Phytochemistry, 1972, Vol. 11, pp. 769 to 777. Pergamon Press. Printed in England.

ALCALOÏDES DES FEUILLES DE L'*HOLARRHENA CRASSIFOLIA**

JACQUES EINHORN, CLAUDE MONNERET et QUI KHUONG-HUU

Institut de Chimie des Substances Naturelles du C.N.R.S., 91 Gif sur Yvette, France

(*Reçu le* 1 *juillet* 1971)

Résumé—Les feuilles de l'*Holarrhena crassifolia* Pierre, Apocynacée du Laos et du Cambodge, sont particulièrement riches en alcaloïdes du type de la conkurchine. Cette caractéristique est un argument en faveur du maintien de l'espèce *H. crassifolia* qui avait été confondue avec *H. curtisii* King et Gamble, Apocynacée de Malaisie. renfermant des alcaloïdes d'un type différent. Un nouvel alcaloïde, la *N*-formylconkurchine est décrit et une étude chimique de la réactivité du système iminique permettant de caractériser les alcaloïdes du groupe de la conkurchine est abordée.

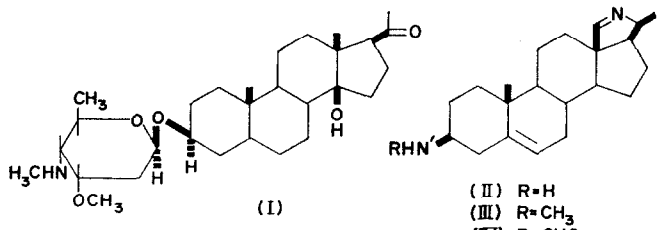
Abstract—The leaves of *Holarrhena crassifolia* Pierre (Apocynaceae) from Laos and Cambodia have been found to be particularly rich in alkaloids of the conkurchine type. This discovery is an argument for maintaining the species *H. crassifolia*, which has been confused with *H. curtisii* King and Gamble, an apocynaceous species from Malaysia which contains alkaloids of a different type. The structure of a new alkaloid, *N*-formyl-conkurchine is described and the reactivity of its functional groups outlined.

UNE ÉTUDE systématique entreprise dans notre laboratoire depuis plusieurs années doi- permettre une révision chimiotaxonomique du genre *Holarrhena* (famille des Apocynat cées,[1,2] sous famille des Plumiéroïdées) et des genres voisins. L'*Holarrhena crassifolia* Pierre[3] (récolté au Laos et au Cambodge) confondu depuis les travaux de Lecomte[4,5] avec l'*H. curtisii* King et Gamble (récolté en Malaisie), constitue en fait une espèce distincte de cette dernière. Alors que parmi les alcaloïdes des feuilles de l'*H. curtisii* on trouve principalement un amino-glyco-stéroide, l'holacurtine I[6] l'*H. crassifolia* s'avère particulièrement riche en alcaloïdes du type de la conkurchine II.[7]

A côté de ces alcaloïdes, la conkurchine II, la conessidine III[7] et un alcaloïde nouveau, la *N*-formylconkurchine IV, trois autres bases dérivant du squelette du prégnane ont été

* Partie CXXXII dans la seriée "Alcaloïdes Stéroidiques". Pour partie CXXXI G. P. WANNIGAMA et A. CAVÉ, *Ann. Pharm. Fr.* (sous presse).

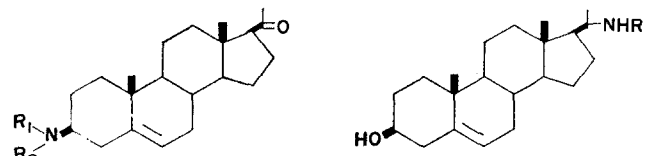
[1] R. GOUTAREL, *Les Alcaloïdes Stéroïdiques des Apocynacées*, Hermann, Paris (1964).
[2] R. GOUTAREL, *Bull. Soc. Chim. Fr.* 1665 (1964).
[3] L. PIERRE, *Flore Forestière de la Cochinchine*, Doin, Paris (1879–1907).
[4] M. H. LECOMTE, *Flore générale de l'Indochine*, Masson, Paris (1907).
[5] P. DOUK, Contribution à l'étude des plantes médicinales du Cambodge, thèse Doct. d'Univ. Pharm., Paris (1966).
[6] M.-M. JANOT, J.-P. DEVISSAGUET, Q. KHUONG-HUU, J. PARELLO, N. G. BISSET et R. GOUTAREL, *Compt. Rend.* **266 C**, 388 (1968).
[7] (a) M.-M. JANOT, F.-X. JARREAU, M. TRUONG-HO, Q. KHUONG-HUU et R. GOUTAREL, *Compt. rend.* **258**, 2089 (1964); (b) M.-M. JANOT, F.-X. JARREAU, M. TRUONG-HO, Q. KHUONG-HUU et R. GOUTAREL, *Bull. Soc. Chim. Fr.* 1555 (1964); (c) F.-X. JARREAU, Thèse de Doctorat ès-Sciences, Paris (1965



(I)

(II) R=H
(III) R=CH_3
(IV) R=CHO

isolées: l'holaphyllamine V,[8] l'holaphylline VI,[8] et l'holafébrine VII.[9] L'extraction de ces alcaloïdes a été conduite selon la technique habituelle (alcalinisation, extraction par du chlorure de méthylène, séparation des bases sous forme de sulfamates hydrosolubles . . . voir Tableau 2). Elle fournit 0,25% d'alcaloïdes totaux. La fraction des alcaloïdes totaux soluble dans le benzène permet d'isoler par des techniques conjuguées de chromatographie et d'acétylation les dérivés du type de la conkurchine. La partie insoluble dans le benzène est acétylée directement puis saponifiée partiellement. On isole ainsi les trois autres alcaloïdes sous forme de dérivés *N*-acétylés VIII–X.



