

Diss. ETH No. 14785

**PHYTOCHEMICAL AND BIOLOGICAL INVESTIGATIONS ON
CLATHROTROPIS GLAUCOPHYLLA (FABACEAE),
AN INGREDIENT OF YANOMAMĪ CURARE,
EMPHASIZING ON QUINOLIZIDINE ALKALOIDS**

A dissertation submitted to the
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

Presented by
ANNE-LISE SAGEN

Pharmacist (University of Oslo, Norway)
born February 7, 1973
Norway

Accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Otto Sticher, examiner
Prof. Dr. Ihsan Çalıs, co-examiner
Prof. Dr. Gerd Folkers, co-examiner
Dr. Jörg Heilmann, co-examiner

Zurich 2002

SUMMARY

In the present study the bark of the Yanomamĩ curare plant, *Clathrotropis glaucophylla* Cowan, was investigated for its contents of secondary metabolites. *Clathrotropis* is a small genus of the Fabaceae family, with six species endemic to the tropical South America. They are small to medium trees with very large leaves, and the fruits are oblong and flat, with large seeds. *C. glaucophylla* was collected in the rainforests of the upper Orinoco in Venezuela in 1999. Ethnobotanical investigation has revealed that the species *C. glaucophylla* and *C. macrocarpa* (*wapu kohi*) are of great economic importance to the Yanomamĩ Amerindians in Venezuela, the seeds playing a significant role in alimentation, and the bark being used as ingredient of curare arrow poison.

Fractionation of the alkaloid and dichloromethane extracts of *C. glaucophylla* bark, by means of various chromatographic methods (VLC, CC, HPLC), led to the isolation of 27 natural compounds. From the alkaloid extract a new quinolizidine alkaloid, (-)-13 α -hydroxy-15 α -(1-hydroxyethyl)-anagyrine, ((-)-clathrotropine), was isolated together with eleven known quinolizidine alkaloids: (-)-anagyrine, (-)-thermopsine, (-)-baptifoline, (-)-epibaptifoline, (-)-rhombifoline, (-)-tinctorine, (-)-cytisine, (-)-*N*-methylcytisine, (-)-lupanine, (-)-6 α -hydroxylupanine and (+)-5,6-dehydrolupanine. The investigation of the dichloromethane extract led to the isolation of two new betulinic acid derivatives, 23-*O*-(4'-hydroxy-3'-methoxy-cinnamoyl)betulinic acid and 23-*O*-(4'-hydroxy-3',5'-dimethoxy-cinnamoyl)betulinic acid, one new α -pyrone, 5(*S*),6(*S*)-6-(2-hydroxy-1-methylpropyl)-3,5-dimethyl-5,6-dihydro-2H- α -pyrone, and one new isocoumarin, 6-hydroxy-8-methoxy-3-*n*-pentylisocoumarin, in addition to eleven known compounds which were identified as: betulinic acid, β -amyirin, glutinol, β -sitosterol, stigmasterol, 7 β -hydroxysitosterol, 7 β -hydroxystigmasterol, β -sitosterol-3-*O*- β -glucoside, stigmasterol-3-*O*- β -glucoside, 2'-*O*-methylevernic acid, and confluent acid.

Structure elucidation of the isolated compounds was carried out by means of spectroscopic, spectrometric and physical methods: 1D and 2D NMR experiments (^1H , ^{13}C , COSY, HSQC, HMBC, ROESY, HSQC-TOCSY and INADEQUATE), UV, MS, and $[\alpha]_{\text{D}}$.

This is the first phytochemical study on *C. glaucophylla*, which showed this plant to accumulate a great variety of quinolizidine alkaloids as well as triterpenes, sterols, depsides and isocoumarins. It is the first time quinolizidine alkaloids have been isolated

from an arrow poison ingredient, and it is also the first report on *Clathrotropis* species being used for arrow poison.

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rinde der Yanomamï Curarepflanze *Clathrotropis glaucophylla* Cowan auf ihre Inhaltsstoffe untersucht. *Clathrotropis* ist eine kleine Gattung aus der Familie der Fabaceae, mit sechs einheimischen Arten im tropischen Südamerika. Es handelt sich um kleine bis mittelgrosse Bäume mit sehr grossen Blättern. Die Früchte sind länglich und flach mit grossen Samen. Ethnobotanische Untersuchungen haben gezeigt, dass die Arten *C. glaucophylla* und *C. macrocarpa* (*wapu kohi*) ökonomisch sehr wichtig für die Yanomamï Indianer in Venezuela sind. Die Samen spielen eine bedeutsame Rolle in der Ernährung und die Rinde wird als Pfeilgiftbestandteil (Curare) verwendet.

Die Fraktionierung der Alkaloid- und Dichlormethanextrakte von *C. glaucophylla*, mittels verschiedener chromatographischer Methoden (VLC, CC, HPLC) führte zur Isolierung von 27 Naturstoffen. Aus dem Alkaloidextrakt wurde ein neues Chinolizidin-Alkaloid (-)-13 α -Hydroxy-15 α -(1-hydroxyethyl)-anagyrin, (-)-Clathrotropin isoliert, sowie elf schon bekannte Chinolizidin-Alkaloide: (-)-Anagyrin, (-)-Thermopsin, (-)-Baptifolin, (-)-Epibaptifolin, (-)-Rhombifolin, (-)-Tinctarin, (-)-Cytisin, (-)-*N*-Methylcytisin, (-)-Lupanin, (-)-6 α -Hydroxylupanin und (+)-5,6-Dehydrolupanin. Die Untersuchung des Dichlormethanextraktes führte zur Isolierung von zwei neuen Betulinsäurederivaten: 23-*O*-(4'-Hydroxy-3'-methoxy-cinnamoyl)-betulinsäure und 23-*O*-(4'-Hydroxy-3',5'-dimethoxy-cinnamoyl)-betulinsäure, einem neuen α -Pyrone (5(*S*),6(*S*)-6-(2-Hydroxy-1-methylpropyl)-3,5-dimethyl-5,6-dihydro-2H- α -pyrone) und einem neuen Isocoumarinderivat (6-Hydroxy-8-methoxy-3-*n*-pentylisocoumarin), sowie elf bekannten Substanzen, die als Betulinsäure, β -Amyrin, Glutinol, β -Sitosterol, Stigmasterol, 7 β -Hydroxysitosterol, 7 β -Hydroxystigmasterol, β -Sitosterol-3-*O*- β -glucosid, Stigmasterol-3-*O*- β -glucosid, 2'-*O*-Methylevernicensäure und Confluenticsäure identifiziert wurden.

Die Strukturaufklärung erfolgte mittels 1D und 2D NMR (^1H , ^{13}C , COSY, HSQC, HMBC, ROESY, HSQC-TOCSY and INADEQUATE) und UV-Spektroskopie, Massenspektrometrie, sowie optische Drehung.

Es handelt sich hier um die erste phytochemische Untersuchung von *C. glaucophylla*. Sie zeigt, dass die Pflanze eine grosse Fülle verschiedener Chinolizidin-Alkaloide, sowie Triterpene, Sterole, Depside und Isocoumarine akkumuliert. Dies ist das

erste Mal, dass Chinolizidin-Alkaloide aus einer Pfeilgiftpflanze isoliert wurden. Ferner ist es der erste Bericht, dass *Clathrotropis*-Arten zur Herstellung von Pfeilgiften verwendet werden.