

Acknowledgements—The authors wish to thank Dr. Kraub (Martin Luther University, G.D.R.) for providing the authentic sample of albizziine and Prof. L. Fowden (Rothamsted Experimental Station, U.K.) for supplying the seed samples of *D. englerianum*, *D. guineense* and *D. dinklagei*. They also thank the Director, Ceylon Institute of Scientific and Industrial Research for providing the facilities to carry out this work.

REFERENCES

1. Gmelin, R., Strauss, G. and Hasenmaier, G. (1958) *Z. Naturforsch.* **13b**, 252.
2. Krauss, G. J. and Reinbothe, H. (1973) *Phytochemistry* **12**, 125.
3. Seneviratne, A. S. and Fowden, L. (1968) *Phytochemistry* **7**, 1034.
4. Reinbothe, H. (1962) *Flora* **152**, 545.
5. Kjaer, A. and Larsen, P. O. (1969) *Acta Chem. Scand.* **13**, 1565.
6. Noguchi, Sakuma and Tamaki (1968) *Phytochemistry* **7**, 1861.
7. Trimen, H. (1893–1931) *A Hand-Book to the Flora of Ceylon* Part II, p. 112. Delhi, India (reprinted 1974).
8. Smith, I. (1960) *Chromatographic and Electrophoretic Techniques* Vol. 1, p. 96. Heinemann, London.
9. Hutchinson, J. (1964) *The Genera of Flowering Plants* Vol. I. Clarendon Press, Oxford.
10. Shewry, P. R. and Fowden, L. (1976) *Phytochemistry* **15**, 1981.

Phytochemistry, 1977, Vol. 16, pp. 1822–1824. Pergamon Press Printed in England

L-4-HYDROXY-3-METHOXYPHENYLALANINE A PARTIR DE *CORTINARIUS BRUNNEUS*

GASTON DARDENNE*, MICHEL MARLIER* et ANDRÉ WELTER†

*Chimie Organique et Biologique, Faculté des Sciences Agronomiques, 5800 Gembloux, Belgique; †Chimie Organique, Université de Liège, Sart Tilman, 4000 par Liège 1, Belgique

(Received 13 May 1977)

Key Word Index—*Cortinarius brunneus*; Basidiomycete; non-protein amino acid; ^1H and ^{13}C NMR L-4-hydroxy-3-methoxyphenylalanine.

Ce travail s'inscrit dans une série d'études sur la répartition des acides aminés et peptides libres des champignons†. Le nombre des acides aminés libres dérivés de la phénylalanine ne cesse d'augmenter. Ainsi, Bell *et al.* et Mwafuluka *et al.* [1,2] ont isolé récemment de graines de *Combretum zeyheri*, la L-N-méthyltyrosine et la 3-aminoéthylphénylalanine. Dans le champignon *Cortinarius brunneus*, nous avons isolé, pour la première fois dans le règne végétal, la L-3-hydroxy-4-méthoxyphénylalanine. Cet acide aminé a été identifié comme un métabolite formé, en faible quantité, dans le sang des patients recevant la dopa comme traitement de la maladie de Parkinson [3]. Il est également considéré comme un précurseur biologique possible de l'acide homovanilique, un des principaux métabolites urinaires chez l'homme et l'animal [4].

RESULTATS ET DISCUSSION

La 2D-PC de la fraction soluble dans l'éthanol aqueux de *C. brunneus* a révélé la présence d'un spot non identifiable, violet-brun avec la ninhydrine, migrant comme la tyrosine au butanol et légèrement plus loin que l'acide γ aminobutyrique au phénol. Par HVE à pH 3,6, la substance est neutre. Après purification de l'extrait sur une colonne de Lewatit S 1080, les acides aminés ont été adsorbés sur une colonne de

