

ALCALOIDES DU XYLOPIA BUXIFOLIA (Baill.) ANNONACEES^(a)

A. RAHARISOLALAO, R. HOCQUEMILLER*, A. CAVE* et
J. RAZAFINDRAZAKA

Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles
Etablissement d'Enseignement Supérieur des Sciences — Ampasampito
B.P. 906 Antananarivo. Repoblika Demokratika Malagasy

RESUME

Le contenu alcaloïdique des écorces de tronc du *Xylopi buxifolia* (Baill.) a été déterminé et comparé à celui d'autres *Xylopi*, particulièrement africains et malagasy. Neuf alcaloïdes ont été isolés : deux tétrahydroprotoberbérines (xylopinine, discrétamine), une benzyloquinoléine (N nor Ométhylarmépavine) et six aporphines (lanuginosine qui est une oxoaporphine, xylopine, anonaïne, nornuciférine) dont deux sont nouvelles, la norstéphalagine : méthylène dioxy-1,2 méthoxy 3 nor aporphine et la buxifoline : méthylène dioxy-1,2 diméthoxy-3,9 nor aporphine. Leurs structures ont été établies par études de leurs données physiques et spectrales ainsi que celles de leurs dérivés.

ABSTRACT

Alkaloid content of trunk barks of Xylopi buxifolia was determined and compared with those of other Xylopi, particularly african and malagasy. Nine alkaloids were isolated : two tetrahydroprotoberberines (xylopinine, discretamine) one benzyloquinoline (N nor Omethylarmepavine) and six aporphines (lanuginosine wich is an oxoaporphine, xylopine, anonaïne, nornuciferine) two of which are new, the norstephallagine : 1,2-methylene dioxy 3-methoxy noraporphine and the buxifoline : 1,2-methylene dioxy 3,9-dimethoxy nor aporphine. Their structures were established by studies of their spectral and physical data as well as these of their derivated.

-
- (a) Ce travail fait partie de la thèse de Doctorat de 3ème cycle soutenu par A. RAHARI-SOLOLALAO, le 15 Septembre 1977 à l'Etablissement d'Enseignement Supérieur des Sciences, Antananarivo, Université de Madagascar et a fait l'objet d'une communication à l'Académie Malagasy, Antananarivo lors du colloque international sur les plantes médicinales malagasy le 7 Septembre 1977 à l'occasion du 75è anniversaire de l'Académie Malagasy.

* U.E.R. Chimie Thérapeutique, Centre d'Etudes Pharmaceutiques 92 290
Chatenay-Malabry, FRANCE

En vue de contribuer à la connaissance des plantes malgaches et dans le cadre d'une étude, travail s'intégrant dans l'étude chimiotaxonomique des Annonacées, il nous a paru intéressant d'entreprendre une étude des *Xylopias* malgaches jusqu'ici non étudiés au point de vue chimique que pour une seule espèce, le *Xylopias lemurica* et dont les activités pourraient être rapprochées des *Xylopias* africains utilisés pour le traitement de la fièvre et des affections pulmonaires (1) (2) (3).

Créé en 1759 par Linné, le genre *Xylopias* appartient à la famille des Annonacées, Mme Le Thomas (4) le range dans la sous famille des Annonoïdeae, dans la tribu des Unoneae et dans la sous tribu des *Xylopineae*.

Il compte environ 160 espèces réparties dans les zones tropicale et subtropicale de l'ancien monde comme du nouveau monde.

Les *Xylopias* malgaches comptent 30 espèces, la plupart endémiques, disséminées sur toute la forêt orientale humide du village d'Ambalavonihy jusqu'aux confins de Mandena Fort-Dauphin, sur la forêt d'Ambre au centre et dans la région argileuse d'Ambato Boéni.

La présente communication porte sur les alcaloïdes isolés des écorces de tronc du *Xylopias buxifolia* Baillon.

C'est un arbre de forêt humide poussant sur sol argileux, granitique, sablonneux à une altitude de 400 à 1300 m. Une description complète et précise de la plante est donnée par Humbert.