(V) $R_1=R_2=H$
(VI) $R_1=CH_3$ $R_2=H$
(VIII) $R_1=H$ $R_2=Ac$
(IX) $R_1=CH_3$ $R_2=Ac$

(VII) R=H
(X) R=Ac

Conkurchine (II) *et Conessidine* (III)

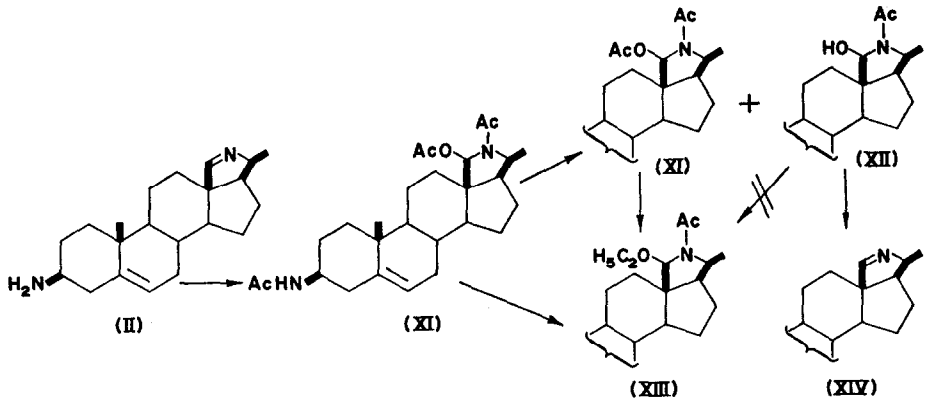
La conkurchine II et la conessidine III sont deux alcaloïdes isolés pour la première fois en 1933 par Bertho, Von Schuckmann et Schonberger de l'écorce du Kurchi,[10] *H. antidysenterica* (Roxb.) Wall. La conkurchine avait été obtenue avec un rendement de 16% et constituait après la conessine XV le second alcaloïde de la plante. Retrouvée par Goutarel *et al.*[11] dans les feuilles de *Funtumia elastica* (Preuss) Stapf, sous-famille des Echitoïdées, elle est décrite sous le nom d'irehline. La structure de celle-ci est démontrée sans ambiguïté comme étant celle d'un amino-3β *N*-déméthyl conadiène-5,18(N).

L'identité de l'irheline et de la conkurchine étant également démontrée,[7] c'est ce dernier nom qui a été conservé. Du fait de cette identité la structure de la conkurchine a été définitivement établie, de même que celle de la conessidine qui est une N_3-méthylconkurchine.[7] La conkurchine a été également retrouvée dans les écorces de l'*H. floribunda* (G. Don) Dur. et Schinz.[12]

La séparation directe de la conkurchine et de la conessidine est difficile à cause de leurs polarités voisines. Ceci rend nécessaire une transformation préalable en dérivés acétylés. De nouvelles difficultés sont dues à la multiplicité des dérivés obtenus. Ainsi, l'acétylation

[8] (a) M.-M. JANOT, A. CAVÉ et R. GOUTAREL, *Bull. Soc. Chim. Fr.* 896 (1959); (b) A. CAVÉ, Thèse de Doctorat ès-Sciences, Paris (1962).
[9] M.-M. JANOT, X. MONSEUR, C. CONREUR et R. GOUTAREL, *Bull. Soc. Chim. Fr.* 285 (1962).
[10] A. BERTHO, G. VON SCHUCKMANN et W. SCHONBERGER, *Chem. Ber.* **66**, 786 (1933).
[11] M.-M. JANOT, M. TRUONG-HO, Q. KHUONG-HUU et R. GOUTAREL, *Bull. Soc. Chim. Fr.* 1977 (1963).
[12] M.-M. JANOT, P. DEVISSAGUET, Q. KHUONG-HUU et R. GOUTAREL, *Ann. Pharm. Fr.* **25**, 733 (1967).

de la conkurchine par l'anhydride acétique dans la pyridine conduit au dérivé XI. Cette structure n'est pas mentionnée dans les travaux antérieurs se rapportant à la conkurchine II. Ceci s'explique par les techniques alors employées[7,11] pour isoler le produit résultant de l'acétylation. Celles-ci aboutissent soit au dérivé hydroxylé en 18, (XII), soit au dérivé éthoxylé correspondant XIII, mais ne permettent pas de faire apparaître le véritable produit de l'acétylation de la Δ_1-pyrroline 18 (N), XI. Ce dernier ne doit pas être confondu avec le 'triacétate' de conkurchine de Bertho[13] qui devait s'avérer identique à XIII. Par contre l'existence d'une structure de type XI a déjà été abordée par Tschesche et Ockenfels[14] sur un dérivé du type de la conkurchine, l'holonamine. On connait de plus des dérivés acétylés stables pour certaines imines.[15]



Le dérivé acétylé XI est très instable. Il est accompagné après extraction du milieu réactionnel par le carbinolamide XII. Une cristallisation de XI + XII dans l'acétone transforme la totalité de XI en XII. Repris par de l'éthanol, le mélange XI + XII conduit à un autre mélange XII + XIII (XI donnant XIII et XII restant stable dans ces conditions).