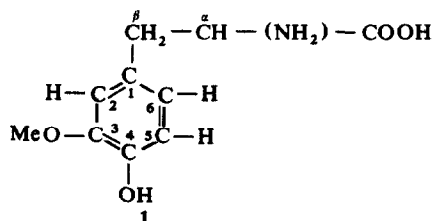
Dowex 1×2 , forme Cl^- et élués par H_2O . La substance passe en même temps que la tyrosine. Elle a été séparée de ce composé aromatique par chromatographie préparative sur papier et ensuite purifiée sur une très petite colonne de Lewatit S 1080. La substance a été recristallisée dans l'eau où elle est particulièrement insoluble. L'analyse élémentaire conduit à la formule moléculaire $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}_4$ en accord avec la SM. L'acide aminé est aromatique (test de Lc Rosen) et possède une fonction αNH_2 (Van Slyke). Le spectre IR du composé présente les bandes caractéristiques d'un acide α aminé aromatique monocarboxylique et aussi des bandes hydroxyles à 3510 et 3245 cm^{-1} . Dans le SM de l'ester méthylique, le pic moléculaire se trouve à $m/e = 225,0990$ ($\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{NO}_4 = 225,1001$). Les fragmentations observées sont caractéristiques des acides aminés aromatique substitués en para par un groupe électrodonneur [5] (voir Partie Experimentale). Elles sont identiques à celles relevées pour la 3-hydroxy-4-méthoxyphénylalanine (1) et pour son isomère, la 4-hydroxy-3-méthoxyphénylalanine (2). Leur distinction est impossible par SM. L'attribution d'une de ces deux structures à l'acide aminé de *C. brunneus* est corroborée par ^1H RMN (voir Partie Experimentale) et par déméthylation par l'acide iodhydrique [7,8]. Celle-ci fournit en effet un composé qui migre comme la dihydroxy-3,4-phénylalanine (dopa) à la chromatographie sur papier et sur couche mince avec de nombreux solvants très différents.

La valeur du pK_a du groupe phénolique (9,8), déterminée par spectroscopie UV [9], est en faveur de l'isomère 2. (pK_a des produits synthétiques DL:1 = 10,4;

†Dardenne *et al.* Public. 11 Acides aminés et peptides des champignons. Public. 10, voir Welter *et al.* (1976) *Phytochemistry* **15**, 1984.

2 = 9,7)[10]. La structure de l'acide aminé a été confirmée de manière absolue par l'examen des spectres ^{13}C RMN (voir Tableau 1). Les résonances de la chaîne $-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$ sont facilement attribuées par comparaison avec les spectres de dérivés de la phénylalanine [11,12], A $\delta = 56.6$ ppm, nous observons la résonance caractéristique du groupe méthoxy. Les résonances C_1 à C_6 du cycle benzénique ont été attribuées en se basant sur les valeurs des déplacements chimiques et en appliquant, en première approximation, l'additivité des effets des substituants [13] et en observant la multiplicité des résonances sur le spectre non découplé. En particulier, les résonances à champ élevé: $\delta = 114,0$ et $116,6$ doivent correspondre respectivement au carbone en ortho du $-\text{OMe}$ et au carbone en ortho du $-\text{OH}$. Or, seule la résonance à $114,0$ ppm présente un couplage méta à longue distance: $^3J = 7,0$ Hz et est dès lors attribué au carbone C_2 . Ceci fixe les positions des substituants $-\text{OMe}$ et $-\text{OH}$ respectivement en C_3 et C_4 . Les attributions reprises au Tableau 1 pour l'acide aminé naturel sont identiques à celles observées pour la DL 4-hydroxy-3-méthoxyphénylalanine du commerce et elles sont différentes de celles observées pour la DL 3-hydroxy-4-méthoxyphénylalanine que nous avons synthétisée à partir d'isovanilline [12]. La structure du nouveau composé a été confirmée par l'identité des spectres IR du produit de synthèse DL et du produit naturel racémisé par NaOH 5N.

La variation positive du pouvoir rotatoire spécifique



lors d'une diminution de pH et l'examen de la courbe de dichroïsme circulaire (effet Cotton positif vers 290 nm) nous permettent d'assigner la configuration L à l'acide aminé naturel. Un examen plus approfondi d'un extrait de *C. brunneus* ne nous a pas permis de mettre en évidence la dopa. Cette substance, très utilisée dans le traitement de la maladie de Parkinson, a été très rarement isolée de champignons. On la trouve dans *Strobilomyces floccopus* [14] et dans *Hygrocybe conica* et *H. ovina* [15].

PARTIE EXPERIMENTALE

Matériel. *Cortinarius brunneus* Fr. ex. Pers. récolté en 1975 et 1976 dans les forêts d'Ardenne (Belgique)

Méthodes d'analyses. Les chromatographies descendantes sur papier Whatmann 3 MM ont été réalisées en utilisant les solvants: *n*-BuOH-HCOOH-H₂O (15:3:2) (a) et phénol saturé par un tampon à pH 4,2 (acide citrique-Na₂HPO₄·2H₂O, 0,08 M) (b). HVE a été réalisée à pH 3,6; 70 V/cm; 90 min. Le SM a été relevé sur un spectromètre A.E.I. MS 902 S par introduction directe, la température de la source était de 200°. L'intensité relative est donnée en % de l'intensité du pic de base. Le spectre ^1H RMN a été enregistré à 100 MHz. Les déplacements chimiques sont donnés en ppm par rapport au 2,2,3,3-tétradeutério-3-(triméthylsilyl)propionate de Na.

