

Properties of O-rhamnosyl-6-C-xylosylapigenin (III).* NMR of TMS ether of III in CDCl_3 (ppm): H-2'6', 7.65(d, $J = 8.5$); H-3'5', 6.8(d, $J = 8.5$); H-8, 6.35(s); H-3, 6.25(s); H-1 rhamnose, 4.9(br.s); H-1 xylose, centred at 4.6; sugar signals, 2.8–4.0; rhamnose- CH_3 , 0.85 (d, $J = 9$). NMR of acetate of III in CDCl_3 (ppm): H-2'6', 7.8(d, $J = 8.5$); H-3'5', 7.2(d, $J = 8.5$); H-8, 7.25(s); H-3, 6.56(s); sugar signals 3.3–5.5; 4',5',7-aromatic acetyls, 2.56, 2.4, 2.3; sugar acetyls, 2.08, 2.01 (two), 1.9, 1.86; rhamnose- CH_3 , 0.6(d, $J = 7$).

Acknowledgements—We wish to thank the Robert A. Welch Foundation (Grant F-130), the National Science Foundation (Grant 5548X), and the National Institutes of Health (Grant HD 04488) for financial support and Dr. Wazahat Hussain, Department of Botany, Aligarh Muslim University for assistance.

* The R_f s of 6- and 8-C-xylosides are quite different in 15% HOAc:

	6-C-Xyloside	8-C-Xyloside
Apigenin	0.37	0.26
Luteolin	0.23	0.12

Phytochemistry, 1971, Vol. 10, pp. 679 to 682. Pergamon Press. Printed in England.

PRIMULACEAE

UN NOUVEL EXEMPLE DE DÉRIVÉ NITRÉ D'ORIGINE NATURELLE: LE NITRO-3 MÉTHYL-5 GENTISATE DE MÉTHYLE, EXTRAIT DES RACINES DE *PRIMULA ACAULIS*

A. GORIS, P. FRIGOT, D. MOLHO, J. AKNIN, P. MULLER et M. CIBAUT

Laboratoire de Matière médicale et Botanique,
Faculté mixte de Médecine et de Pharmacie, 80-Amiens et Laboratoire de Chimie
(associé au C.N.R.S.), Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France

(Received 30 April 1970, in revised form 19 June 1970)

Résumé—Présence dans les essences d'organes souterrains de la Primevère des jardins (*Primula acaulis* Jacq.) du nitro-3 méthyl-5 gentisate de méthyle.

Abstract—5-Methyl-3-nitrogentisic acid methyl ester was identified in the roots of *Primula acaulis* Jacq.

INTRODUCTION

DANS un travail antérieur, deux d'entre nous¹ ont montré qu'une essence obtenue à partir de rhizomes d'une variété cultivée de *Primula acaulis*, après macération et hydrolyse enzymatique, renfermait en majorité de l'hydroxy-2 méthoxy-5 benzoate de méthyle (ou méthyl-5 gentisate de méthyle) puis, en quantités moindres, de l'hydroxy-2 méthoxy-4 benzoate de méthyle, du salicylate de méthyle, de l'hydroxy-2 méthoxy-4 acétophénone, de l'hydroxy-2 méthoxy-5 acétophénone et enfin des traces d'un produit coloré en jaune.

Nous avons pu obtenir, à partir d'un lot important de racines de *Primula*, des quantités suffisantes (0,5 g) de ce composé jaune (I) pour en déterminer la structure, objet du présent travail.

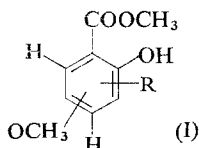
¹ P. FRIGOT et A. GORIS, *Ann. Pharm. Franc.* **26**, 287 (1968).

RESULTATS ET DISCUSSION

(I) [Lamelles jaunes (F 137°)] est insoluble dans l'eau et les acides, soluble dans les bases avec une coloration orangée et donne une réaction gris-vert au perchlorure de fer. Son spectre de masse (pic moléculaire $m/e = 227$) et son analyse élémentaire conduisent à la formule brute $C_9H_9NO_6$. Le spectre de RMN indique la présence d'un OH chélaté [δ (TMS): 11,60 ppm] disparaissant en présence d'acide trifluoracétique, de 2 OCH_3 (s 3H à δ : 3,87 et 4,03 ppm) confirmés par le dosage, et de 2 protons indéterminés (s à δ : 7,86 ppm). Enfin le spectre I.R. (KBr) (1675 et 1613 cm^{-1}) suggère un CO chélaté.