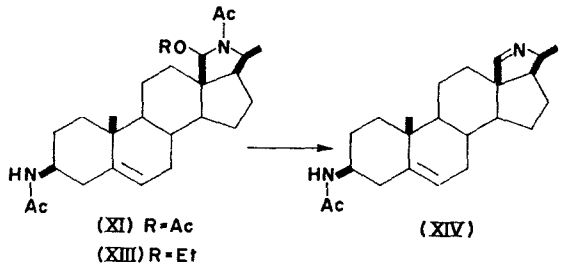
Lorsque l'acétylation de II est suivie, non plus d'une extraction mais d'une évaporation à sec et le résidu traité par de l'éthanol absolu, on obtient le seul dérivé XIII.

On voit ainsi qu'il est très facile de passer du dérivé *o*-acétylé XI à des dérivés *o*-alcoylés ou hydroxylé correspondants. Il est par contre impossible de passer dans ces mêmes conditions du dérivé hydroxylé XII à l'éthoxy XIII.

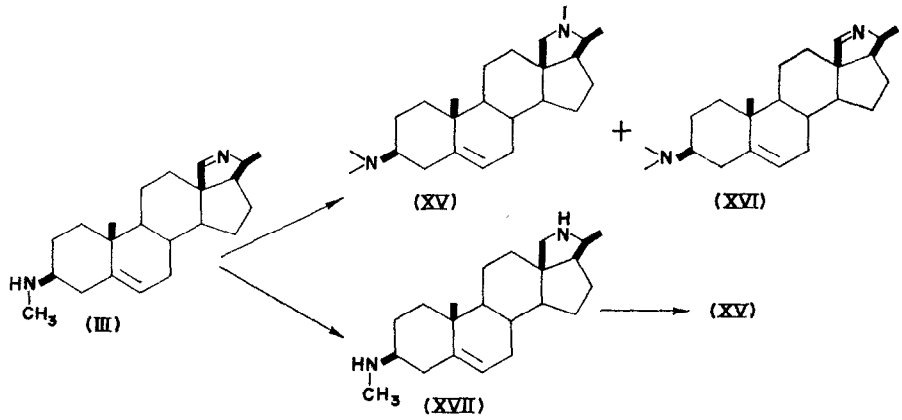
Il avait été démontré[7,11] que l'hydrolyse acide (comme la sublimation sous vide poussé) de XII permet de régénérer le système iminique en laissant intact un groupe acétamide en 3. L'hydrolyse acide a été répétée sur les dérivés éthoxy XIII et acétoxy XI: elle conduit également à la monoacétylconkurchine XIV.

Les identifications de la conkurchine II et de la conessidine III sont effectuées à l'aide des points de fusion, pouvoirs rotatoires et spectres de RMN. Dans le cas de III, l'identification est complétée par la transformation de la conessidine en conessine XV. La méthylation directe de la conessidine III par la méthode d'Eschweiler-Clarke[16] donnant non seulement la conessine XV mais aussi une faible quantité de diméthylconkurchine XVI,[17] la

[13] A. Bertho, *Annalen.* **214,** 555 (1944).
[14] R. Tschesche et H. Ockenfels, *Chem. Ber.* **97,** 2326 (1964).
[15] W. Korytnyk, H. Ahrens et N. Angelino, *Tetrahedron* **26,** 5415 (1970).
[16] (a) W. Eschweiler, *Chem. Ber.* **38,** 880 (1905); (b) H. T. Clarke, H. B. Gillespie et S. Z. Weisshaus, *J. Amer. Chem. Soc.* **55,** 4571 (1933).
[17] Q. Khuong-Huu, M. Truong-Ho, L. Lábler, R. Goutarel et F. Šorm, *Coll. Czech. Chem. Comm.* **30,** 1016 (1965).



conessidine III est d'abord réduite en conimine XVII par le borohydrure de sodium dans le méthanol. La méthylation transforme quantitativement XVII en un produit dont les données spectrales (IR, RMN) et physiques (F, pouvoir rotatoire) sont identiques à celles de la conessine XV.



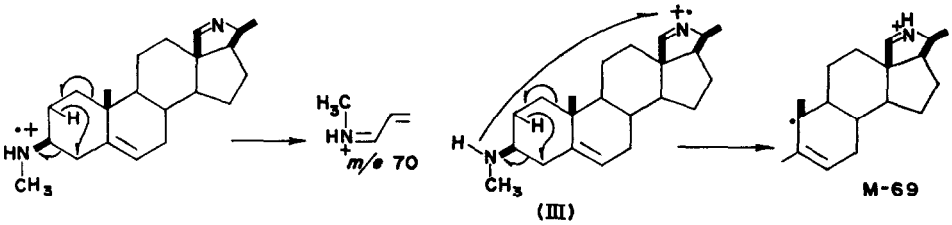
On peut enfin remarquer que les récents travaux de spectrométrie de masse[18] sur les molécules 3–20 diazotées constituent un soutien évident lors de la détermination des structures des molécules de type conkurchine. Le spectre de masse de III, dont le pic moléculaire ($M^+ = 326$) confirme la formule brute, renferme en outre deux pics d'intensité importante. Le pic de base à *m/e* 70 ($\epsilon_{40} = 43\,\%$) spécifique des méthylamino-3Δ^5-stéroïdes[19] s'accompagne en effet d'un pic ($\epsilon_{40} = 23\,\%$) situé à *m/e* 257 (M-69). Celui-ci correspond à un ion qui résulte de la perte d'une molécule contenant l'azote en 3 par suite d'un réarrangement d'hydrogène de l'amine en 3 sur l'hétérocycle azoté. On observe de même pour la conkurchine II le pic *m/e* 56 dû à la fragmentation de l'amine primaire en 3 et un pic *m/e* 257 qui résulte de la perte de 55 unités au lieu de 69 dans le cas de la conessidine.

