

Research on the alkaloids of *Strychnos*. XVII. The alkaloids of *Strychnos Jobertiana* Baill. and *Strychnos rondeletoides* Spruce: the occurrence of a new alkaloid, Jobertine (O-acetyl-diaboline B), in *Strychnos Jobertiana*

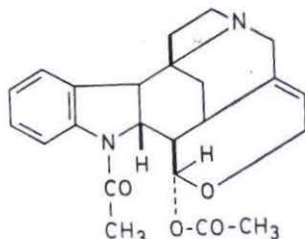
The investigations on a sample of stem bark of *Strychnos Jobertiana* collected by Ducke, North East of Flores, near Manaus (Amazonas, Brazil) were reported in a previous note¹.

The total toxicity of the plant determined according to MARINI-BETTÒLO & BOVET² was very low (2.5 g/kg) and only traces of quaternary alkaloids could be detected in this sample. These results were not in agreement with the reports on this species which is said to be used as a secondary ingredient in the elaboration of curare by Cauichanas (Rio Tonantins) and Javas (Rio Javary) in Brazil, by Canelos in Ecuador and in the basin of Rio Putumayo in Colombia³. Information is also available that it is the root bark and not the stem bark that is used, at least by Javas and Canelos.

We have decided to check on this on a new sample of root bark (Prance & Silva 58713) collected by G. T. Prance near Paragominas (Para, Brazil) and determined by B. A. Krukoff. This species, as reported by KRUKOFF³, is widely distributed in the Amazon basin and the Guianas.

The plant material was extracted with water and methanol according to the procedure followed previously⁴. Only tertiary alkaloids were found and identified as diaboline and O-acetyl-diaboline B. The latter is stereoisomer of henningsamine found in *S. Henningsii*⁵ and *S. chlorantha*⁶.

O-acetyl-diaboline B although known, having been prepared by synthesis, has now been found for the first time in a plant. Therefore we propose for O-acetyl-diaboline B the name Jobertine.



Jobertine (O-acetyl-diaboline B)

During the extraction with chloroform of the concentrates under acidic conditions, a mixture of free acids with diaboline and Jobertine was obtained. This fact suggests that the acids may salify the alkaloids in the plant.

The acids were submitted to methylation with diazomethane. The investigation on their structure will be reported elsewhere.

The alkaloids of *S. rondeletoides* so far have not been studied although it was reported that its root bark is used for the preparation of curare in Waupés (Colombia)

and in Bolivar and Amazonas (Venezuela)⁷. As in the case with *S. Jobertiana*, this species is widely distributed in the Amazon basin and the Guianas.

Our study of this species was made on a sample of root bark (*Prance, Silva & Pires* 59204) collected near the margin of Garapu airstrip, Serra do Raucador basin of Rio Araguaia, Mato Grosso, Brazil. Only tertiary alkaloids, mainly diaboline, were recognized by means of chromatographic methods.

The occurrence of diaboline in the two species investigated is a new confirmation of the large distribution of diaboline in the genus *Strychnos* and of the theory that it may be considered the precursor of both strychnine and quaternary bimolecular alkaloids. It is also of interest that Jobertine, a stereoisomer of henningsamine, another substance closely related to diaboline, is present in one *Strychnos* species.

The presence of quaternary alkaloids has been investigated extracting methanol exhausted material with 2 % acetic acid, both from *S. Jobertiana* and *S. rondeletoides*. Only traces of alkaloids were precipitated with picric acid. Picrates were converted on amberlite IRA column into free bases which gave positive Dragendorff reaction but no colour reaction with cerium sulphate.

The presence of Jobertine in the root bark and its absence in the stem bark of the same species, demonstrates that it is quite likely that in the majority of the American species of *Strychnos* the root bark is the preferred source of the alkaloids as suggested by KRUKOFF⁸ and as already shown for *S. chlorantha*⁹.

Experimental

« STRYCHNOS JOBERTIANA ».

Extraction. — 1.1 kg of root bark finely grounded were extracted by the procedure of MÜLLER *et al.*⁶ first with water (3 + 2 + 2 l) and then with methanol (2.5 + 2.5 + 1.5 l). The extracts were concentrated separately *in vacuo* at 35-40°C to 250 ml, then pooled in 1 l, methanol was added and the mixture stirred and filtered. The filtrate was concentrated again to 300 ml *in vacuo* at 35-40°C the precipitate removed by filtration and the filtrate was treated with HCl and extracted with chloroform (6 × 100 ml). By evaporation of the solvent a residue of 3 g was obtained.

