

9. Jensen, S. R. und Nielsen B. J. (1973) *Act. Chem. Scand.* **27**, 2661.
10. Fischer, E. (1895) *Ber. Deut. Chem. Ges.* **28**, 1508.
11. *Beilstein's Handbuch der org. Chemie*, 4.Aufl., Bd. 31 (1938) p. 238, Springer Verlag, Berlin.
12. Secor, J. B., Conn, E. E., Dunn, J. E., Seigler, D. S. (1976) *Phytochemistry* **15**, (in press).

Phytochemistry, 1976, Vol. 15, p. 1984 Pergamon Press. Printed in England.

PRUNASIN AND AMYGDALIN FROM *SORBUS COMMIXTA*

KIYOKAZU TAKAISHI and HIROSHI KUWAJIMA
Faculty of Pharmacy, Kinki University, Higashiosaka, Japan

(Revised received 19 June 1976)

Key Word Index—*Sorbus commixta*; Rosaceae; prunasin; amygdalin; UV light hydrolysis; gentiobiose.

Plant. *Sorbus commixta* Hedl. (*S. aucuparia* var. *japonica* Max.) Rosaceae. *Previous work.* Prunasin was detected from *Sorbus aucuparia* by PC [1]. *Present work* Fresh plants of *Sorbus commixta* (2.7kg) were extracted with MeOH, the MeOH extract evaporated to dryness, and the residue extracted with water. The aqueous solution was extracted with Et₂O. From the Et₂O extract prunasin (1) was obtained (0.5% for seeds, 0.01% for leaves, 0.05% for barks, 0.003% for roots). 1 was recrystallized from EtOAc to give crystals, mp 147–148°, $[\alpha]_D^{20} - 27.2^\circ$. 1 was identified by mp, GLC, UV, IR and NMR. The aqueous solution (70g) was chromatographed over charcoal using 10–20% EtOH. The residue obtained from 20% EtOH fraction on rechromatography over Si gel using EtOAc–MeOH (4:1) gave amygdalin (2) (0.007g). 2 was identified by mp GLC, UV, IR and NMR. This is the first isolation of 2 in crystalline form from

Sorbus species. 2 was hydrolyzed by a new method developed by us [2,3]. Then, 2 (200 mg) in 0.2N H₂SO₄ (20 ml) was hydrolyzed by irradiating it with UV light (from a low voltage UV lamp, 120 W) for 3 hr at room temp. (20°) to give gentiobiose (10%) which was identified by TLC and GLC. Conventional acid hydrolysis of 2 gave 2 mol of glucose.

REFERENCES

1. Sendra, J., Oswiecimska, M. and Janeczko, Z. (1971) *Dissert. Pharm. Pharmacol.* XXIII, 1.
2. Takaishi, K., Kuwajima, H., Uematsu, M., Yaku, M. and Hatano, H. (1973) *Annual Meeting Japanese Society of Pharmacognosy*, 30.
3. Takaishi, K. and Kuwajima, H. (1975) *The 94th Annual Meeting Pharmaceutical Society of Japan*, II, 209.

Phytochemistry, 1976, Vol. 15, pp. 1984–1986. Pergamon Press. Printed in England

L- γ -GLUTAMYL-2-AMINO-3-HEXANONE DANS *RUSSULA OCHROLEUCA**

ANDRÉ WELTER†, JOSEPH JADOT†, GASTON DARDENNE†, MICHEL MARLIER† et
JEAN CASIMIR†

†Chimie Organique, Université de Liège, 1 bis, quai Roosevelt 4000 Liège; ‡Chimie Organique et Biologique, Faculté des Sciences Agronomiques, 5800 Gembloux, Belgique

(Received 5 June 1976)

Key Word Index—*Russula ochroleuca*; Basidiomycete; new aminoketone; L- γ -glutamyl-2-amino-3-hexanone.

Abstract—A new peptide, L- γ -glutamyl-2-amino-3-hexanone has been isolated from a mushroom *Russula ochroleuca*. The suggested structure is supported by ¹H and ¹³C NMR spectroscopy. It is the first natural α -aminoketone associated with glutamic acid.