L'échantillon étudié a été récolté dans la forêt d'Analamazaotra (Province de Tamatave).

Après un test préliminaire, nous avons remarqué la présence d'alcaloïdes. Ceux-ci sont extraits et purifiés suivant le procédé classique, la drogue séchée et pulvérisée est dégraissée par l'éther de pétrole. On l'extrait ensuite en milieu alcalin par le chloroforme, l'extrait chloroformique est repris par une solution d'acide phosphorique à 2%, alcalinise la solution acide et réextrait par du chloroforme. La phase chloroformique est lavée à l'eau, séchée sur du sulfate de sodium et épurée à sec sous pressions.

Le rendement en alcaloïdes totaux est 0,13 %.

L'analyse chromatographique sur couche mince de silice alcaline révèle la présence d'au moins dix constituants alcaloïdiques.

L'isolement des alcaloïdes est alors réalisé par chromatographie sur colonne d'alumine et par chromatographies préparatives sur couches minces de silice. Neuf alcaloïdes ont été isolés.

En raison de l'origine botanique de ces alcaloïdes, il est logique de penser que l'on a affaire à des dérivés de l'isoquinoléine. En effet, il est connu que les Annonacées renferment des alcaloïdes appartenant au groupe des benzyloisoquinoléines, des bisbenzyloisoquinoléines, des aporphines et protoberbérines. Ces deux derniers groupes ayant, d'ailleurs été mis en évidence lors des études des *Xylopias* africains.

L'identification et la détermination des structures des alcaloïdes de notre *Xylophia* font appel aux méthodes physiques, en particulier, les spectrométrie UV, spectrométrie de RMN et spectrométrie de masse.

L'examen des spectres ultraviolets permet immédiatement de classer 2 des alcaloïdes dans le groupe des tétrahydroprotoberbérines (alcaloïdes A et B), 1 dans le groupe des benzylisoquinoléines (alcaloïde C) et 6 autres dans le groupe des aporphines (alcaloïde D à I) dont deux sont nouveaux H et I.

L'alcaloïde A – une tétrahydroprotoberbérine présente en RMN quatre groupements méthoxyles. Le spectre de masse est caractéristique des tétrahydroprotoberbérines tétra substituées en 2, 3, 10, 11. Il s'agit de la Xylopinine, ce qui a été confirmé par comparaison avec un échantillon authentique (5).

L'alcaloïde B – de masse 327 présente en RMN 2 groupements méthoxyles à 3,83 ppm et 3,91 ppm, quatre protons aromatiques et deux protons échangeables par deutérioration appartenant à des groupements phénoliques, ce qui est confirmé par le déplacement bathochrome du spectre UV en milieu alcalin.

Le spectre de masse indique son appartenance aux tétrahydroprotoberbérines tétra substituées en 2, 3, 9 et 10, ce qui est confirmé après méthylation par l'obtention de la tétrahydropalmatine ou tétraméthoxy-2, 3, 9, 10 tétrahydroprotoberbérine.

L'alcaloïde B a été identifié à la discrétamine (diméthoxy-2,9 dihydroxy-3, 10 tétrahydroprotoberbérine) par comparaison de toutes les données physiques et spectrales à celles de la littérature.

L'alcaloïde C - est une benzylisoquinoléine qui a été rapidement identifiée à la Nor Ométhylarmépavine après examen détaillé de son spectre de RMN. La comparaison avec un échantillon témoin a permis de confirmer l'hypothèse.

L'alcaloïde D est une oxoaporphine. Ceci a été mis en évidence par la réaction très caractéristique de ce type d'alcaloïde aporphinique : coloration rouge foncé en présence d'acide et insolubilité dans la plupart des solvants usuels. Le spectre de RMN effectué dans l'acide trifluoroacétique deutérié permet de mettre en évidence un groupement méthylène dioxy en 1,2 et un groupement méthoxyle. L'aspect du signal correspondant au proton en 11, sous forme de doublet ($J = 9\text{Hz}$) permet de conclure que la position 9 est substituée. L'alcaloïde D est donc la lanuginosine (méthylène dioxy-1, 2 méthoxy-9 oxo aporphine) ce qui est confirmé par comparaison avec un échantillon témoin.

