

Mass spectroscopy

Mass spectroscopy was used for the identification of the isolated alkaloids. The spectra were recorded on a LKB 2091-2130 GC-MS system, using a direct inlet system with a temperature of about 100°C and an ionization energy of 20 eV or 22 eV.

Acknowledgements

We wish to thank: Prof. Dr. E. Leete, Department of Chemistry, University of Minnesota, Minneapolis, U.S.A., Dr. J. D. Phillipson, The School of Pharmacy, University of London, England, and Drs. J. Kuiper, Pharmaceutical Laboratory, State University of Utrecht, The Netherlands, for reference compounds, and Dr. G. Staritsky, Department of Tropical Crop Science of the Agricultural University, Wageningen, The Netherlands, for providing us with plant material. Gifts of reference alkaloids by ACF Chemiefarma N. V., Maarssen, The Netherlands, are also kindly acknowledged.

References

- (1) Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture, (1977), (Reinert, J., Bajaj, Y. P. S. eds.) p. 649, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- (2) Plant Tissue Culture and its Biotechnological Application, (1977), (Barz, W., Reinhard, E., Zenk, M. H. eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

- (3) Production of natural compounds by plant cell culture methods, (1978), (Alfermann, A. W., Reinhard, E. eds.) p. 27, GSF-BPT Report, München.
- (4) Staba, E. J., Chung, A. C. (1981) *Phytochemistry* 20, 2495.
- (5) Anderson, L. A., Keene, A. T., Phillipson, J. D. (1982) *Planta Med.* 46, 25.
- (6) Mulder-Krieger, Th., Verpoorte, R., de Graaf, Y. P., van der Kreek, M., Baerheim Svendsen, A. (1982) *Planta Med.* 46, 15.
- (7) Mulder-Krieger, Th., Verpoorte, R., de Water, A., van Gessel, M., van Oeveren, B. C. J. A., Baerheim Svendsen, A. (1982) *Planta Med.* 46, 19.
- (8) Staritsky, G., personal communication.
- (9) Hunter, C. S. (1979) *J. Hort. Sci.* 54, 111.
- (10) Mulder-Krieger, Th., Verpoorte, R., Baerheim Svendsen, A. (1982) *Planta Med.* 44, 237.
- (11) Verpoorte, R., Mulder-Krieger, Th., Troost, J. J., Baerheim Svendsen, A. (1980) *J. Chromatogr.* 184, 79.
- (12) Le Men, J. Kan, C., Potier, P., Janot, M.-M. (1965) *Ann. Pharm. Fr.* 23, 691.
- (13) Potier, P., Kan, C., Le Men, J., Janot, M.-M. (1966) *Bull. Soc. Chim. Fr.* 2309.
- (14) Zeches, M. (1979) Thèse, Université de Reims.
- (15) Zeches, M., Richard, B., Thepenier, P., Le Men-Olivier, L., Le Men, J. (1980) *Phytochemistry* 19, 2451.
- (16) Zeches, M., Sigaut, F., Le Men-Olivier, L., Lévy, J., Le Men, J. (1981) *Bull. Soc. Chim. Fr.* II-75.
- (17) Hunter, C. S., McCalley, D. V., Barraclough, A. J. (1982) Paper presented on the Vth International Congress of Plant Tissue and Cell Cultures, Tokyo, (Japan), 11-16 July.
- (18) Murashige, T., Skoog, F. (1962) *Physiol. Plant* 15, 473.

Etude des Hernandiacées VI (1): Lignanes et Alcaloïdes de *Hernandia guianensis*

Studies on hernandiaceae VI. Lignans and alkaloids of *Hernandia guianensis*

P. Richomme¹, M. Lavault¹, H. Jacquemin² et J. Bruneton¹

Abstract: The lignoidic and alkaloidal content of the leaves, stem barks and root barks of *H. guianensis* has been studied; two aryltetrahydro-naphthalenes, two dibenzylbutyrolactones and nine alkaloids are isolated. All components are identified by means of the spectral analysis. Eight alkaloids are aporphines and nor-aporphines.

Introduction

Le genre *Hernandia* qui comprend vingt-quatre espèces est peu représenté sur le continent américain (2): pour ce qui concerne l'Amérique du Sud une seule espèce a été signalée en Guyane, au Surinam, au Vénézuéla il s'agit de *H. guianensis* Aubl. (3) Arbre atteignant vingt mètres de hauteur il est parfois confondu avec *H. sonora* L., spécifique des Antilles qui s'en distingue par des feuilles nettement peltées. Assez rare en Guyane fran-

çaise il est connu sous les appellations de waliwowo (wayampi) et de kayuwaballi (arawak) mais il ne semble pas avoir d'utilisation particulière. Récemment (4) la présence de stérols et de lignanes a été signalée dans des écorces d'un échantillon récolté au Brésil. Nous rapportons ici la composition lignoïdique et alcaloïdique des différents organes de cette espèce.