N-*Formylconkurchine* IV

La présence du proton H—C=N en 18 est démontrée en RMN par un doublet à δ 7,58 de faible constante de couplage ($J = 3$ Hz), tandis que le proton du formamide

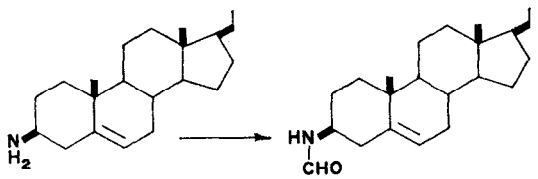
[18] P. LONGEVIALLE et L. DIATTA, *Org. Mass. Spectrometry* **3**, 803 (1970).

[19] (a) W. VETTER, P. LONGEVIALLE, F. KHUONG-HUU-LAINÉ, Q. KHUONG-HUU et R. GOUTAREL, *Bull. Soc. chim. Fr.* 1324 (1963); (b) L. DOLEJS, V. HANUS, V. CERNY et F. SORM, *Coll. Czech., Chem. Commun.* **28**, 1584 (1963); (c) Z. PELAH, M. A. KIELCZEWSKI, J. M. WILSON, M. OHASHI, H. BUDZIKIEWICZ et C. DJERASSI, *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2470 (1963).



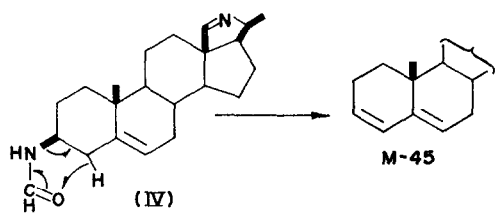
(III)

NHCHO est représenté par un signal (*s* élargi) à δ 8, 11. D'autres signaux correspondant chacun à un proton apparaissent, dont le proton NH et le proton en 3. Les positions identiques du proton NCHO et du proton en 3 ainsi que l'aspect large (0,4 ppm) de ce dernier dans le spectre de RMN du *N*-formyl amino-3β prégnène-5, XIX, préparé à partir de l'amino-3β prégnène-5, XVIII sont en accord avec une structure de type *N*-formyl amino-3β-Δ_5-stéroïde pour l'alcaloïde IV.



(XVIII) (XIX)

Le spectre de masse montre un pic moléculaire ($M^+ = 340$) qui confirme la formule brute et un pic de base M-45 qui résulte de la perte de NH_2CHO, très certainement favorisée par la présence de la double liaison 5–6. Une confirmation chimique est apportée par l'hydrolyse acide de la *N*-formylconkurchine IV qui conduit bien à la conkurchine II.



(IV)

Holaphyllamine V, *Holaphylline* VI *et Holafébrine* VII

La fraction des alcaloïdes totaux, insoluble dans le benzène, est acétylée puis saponifiée à la température du laboratoire. L'utilisation des techniques conjuguées de chromatographie sur colonne et sur plaque préparative permet de séparer les alcaloïdes V, VI et VII sous leur forme *N*-acétylée VIII, IX et X. Ces alcaloïdes sont identifiés par comparaison avec des échantillons authentiques.[8,9]

A côté du problème chimiotaxonomique qui est résolu par ce travail, des observations

d'ordre biogénétique peuvent être posées par la présence simultanée de la *N*-formylconkurchine IV et des alcaloïdes II et III. La *N*-formylconkurchine représente peut-être l'intermédiaire biogénétique dans la méthylation ou la déméthylation des amines stéroïdiques.

TABLEAU 1

NH	NCHO	NCH_3	Plantes
Cyclovirobuxéine B[20]	N-formyl cyclovirob. B[20]		*Buxus malayana Ridl.*
Aspidofractinine[21]	Aspidofractine[22]		*Aspidosperma refractum*
Périvine[23]	Périformyline[24]		*Catharanthus lanceus*
	Périformyline[24]	Vobasine[25]	
	Vallésine[28]	Méthyl-1 aspidospermidine[26]	
Périvine[25]		Vobasine[25]	*Gabunia odoratissima*
Aspidospermidine[26]		Méthyl-1 aspidospermidine[26]	*Aspidosperma quebrachoblanco*
Dictyolucidine[27]		Dictyolucidamine[27]	*Dictyophleba lucida*
Conkurchine	*N*-formylconkurchine	Conessidine	*Holarrhena crassifolia*

S'il est possible d'observer dans certaines plantes des couples d'alcaloïdes stéroïdiques ou indoliques du type NH, NCHO ou NH, NCH_3, et dans des plantes différentes (voir Tableau 1) les éléments du couple NCHO, NCH_3, il est remarquable que se trouvent réunis dans la même plante, les dérivés NH, NCHO et NCH_3, conkurchine II, *N*-formylconkurchine IV et conessidine III.