L'alcaloïde E est une noraporphine. L'examen du spectre de RMN permet de postuler la substitution en 1, 2 par un groupement méthylène dioxy (OCH_2O) et en 9 par un groupement méthoxy (OCH_3) ce qui en ferait le précurseur direct de l'alcaloïde précédent, c'est la xylopine. Les données physiques $[\alpha]_D$, PF et le spectre de RMN dans l'acide trifluoroacétique deutérié sont en tout point semblables à celles décrites pour la Xylopine par Casagrande en 1970(3).

Les alcaloïdes F et G n'ont pas été isolés purs. Toutefois, l'examen du spectre de RMN du mélange permet de supposer qu'il s'agit d'un mélange d'anonaine et de Nornuciférine respectivement (méthylène dioxy-1, 2 noraporphine et diméthoxy-1, 2 noraporphine).

Cette hypothèse est confirmée par Ccm en présence des deux alcaloïdes témoins.

Les deux alcaloïdes H et I sont des alcaloïdes nouveaux appartenant au groupe des Aporphines que nous dénommons *buxifoline* et *Norstéphalagine*.

a) L'alcaloïde H, la *Buxifoline* (fig 1) de masse moléculaire 325 répond à la formule brute $C_{19}H_{19}O_4N$. L'examen du spectre de RMN ne présente pas de signal attribuable à un groupement N-méthyle. Nous avons affaire à une noraporphine.

Deux signaux de 3 protons à 3,80 ppm et 4,03 ppm sont attribuables à deux groupements méthoxyles.

Un système AB de deux protons centré sur 6 ppm est attribuable à un groupement méthylène dioxy en 1, 2.

Les trois protons benzéniques correspondants aux positions non substituées du noyau aporphine qui résonnent le premier sous forme d'un doublet à 8 ppm ($J = 9\text{Hz}$) donc attribuable au proton en 11 couplant avec le deuxième proton en 10, résonnant lui-même à 7,20 ppm. Le troisième proton résonne à 6,66 ppm sous forme d'un multiplet.

L'aspect de ces protons benzéniques est tout à fait caractéristique d'un noyau D monosubstitué en 9.

Le deuxième groupement méthoxy se trouve donc en 3 sur le noyau A, ceci étant corroboré par l'absence de singulet vers 6,50 ppm, caractéristique du proton en 3 des aporphines.

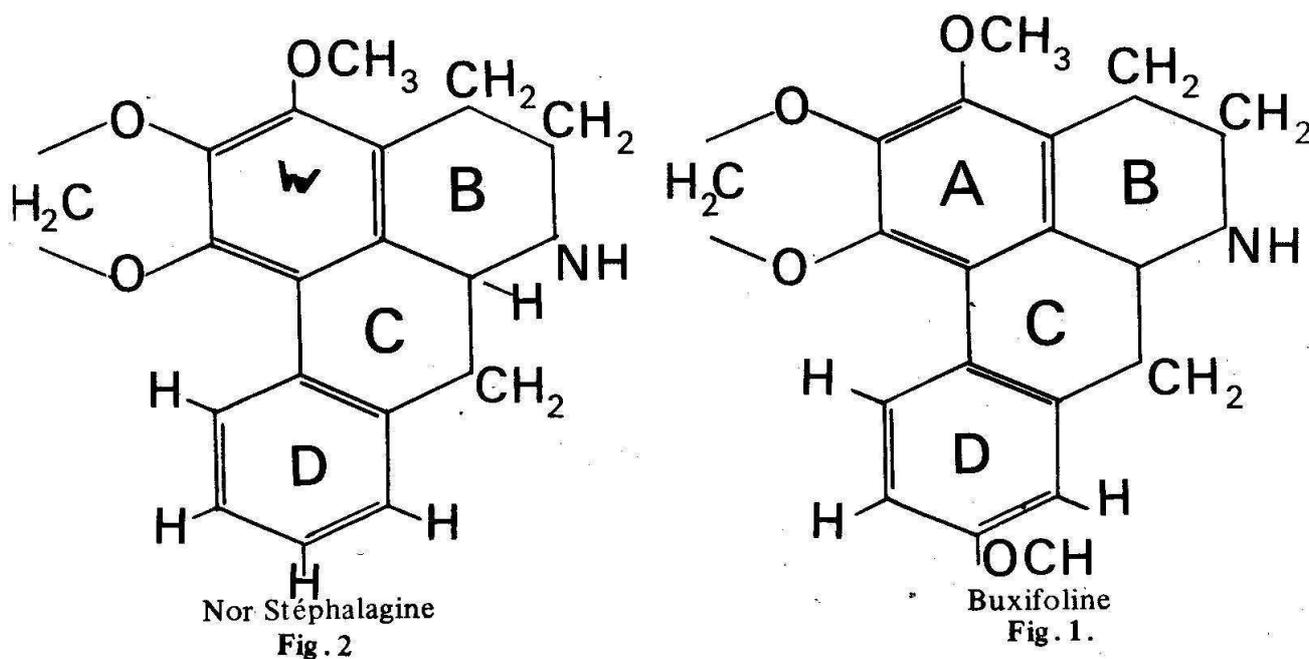
La *buxifoline* est donc la méthylène dioxy 1, 2 diméthoxy 3, 9 noraporphine