Diaboline. — The aqueous solution was basified with Na₂CO₃ and extracted with CHCl₃, a residue of 0.420 g of diaboline was thus obtained. Diaboline was identified with a pure sample by thin-layer chromatography⁹, and as the picrate (m.p. 237-240°C undepressed in mixture with an authentic specimen).

Acid extract. — As above reported a residue of 3 g was obtained from the extraction under acid conditions.

The residue surprisingly shows a faint alkaloid reaction with Dragendorff.

The residue was passed through a column of silica gel and eluted with chloroform containing 10 % methanol.

Acids. — The first fractions contain an oil (1.5 g) with strong acid reaction. The oil was purified by vacuum distillation and methylated with an ethereal diazo-methane solution. The methyl-esters are easily hydrogenated with H₂ on PtO₂. Elsewhere it will be reported on the nature of the acid fraction.

Jobertine. — After the separation of the acid fraction from the column, fractions containing 0.3 g Jobertine (O-acetyl-diaboline B) and 0.25 g diaboline were collected.

Jobertine was identified by thin-layer chromatography with an authentic specimen of O-acetyl-diaboline B prepared by synthesis¹⁰.

In Table 1 the R_f for Jobertine (O-acetyl-diaboline B) and henningsamine (O-acetyl-diaboline A)¹¹ are reported.

TABLE I.

Rf values of Jobertine and Henningsamine (thin-layer chromatography on SiO_2)

Solvent System	Jobertine (O-acetyl-diaboline B)	Henningsamine (O-acetyl-diaboline A)
CHCl_3 -Acetone-Diethylamine (5:4:1)	0.68	0.60
CHCl_3 -Diethylamine (9:1)	0.86	0.79
Cyclohexane-Chloroform-Diethylamine (5:4:1)	0.58	0.35
Benzol-Acetate-Diethylamine (7:2:1)	0.43	0.39
CHCl_3 -Metanol (8:2)	0.45	0.60
EtOH-Diethylamine (95:5)	1	1

Jobertine crystallizes with difficulty from ethyl-acetate-petrol ether, m.p. 87-91°C (Lit. 92-94.5°)¹⁰. (Analysis found %: C 66.57, H 6.91, N 6.59; calculated for $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{O}_4\text{H}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ %: C 66.97, H 6.84, N 6.7 %). 60 Mc NMR spectrum is identical with that of the synthetic O-acetyl-diaboline B.

For further confirmation 10 mg Jobertine were treated on water bath with 10 ml H_2SO_4 2N for 2 hrs. After basification with NH_4OH and extraction with chloroform, 8 mg Wieland-Gumlich aldehyde were obtained and identified by thin-layer chromatography⁹.

Jobertine (10 mg) was also converted into diaboline by treatment with 0.5 ml ethanol and 1 ml NH_4OH 33 % at room temperature for 2 days. Ethanol was eliminated *in vacuo* and the water phase extracted with chloroform. The residue (10 mg) was identified with diaboline by thin-layer chromatography⁹.

« STRYCHNOS RONDELETOIDES » Spruce.

From 0.700 kg of *S. rondeletoides* Spruce shavings according to the procedure reported for *S. Jobertiana*, 0.820 g tertiary alkaloids were obtained. These are mainly constituted by diaboline with traces of Wieland-Gumlich aldehyde, both identified as above reported

We are indebted to Dr. B. A. Krukoff for determining the plants and for advice on our work. We thank Dr. Prance and the New York Botanical Garden for collecting the plants.

25 luglio 1967.

FRANCO DELLE MONACHE, ERMANNO CORIO
e G. B. MARINI-BETTÒLO

*Laboratori di Chimica Biologica, Istituto Superiore di Sanità
e Centro Chimica del Farmaco e delle Sostanze biologicamente
attive del CNR, Istituto di Chimica, Università Cattolica, Roma.*

