

REFERENCES

1. Rao, B. S., Sudborough, J. J. and Watson, H. E. (1925) *J. Ind. Inst. Sci.* **8A**, 143; *Chem. Abst.* (1925) **19**, 3563.
2. Enzell, C. R. and Ryhage, R. (1965) *Arkiv Für Kemi* **23**, 367.
3. Bory, S. and Fetizon, M. (1964) *Bull. Soc. Chim. Fr.* 570.
4. Gaudemer, A., Polonsky, J. and Wenkert, E. (1964) *Bull. Soc. Chim. Fr.* 407.
5. Sawada, T. (1958) *J. Pharm. Soc. (Japan)* **78**, 1023.
6. Carman, R. M. and Deeth, H. C. (1971) *Australian J. Chem.* **24**, 357.

Phytochemistry, 1977, Vol. 16, pp. 803-805 Pergamon Press Printed in England.

STRUCTURE DE DEUX METHOXY-YOHIMBINES, ISOLEES DE *RAUWOLFIA CAPURONI*

CHRISTINE MIET, GUY CROQUELOIS et JACQUES POISSON

Centre d'Etudes Pharmaceutiques de Châtenay-Malabry, Laboratoire du C.E.S. de Pharmacotechnie*

(Received 8 September 1976)

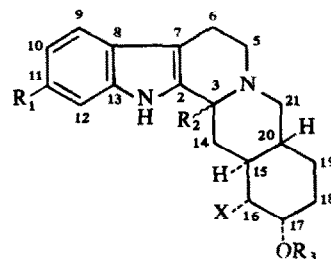
Key Word Index—*Rauwolfia capuroni*; Apocynaceae; structure; 11-methoxy-yohimbine; 11-methoxypseudo-yohimbine; indole alkaloids.

Par extraction des alcaloïdes des écorces de tronc d'une Apocynacée malgache *Rauwolfia capuroni* Mgf (C. Miet, M. Debray, M. Jacquemin et J. Poisson, Non publié) on obtient un totum basique soluble dans le chloroforme qui cristallise abondamment par concentration de la solution. Le produit obtenu 1 représente la presque totalité des alcaloïdes totaux (26 g. p. 1000)†. Toutefois, on peut isoler en très faible proportion des eaux-mères, par chromatographie sur alumine, un autre alcaloïde 2 qui cristallise dans le méthanol.

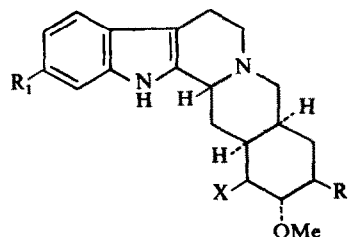
Après cristallisation répétée dans l'acétone, l'alcaloïde 1 se présente comme un produit homogène, F. 267-268° (Microscope Kofler), $[\alpha]_D^{20} + 30^\circ$ (pyridine, $c = 1$), de formule $C_{22}H_{28}O_4N_2$. Sa solubilité est très faible dans les solvants usuels. Le spectre UV (EtOH) est du type méthoxy-6 indole 3: λ_{max} nm (log ϵ) 229 (4,51), 271 (3,68), 298 (3,75) et le spectre IR (KBr) révèle la présence de groupes OH (3520 cm^{-1}), NH (3320 cm^{-1}) et carbonyle (1720 cm^{-1}). Le spectre RMN ^1H à 60 MHz (DMSO- d_6 + TMS) montre des signaux à δ ppm 3,68 (sing., 3 pr., COOCH_3) et 3,76 (sing. 3 pr., Ar-OCH_3) ainsi que 3 multiplets de 1 proton chacun dans la zone aromatique à 6,45 (doublet dédoublé, $J_{HH} = 2\text{ Hz}$ et 8 Hz); 6,75 (doublet, $J_{HH} = 2\text{ Hz}$) et 7,10 (doublet, $J_{HH} = 8\text{ Hz}$) qui confirment le noyau méthoxy-6 indole 3. On note également deux protons échangeables par D_2O à 4,41 (OH) et à 8,66 (NH indolique). Le spectre de masse [m/e (abondance %): 384 (100) (M^+), 383 (90), 369 (2), 354 (7), 353 (10), 214 (10), 200 (15), 199 (13), 186 (10), 174 (10), 173 (6)] possède le profil de celui de la yohimbine 4 avec un décalage de +30 um des fragments contenant le noyau indole [1].