Ce travail s'inscrit dans une série d'études sur la répartition des acides aminés et peptides libres des champignons*. Un nombre important de γ -glutamylamines ont été isolées du règne végétal [1]. Dans les Basidiomycètes, leur répartition est cependant plus limitée. Citons une

nouvelle substance, la γ -glutamyl-4-hydroxybenzène trouvée récemment par Weaver *et al.* [2] dans *Agaricus bisporus* et qui n'est autre que la γ -glutamyl-4-hydroxy-aniline isolée par Casimir *et al.* [3] en 1960 à partir de *A. hortensis*. *A. bisporus* contient aussi la γ -glutamyl-4-hydroxyméthylphénylhydrazine [4] tandis que la γ -glutamyl-4-formylphénylhydrazine et la γ -glutamyltyramine ont été identifiées dans *A. subrufescens* [5]. Un dérivé d'amine très simple a été trouvé dans *Xerocomus badius*, il s'agit de la γ -glutamyléthylamine [6].

* Casimir, J.; Jadot, J.; Dardenne, G. Publ. 10 Acides aminés et peptides des champignons. Publ. 9 voir Dardenne *et al.* (1974) *Phytochemistry* **13**, 1897.

La présente étude nous a permis d'isoler de *Russula ochroleuca* un nouveau dérivé de l'acide glutamique: la γ -glutamyl-2-amino-3-hexanone. La configuration du groupe méthyle en C₆ n'a pas été déterminée. C'est la première fois que nous pouvons identifier un dérivé de l'acide glutamique et d'une α aminocétone primaire, composé peu stable et rarement isolable [7].

RESULTATS ET DISCUSSION

La 2D-PC de la fraction soluble dans l'éthanol aqueux de *R. ochroleuca* a révélé la présence d'un spot non identifiable, bleu-violet avec la ninhydrine, migrant au front du phénol et au niveau de la phénylalanine au butanol. Par HVE à pH 3.6, la substance est neutre. Elle est particulièrement sensible à l'hydrolyse acide et elle se scinde en acide glutamique et en un produit inconnu basique par HVE à pH 3.6. Ce dernier migre plus au butanol que ne le font généralement les acides aminés provenant de l'hydrolyse d'un glutamyl-dipeptide (R_f , voir partie expérimentale). Après purification de l'extrait sur une colonne de Lewatit S 1080, les acides aminés aromatiques et une grande partie de la substance inconnue ont été adsorbés sur une colonne de charbon préparée suivant la méthode de Partridge [8]. Après désorption, ces composés ont été fractionnés sur une colonne de Lewatit M 5080, AcO⁻. Le nouveau produit est élué avant la phénylalanine et la tyrosine. Il est recristallisé dans un mélange H₂O-EtOH.

L'analyse élémentaire et la détermination du poids moléculaire par osmométrie conduisent à la formule moléculaire C₁₁H₂₀O₄N₂. Le test de Rydon-Smith [9] indique l'existence d'une fonction -CONH-. La substance possède une fonction α NH₂ [10]. L'hydrolyse par HCl 1 N fournit l'acide L-glutamique et une substance instable, à caractère basique. Le spectre IR du composé (KBr) montre à côté des vibrations caractéristiques des acides aminés, les vibrations correspondant à une fonction amide aliphatique à chaîne ouverte: ν_{NH} (cm⁻¹) 3290 (w), 3270 (m), 1535 (m); $\nu_{\text{C=O}}$ (cm⁻¹) 1640 (s). Une absorption intense à 1718 cm⁻¹ indique la présence d'une fonction cétone aliphatique. Ces divers arguments

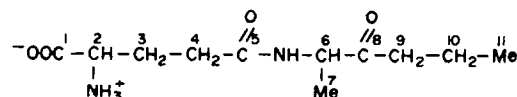


Fig. 1.

ainsi que les résultats de la spectroscopie ¹H et ¹³C RMN (voir Tableaux 1 et 2) permettent de proposer pour ce dérivé de l'acide glutamique la formule représentée à la Fig. 1. Dans les spectres de ¹H RMN (voir Tableau 1), les protons du groupe glutamyle sont facilement repérés par la variation de leur déplacement chimique lors du passage en milieu acide [11]. Le déplacement du proton H₆ uniquement couplé avec les protons H₇ du groupe méthyle correspond à celui d'un proton situé sur le groupe méthine voisin du NH- de la fonction amide. Les autres résonances H₉, H₁₀ et H₁₁ caractérisent un groupe propyle fixé sur le carbone cétonique. L'examen des spectres de ¹³C RMN (voir Tableau 2) et des spectres découplés "hors résonance" ainsi que les valeurs des déplacements chimiques permettent de déterminer la présence de 3 groupes carbonyles, 2 groupes méthyles, 4 groupes méthyléniques et 2 groupes méthynes. La résonance à 214 ppm est caractéristique d'une cétone aliphatique [12]. Les résonances à 173.2 ppm et 173.6 ppm correspondent respectivement à un carbonyle amide [13] et à un carboxyle α acide aminé d'un groupe glutamyle [13-15]. Ce carboxyle présente le déplacement attendu vers les champs faibles par protonation en milieu acide [14, 15]. Les résonances des autres atomes de C du groupe glutamyle sont également attribuées grâce à la variation de leur déplacement chimique. Le C méthyne C₆ résonne à champ faible ce qui fixe sa position sur le NH amide et en α de la fonction cétone. Le C méthylénique C₉ est également déblindé par le groupe C=O adjacent. Par les courbes de dichroïsme circulaire, nous avons observé un effet Cotton négatif vers 280 nm qui indique la présence d'un groupe carbonyle "asymétriquement perturbé". L'effet Cotton positif important vers 215 nm, plus intense en milieu acide qu'en milieu basique est caractéristique d'un L acide aminé [16, 17].