- BOVET, D., A. DUCKE, K. ADANK & G. B. MARINI-BETTÒLO. *Gazz. Chim. Ital.*, **84**, 1141 (1954).
- MARINI-BETTÒLO, G. B. & D. BOVET. *Selected Sci. Papers Ist. Super. Sanità*, **1** 26 (1954).
- KRUKOFF, B. A. *Mem. New York Botan. Garden*, **12** (2) 40 (1965).
- PELLICCIARI, R., F. DELLE MONACHE, N. LOZANO REYES, C. G. CASINOVÌ & G. B. MARINI-BETTÒLO. *Ann. Ist. Super. Sanità*, **2**, 411 (1966).
- GROSSERT, J. S., J. M. HUGO, M. E. VON KLEMPEREN & F. L. WARREN. *J. Chem. Soc.*, 2812 (1965).
- MÜLLER, H., M. HESSE, P. WASER, H. SCHMID & P. KARRER. *Helv. Chim. Acta*, **48**, 320 (1965).
- KRUKOFF, B. A. *Mem. New York Botan. Garden*, **12** (7) 24 (1965).
- KRUKOFF, B. A. *Mem. New York Botan. Garden*, **12** (7) 9, 11 (1965).
- DELLE MONACHE, F., E. CORIO & G. B. MARINI-BETTÒLO. *Ann. Ist. Super. Sanità*, **3**, 190 (1967).
- BIEMAN, K., J. S. GROSSERT, J. M. HUGO, J. OCCOLOWITZ & F. L. WARREN. *J. Chem. Soc.*, 2814 (1965).
- DEYRUP, S. A., H. SCHMID & P. KARRER. *Helv. Chim. Acta*, **45**, 2266 (1962).

Sulla presenza nella corda nervosa di *Periplaneta americana* di una adenosintrifosfatasi attivata dal sodio e dal potassio (Na, K ATPasi)

Recenti esperimenti ^{1,2} hanno dimostrato l'esistenza di scambi rapidi di ioni inorganici e di molecole, come il glucosio, tra l'emolinfa e i tessuti del sistema nervoso di alcuni insetti (*Periplaneta americana*, *Carausius morosus*).

Nello studio cinetico di questi scambi una particolare importanza è stata attribuita alla guaina che, bagnata direttamente dall'emolinfa e costituita da uno strato cellulare o *perilemma* e uno strato collageneo o *lamella neurale*, riveste l'intero sistema di gangli e connettivi nervosi ³.

Le condizioni ioniche degli spazi extracellulari compresi tra il tessuto nervoso e la guaina sono diverse da quelle dell'emolinfa e paragonabili a quelle del fluido che bagna i tessuti di animali appartenenti ad altri gruppi zoologici ⁴.

Vari autori hanno dimostrato ⁵, che le condizioni ioniche dell'emolinfa degli insetti sono del tutto particolari; il rapporto Na, K, Mg, Ca che nei vertebrati e in molti invertebrati è di 50, 1, 1, 1, può variare da 40, 2, 1, 1 a 1, 4, 2, 8.

Secondo NARAHASHI ⁶ anche negli Insetti, la conduzione dell'impulso nervoso può essere spiegata nei termini classici della teoria di Hodgkin e Huxley (HODGKIN ⁶), che prevede l'impiego di un sistema tipico della membrana a riposo, mantenuto metabolicamente dalla cellula per il «trasporto attivo» del Na⁺ contro il gradiente elettrochimico.

Come già dimostrato ⁷, esiste nella corda nervosa di *P. americana* un sistema ATPasico la cui attività, essendo regolata dal rapporto reciproco degli ioni Na e K nel mezzo interno ed esterno, può essere a ragione considerato il sistema responsabile di tale *trasporto attivo* ⁸. Alcune caratteristiche di questo sistema ATPasico e la sua assenza nella guaina vengono descritte nella presente nota.

Materiali e metodi. — La tecnica usata per la determinazione della attività Na⁺, K⁺ ATPasica è quella descritta da BONTING, HAWKINS & CANADY ⁹ da noi leggermente modificata ⁷. Le corde nervose di giovani maschi di *P. americana*, allevati in laboratorio erano prelevate in acqua bidistillata come descritto da ROEDER & WEIANT ¹⁰. Le guaine erano invece isolate al microscopio da dissezione seguendo in un primo tempo la tecnica descritta da TWAROG & ROEDER ¹¹ e successivamente il metodo usato da BAKER, HODGKIN & SHAW ¹² per l'assone gigante di calamaro.

Risultati e discussione. — Nella Fig. 1 sono riportate in grafico le variazioni della attività ATPasica dell'omogenato di corda nervosa in seguito all'aggiunta di cationi.