Par acétylation (I) conduit à un monoacétate (II), insoluble dans les alcalis, à perchlorure de Fe négatif. En i.r. apparaît la bande OAc (1764 cm^{-1}), une bande CO (1724 cm^{-1}) caractéristique d'une fonction lactone ou ester. En RMN, l'apparition de 2 d (δ : 7,85 ppm, $J = 3\text{ Hz}$) et (δ : 7,95 ppm, $J = 3\text{ Hz}$) définit les 2 protons indéterminés de (I) comme étant aromatiques et en *méta* l'un de l'autre.

(I) Après saponification donne un acide (III), dont le spectre de RMN n'indique qu'1 OCH_3 , un des 2 OCH_3 de (I) est donc sous forme d'ester méthylique. On peut donc écrire la formule suivante pour (I)

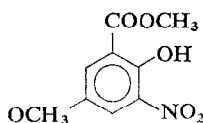


R déduit de la formule brute est égal à NO_2 .

Etant donné la rareté des dérivés nitrés naturels dans les Végétaux supérieurs, nous avons voulu prouver chimiquement la réalité du groupement NO_2 . Par hydrogénation catalytique (Pd/C) (I) donne une amine aromatique (IV), soluble dans HCl (RMN: m NH_2 8,37–4,3 ppm, disparaissant par addition de D_2O). On ne retrouve pas dans le spectre i.r. les bandes à 1520 et 1342 cm^{-1} attribuables à NO_2 aromatique² et qui étaient présentes dans les spectres de (I), (II) et (III).

Quatre structures sont dès lors possibles: (Ia) nitro-3 hydroxy-2 méthoxy-5 benzoate de méthyle; (Ib) nitro-4 hydroxy-2 méthoxy-6 benzoate de méthyle; (Ic) nitro-6 hydroxy-2 méthoxy-4 benzoate de méthyle; (Id) nitro-5 hydroxy-2 méthoxy-3 benzoate de méthyle. Si (I) avait la structure (Ib), son produit de méthylation (V) serait symétrique et les 2 H caractérisés en RMN par 1 singulet. Or, le spectre de RMN de (V) montre 2 d H (δ : 7,65, $J = 3,5\text{ Hz}$ et 7,74 ppm, $J = 3,5\text{ Hz}$). (Ib) est donc à rejeter. C'est par une méthode synthétique que nous avons pu identifier (I) à (Ia) et par suite éliminer les possibilités (Ic) et (Id).

Par nitration de l'acide gentisique selon la méthode de Klemenc,³ nous avons obtenu l'acide nitro-3 gentisique (VI), identique (P F mélangé non abaissé, spectres u.v. et i.r. superposables) au produit de déméthylation par BrH de (I). Donc (I) a la structure suivante:



² S. KUPCHAN et H. WORMSER, *J. Org. Chem.* **30**, 3933 (1965).

³ A. KLEMENC, *Monatsch. Chem.* **33**, 1250 (1912).

L'étude de RMN nous a permis de confirmer que la nitration de l'acide gentisique, au cours de la réaction de Klemenc, se faisait bien en position 3.

La mise en évidence de produits naturels nitrés est relativement récente, elle date de 1949 avec la détermination de la structure du chloramphénicol,⁴ isolé à partir de *Streptomyces venezuelae* et de celle de l'acide hiptagénique (acide nitro-3 propionique) extrait sous forme de glucoside de certains Végétaux supérieurs: *Hiptage mandablota* Gaert. (Malpighiacées), *Corynocarpus laevigata* (Anacardiacees), etc. . . .

Mais ce sont des dérivés nitrés aliphatiques et il a fallu attendre les travaux effectués sur les acides aristolochiques⁵⁻⁷ pour trouver, chez les Végétaux supérieurs (Aristolochiacées), des dérivés nitrés sur un noyau de type phénanthrénique.