Isolement de la L-4-hydroxy-3-méthoxyphénylalanine. Les champignons fraîchement récoltés (2 kg) sont broyés et extraits par 10 l. d'éthanol à 95%. L'extrait filtré est alors purifié sur une colonne de Lewatit S 1080, H⁺, élution par la pyridine 1N. Le mélange d'acides aminés est alors fractionné sur une colonne de Dowex 1 × 2, Cl⁻, 4 × 100 cm, élution par H₂O. L'acide aminé inconnu est élué avec la tyrosine et est alors séparé par chromatographie préparative sur papier (Whatmann 3 MM, 20 fe, 200 mg). $R_{\text{f}} = 1,6$ (a) et 3,0 (b), C, 56,71; N, 6,16; O, 6,61%; calculé pour C₁₀H₁₃NO₄: C, 56,86; H, 6,20; N, 6,63%. $[\alpha]_D^{25} = -34^\circ$ (c 0,3936, H₂O), $[\alpha]_D^{25} = -15,4^\circ$ (c 0,3578 HCl 0,1 N). λ_{max} (pH 7,8) = 287 nm ($\epsilon = 1360$). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ 3510(m), 3245(m), 3015(m), 2920(m), 2600(m), 2380(m), 2020(m), 1610(f), 1590(f), 1510(f), 1450(m), 1430(m), 1345(m), 1330(m), 1314(f), 1277(m), 1255(m), 1228(m), 1158(m), 1128(m), 1112(m), 1095(f), 1012(m), 940(f), 900(m), 860(f), 820(f), 795(f), 702(f) cm⁻¹. SM: 70 eV, m/e (int. rel.) 225(2), 166(4,6), 138(22),

137(M⁺, 100%), 123(4), 122(11), 107(24), 94(6,6), 88(9), 77(6), 74(4,5), 50(14), 51(4,5). ^1H RMN: produit naturel, δ 6,84 (3H, m, C₂₋₅-o); 4,26 (1H, t, C₂); 3,80 (Me, s); 3,20 (2H, mnr, C₆).

Remerciements.—Nous tenons à remercier Monsieur le Professeur P. Heinemann, Faculté des Sciences Agronomiques, Gembloux et Monsieur Marchal, Couvin pour la récolte et la détermination du champignon. Le spectre ^1H RMN a été pris au service de Monsieur le Professeur Krief, Faculté Notre Dame de la Paix à Namur.

Tableau 1. ^{13}C RMN de la L-4-hydroxy-3-méthoxyphénylalanine (2) et de la DL-3-hydroxy-4-méthoxyphénylalanine (1)

| | | —COOH | C ₃ | C ₄ | C ₁ | C ₆ | C ₅ | C ₂ | Me | C _a | C ₆ |
|--------------------------|----------|-------|-------------------------------------|----------------|---------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------|----------------|-------------------------------------|----------------|----------------|
| (D ₂ O + TFA) | δ | 171,9 | 148,6 | 145,5 | 126,8 | 123,1 | 116,6 | 114,0 | 56,6 | 55,0 | 36,1 |
| | | s | ss | ss | ss | dd | d | dd | q | d | t |
| (2) | | | $^1J_{\text{C}_2-\text{H}} = 156,9$ | | | $^1J_{\text{C}_3-\text{H}} = 157,9$ | | | $^1J_{\text{C}_4-\text{H}} = 157,9$ | | |
| | δ | 171,9 | 146,3 | 148,0 | 126,1 | 123,8 | 113,4 | 116,7 | 56,5 | 55,0 | 35,7 |
| (1) | | | $^1J_{\text{C}_2-\text{H}} = 155,1$ | | | $^1J_{\text{C}_3-\text{H}} = 152,5$ | | | $^1J_{\text{C}_4-\text{H}} = 158,8$ | | |
| | | | | | $^3J_{\text{C}_2-\text{H}} = 7$ | | $^3J_{\text{C}_6-\text{H}} = 8$ | | | | |

Les spectres ont été enregistrés sur un spectromètre Bruker 22,63 MHz avec le dioxane (5% v/v) comme référence interne. Les déplacements chimiques sont en ppm par rapport au TMS ($\delta_{\text{TMS}} = \delta_{\text{diox.}} + 67,4$ ppm). Les multiplicités observées sur le spectre non découplé sont notées: s, d, t, q, ss et dd. Elles signifient singulet, doublet, triplet, quadruplet; singlet et doublet découplés par couplage à longue distance.