EXPERIMENTALE

Les points de fusion pris en tubes capillaires sont corrigés. Les pouvoirs rotatoires, sauf indication contraire, sont déterminés à une concentration voisine de 1% dans le $CHCl_3$ RP (0,5% EtOH) et à une température d'environ 20°, à l'aide du Quick-polarimètre Jouan-Roussel. Les spectres de RMN sont enregistrés avec les spectromètres Varian A 60 A et T 60, les produits étant en solution dans le $CDCl_3$ (tétraméthylsilane, référence zéro). Les déplacements chimiques sont exprimés en δ et les constantes de couplage en Hertz (s: singulet; *d*: doublet; *m*: multiplet; *t*: triplet; *q*: quadruplet; *Qdd'*: quadruplet 2 fois dédoublé). Les spectres de masse sont enregistrés sur un appareil Perkin–Elmer, modèle 257. Les chromatographies sont faites sur alumine Merck standardisée selon Brockmann activité II–III et sur Silice AR C4 Mallinckrodt (100–200 mesh). Les chromatographies en couche mince (CCM) et préparative (CCP) ont été exécutées sur Kieselgel-G. La révélation des CCM est obtenue par pulvérisations de réactif de Dragendorff et H_2SO_4 à 50%.

Extraction. Les feuilles séchées (9,5 kg) d'*H. crassifolia* Pierre sont dégraissées à l'éther. Séchées à nouveau, elles sont alcalinisées par une solution de Na_2CO_3 à 20% (4 kg de carbonate au total) et épuisées au soxhlet par du CH_2Cl_2 jusqu'à réaction de Mayer négative. La solution organique concentrée jusqu'à 41. est extraite une fois par 700 cm^3 d'acide sulfamique à 10% et 11 fois par 350 cm^3 de cette même solution. Les phases aqueuses qui renferment les sulfamates d'alcaloïdes sont lavées par du CH_2Cl_2 puis traitées par

[20] M. J. MAGDELEINE, Thèse de Doct. d'Université, Paris (1969).
[21] C. DJERASSI, H. BUDZIKIEWICZ, R. J. OWELLEN, J. M. WILSON, W. G. KUMP, D. J. LE COUNT, A. R. BATTERSBY et H. SCHMID, *Helv. chim. Acta* **46**, 742 (1963).
[22] C. DJERASSI, T. GEORGE, N. FINCH, H. F. LODISCH, H. BUDZIKIEWICZ et B. GILBERT, *J. Am. Chem. Soc.* **84**, 1499 (1962).
[23] W. D. LOUB, N. R. FARNSWORTH, R. N. BLOMSTER et W. W. BROWN, *Lloydia* **27**, 470 (1964).
[24] D. J. ABRAHAM, N. R. FARNSWORTH, R. N. BLOMSTER et A. G. SHARKEY, *Tetrahedron Letters* 317 (1965).
[25] M. P. CAVA, S. K. TALAPATRA, J. A. WEISBACH, B. DOUGLAS, R. F. RAFFAUF et J. L. BEAL, *Tetrahedron Letters* 931 (1965).
[26] K. BIEMANN, M. FRIEDMANN-SPITELLER et G. SPITELLER, *Tetrahedron Letters* 485 (1961).
[27] C. MONNERET, Thèse de Doctorat ès-Sciences, Paris–Orsay (1968).
[28] (a) E. SCHLITTLER et M. ROTTENBERG, *Helv. chim. Acta* **31**, 446 (1948); (b) J. S. E. HOLKER, M. CAIS, F. A. HOCHSTEIN et C. DJERASSI, *J. Org. Chem.* **24**, 314 (1959).

de la potasse en pastilles jusqu'à pH neutre et par de l'ammoniaque (600 cm^3) jusqu'à pH 10. Les alcaloïdes ainsi déplacés de leurs sels sont extraits par du CH_2Cl_2 (500 cm^3 puis 200 cm^3 × 3). Celui-ci, lavé par de l'eau salée, séché et évaporé à sec laisse un résidu d'alcaloïdes totaux pesant 24 g (soit un rendement de 0,25%).

Isolement des alcaloïdes (Tableau 2). Une première séparation est effectuée en fraction soluble dans le benzène (21 g) et fraction insoluble dans le benzène (3 g). La fraction soluble dans le benzène est chromatographiée sur 630 g d'alumine.

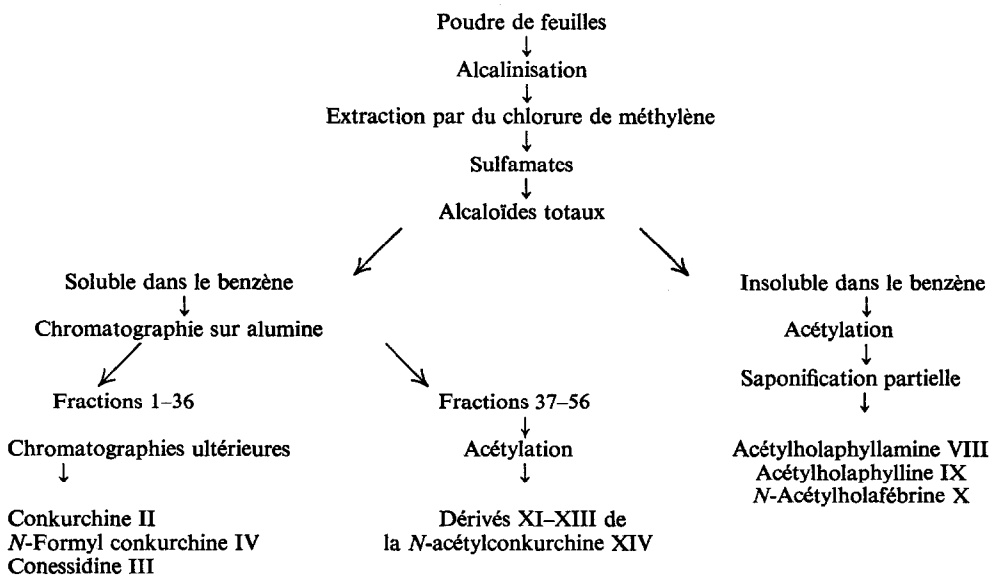


TABLEAU 2. EXTRACTION ET ISOLEMENT DES ALCALOÏDES DES FEUILLES DE l'*Holarrhena crassifolia* PIERRE