Le nitro-3 méthyl-5 gentisate de méthyle isolé d'une Primulacée est un nouvel exemple d'un dérivé nitré aromatique naturel. La présence simultanée de méthyl-5 gentisate de méthyle dans la racine suggère que ce dernier composé pourrait être le précurseur du produit nitré (la nitration par voie chimique de celui-ci s'effectue bien en position 3). Des recherches biogénétiques seraient nécessaires pour vérifier cette hypothèse, d'autant qu'avec les acides aristolochiques, par exemple, il a été montré que le groupement NO₂ dérive du groupement NH₂ de la tyrosine⁸ par une oxydation ultérieure et que la nitration directe n'est guère possible.

PARTIE EXPERIMENTALE*

Extraction du Nitro-3 Methyl-5 Gentisate de Méthyle (I)

5 kg de racines de *Primula acaulis* Jacq. sont finement hachées et mises à macérer 48 hr dans 10 l. d'eau. On ajoute 5 l. d'eau, de l'antimousse et on distille. L'essence entraînée est extraite par CHCl₃ puis récupérée par distillation du solvant. (I) (0,55 g) se dépose sur les parois du réfrigérant. On le reprend par de l'alcool, on recristallise dans le méthanol. F: 137°5. Analyse (Tr : C: 47,60, H: 3,95, O: 42,27, N: 6,18, OCH₃: 26,27, C₉H₉NO₆; Calc.: C: 47,57, H: 3,96, O: 42,29, N: 6,16, OCH₃: 27,31). Spectres i.r., RMN (voir texte) Spectre masse = m/e (%) M⁺ 227 (60), 196 (17), 195 (100), 179 (8), 165 (5), 149 (7), 137 (22), 93 (21), 79 (7) 78 (8), 59 (6), 51 (7), 50 (7).

Dérivés Caractéristiques

Acétoxy-2 nitro-3 méthoxy benzoate de méthyle (II). (I) traité par Ac₂O/pyridine donne (II), recristallisé dans l'alcool, F: 78° i.r. (voir texte). RMN δ = 2,44 (s.3H — COCH₃), 4 (s.6H — 2OCH₃) ppm. Spectre masse m/e (%) M⁺ 269 (40), 238 (3), 227 (88), 195 (100), 179 (10), 149 (10), 137 (25), 109 (4), 93 (20), 59 (15), 53 (20), 43 (85).

Acide hydroxy-2 nitro-3 méthoxy-5 benzoïque (III). 20 mg de (I) saponifiés par KOH méthanol. À 5% donnent 15 mg de (III). Recristallisés dans l'eau. F: 183° (litt.³ 181°). i.r. (KBr): 3590 (OH), 3510 (OH arom), 1690 (CO), 1520-1342 (NO₂) cm⁻¹. RMN: δ = 3,98 (s.3H — OCH₃), 6,10 — 7,00 (m.H — COOH), 7,95 (t.2H arom. — J = 3,5 Hz) ppm.

Hydroxy-2 amino-3 méthoxy-5 benzoate de méthyle (IV). 20 mg de (I) en sol. dans l'éthanol (5 cm³) sont hydrogénés pendant 1 hr (avec 10 mg de Pd/C) à pression ordinaire. On filtre. On lave à l'alcool chaud. Après évaporation et recristallisation dans alcool-eau. F: 88-89° i.r. RMN (voir texte). Spectre masse = m/e (%) M⁺ 197 (40), 165 (90), 149 (18), 137 (30), 109 (7), 94 (100).

Diméthoxy-2,5 nitro-3 benzoate de méthyle (V). 10 mg de (I) en sol. dans l'éther anhydre sont traités 1 nuit par une sol. étherée de diazométhane. 10 mg de (V) après recristallisation dans benzène/éther de pétrole. F:

* Les spectres de RMN ont été effectués sur Varian A60. TMS référence interne; les spectres de masse sur Thomson-CSF. TSN 208 (double focalisation—introduction directe)

⁴ J. CONTROULIS, M. C. REBSTOCK et H. M. CROOKS, JR., *J. Am. Chem. Soc.* **71**, 2463 (1949).

⁵ M. PAILER et A. SCHLEPPNIK, *Med. J. Chem.* **88**, 367 (1957).

⁶ M. PAILER et P. BERGTHALLER, *Med. J. Chem.* **98**, 579 (1967).

⁷ S. KUPCHAN et J. MERIANOS, *J. org. Chem.* **33**, 3735 (1968).

⁸ F. CONIER, H. TIWARI et J. SPENSER, *Can. J. Chem.* **47**, 481 (1969).