Tableau 1. ¹H RMN. Déplacements chimiques et constantes de couplage*

	H ₂	H ₃ (2)	H ₄ (2)	H ₆	H ₇ (3)	H ₉ (2)	H ₁₀ (2)	H ₁₁ (3)
δ (D ₂ O)	3,80 (t)	2,20 (mnr)	2,48 (mnr)	4,46 (q)	1,38 (d)	2,67 (t)	1,63 (s)	0,93 (t)
δ (D ₂ O + TFA)	4,20	2,33	2,67	4,47	1,39	2,67	1,63	0,93
J (en Hz)	$J_{\text{H}_2-\text{H}_3}$	≈ 6			$J_{\text{H}_6-\text{H}_7}$	$\approx 7,5$		
		$J_{\text{H}_9-\text{H}_{10}} \approx J_{\text{H}_{10}-\text{H}_{11}} \approx 7,5$						

* Les constantes de couplage et les déplacements chimiques du composé en solution dans D₂O et dans D₂O + TFA ont été déterminés sur un spectromètre JEOL 100 MHz. Les déplacements chimiques sont donnés en ppm par rapport au 2,2,3,3-tétradeutério -3-(triméthylsilyl) propionate de Na. Les symboles d, t, q, s, mnr signifient respectivement doublet, triplet, quadruplet, sextuplet, multiplet non résolu.

Tableau 2. ¹³C RMN. Déplacements chimiques*

	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈	C ₉	C ₁₀	C ₁₁
δ (D ₂ O)	173,6	54,8	27,0	31,9	173,2	55,4	16,1	214,0	41,3	17,6	13,9
δ (D ₂ O + TFA)	170,7	52,8	26,3	31,6	173,2	55,4	16,1	214,0	41,3	17,6	13,9

* Les spectres du composé en soln dans D₂O et dans D₂O + TFA ont été enregistrés sur un spectromètre BRUKER 22,63 MHz. Les déplacements chimiques sont donnés en ppm par rapport au TMS.

PARTIE EXPERIMENTALE

Isolement de la L-γ-glutamyl-2-amino-3-hexanone. 2.6 kg de *R. ochroleuca* frais ont été broyés et extraits par de l'alcool à 95%. L'extrait filtré a été purifié sur une colonne de Lewatit S 1080, H⁺ et les acides aminés ont été extraits par la pyridine 1 N. Les acides aminés aromatiques et le peptide ont été adsorbés sur une colonne de charbon traité par la méthode de Partridge. Après désorption, le mélange (0.5 g) a été fixé sur une colonne de Lewatit M 5080, forme AcO⁻, 100–200 mesh, 4.5 × 95 cm. Par élution avec HOAc 0.5 N, le peptide passe avant les acides aminés aromatiques. (118 mg). C, 54.1; H, 8.37; N, 11.42. Calc. pour C₁₁H₂₀O₄N₂: C, 54.08; H, 8.25; N, 11.47%. IR: $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ 3290 (w), 3270 (m), 3065 (m), 2960 (m), 1718 (s), 1640 (s), 1585 (s), 1535 (m), 1450 (m), 1408 (s), 1250 (m), 1122 (m), 1030 (m) cm⁻¹.

Méthodes d'analyses. La chromatographie sur papier Whatman 3 MM a été réalisée en utilisant comme solvant le mélange *n*-BuOH–HCOOH–H₂O (15:3:2) et le phénol saturé par un tampon à pH 4.2. Les R_f pour le dérivé, l'α aminocétone et l'acide glutamique sont respectivement: BuOH, 0.52; 0.63; 0.23; Phénol, 0.91; 0.77; 0.26.

Remerciement—Nous tenons à remercier le Professeur P. Heinemann, Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux et Mr. Marchal, Couvin pour la récolte et la détermination du champignon. Les spectres RMN ont été pris au service de Monsieur le Professeur Krief, Faculté Notre Dame de la Paix à Namur. Nous l'en remercions très sincèrement.