Fractions	Eluant	Poids (en g)	Lots
12–20	Benzène–éther 8:2 puis Ether	1,1	E
21–26	Ether	1	A
27–31	Ether puis Ether–EtOH 99:1	3,1	E
32–36	Ether–EtOH 95:5	2,4	B
37–46	Ether–EtOH 95:5 puis 9:1	5,3	C
47–56	Ether–EtOH 9:1	4,9	D

Lot A. Les fractions 21–26 (1 g) constituant le lot A sont rechromatographiées sur 'Florisil' (40 g). Les fractions recueillies sont de 125 cm^3.

Fractions	Eluant		Poids (mg)	
1–10	CH_2Cl_2–EtOH	95:5	195	
11–13		9:1	145	*Conessidine* III
14–18		1:1	227	
19–27	EtOH puis EtOH–pyridine	9:1	107	

Les fractions 14 à 27 donnent par sublimation à 165° sous 0,02 mm de Hg la conessidine III.

Lot B. Les fractions 32–36 (2,4 g) sont filtrées sur colonne d'alumine réhydratée à 6% (73 g), ce qui permet d'obtenir deux fractions: l'une éluée par du benzène pesant 835 mg, réunie au lot E, l'autre éluée par du CH_2Cl_2 (600 mg) immédiatement rechromatographiée sur 30 g de 'Florisil' par fractions de 125 cm^3. Les fractions 3–7 éluées par un mélange CH_2Cl_2–EtOH 98:2 sont constituées par la N-*formylconkurchine* IV.

Les fractions 13 à 15 (éluant CH_2Cl_2–EtOH, 9:1) cristallisent dans l'éther et donnent la *conkurchine* II.

Lot C. (1) *Acétylation.* Ce lot (5,3 g) est acétylé par un mélange d'Ac_2O (10 cm^3) et de pyridine (5 cm^3) à la température du bain-marie bouillant. Des cristaux formés au bout de quelques minutes sont essorés et recristallisés dans l'acétone (1,98 g). Une CCM (solvant de migration: CH_2Cl_2–MeOH, 9:1) révèle un produit nettement majoritaire, mais accompagné d'un produit légèrement plus polaire et de R_f identique à celui de la diacétylconkurchine. Ce produit brut cristallisé dont le spectre IR (ν OAc 1740 et 1240 cm^{-1}) est en faveur de la structure de la *triacétylconkurchine* XI n'est pas purifiable par recristallisations successives; le milieu réactionnel est extrait par de l'éther et donne 720 mg de produit cristallisé. Celui-ci est réuni aux cristaux de triacétylconkurchine XI.

(2) *Traitement par de l'éthanol.* Le simple fait de réunir ces deux fractions avec de l'éthanol donne un mélange qui ne présente plus en spectrométrie IR de bandes ester acétique. Ce mélange est chromatographié sur 90 g de 'Florisil' par fractions de 250 cm^3. La première fraction éluée par du CH_2Cl_2 pur (0,36 g) est constituée par la *diacétyléthoxyconkurchine* XIII. Les fractions 7–11 éluées par un mélange CH_2Cl_2–EtOH(98:2) (soit 0,60 g) sont constituées par la *diacétylconkurchine* XII.

Lot D. (1) *Acétylation et séparation en dérivés neutres et basiques après acétylation.* Les fractions 47–56 sont acétylées (10 cm^3 d'Ac_2O: 5 cm^3 de pyridine) à 100° durant 20 mn. Le milieu réactionnel est concentré sous pression réduite puis dilué par de l'eau et extrait par de l'éther. La phase organique est séparée, alcalinisée par de l'ammoniaque, lavée par de l'eau jusqu'à neutralité puis évaporée sous pression réduite. On obtient une fraction neutre après acétylation (6,3 g). La phase aqueuse résiduelle est alcalinisée puis extraite comme précédemment conduisant à une fraction basique après acétylation (0,4 g). Un insoluble dans l'éther (1,1 g) est repris par du $CHCl_3$ puis joint au *lot E.*

(2) *Dérivés neutres après acétylation.* On dissout ces fractions dans l'EtOH absolu et évapore à sec. Cette opération répétée plusieurs fois permet après extraction habituelle par de l'éther puis cristallisations répétées dans l'acétone de recueillir 320 mg de cristaux constitués par un mélange de XII et XIII.

Les cristaux sont dissous dans une solution HCl 2 N (MeOH: eau; 12,5 cm^3: 2,5 cm^3) et la solution est chauffée à reflux pendant 5 hr. Le milieu réactionnel, préalablement refroidi, est dilué par de l'eau, alcalinisé par de l'ammoniaque et extrait par du $CHCl_3$. On obtient 280 mg de *monoacétylconkurchine* XIV.

Les eaux-mères (3,3 g) sont chromatographiées sur 100 g d'alumine réhydratée à 3% et l'élution par un mélange éther–EtOH (99:1 puis 98:2) permet d'isoler la diacétyléthoxyconkurchine XIII. Les fractions suivantes éluées par le même mélange mais dans des proportions différentes (95:5) donnent après hydrolyse en milieu acide comme ci-dessus 150 mg de monoacétylconkurchine XIV.