Résultats et Discussion*Lignanes - 1 - écorces de tiges*

Les écorces sont épuisées par l'éther de pétrole; une partie des lignanes précipite par concentration de la solution étheropétroléique (R = 0,68 %). Le marc séché est ensuite percolé par de l'éthanol acétique, la solution éthanolique concentrée est additionnée d'eau: les lignanes précipitent (R = 5,7 %). Les différents constituants du mélange sont séparés par chromatographie sur colonne de gel de silice pour plaques et purifiés par cristallisation ou par chromatographie préparative sur couche mince, trois composés sont ainsi obtenus.

¹ Laboratoire de Pharmacognosie, UER de Médecine et de Pharmacie, 16, boulevard Daviers, 49000 Angers, France

² ORSTOM, Centre de Cayenne, Guyane

O. R. S. T. O. M. Fonds Documentaire

N° : 16429

Cote : B

= 9 JANV. 1985

1.80

Le composé **1** qui représente 60 % du précipité répond à la formule brute $C_{22}H_{22}O_7$ (déterminée par spectrométrie de masse à haute résolution). Le spectre de RMN 1H révèle l'existence de trois groupes méthoxyles, d'un méthylène dioxyle; quatre protons aromatiques apparaissent sous forme de singulets isolés. Les deux atomes d'oxygène supplémentaires sont engagés dans une fonction lactonique comme le montre le spectre IR (ν_{CO} à 1760 cm^{-1}) et le spectre de masse: pic à m/z 353 ($M-CO_2-H$) (5); les autres fragmentations observées sur ce dernier sont très caractéristiques: pics à m/z 168 (triméthoxyphényl), et à 173, 185 et 230 spécifiques des lactones aryltétrahydronaphtaléniques (6). Dans ces conditions **1** peut être la désoxypodophyllotoxine ou l'un de ses isomères. L'isomérisation aisée de **1** dans le méthanol en présence de carbonate de sodium (7) montre que **1** est bien la $1\alpha, 2\alpha, 3\beta$ désoxypodophyllotoxine F 167°C , $[\alpha]_D = -116^\circ$ ($CHCl_3$); (litt F $166-168^\circ$, $[\alpha]_D = -116^\circ$ (7));

Le composé **2**, F 210° $[\alpha]_D = -142^\circ$ ($CHCl_3$) présente des caractéristiques structurales voisines de celles du précédent à ceci près que le pic moléculaire est décalé de 58 u.m.a. à 456, 1398: $C_{24}H_{24}O_9$. La RMN (δ à 2,13 ppm) et la spectrométrie IR (ν_{CO} à 1725 cm^{-1}) montrent que le fragment supplémentaire est un groupe $O-CO-CH_3$ et que **2** est l'acétylpodophyllotoxine (4, 7).

Le composé **3** $C_{21}H_{22}O_6$ apparaît d'emblée différent. C'est aussi une lactone ($\nu_{CO} = 1765\text{ cm}^{-1}$) et sa structure comporte un groupe diméthoxy-3,4 benzyl, un groupe méthylènedioxybenzyl (m/z 151 et 135) et cinq protons aromatiques: il s'agit donc d'une dibenzyl-butylolactone. Dans cette série il est con-