73–74° (F mélangé avec échantillon auth.³ non abaissé). i.r.: 1740 (CO), 1520–1342 (NO₂) cm⁻¹. RMN (voir texte) et δ = 3,98 (s. 3H — OCH₃), 4,05 (s. 6H — OCH₃) ppm.

Acide dihydroxy-2,5 nitro-3 benzoïque (ou acide nitro-3 gentisique) (VI). 20 mg de (I) sont déméthylés dans cm³ de HBr à 48 % pendant 1 hr à ébullition. On ajoute 10 cm³ d'eau glacée, on extrait à l'éther. L'éther est ensuite extrait par une solution de bicarbonate de Na à 5 %. Après acidification, on isole 10 mg de (VI). Recristallisé dans l'eau, F: 226–228° (P.F. non abaissé en mélange avec échantillon préparé par synthèse selon Klemenc³). I.r. superposable (KBr): 3500 (OH), 1680 (CO), 1520–1342 (NO₂) cm⁻¹. Spectre masse: *m/e* (%) M⁺ 199 (25), 181 (100), 165 (5), 135 (10), 123 (5), 107 (8), 95 (15), 79 (20), 53 (25).

Phytochemistry, 1971, Vol. 10, pp. 682 to 685 Pergamon Press. Printed in England.

RUTACEAE

A QUATERNARY TETRAHYDROPROTOBERBERINE ALKALOID FROM *FAGARA CAPENSIS*

J. M. CALDERWOOD,* N. FINKELSTEIN,† F. FISH and R. T. PARFITT‡

Division of Pharmacognosy and Forensic Science, Department of Pharmaceutical Chemistry,
University of Strathclyde, Glasgow, C.1, Scotland

(Received 10 March 1970, in revised form 20 June 1970)

Abstract—The quaternary tetrahydropprotoberberine alkaloid, (—)-*N*-methyltetrahydropalmatine, has been isolated from the stem bark of *Fagara capensis* Thunb. This is the first report of the isolation of this alkaloid from a natural source

INTRODUCTION

IN AN earlier communication¹ the presence of the furoquinoline alkaloid, skimmianine and of the benzophenanthridine alkaloids, chelerythrine and nitidine, was reported in the stem and root barks of *Fagara capensis* Thunb. (Rutaceae). We now report the isolation and characterization of a quaternary tetrahydropprotoberberine alkaloid, (—)-*N*-methyltetrahydropalmatine, (I), from the stem bark of this species. Previously, (—)- α -canadine methochloride was the only tetrahydropprotoberberine alkaloid reported in the genus *Fagara*^{2–5} and the closely allied genus *Zanthoxylum*.⁶ The tertiary bases, (+)-tetrahydropalmatine and (±) tetrahydropalmatine, have been reported in the genus *Corydalis* (Papaveraceae) and (—)-tetrahydropalmatine from *Stephania* (Menispermaceae),⁷ but this is the first isolation of (—)-*N*-methyltetrahydropalmatine from a natural source.

* Present address: Analytical Research Department, Glaxo Laboratories, Greenford, Middlesex.

† Present address: Department of Pharmacy, Science and Paramedical Studies, Cape Technical College, Cape Town, South Africa.

‡ Present address: Chemical Research Department, The Pfizer Group, Sandwich, Kent.

¹ J. M. CALDERWOOD, N. FINKELSTEIN and F. FISH, *Phytochem* **9**, 675 (1970)

² H. A. D. JOWETT and F. L. PYMAN, *J. Chem. Soc.* **103**, 290 (1913).

³ J. R. CANNON, G. K. HUGHES, E. RITCHIE and W. C. TAYLOR, *Australian J. Chem.* **6**, 86 (1953).

⁴ J. M. CALDERWOOD and F. FISH, *Chem. Ind.* 237 (1966).

⁵ A. T. AWAD, J. L. BEAL, R. W. DOSKOTCH and J. TOMKO, *Lloydia* **30**, 231 (1967).

⁶ J. A. DIMENT, E. RITCHIE and W. C. TAYLOR, *Australian J. Chem.* **20**, 565 (1967).

⁷ P. W. JEFFS, in *The Alkaloids* (edited by R. H. F. MANSKE), Vol. 9, p. 41, Academic Press, New York (1967).