Lot E. Ce lot est constitué par l'insoluble de départ dans le benzène, par les fractions 12–20, 27–31 de la première chromatographie, par des fractions de chromatographie du lot B (fractions éluées par du benzène), par les eaux-mères de cristallisation du lot C acétylé et enfin par l'insoluble dans l'éther après acétylation du lot D. On obtient après regroupement de ces divers produits 12 g, qui sont acétylés puis séparés en produits neutres et produits basiques après acétylation. Les produits neutres (6,4 g) fournissent après chromatographie sur 190 g d'alumine standard une fraction pesant 1,3 g éluée par des mélanges benzène–ether (8:2–1:1) à nouveau chromatographiée sur silice (52 g) par fractions de 50 cm^3. Les fractions 95–102 (160 mg) sont saponifiées durant une nuit à la température du laboratoire dans 5 cm^3 de potasse éthanolique N. Le résidu cristallisé blanc (140 mg) obtenu par extraction par de l'éther est purifié par CPP (solvant de migration: CH_2Cl_2–MeOH, 98:2). On isole 13 mg d'*acétylholaphylline* IX et 39 mg de N-*acetylholafébrine* X. Les fractions 103–122 (530 mg) sont également saponifiées dans les mêmes conditions puis chromatographiées sur CPP (solvant de migration: éther–EtOH, 95:5). Elles permettent d'isoler 38 mg d'*acetylholaphyllamine* VIII.

Déscription des Alcaloïdes Isolés et de leurs Dérivés

Conkurchine ou amino-3β N-démèthyl conadiene-5,18(N), II. F 150° (ether); $[\alpha]_D$ −51°; spectre IR: ν C=N à 1665 cm^{-1}; amine à 3280, 3225 et 1610 cm^{-1}. Spectre de RMN: $CH_3$19, *s* 1,05; $CH_3$21, *d* 1,35; NH_2, *s* 1,58; H 6, *m* 5,33; H 18, *d* 7,58. Spectre de masse: M^+ 312, M-55 (10%); *m/e* 56 (15%).

Conessidine ou méthylamino-3β N-déméthyl conadiène-5,18 (N), III. F 124°; $[\alpha]_D$ −62°; spectre IR: ν C=N à 1665 cm^{-1}. Spectre de RMN: identique à celui de la conkurchine avec en plus NCH_3, *s* 2,46. Spectre de masse: M^+ 326, M-69 (23%), *m/e* 70 (43%).

N-*formylconkurchine ou* N-*formylamino-3β* N-*déméthyl conadiene-5,18* (N), IV. F 247° (acétone); $[\alpha]$ −50°; spectre IR: amide à 3210, 1660, 1560 cm^{-1}. Spectre de RMN: CH_3 19, *s* 1,05; $CH_3$21, *d* 1,35 (J = 7); H en 3, *m* 3,80; H 20, *Qdd'* 4,10 ($J_{H_{20}-H_{21}}$ = 7; $J'_{H_{20}-H_{17}}$ = 7; $J''_{H_{20}-H_{18}}$ = 3); H en 6, *m* 5,40; NH, *m* 5,71 (disparaissant après deutériation); H 18, *d* 7,58 (J = 3); NCHO, *s* 8,11. Spectre de masse: M^+ = 340 (< 1%); *m/e* 311 = M-29 (2,5%); *m/e* 295 = M-45 (10%); *m/e* 55 (3%); *m/e* 43 (5%).

N-*acétyl holaphylline ou acétylméthylamino-3β prégnène-5 one-20*, IX. F 196–198° (théorie 203–204°); $[\alpha]_D$ +15°; spectre IR νC=O à 1700 cm^{-1}; amide tertiaire, 3310, 1630 cm^{-1}. Spectre de RMN: CH_3 18, *s*

0,79; CH_3 19, *s* 1,01; CH_3 21, *s* 2,10; $NCOCH_3$, *s* 2,08; NCH_3, *s* 2,87; H 6, *m* 5,35. Spectre de masse: M^+ = 371 (< 1%); *m/e* 298 = M-73 (13%); *m/e* 74 (23%); *m/e* 70 (7%); *m/e* 43 (7%).

N-*acétylholaphyllamine ou acétylamino-3β prégnène-5 one-20*, VIII. F 220–224° MeOH (théorie 228°); $[\alpha]_D$+ 20° (c = 0,8); spectre IR: amide à 3260, 1640, 1550 cm^{-1}; νC=O 1700 cm^{-1}. Spectre de RMN: CH_3 18, *s* 0,62; CH_3 19, *s* 0,98; $NCOCH_3$, *s* 1,94; CH_3 21, *s* 2,10; H 6 et NH, *m* 5,35. Spectre de masse: M^+ = 357 (< 1%); *m/e* 298 = M-59 (15%); *m/e* 60 (6,5%); *m/e* 43 (10%).

N-*acétylholafébrine*, X. F 240–244° (acétone). Spectre IR: OH et amide 3460 et 3240 cm^{-1}; amide 1620, 1560 cm^{-1}. Spectre de RMN: CH_3 18, *s* 0,72; CH_3 19, *s* 1,00; CH_3 21, *d* 1,15 (*J* = 6,5); $NCOCH_3$, *s* 1,93; H 6 et NH, *m* 5,35. Spectre de masse: M^+ = 359 (< 1%); *m/e* 344 = M-15 (< 1%); *m/e* 300 = M-59 (3,5%); *m/e* 282 = M-59-18 (3,5%); *m/e* 86 (22%); *m/e* 44 (17%).