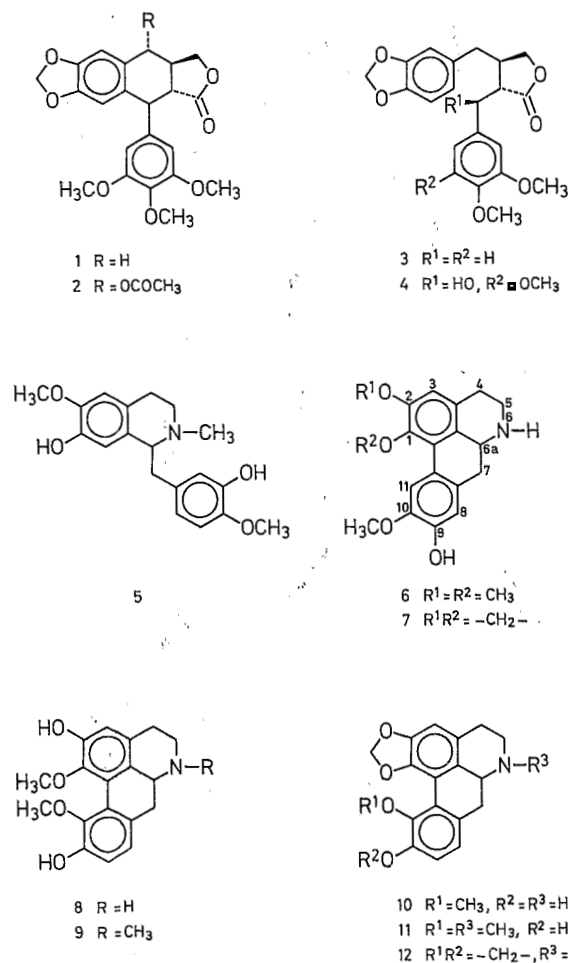
nu (8) que la fragmentation en spectrométrie de masse permet de déterminer la position relative des deux groupements benzyles sur la butylolactone: des pics à m/z 131, 161 et 208 indiquent que **3** doit être une (diméthoxybenzyl)-2 (méthylènedioxybenzyl)-3 butylolactone. Un tel composé a été initialement décrit chez une Burséracée (9) et sa configuration exacte: $2R, 3R$ a pu être par la suite établie par corrélation chimique (10); récemment il a été retrouvé dans les graines de *Hernandia ovigera* (11) et dénommé bursehernine. L'ensemble des constantes et données spectrales observées pour **3** est en bon accord avec celles publiées pour la bursehernine, l'analyse des couplages en RMN protonique à 250 MHz et le spectre de RMN du carbone 13 confirment l'identité de **3** avec la bursehernine.

-2- Ecorces de racines

Le résidu lignoïdique (6,2 %) est obtenu de la même façon et, après chromatographie, s'avère être composé de désoxypodophyllotoxine **1**, (2 % de la drogue) d'acétylpodophyllotoxine **2** et d'un dérivé plus polaire F 125° $[\alpha]_D = -50^\circ$ ($CHCl_3$), $C_{22}H_{24}O_8$. L'ensemble des données spectrales est en accord avec une structure de dibenzylbutylolactone, on note en particulier la présence d'un hydroxyle alcoolique (OH 3520 cm^{-1} et proton échangeable à 2,8 ppm). Ce fait tend à faire penser que **4** est le podorhizol, isolé précédemment à l'état de glucoside Ceci est confirmé par une comparaison avec les données de la littérature (12).

-3- Feuilles

La désoxypodophyllotoxine **1** est le seul composé isolé à partir de l'extrait éthanolique, après partage de celui-ci entre du méthanol aqueux et de l'hexane.



Alcaloïdes

Les alcaloïdes totaux sont obtenus par les procédés classiques: alcalinisation et extraction des eaux acides résiduelles pour les écorces des tiges et de racines; extraction en milieu alcalin en Soxhlet puis purification par passage aux sels et retour aux bases pour les feuilles. Les rendements obtenus sont de 0,9 % (écorces de tiges), 2 % (écorces de racines) et 0,21 % (feuilles). Les alcaloïdes totaux sont séparés par une suite de chromatographies sur colonnes d'alumine désactivée, et de silice puis par des chromatographies sur couches minces de silice. A l'exception de la réticuline **5** présente à l'état de traces dans les écorces de tiges et les feuilles tous les alcaloïdes isolés sont des aporphines ou des nor-aporphines:

Ecorces de tiges

La nandigérine **10** est largement majoritaire (plus de 60 % des A. T.), deux autres bases sont prépondérantes (5 à 10 % des A. T.): hernovine **8** et ovigérine **12**, les autres composés sont minoritaires: laurotétanine **6**; *N*-méthylhernovine **9** et *N*-méthylnandigérine **11**.

Les écorces de racines conduisent à l'isolement de la nandigérine **10** et de son dérivé méthylé **11**, de l'hernovine **8** et d'une trace d'un alcaloïde noraporphinique, phénolique, diméthoxylé et substitué par un groupe méthylène dioxyle: il semble identique à l'hernandine (13) mais la très faible quantité isolée et l'absence d'un échantillon authentique ne permettent pas d'affirmer son identité.