On peut donc envisager pour l'alcaloïde 1 la structure

plane d'une méthoxy-11-yohimbine. Celle-ci, et en particulier la position du méthoxyle indolique, est confirmée par l'analyse du spectre de RMN ^{13}C dans le DMSO- d_6 effectuée parallèlement à celle de la yohimbine 4: deux signaux de méthines aromatiques subissent un fort déplacement à champ fort et correspondent à C-10 ($\Delta\delta -14,26\text{ ppm}$) et C-12 ($\Delta\delta -15,74\text{ ppm}$). Un autre méthine aromatique est déplacé en sens inverse, le C-11 ($\Delta\delta +36,92\text{ ppm}$) et son degré de substitution



1	R_1 : OMe	R_2 : H(β)	R_3 : H	X: CO_2Me
2	: OMe	H(α)	H	CO_2Me
4	H	H(α)	H	CO_2Me
5	H	H(β)	H	CO_2Me
6	OMe	H(β)	Ac	CO_2Me
9	OMe	H(α)	one-17	H
10	H	H(α)	one-17	H



7 R_1 : H R_2 : $\text{C}_6\text{H}_2(\text{OMe})_3\text{COO}$
 8 R_1 : OMe R_2 : $\text{C}_6\text{H}_2(\text{OMe})_3\text{COO}$
 X: CO_2Me

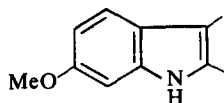
* Adresse: Rue J. B. Clément, 92290, Châtenay-Malabry. Equipe de Recherche Associée au C.N.R.S. n° 317.

† L'isolement et la description de cet alcaloïde ont fait l'objet du dépôt d'un pli cacheté à l'Académie de Pharmacie, Paris le 19.2.1973.

passé de 3 à 4. Les autres signaux ne sont que très peu ou pas affectés (voir partie expérimentale). Ces déplacements sont comparables à ceux qui sont observés quand on passe de la désépidine 7 à la réserpine 8 [2].

L'alkaloïde 2, $C_{22}H_{28}O_4N_2$, F. 200–202° (Kofler), $[\alpha]_D^{20} + 90^\circ$ (pyridine, $c = 0,5$) a des caractéristiques spectrales très proches de celles de l'alkaloïde 1: UV λ_{max} nm (log ϵ) 229 (4,43), 271 (3,64), 298 (3,74); IR (KBr) ν cm^{-1} 3500, 3200, 1725; RMN 1H (60 MHz, DMSO- d_6 + TMS) δ ppm 3,65 (sing., 3 pr., $COOCH_3$), 3,70 (sing., 3 pr., $Ar-OCH_3$), 6,63, 6,8 et 7,25 (mult., 1 pr. chacun, $Ar-H$). SM: m/e (ab. %) 384 (100) (M^+), 383 (88) ($M-1$)⁺, 353 (5), 325 (4), 214 (12), 200 (14), 199 (15), 186 (8), 174 (7). Il peut être considéré également comme une méthoxy-11 yohimbine, stéréoisomère de 1.