La faible quantité de *buxifoline* isolée ne nous a pas permis d'entreprendre des réactions en vue d'établir une corrélation avec d'autres produits connus.

b) L'alcaloïde I (ou *Norstéphalagine*) (fig 2) de masse moléculaire 295 répond à la formule brute $C_{18}H_{17}O_3N$. C'est également une noraporphine ce qui est confirmé par la préparation de ses dérivés N acétylé et N méthylé. Le spectre de RMN indique que le noyau D n'est pas substitué. En effet, le proton en 11 résonne sous forme d'un multiplet centré sur 8,03 ppm présentant des couplages orthométa et para. Les trois protons 8, 9, 10 quant à eux résonnent sous forme de multiplet mal résolu centré sur 7,20 ppm. L'absence d'autre proton benzénique permet de penser que là encore la position 3 est substituée comme dans la *buxifoline* par un groupement méthoxy qui résonne à 4,03 ppm. Les positions 1 et 2 sont substituées par un groupement méthylène dioxy (système AB centré sur 6 ppm).

L'alcaloïde I est donc la méthylène dioxy-1, 2 méthoxy 3 noraporphine c'est-à-dire la *norstéphalagine*.

Ceci a été confirmé par comparaison de son dérivé N méthylé avec la stéphalagine, alcaloïde précédemment isolé d'une Menispermacée : le stéphania dinklagei. Les spectres IR, UV et RMN de notre dérivé N-Méthylé sont en tous points superposables aux spectres de stéphalagine aimablement envoyés par le Docteur Knapp de l'Université de Pittsburgh.



En conclusion :

On peut noter que la composition en alcaloïdes du *Xylophia buxifolia* est tout à fait caractéristique des Annonacées et qu'elle se rapproche de celles d'autres *Xylophia* étudiés, par le fait qu'on y trouve des tétrahydroprotoberbéridines, telle la xylopinine, des aporphines telle la xylopine isolée d'autres *xylophia* africains, une oxoaporphine, la lanuginosine comme dans le *Xylophia lemurica* (6) une benzylisoquinoléine la Nor Ométhylarmépavine initialement isolée du *Xylophia pancheri* (7).

Toutefois, le *Xylophia buxifolia* se caractérise par le fait que toutes les aporphines sont des Nor aporphines et par la présence des dérivés aporphiniques substitués en 3 ce qui est jusqu'à présent relativement rare.

En raison de la composition alcaloïdique, on pourrait penser que ce *Xylophia* soit doué de propriétés légèrement neuroleptiques, propriétés qui ont été décrites pour la Xylopinine par Nakanishi (8) et Yamamoto (9) ; propriétés également relatées pour un autre *Xylophia* : le *Xylophia quintasii*. Il serait également intéressant pour ses propriétés antitumorales, propriétés décrites pour certaines oxoaporphines : la liriodénine dont la structure est proche de la lanuginosine.