Les feuilles fournissent pour leur part trois alcaloïdes majoritaires: laurotétanine **6**, actinodaphnine **7** et nandigérine **10**, trois minoritaires (réticuline **5**, *N*-méthylnandigérine **11** et ovigérine **12**) et un composé non identifié, M^+ 325 en cours d'étude.

On notera qu'il existe d'importantes différences entre la composition lignoïdique des écorces de notre échantillon et celles du spécimen récolté dans la région de Bélem (4). Chez ce

dernier il n'y a pas de désoxypodophyllotoxine mais de l'acétyl-podophyllotoxine (2,5 %) et de la micropodophylline (0,1 %). Ces différences s'expliquent difficilement. La présence de désoxypodophyllotoxine n'est pas surprenante chez une Hernandiacee: outre le fait qu'elle avait été identifiée en 1953 comme agent co-responsable d'érythèmes apparus chez des ouvriers manipulant le bois de *H. sonora* L. (14) elle a par ailleurs été décrite à plusieurs reprises chez *H. ovigera* L.: dans les graines sous le nom d'hernandione (15), dans les bois de tronc (16) et les écorces de racines (17) d'un lot provenant de la péninsule de Hengchun et, de nouveau, dans des graines provenant d'Okinawa (18) chez lesquelles elle est accompagnée de son dérivé méthoxylé (19). Ce qui est plus inhabituel c'est la teneur importante que nous avons observé dans notre échantillon: celle-ci contraste singulièrement avec les faibles rendements souvent obtenus aussi bien chez les Burseracées (20), les Polygalacées (21), les Labiées (22) les Conifères (23) ou même les Berbéridacées chez lesquelles elle ne constitue que l'un des produits secondaires (24). Une telle teneur est d'autant plus intéressante que l'on connaît les propriétés cytostatiques marquées de ce composé (25).

Le podorhizol est beaucoup plus sporadique puisqu'il semble limité aux Hernandiacees et, sous forme de glucoside, à certains *Podophyllum* (12). Sa présence est logique car il peut être le précurseur immédiat de la désoxypodophyllotoxine. On notera que l'existence simultanée de bursehernine, de podorhizol et de désoxypodophyllotoxine rapproche curieusement *H. guianensis* de certains lots de *H. ovigera* ce que confirme par ailleurs la composition alcaloïdique: la seule différence significative étant la présence, chez *H. ovigera* de thalicarpine (26, 27), alcaloïde dimère que nous n'avons pas retrouvé dans notre échantillon.

Partie Experimentale

Les échantillons étudiés ont été récoltés le 1. 8. 1981 à Trois-Sauts (Guyane) par l'un d'entre nous et un échantillon est conservé dans l'herbier du Centre Orstom de Cayenne (Réf. HJ2620).

Extraction

1) écorces de tiges. Les écorces (5,4 kg) sont réduites en poudre puis épuisées par l'éther de pétrole en appareil de type Soxhlet. Par concentration de l'extractum éthéro-pétroléique un précipité se forme: A = 37 g; par évaporation du surnageant on obtient 440 g d'un résidu pâteux B. Le marc séché est ensuite percolé par un mélange EtOH, H₂O, AcOH (90-8-2) jusqu'à réaction de Mayer négative. Le percolat est concentré sous vide puis dilué par cinq fois son volume d'eau; un précipité se forme: C = 307 g. L'analyse en CCM (C₆H₆-AcOEt 90-10) montre que A et C sont identiques et constitués majoritairement du composé I; la fraction B renferme essentiellement des produits peu polaires et n'a pas été étudiée. Le filtrat acide résiduel contient les alcaloïdes qui sont récupérés par le procédé habituel (NH₄OH, CHCl₃) et obtenus avec un rendement de 0,9 %.

2) écorces de racines: on procède directement à la percolation (EtOH, H₂O, AcOH), 90 g d'écorces fournissant 5,6 g de lignanes et 1,8 g d'A. T.

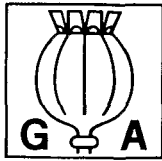
3) feuilles 1,27 kg de feuilles pulvérisées sont percolées par l'éthanol. La solution alcoolique concentrée est partagée entre l'hexane et une solution méthanol-eau (90-10). La solution alcoolique est concentrée et diluée à l'eau: les lignanes précipitent (p = 17,8 g), une nouvelle quantité de lignanes est obtenue par réextraction de la phase aqueuse par CHCl₃ (7,5 g). Le marc séché, est alcalinisé (NH₄OH) et les alcaloïdes sont extraits (CHCl₃) et purifiés par les procédés habituels (AT: 2,66f).