La comparaison du spectre de RMN 1H de 1 avec ceux de divers isomères yohimbiques [3, 4] permet de préciser la configuration en 16 ($COOMe$ équatorial) et 17 (proton équatorial), les déplacements chimiques étant très voisins de ceux de la yohimbine 4. L'orientation du groupe carbométhoxyle est confirmée par saponification et méthylation de l'acide obtenu, redonnant le produit de départ [5], et la configuration du C-17 par acétylation, le dérivé acétylé 6 présentant dans son spectre RMN le signal de H-17 à δ 5,40 ppm, caractéristique d'une orientation équatoriale [3]. Les configurations en 15 et 20 sont données par le spectre CD de la cétone 9 [obtenue par oxydation selon Oppenauer de l'acide correspondant à 1 [6]] qui est superposable à celui de la (+)-yohimbone 10. La configuration en 3*, enfin, découle de la deshydrogénation en 3-4 de 1 par l'acétate mercurique, suivie de la réduction de l'immonium obtenu par $NaBH_4$. On obtient quantitativement une base qui se révèle absolument identique à 2. On en conclut que 1 et 2 diffèrent seulement par leur stéréochimie en 3 et que 1 doit posséder la configuration la moins stable 3β , 2 étant 3α . D'après l'ensemble des données précédentes, on peut affirmer que 1 est la méthoxy-11 pseudo-yohimbine et 2 la méthoxy-11 yohimbine. Leur rattachement au couple yohimbine 4-pseudoyohimbine 5 est confirmé par le pouvoir rotatoire positif des deux produits dans la pyridine, 4 et 5 étant les seuls isomères yohimbiques dextrogyres dans ces conditions.



Formule 3

Ces alcaloïdes sont nouveaux car leur caractéristiques diffèrent de celles des autres méthoxyyohimbines actuellement connues [4, 7, 8].

* L'analyse des bandes 'de Bohlmann' du spectre IR pour la détermination de celle-ci n'est pas possible ici en raison de l'insolubilité des alcaloïdes dans $CHCl_3$.

† Signaux agglomérés; multiplicité et attribution incertaines.

‡ L'obtention d'une yohimbone-(3 α) à partir d'une base ayant la configuration 3β de la pseudoyohimbine peut s'expliquer par une épimérisation en 3 dans les conditions de basicité de la réaction d'oxydation [10].

PARTIE EXPERIMENTALE

CCM. Chromatographie en couche mince. Les spectres de masse ont été mesurés à 70 eV sur un appareil AEI MS-9 ou Varian MAT 112, les spectres RMN 1H sur un appareil Varian A-60. Les analyses centésimales donnent des résultats satisfaisants.

Méthoxy-11 pseudo-yohimbine 1. Spectre de RMN de ^{13}C : déterminé en 'Noise decoupling' et 'Off-Resonance' sur un appareil Varian CFT-20 dans le DMSO- d_6 . Déplacement en δ ppm par rapport au TMS (multiplicité, n° de carbone. cf. formule 1): 172,9 (s, 22), 155,1 (s, 11), 136,4 (s, 13), 132,7 (s, 2), 121,8 (s, 8), 117,6 (d, 9), 107,9 (s, 7), 105,8 (d, 10), 95,2 (d, 12), 66,6 (d, 17), 55,3†, 53,7†, 52,3†, 51,4†, 51,1†, 50,7†, 32,3†, 32,1†, 30,8†, 22,9 (t, 19), 16,4 (t, 6).

Yohimbine 4. Spectre effectué dans les mêmes conditions, δ ppm: 172,7 (s, 22), 136,1 (s, 13), 135,7 (s, 2), 126,7 (s, 8), 120,1 (d, 10), 118,1 (d, 11), 117,3 (d, 9), 110,9 (d, 12), 106,1 (s, 7), 66,5 (d, 17), 61,1 (t, 21), 60,0 (d, 3), 52,3 (t, 5), 51,0 (d, 16), 40,0 (q, 23), 36,4 (d, 20), 35,9 (d, 15), 34,0 (t, 14), 32,4 (t, 18), 22,9 (t, 19), 21,6 (t, 6).

Saponification et réestérification par CH_2N_2 de l'alkaloïde 1. La technique suivie est celle publiée pour la sérédine [6]. On récupère un produit identique à l'alkaloïde de départ (R_f en CCM-PF-IR).