PARTIE EXPERIMENTALE

Les spectres de RMN sont mesurés à l'aide de l'appareil Varian T 60, la plupart des cas dans le chloroforme deutérié. Le zéro de l'appareil est réalisé avec le tétraméthylsilane (T.M.S.). Les déplacements chimiques des protons sont exprimés en parties par millions (ppm).

Les spectres de masse sont enregistrés à l'aide de l'appareil MAT 112 Varian. Cet appareil donne le pic moléculaire et les ions correspondant aux fragmentations attendues (m/e).

Les spectres UV sont enregistrés à l'aide d'un spectrophotomètre UNI-CAN SP 800, dans l'éthanol absolu et dans l'éthanol absolu additionné d'une goutte de soude pour déceler la présence de groupements hydroxyles phénoliques (OH) qui provoquent des déplacements bathochromes, en milieu alcalin.

Les plaques pour chromatographie sur couches minces ou préparatives sont préparées avec du Kieselgel GF 254.

Les colonnes chromatographiques de silice sont montées avec du Kieselgel 60 (70-230 mesh ASTM) celles d'alumine, avec de l'Alumine Merck standardisé (activité II, III selon Brockmann).

La révélation est réalisée par pulvérisation de la plaque chromatographique avec le réactif Dragendorff.

EXTRACTION

5 kg de poudre d'écorces de tronc du *Xylopi buxifolia* sont dégraissées dans un soxhlet par l'éther de pétrole. La poudre dégraissée et séchée est alcalinisée par une solution ammoniacale au demi, puis extraite par du chloroforme. La phase chloroformique concentrée est épuisée par une solution d'acide phosphorique à 2%. La phase aqueuse acide est alcalinisée et extraite avec du chloroforme.

Les extraits chloroformiques sont lavés à l'eau, séchés sur du sulfate de sodium, évaporés à sec.

- le résidu pèse 6,3 g ;
- Le rendement en alcaloïdes totaux est de : 1,3 g/kg.

ISOLEMENT DES ALCALOÏDES

4,86 g d'alcaloïdes sont déposés sur 150 g d'alumine. L'élution est effectuée avec des solvants de polarités croissantes et par fractions de 150 ml. Les fractions sont rassemblées en fonction de la similitude de R_f

On obtient trois lots

(E ₁ = 0,470 g
) E ₂ = 1,535 g
(E ₃ = 1,100 g

Lot E₁

La chromatographie sur colonne de silice, effectuée avec le mélange de chloroforme-méthanol, proportions en méthanol allant de 1% à 25% produit les fractions :

$$a = 0,095 \text{ g}; \quad b = 0,840 \text{ g}; \quad c = 0,183 \text{ g}.$$

E₁-a. La chromatographie préparative sur couche mince de silice dans le mélange chloroforme méthanol 95/5 révèle la présence des deux taches majoritaires : ce sont la lanuginosine et la xylopinine.

E₁-b. La chromatographie sur colonne Merck avec le mélange chloroforme-méthanol 94/6 permet la séparation de la norstéphalagine, l'anonaïne la nor-nuciférine et la nor-Ométhyl-armépavine.

E₁-c. La chromatographie préparative sur couche mince de silice alcaline dans le mélange benzène/méthanol conduit à la buxifoline et la xylopinine.

Lot E₂

Cette fraction donne, par chromatographie sur colonne de silice, la Dis-crétamine.

Lot E₃

Cette fraction donne la Dis-crétamine par chromatographie sur colonne de silice avec des mélanges de solvants de polarité croissante.