L'attività ATPasica in assenza di ioni è relativamente bassa, ma in presenza di Mg⁺⁺, di Mg⁺⁺, Na⁺ o Mg⁺⁺, K⁺ essa aumenta considerevolmente. Quando Mg⁺⁺, Na⁺, K⁺ sono contemporaneamente aggiunti al mezzo di incubazione si ha un aumento ulteriore dell'attività. Questo aumento di attività è completamente neutralizzato dall'aggiunta di ouabaina in concentrazione finale 0,1mM. L'attività dopo aggiunta del glicoside cardiaco, è simile a quella che si ha in presenza di solo Mg⁺⁺ essendo l'inibizione equivalente alla stimolazione prodotta dalla presenza degli ioni Na e K, come

del resto previsto dal metodo originale di BONTING, HAWKINS & CANADY⁹. Alla temperatura di incubazione di 37° C la liberazione di ortofosfato inorganico è, nei limiti di 30 minuti proporzionale al tempo di incubazione⁷.

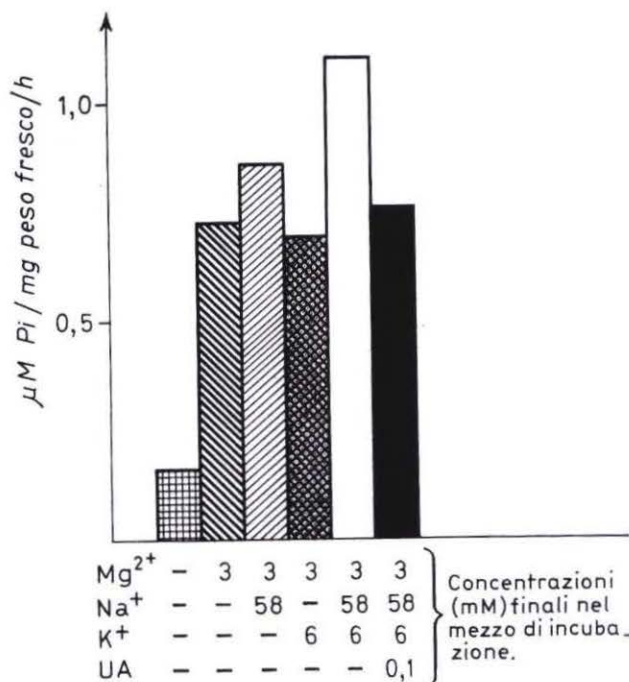


Fig. 1. — Attività ATP-asica di un omogenato di corda nervosa di *Periplaneta americana* espressa come µM di fosfato inorganico per mg di tessuto fresco per ora (ordinate). Il mezzo di incubazione era costituito da ATP 2mM, varie concentrazioni di cationi come sopra descritto e tampone imidazolo-HCl 60mM (pH 7,4).

Con queste premesse e allo scopo di chiarire la funzione della guaina nella regolazione della concentrazione ionica degli spazi extracellulari si è studiata l'attività ATP-asica di omogenati di guaina trattati similmente agli omogenati di corda e incubati per trenta minuti in presenza e in assenza di uabaina.

Nella Tab. 1 si riportano l'attività ATP-asiche sia di corde intere che di guaine toraciche. Nelle preparazioni di guaine non è stato possibile riconoscere un sistema

TABELLA 1.

Attività ATP-asica di omogenati di corda e di guaina toracica di «*Periplaneta americana*» (*)

Tessuto	Attività ATP-asica totale (**)	Attività ATP-asica uabaina insensibile (***)	Rapporto
Guaina toracica	2,1 ± 0,5 (5)	2,1 ± 0,4 (5)	~ 1
Corda nervosa	13,3 ± 0,8 (14)	9,4 ± 0,4 (14)	~ 1,4

(*) Media aritmetica ± deviazione standard. Valori espressi come µM di Fosfato inorganico per mg di tessuto per ora. Tra parentesi il numero delle preparazioni studiate.

(**) Condizioni sperimentali: Mg 3, Na 60, K 5, ATP 2 mM, tampone imidazolo-HCl pH 7,4, 80 mM.

(***) Condizioni sperimentali come le precedenti più uabaina 0,1 mM.

ATPasico sensibile all'uabaina nelle condizioni sperimentali sopra descritte. Infatti il rapporto tra l'attività ATPasica in presenza di Mg^{++} , Na^+ , K^+ e l'attività in presenza di Mg^{++} , Na^+ , K^+ e uabaina che per la corda nervosa è circa 1,4, per la guaina toracica è circa 1.

Gli esperimenti sopra riportati confermano la presenza di una attività ATPasica nella corda nervosa di blatta legata in parte alla contemporanea presenza degli ioni Na e K ed inibita dall'uabaina. Naturalmente, con il tipo di esperimento descritto l'esistenza diretta di una correlazione tra il trasporto attivo e l'attività Na , K ATPasica del tessuto nervoso, non è provata. È tuttavia lecito sostenere che l'ATP intervenga nel trasporto dei cationi dal momento che nella estrusione del Na dalla corda nervosa di blatta si possono distinguere una fase rapida e una lenta, quest'ultima sensibile al dinitrofenolo e al cianuro⁴.