REFERENCES

1. Fowden, L. (1970) in *Progress in Phytochemistry* (L. Reinhold and Y. Liwschitz, eds.) vol. 2, p. 203. Wiley, London.
2. Weaver, R. F., Rajagopalan, K. V., Handler, P., Rosenthal, D. and Jeffs, R. W. (1971) *J. Biol. Chem.* **246**, 2010.
3. Jadot, J., Casimir, J. and Renard, M. (1960) *Biochim. Biophys. Acta* **43**, 322.
4. Levenberg, B. (1961) *J. Am. Chem. Soc.* **83**, 503.
5. Doyle, R. R. and Levenberg, B. (1967) *Fed. Proc.* **26**, 2.
6. Casimir, J., Jadot, J. and Renard, M. (1960) *Biochim. Biophys. Acta* **39**, 462.
7. Grignard, V. (1941) *Traité de Chimie Organique*, vol. 12, p. 703. Masson Eds, Paris.
8. Partridge, S. M. (1949) *Biochem. J.* **44**, 521.
9. Rydon, H. N. and Smith, P. W. G. (1952) *Nature* **169**, 922.
10. Larsen, P. O. and Kjaer, A. (1960) *Biochim. Biophys. Acta* **38**, 148.
11. Roberts, G. E. K. and Jardetzky, D. (1970) *Advan. Protein Chem.* **24**, 447.
12. Jackman, L. M. & Kelley, D. P. (1970) *J. Chem. Soc. (B)* 102.
13. Voelter, W., Jung, G., Breitmaier, E. and Bayer, E. (1971) *Z. Naturforsch.* **26B**, 213.
14. Horsley, W. J. and Sternlicht, H. (1969) *J. Am. Chem. Soc.* **90**, 3738.
15. Horsley, W. J., Sternlicht, H. and Cohen, J. S. (1970) *J. Am. Chem. Soc.* **92**, 680.
16. Crabbe, P. (1965) *Optical Rotatory Dispersion and Circular Dichroism in Organic Chemistry*, Chapt. 11. Holden-Day, San Francisco.
17. Dirks, I. P. and Sixma, F. L. J. (1970) *Tetrahedron* **26**, 5953.

Phytochemistry, 1976, Vol. 15, pp. 1986–1987. Pergamon Press Printed in England.

THE STRUCTURE OF PARISHIN, A GLUCOSIDE FROM *VANDA PARISHII**

JAN DAHMÉN† and KURT LEANDER‡

†Department of Organic Chemistry, Arrhenius Laboratory, University of Stockholm, S-104 05 Stockholm; ‡Department of Toxicology, Swedish Medical Research Council, Karolinska Institute, S-104 01 Stockholm 60, Sweden

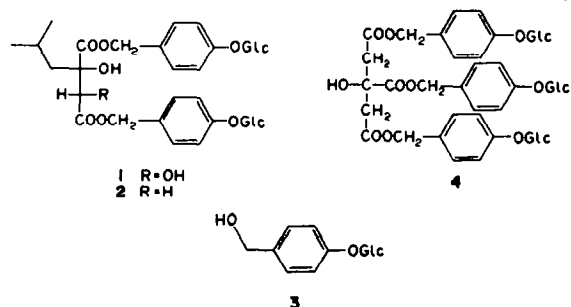
(Received 31 May 1976)

Key Word Index—*Vanda parishii*; Orchidaceae, glucoside, parishin.

Abstract—Two new glucosides, tris [4-(β-D-glucopyranosyloxy)benzyl] citrate, named parishin, and 4-(β-D-glucopyranosyloxy)benzyl alcohol have been isolated from *Vanda parishii*. The latter compound may, however, be an artefact formed from parishin.

In a recent communication [2] Aasen *et al.* reported that the glucosides loriglossine (1) and militarine (2), both of which are found in *Orchis militaris* L., are diesters of 4-(β-D-glucopyranosyloxy)benzyl alcohol (3) and (2R,3S)-2-isobutyltartaric acid and (R)-2-isobutylmalic acid respectively. We now report the occurrence in *Vanda parishii* of a new glucoside, named parishin (4), which is shown to be the triester of citric acid and 3. Besides parishin (4), the glucoside 3 was isolated from the methanolic extract, but this substance may be an artefact formed from 4 during the isolation procedure.

The glucosides 3 and 4 were isolated from a methanolic extract by chromatography on silica gel followed by



* Part 7 in the series "Studies on Orchidaceae Glucosides". For part 6 see ref. [1].