Séparation et identification des constituants

Les lignanes sont séparés par chromatographie sur 30 fois leur poids de silice Merck HF 254 ou CCM avec comme solvant des mélanges successifs C₆H₆-AcOEt de 92-8 à 80-20. Les alcaloïdes sont séparés par une suite de chromatographies sur alumine Merck 90 II.III, désactivée par addition des 5 % d'eau, puis par chromatographies sur colonnes de gel de silice HF 254 pour CCM; les purifications sont obtenues par cristallisation ou, si cela est nécessaire, par chromatographie préparative sur couche mince. Tous les produits isolés ayant été décrits par ailleurs leurs constantes et caractéristiques spectrales ne sont pas publiées ici.

Literature

- (1) Partie V: Bruneton, J., Shamma, M., Minard, R. D., Freyer, A. J., Guinaudeau, H. (1983), *J. Org. Chem.*, 48, 3957.
- (2) Kubitzki, K. (1969) *Bot. Jahrb.*, 89, 78.
- (3) Aublet, (1775) *Hist. Pl. Guyane française* 2, 848.
- (4) Gottlieb, O. R., Guimaraes, I. S. de S., Magalhães, M. T., Mesquita, A. A. L., de Oliveira, W. G. (1980) *Acta Amazonica*, 10, 425.
- (5) Duffield, A. M., (1967) *J. Heterocyclic Chem.* 4, 16.
- (6) Pelter, A., (1968) *J. Chem. Soc.*, 74.
- (7) Hartwell, J. L., Schrecker A. W., Johnson, J. M. (1953) *J. Amer. Chem. Soc.*, 75, 2138.
- (8) Harmatha, J., Budezinsky, M., Trka, A. (1982) *Coll Czech. Chem. Comm.*, 47, 644.
- (9) MacDoniel, P. B., Cole, J. R. (1972) *J. Pharm. Sci.*, 61, 1992.
- (10) Nishibe, S., Chiba, M., Hisada, S. (1977) *Yakugaku Zasshi*, 97, 1366.
- (11) Yamaguchi, H., Arimoto, M., Yamamoto, K., Numata, A. (1979) *Yakugaku Zasshi*, 99, 674.
- (12) Kuhn, M., von Wartburg, A. (1967) *Helv. Chim. Acta.*, 50, 1546.
- (13) Soh, K. S., Lahey, F. N., Greenhalgh, R. (1966) *Tetrahedron Lett.*, 5279.
- (14) King, F. E., (1953) *Chem. Ind.* 1325.
- (15) Hata, C., (1942) *J. Chem. Soc. Japan*, 63, 1540.
- (16) Yang, T. H., Lu, S. T., Liu, S. C. (1973) *J. Taiwan Pharm. Assoc.*, 25, 8.
- (17) Yang, T. H., Lu, S. T., Lin T. S., Yang, L. M. (1976) *J. Chinese Chem. Soc.*, 23, 29.
- (18) Yamaguchi, H., Arimoto, M., Yamamoto, K., Numata, A. (1979) *Yakugaku Zasshi*, 99, 674.
- (19) Yamaguchi, H., Arimoto, M., Tanoguchi, M., Ishida, T., Inoue, M. (1982) *Chem. Pharm. Bull.*, 30, 3212.
- (20) Jolad, S. D., Wiedhoph, R. M., Cole, J. R. (1977) *J. Pharm. Sci.*, 66, 892.
- (21) Hokanson, G. C. (1979) *J. Nat. Prod.*, 42, 377.
- (22) Kingston, D. G. I., Rao, M. M., Zucker, W. V. (1979) *J. Nat. Prod.*, 42, 496.
- (23) Rao, C. B. S. (1978) *Chemistry of lignans*, Andhra University Press, Waltair.
- (24) Dewick, P. M., Jackson, D. E. (1981) *Phytochemistry*, 20, 2277, et références citées.
- (25) Iardine, I. (1980) podophyllotoxins, in Cassady, J.-M., Douros, J. D. *Anticancer agents based on natural products model*, Academic Press, New York.
- (26) Cava, M. P., Bessho, K., Douglas, B., Markey, S., Raffauf, R. F., Weisbach, J. A. (1966) *Tetrahedron Lett.*, 1577.
- (27) Furukawa, H., Lu, S. T. (1966) *Yakugaku Zasshi*, 86, 1143.



Planta Medica

Journal of Medicinal Plant Research

Sonderdruck

© Georg Thieme Verlag Stuttgart · New York

Nachdruck nur mit Genehmigung des Verlags