Diacétylconkurchine ou acétylamino-3β hydroxy-18 ξ N-*déméthyl* N-*acétyl conanène-5*, XII. F 183°. Spectre IR: amide à 3230, 1640, 1560 cm^{-1}. Spectre de RMN: CH_3 19, *s* 1,00; CH_3 21, *d* 1,36 (*J* = 6); $NCOCH_3$ 3, *s* 1,95; $NCOCH_3$ 20, *s* 2,10; H 6, *m* 5,35.

Diacétyléthoxyconkurchine ou acétylamino-3β ethoxy-18 ξ N-*déméthyl* N-*acétyl conanène-5*, XIII. F 265–268°; acétone (théorie 263°); $[\alpha]_D$−0° ± 2. Spectre IR: amide à 3320, 1670, 1620, 1550 cm^{-1}; ν C—O—C, 1085 cm^{-1}. Spectre de RMN: CH_3 19, *s* 1,00; CH_3 21, *d* 1,30 (*J* = 7); $NCOCH_3$ 3, *s* 1,95; $NCOCH_3$ 20, *s* 2,10; OCH_2CH_3, *t* 1,25 (*J* = 7); OCH_2CH_3, 3,56 (*J* = 7); H 6, *m* 5,35.

Monoacétylconkurchine ou acétylamino-3β N-*déméthyl conadiène-5,18* (N) XIV. La diacétyléthoxyconkurchine (XIII) (285 mg) en solution dans 15 cm^3 de MeOH et 15 cm^3 d'H_2SO_4 2N, est chauffée au bain-marie bouillant durant 3 hr. On refroidit et dilue par de l'eau. L'extraction par du CH_2Cl_2 donne 200 mg de XIV. F 245–249° (acétone); $[\alpha]_D$−56°. Spectre IR: amide à 3225, 1640 et 1560 cm^{-1}. Spectre de RMN (CF_3COOH); CH_3 19, *s* 1,03; CH_3 21, *d* 1,35 (*J* = 6,5); $NCOCH_3$, *s* 1,95; H 6, *m* 5,35; H 18, *d* 7,50 (*J* = 3). Spectre de masse: M^+ = 354 (< 1%); M-59 (25%); *m/e* 56 (2,5%); *m/e* 55 (1,5%).

N-*formylamino-3β prégnène-5*, XIX. L'amino-3β prégnène-5 (XVIII) (900 mg), traité par un mélange d'HCOOH (10 cm^3) et d'Ac_2O (2 cm^3) à 75° pendant 5 hr. donne après addition d'eau, un précipité cristallisé blanc. Celui-ci repris par du $CHCl_3$ donne après évaporation du solvant un résidu pesant 900 mg: F 254° (acétone); $[\alpha]_D$−48°. Spectre IR: amide à 3230, 1660, 1555 cm^{-1}. Spectre de RMN: CH_3 18, *s* 0,58; CH_3 19, *s* 1,01; H 3, *m* 3,80; H 6, *m* 5,40; NCHO, *s* 8,13. Spectre de masse: M^+ = 329. Analyse: Calc. % C 80,19; H 10,71; N 4,25; O 4,86. Tr. %: C 80,41; H 10,70; N 4,45; O 4,91.

Transformation de la conessidine III *en conessine* XV.

Méthylamino-3β N-*déméthyl conanène-5*, XVII. A une solution de conessidine III (47 mg) dans le MeOH (4 cm^3), on ajoute 50 mg de BH_4Na sous agitation magnétique à la température du laboratoire. Après environ 4 hr, on extrait par du $CHCl_3$ et obtient 46 mg de XVII sous forme de vernis transparent. Un contrôle par spectrométrie de RMN montre la disparition du proton H—C=N: CH_3 19, *s* 0,93; CH_3 21, *d* 1, 15 (*J* = 6,5); NH 20, *s* 1,58; NCH_3, *s* 2,43; H 6, *m* 5,35; CH_2 18, AB, A 2,56, B 2,88 (*J* = 12).

Conessine, XV. 46 mg de XVII sont méthylés par 1,5 cm^3 d'HCOOH et 2 cm^3 d'HCHO à 30% (bain-marie bouillant 4 hr 30). Une extraction par du CH_2Cl_2 après alcalinisation par l'ammoniaque donne 48 mg de produit brut, cristallisant dans l'acétone F 124° $[\alpha]_D$−6°. Les spectres IR et de RMN sont superposables à ceux de la conessine.

Hydrolyse acide de la triacétylconkurchine, XI. La triacétylconkurchine XI (renfermant environ 10% de diacétylconkurchine XII) (280 mg) est chauffée à reflux dans du méthanol chlorhydrique 2 N durant 5 hr. Après extraction, le produit brut est identifié à la monoacétylconkurchine XIV.

Hydrolyse acide de la N-*formylconkurchine*, IV. 50 mg de IV traités comme ci-dessus conduisent à 35 mg de produit brut identifié à la conkurchine II.

Remerciements—Ce travail nous a été confié par R. Goutarel qui en a constamment suivi les résultats et que nous remercions. Nous remercions également le Prof. M.-M. Janot pour l'intérêt qu'il a porté à ces recherces.

Key Word Index—Holarrhena crassifolia; Apocynaceae; chemotaxonomy; steroidal alkaloids.