p. 1017.
- (7) T. R. GOVINDACHARI, K. NAGARAJAN et S. RAJAPPA, *J. chem. Soc.*, 1957, p. 551.
- (8) N. V. KARIMGAYA, *Nekatorie Voprosy Farmatsii*, 1956, p. 197 (*Chem. Abstr.*, 1959, 20695 e).
- (9) FENG YUNG FU et NAM CHEM SEM, *Yao Huich Pao.*, 1958, 6, 198 (*Chem. Abstr.*, 1959, 8310 d).
- (10) S. SHIBATA, M. FUJITA et H. IGETA, *J. pharm. Soc. Japan*, 1957, 77, 116.
- (11) T. KUBOTA et Y. TOMITA, *Tetrahedron Letters*, 1961, 14, 453.
- (12) T. KUBOTA et Y. TOMITA, *Ibid.*, 1961, 5, 176.
- (13) T. KUBOTA et T. KAMIKAWA, *Bull. chem. Soc. Jap.*, 1962, 35, 1046.
- (14) L. GANONICA, F. PELIZZONI et G. JOMMI, *Gazz. chim. ital.*, 1962, 92, 298.