REFERENCES

1. Bell, E.A., Mwafuluka, K. et Charlwood, B.V. (1975) *Phytochemistry* **14** 858.
2. Mwafuluka, K., Bell, E.A., Charlwood, B.V. et Briggs, J.M. (1975) *Phytochemistry* **14**, 1657.
3. Tyce, G.M., Muentner, M.D. et Owen, C.A. (1970) *Mayo Clin. Proc.* **45**, 438.
4. Shaw, K.N.F., McMillan, A. et Armstrong, M.D. (1957) *J. Biol. Chem.* **226**, 255.
5. Bieman, K., Seibi, J. et Gapp, F. (1961) *J. Am. Chem. Soc.* **83**, 3795.
6. Undheim, K. et Hvistendahl, G. (1972) *Anal. Chim. Acta* **62**, 187.
7. Greenstein, J.P. et Winitz, M. (1961) *Chemistry of the Amino Acids* p. 2722. Academic Press, New York.
8. Kaiser, G. et Burger, A. (1957) *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 4365.
9. Albert, A. et Serjeant, E.P. (1962) *Ionization Constants of Acids and Bases* p. 69. J. Wiley, New York.
10. Anhoury, M. L., P., De Neys, R. et Eliaers J. (1974) *Bull. Soc. Chim. Belg.* **83**, 117.
11. Voelter, W., Jung, G., Breitmaier, E. et Bayer, E. (1971) *Z. Naturforsch.* **26b**, 213.
12. Welter, A. résultats non publiés.
13. Stothers, J. B. (1972) *Carbon-13 NMF Spectroscopy* Chap 5. Academic Press, New York.
14. Steglich, W. et Esser, F. (1973) *Phytochemistry* **12**, 1817.
15. Steglich, W. et Preuss, R. (1975) *Phytochemistry* **14**, 1119.

Phytochemistry, 1977, Vol. 16, pp. 1824–1826 Pergamon Press. Printed in England.

BIOSYNTHESIS OF STIZOLAMINE IN *STIZOLOBIUM HASSJOO*

TAKEO YOSHIDA

Department of Biology, Faculty of Science, Tokyo Metropolitan University, Setagaya-ku, Tokyo, 158, Japan

(Received 22 April 1977)

Key Word Index—*Stizolobium hassjoo*; Leguminosae; stizolamine; 1-methyl-3-guanidino-6-hydroxymethylpyrazin-2-one; seeds; biosynthesis.

Abstract—In *Stizolobium hassjoo*, stizolamine is located in seeds and pericarps and is not found in mature leaves, stems and roots. The content of stizolamine in seeds and the fruits increases with their maturation but do not correlate with their dry weights. A feeding experiment showed that guanosine triphosphate [$U-^{14}C$] is effectively incorporated into stizolamine in pericarps.

INTRODUCTION

Stizolamine has been isolated from the seeds of *Stizolobium hassjoo* and its structure shown to be 1-methyl-3-guanidino-6-hydroxymethylpyrazin-2-one by chemical, physical and X-ray diffraction analyses [1]. It has also been shown that stizolamine is detected widely in seeds of Leguminosae, especially of the subfamily Lotoideae [2]. The present investigation was undertaken to study the biosynthetic pathway of stizolamine.

RESULTS AND DISCUSSION

Change of stizolamine content

Stizolamine has been previously detected in the seeds and in the etiolated whole plants of *S. hassjoo* [1], but not in the mature plants. In the present work stizolamine could not be detected in any organs except fruits (Table 1). It is also shown that the content in seeds increases with maturation. This result is shown more distinctly in the next experiment, in which the contents of stizolamine in pericarps and in seeds were measured. The content in seeds gradually increased until the 4th week, remained constant until the 8th week and then increased (Fig. 1). The latter increase did not correspond to the change in dry wt of the seeds (Fig. 2). In pericarps and fruits the change of stizolamine content did not correlate with the change in dry wt. The maximum content is obtained in the 2-week-old pericarps but the maximum dry wt was found at the 4th week.

To investigate the possibility that stizolamine can be synthesized in pericarps and in seeds, suggested from the results described above the 8-week-old fruits were detached to prevent import of stizolamine and the stizolamine was measured two weeks later. Fruits of the same stage were also halved longitudinally and the contents in both halves were measured. The results are summarized in Table 2. An apparent increase in pericarps and seeds was observed, but the stizolamine contents in those seeds and fruits did not reach the level found normally. The results described above show that stizolamine is synthesized in pericarps and seeds, and

Table 1. Localization of stizolamine

| Organ | Content 10 ⁻⁸ mol/g |
|-------------------|-----------------------------------|
| Stem | [< 0.06]* |
| Root | [< 0.34] |
| Mature leaf | [< 0.60] |
| Petal | [< 0.94] |
| Calyx | [< 4.19] |
| Stamen | [< 1.92] |
| Pistil | 0.25 |
| Immature pericarp | 6.54 |
| Immature seed | 175 |
| Mature seed | 697 |

* Stizolamine could not be detected.