RÉACTIONS*1. - N-méthylation de la norstéphalagine*

30 mg de norstéphalagine sont dissous dans 3 ml de méthanol et 0,1 ml de solution à 37% d'aldéhyde formique. Le mélange est agité et porté à reflux, au bain-marie pendant 30 minutes. Après refroidissement, 0,21 g de borohydrure de sodium (H₄BNa) sont ajoutés au mélange. Le tout est de nouveau porté à reflux pendant 30 minutes. L'excès de borohydrure de sodium est éliminé par addition de solution d'acide chlorhydrique et l'excès de méthanol (CH₃OH) est éliminé par évaporation sous pression réduite. L'alcaloïde résultant est extrait par du chloroforme selon la méthode d'extraction classique a des données spectrales RMN, UV, Masses identiques à celles de stéphalagine de Knapp :

RMN : singulet 3 protons à 2,53 ppm (N méthyl), singulet de trois protons à 3,98 ppm (méthoxy en 3) système AB centré à 6 ppm de 2 protons (méthylène dioxy en 1-2), multiplet de 3 protons à 7,20 ppm, multiplet d'un proton à 7,95 ppm (cycle D non substitué)

UV : max dans méthanol : 215, 244, 275 nm

M⁺ : 309 m/e : 308, 278, 266, 236.

2. - *N* Acétylation de la nor stéphalagine

20 mg de nor stéphalagine sont dissous dans 1 ml de pyridine. On y ajoute 1 ml d'anhydride acétique. Après agitation, le mélange est tenu à l'abri de la lumière pendant 12 heures. L'alcaloïde extrait avec du chloroforme, évaporé à sec donne :

spectre de RMN : un singulet de trois protons à 2,15 ppm (N acétyl NCOCH₃), un singulet de trois protons à 3,96 ppm (méthoxy en 3) un système AB centré à 6 ppm de deux protons (méthylène dioxy en 1-2), deux multiplets de trois protons et d'un proton respectivement à 7,16 ppm et 8 ppm : (cycle D non substitué)

spectre de Masse : M⁺ : 337, m/e : 321, 305, 279, 265.

REMERCIEMENTS

Nous remercions le Dr. J.E. Knapp, Department of Pharmacognosy, University of Pittsburgh School of Pharmacy Pennsylvania pour les différents spectres de RMN, masse, IR, UV qu'il nous a aimablement envoyés et qui nous ont permis d'effectuer les comparaisons.

Nous tenons à remercier le Conseil Suprême de la Révolution (CSR) de la République Démocratique Malagasy pour nous avoir octroyé une bourse afin de nous rendre à Chatenay-Malabry.

*

*

*

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Ekong D.E.U., ODUTOLA F.A. — La chimie de certaines drogues antitussives traditionnelles du Nigéria in Attisso M « rapport général et analyse des travaux du premier symposium inter-africain sur les pharmacopées traditionnelles et les plantes médicinales africaines ».
Dakar 25-29 Mars 1968. Faculté mixte de Médecine et Pharmacie p.47-49.
- [2] Bouquet A., Debray M.— Plantes médicinales de la Côte d'Ivoire in travaux et Documents de l'ORSTOM Paris 1974, 32 p. 18-20.
- [3] CASAGRANDE C., MEROTTI G.— Studies in aporphine alkaloids. Isolation and synthesis of alkaloids of *Xylopi* *brasiliensis* St Hil
Farm. Ed. Sci 1970, 25, p. 799-808
- [4] Le Thomas A.— Flore du Gabon : Annonacées
Museum d'Histoire Naturelle. Laboratoire de Phanérogamie Paris 1969, 16
- [5] CHEN C. Y. and MacLean D.B.— Mass spectra and proton magnetic resonance spectra of some tetrahydroprotoberberine alkaloids
Can J. chem 1968 46 2501
- [6] Nieto M., Lebœuf M., Cavé A.— Isolement de la lanuginosine d'une annonacée malgache : le *xylopi* *lemurica*
Pht : 1975, 14, 2508-2509
- [7] Nieto M., Lebœuf M., Sevenet T., Cavé A.— Alkaloids of Annonaceae : alkaloids of *Xylopi* *pancheri* (Nlle Calédonie) *Planta medica* 1976, 30, 48-58
- [8] NAKANISHI H.— Electroencephalographic studies of *Xylopinine* in rabbits
Jap J. Pharm, 1964, 14, 317-342
- [9] YAMAMOTO H.— The central effects of *xylopinine* in mice Jap J Pharm, 1963, 13, 230-239