A conferma dei risultati di NARAHASHI³, si può allora concludere che se il sistema enzimatico descritto si identifica con il meccanismo metabolico responsabile dell'ineguale distribuzione degli ioni ai lati della membrana, la conduzione dell'impulso nervoso può essere spiegata anche per gli insetti nei termini classici della teoria di Hodgkin e Huxley (HODGKIN⁶). Le proprietà della guaina che determinano una barriera alla libera permeabilità degli ioni, quasi si trattasse di una membrana funzionante all'inverso⁵ non sono attribuibili sulla scorta dei nostri risultati ad un sistema attivo di trasporto ATP dipendente.

Gli autori desiderano ringraziare la d.ssa V. d'Ajello per l'insostituibile aiuto prestato nella dissezione delle guaine, e il sig. S. Fiorentino per l'ottima organizzazione dell'allevamento di *P. americana*.

25 ottobre 1967.

ALFONSO GRASSO e ELVIRA SAMPAOLO
Laboratori di Parassitologia

¹ TREHERNE, J. E. *J. Exptl. Biol.* **39**, 193 (1962).

² TREHERNE, J. E. *J. Exptl. Biol.*, **42**, 7 (1965).

³ NARAHASHI, T. *Advan. Insect Physiol.*, **1**, 401 (1963).

⁴ TREHERNE, J. E. *The physiology of the Insect central nervous system*. Academic Press, New York & London, 1965, p. 21.

⁵ HOYLE, G. In: *The physiology of Insecta*. M. Rockstein, Ed., Academic Press, New York & London, 1964, vol. II, p. 408.

⁶ HODGKIN, A. L. In: *The conduction of the nervous impulse*. Ed. Liverpool University Press, Liverpool 1964.

⁷ GRASSO, A. *Life Sci.*, **6**, 1911 (1967).

⁸ SKOU, J. C. *Progr. Biophys.*, **54**, 131 (1964).

⁹ BONTING, S., N. M. HAWKINS & M. R. CANADY. *Biochem. Pharmacol.*, **13**, 13 (1963).

¹⁰ ROEDER, K. D. & E. A. WEIANT. In: *Methods of testing chemicals in insects*. H. H. Shepard Ed., Burgess Publishing Comp., Minneapolis, 1958, vol. I, p. 45.

¹¹ TWAROG, B. M. & K. D. ROEDER. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, **50**, 231 (1957).

¹² BAKER, P. F., A. L. HODGKIN & T. I. SHAW. *Nature*, **190**, 885 (1960).

Produzione di alcaloidi clavinici in coltura sommersa con un ceppo di *Claviceps* sp.

Sono stati isolati recentemente alcuni ceppi di *Claviceps* sp. da sclerozi raccolti in Africa in piante di *Sorghum* sp.¹.

Alcuni dei ceppi isolati producono in coltura sommersa in un terreno nutritivo costituito fondamentalmente da saccarosio e asparagina² elevate quantità di alcaloidi clavinici rappresentati come segue: canoclavina I 5 %, elimoclavina 65 %, penniclavina 5 %, agroclavina 7 %, setoclavina 10 %, altre clavine non identificate 8 %.

La produzione di alcaloidi è correlata anche in questo caso, analogamente a quanto è stato già descritto per la *C. fusiformis* Lov.³, alla presenza di forme di riproduzione asessuata nel brodo di coltura.

Si ringrazia sentitamente il Dr. M. C. Futrell, Ahamadu Bello University, Zaria, Nigeria, West Africa, per gli sclerozi che ci ha gentilmente inviato.

26 ottobre 1967.

MARIA BORELLA, RINALDO MERCANTINI,
NICOLA ODDO e ANTONIO TONOLO
*Laboratori di Chimica Biologica,
Centro Internazionale di Chimica Microbiologica*

¹ FUTRELL, M. C. & O. J. WEBSTER, *Rev. Appl. Mycol.*, **44**, N. 3342 (1965).

² STOLL, A., A. BRACK, A. HOFMANN & H. KOBEL, *U. S. Patent*, **2**, 809, 820 (1957).

³ TONOLO, A. & E. UDVARDY-NAGY (1967) (in corso di stampa)