Oxydation de 1 en méthoxy-11 yohimbone 9. L'oxydation est conduite sur l'acide méthoxy-11 yohimbique préparé comme précédemment, selon la même méthode que pour la sérédone [6]. On obtient avec un faible rendement un produit amorphe, homogène en CCM (Kieselgel G, $CHCl_3$ -MeOH 93-7, tache orange avec la dinitro-2,4 phénylhydrazine), bande IR (KBr) à ν 1710 cm^{-1} . Spectre CD (dichrographe Jouan CD-2, EtOH, $c = 0,733$ g.p. 1000, $e = 0,5$ cm) λ_{max} ($\Delta\epsilon$): 260 (+1,80), 298 (-3,35), 303 (-3,40)†.

Acétyl-17 méthoxy-11 pseudo-yohimbine 6. 180 mg de méthoxy-pseudo-yohimbine 1 sont traités par Ac_2O /pyridine. Après 96 hr de contact à 20° et extraction, on obtient 150 mg de résidu qui est purifié par CCM préparative ($CHCl_3$ -MeOH, 97:3) donnant 40 mg de produit cristallisant dans Et_2O . F. 153–56°, IR_{KBr} ν cm^{-1} 1750 et 1250. RMN 1H δ ppm ($CDCl_3$, TMS): 1,90 (s, 3 pr.) (CH_3-CO); 3,66 (s, 3 pr.) ($COOCH_3$); 3,83 (s, 3 pr.) ($Ar-OCH_3$); 4,47 (m, 1 pr.); 5,40 (m, 1 pr.) ($Ar-CH$); 8,16 (s, 1 pr.) (NH). Spectre de masse: m/e (ab. %): 426 (100), 425 (73), 396 (10), 395 (10), 383 (3), 367 (5), 365 (3), 307 (2), 214 (6), 200 (7), 199 (6), 186 (6), 174 (6), 173 (3).

Epimérisation de 1 par l'acétate mercurique. Elle est effectuée par la méthode de Wenkert [9] sur 430 mg de base. On obtient 500 mg de perchlorate de dérivé deshydro-3,4. Son traitement direct dans MeOH avec un excès de $NaBH_4$ donne 400 mg de produit, extrait par Et_2O après addition d'eau au milieu réactionnel. Ce résidu, repris par MeOH fournit 135 mg de cristaux, F. 200–202° après deux recristallisations dans le même solvant, identifiés à l'alkaloïde 2 (PF mélangé, IR, $[\alpha]_D$, R_f en CCM).

Remerciements—Ils vont au Pharmacien-Cdt M. Debray et à M. M. Jacquemin (Orstom) qui ont récolté les échantillons de *R. capuronii*, aux Drs. B. C. Das et J. Cosson (ICSN, Gif-sur-Yvette) pour les spectres de masse, à Mme F. Picot (ICSN) pour le spectre CD et au Dr. A. Rabaron pour l'analyse en RMN ^{13}C . L'isolement des alcaloïdes a été en partie réalisé par un groupe d'étudiants du C.E.S. de Pharmacotechnie, et plus particulièrement M. Bague. Nous remercions également le Syndicat National de l'Industrie Pharmaceutique (S.N.I.P.) pour l'appui matériel qu'il apporte à ce Certificat.

BIBLIOGRAPHIE

- Hesse, M. (1974) *Indolalkaloïde in Progress in Mass Spectrometry*, 1 p. 198 (Budzikiewicz, H. ed.). Verlag Chemie, Berlin.
- Levin, R. H., Lallemand, J.-Y. et Roberts, J. D. (1973) *J. Org. Chem.* **38**, 1983.

3. Albright, J. D., Mitscher, L. A. et Goldmann, L. (1963) *J. Org. Chem.* **28**, 38.
4. Mamatas-Kalamaras, S., Sevenet, T., Thal, C. et Potier, P. (1975) *Phytochemistry* **14**, 1849.
5. Le Hir, A., Janot, M.-M. et Goutarel, R. (1953) *Bull. Soc. Chim. Fr.* 1027.
6. Poisson, J., Neuss, N., Goutarel, R. et Janot, M.-M. (1958) *Bull. Soc. Chim. Fr.* 1195.
7. Douzou, L., Mansour, M., Debray, M., Le Men-Olivier, L. et Le Men, I. (1974) *Phytochemistry* **13**, 1994.
8. Gabetta, B. et Mustich, G. (1975) *Spectral Data of Indole Alkaloids*. Inverni della Beffa, Milan.
9. Wenkert, E. et Roychaudhuri, D. K. (1958) *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 1613.
10. Bartlett, L., Dastoor, N. J., Hrbek J., Jr., Klyne, W., Schmid, H. et Snatzke, G. (1971) *Helv. chim. Acta* **54**, 1238.

Phytochemistry, 1977, Vol. 16, pp. 805-807. Pergamon Press. Printed in England.

SUBCELLULAR LOCALIZATION OF STEROIDAL GLYCOALKALOIDS IN VEGETATIVE ORGANS OF *LYCOPERSICON ESCULENTUM* AND *SOLANUM TUBEROSUM*

JAMES G. RODDICK

Department of Biological Sciences, University of Exeter, Exeter EX4 4QG, England

(Received 20 January 1977)

Key Word Index—*Lycopersicon esculentum*; *Solanum tuberosum*; Solanaceae; tomato; potato; subcellular localization; steroidal glycoalkaloids; α -tomatine, α -solanine, α -chaconine.

Abstract—Cell fractions from the major vegetative organs of tomato and potato plants were obtained by homogenization and differential centrifugation. In both species, steroidal glycoalkaloids were found to accumulate mainly in the soluble fraction, with smaller amounts in the microsomal fraction. Alkaloids appeared sporadically in the mitochondrial fractions but were only detected in lower fractions as an artefact.

INTRODUCTION

In a previous communication [1] it was shown that in unripe tomato pericarp α -tomatine is most abundant in the soluble phase of the cells, with only small amounts being associated with certain particulate fractions. However, since developing fruits show progressive degradation of tomatine [2] while developing vegetative organs synthesize and accumulate the alkaloid [2,3], localization of tomatine within vegetative cells cannot reasonably be deduced by extrapolating from studies conducted with reproductive cells. This communication provides information on the distribution of α -tomatine in vegetative cells of tomato and also on glycoalkaloid (α -solanine and α -chaconine) distribution in vegetative cells of potato. The data presented here complement and extend those reported elsewhere [4].

RESULTS AND DISCUSSION

Although glycoalkaloids varied in amount in different organs, their subcellular distribution was essentially the same in all tested organs of both species with the highest

concentration (per unit of protein) in the 105000g supernatant and (with the exception of potato root) smaller amounts in the 105000g pellet (Table 1). These data therefore suggest that, in vegetative cells of potato and tomato, as in tomato fruit cells, glycoalkaloids are located principally in the soluble phase, a conclusion which tends to be supported by the close correspondence found between expressed sap alkaloid levels and concentration in whole organs [4]. Although not studied here, it seems probable that the alkaloids of reproductive cells of potato show a similar distribution at the subcellular level to that in vegetative cells. The presence of glycoalkaloids (although in much smaller quantities) in, and, in some cases, their apparent absence from, the microsomal and mitochondrial fractions may reflect a variety of causes and conditions e.g. sites of synthesis, contamination, limits of detection, technical problems, etc., as has already been discussed [4].

No glycoalkaloids were detected in the 2500g or 500g pellets from potato cells or from tomato root cells, but in each of the first two tomato leaf fractionations, significant amounts of tomatine were observed in both these fractions. In view of the actual and relative amounts of alkaloid in these two fractions, the large amounts present in the leaf as a whole, and the fact that tomatine is not