

Effect of K and Mg Aspartate on Cellular Metabolism

The beneficial effects of the K and Mg salts of D,L-aspartic acid in some circulatory disturbances have been attributed to their cation-carrier functions¹⁻⁴. On the other hand, there is a possibility of a metabolic stimulus exerted by the aspartate (the monoaminodicarboxylic acid salt) as well, which could enhance some metabolic cellular processes⁵. Thus, for instance, aspartic acid may act as an anaerobic furnisher of CO₂ by decarboxylation, or may stimulate, after a previous deamination, the tricarboxylic cycle.

We wished to study the effect of the K and Mg aspartate on the oxygen consumption and respiratory CO₂ production in a tissue preparation consisting of isolated nephrons, *in vitro*.

Materials and methods. Experiments were carried out in a preparation of isolated rat nephrons, by tripsinization. The homogenate of nephrons (cytocrit 2-3%) in isotonic saline, containing 5% calf serum⁶, with 5 μM glucose per ml and 2 μM lactate per ml, was subjected to manometrical measurements of gas exchanges by a procedure based on the DICKENS-SIMMER II method⁷. O₂ consumption, respiratory and glycolytic CO₂ production and the respiratory quotient were determined. Two series of experiments were carried out: one control series and the other in the presence of aspartate (5 μM per ml). The rate of K and Mg aspartate was 1:1. Results were worked out statistically.

Results and discussion. The results are presented in the Table (mean values). Aspartate addition leads to intensification of gas exchanges with no modification of the respiratory quotient. The increase of O₂ consumption and CO₂ production are statistically significant ($p < 0.01$).

It is known that the renal tissue takes up and utilizes preferentially free fatty acids⁸⁻¹⁰ and lactate^{8,11}; under certain conditions, it can oxidize glucose^{12,13}; it seems that there is no renal uptake of aminoacids⁸. Our findings agree with these data. In the presence of aspartate, the oxidized substrate remains the same (lactate, possibly glucose), the respiratory quotient being unmodified. So

QO₂ (μl oxygen/mg dry weight tissue/h), QCO₂ (μl CO₂/mg dry weight tissue/h) and QR(respiratory quotient) of the isolated rat nephrons preparation

Experiment series	QO ₂	QCO ₂	QR	No. of experiments
Control	32.7 ± 1.4	33.1 ± 1.0	1.01	15
Aspartate	40.3 ± 1.9	41.1 ± 1.5	1.02	20

we can also assume that aspartate does not act as an anaerobic generator of CO₂, as this would lead to an increase of the respiratory coefficient. On the other hand, the significant increase of O₂ consumption supports the hypothesis of the intervention of aspartate in the stimulation of the KREBS cycle. This effect finds its explanation in the simplest way by the oxalacetate-producing role of aspartate, the more so as the oxalacetate may be one of the limiting factors of the tricarboxylic acid cycle¹⁴.

Thus the therapeutic effects of the aspartate are more complex than those explained only by their cation-carrier (K and Mg) action, and must also be considered as a cellular metabolic effect, as the result of oxalacetate production, which could stimulate the KREBS cycle. We mention that recently a vasodilating effect, of oxalacetate especially upon small vessels, has been demonstrated¹⁵, so we can consider a vascular action too.

Zusammenfassung. Gasstoffwechselbestimmungen von unter K- und Mg-Asparaginat stehenden Zellenpräparaten isolierter Nephronen zeigen vermehrten Sauerstoffverbrauch. Der dabei unveränderte Atmungskoeffizient beweist, dass das oxydierte Substrat offenbar dasselbe bleibt.

S. GAVRILESCU, G. DEUTSCH
and O. DREICHLINGER

1st Internal Clinic, Institute of Medicine
Timisoara (Romania), 1st December 1966.

- 1 B. WEBER, H. LABORIT, M. JOUANY, P. NIAUSSAT and C. BARON, C. r. Séanc. Soc. Biol. 151, 1383 (1957).
- 2 J. A. KÖHLER, Fortschr. Med. 82, 544 (1964).
- 3 H. KENTER and A. FALKENHANN, Medsche Welt, Berl. 35, 1848 (1964).
- 4 R. KANTHER, in *Electrolytes and Cardiovascular Diseases* (Ed. E. BAJUSZ; S. Karger, Basel/New York 1965), p. 274.
- 5 S. GAVRILESCU, I. ATHANASESCO, C. STREIANO, F. BARTL and L. GABRIEL, Angiologie 18, 15 (1966).
- 6 B. BURG, E. GROLLMAN and J. ORLAFF, Am. J. Physiol. 206, 483 (1964).
- 7 W. UMBREIT, R. BURRIS and J. STAUFFER, *Manometric Techniques and Tissue Metabolism* (Burgess Pbl. Co., Minneapolis 1951).
- 8 J. COHEN, Am. J. Physiol. 199, 560 (1960).
- 9 B. LEE, J. WANCE and G. CAHILL, Am. J. Physiol. 203, 27 (1962).
- 10 M. GOLD and J. SPITZER, Am. J. Physiol. 206, 153 (1964).
- 11 M. LEVY, Am. J. Physiol. 202, 302 (1962).
- 12 B. OCHWADT, E. SCHRÖDER and H. BETHGE, Pflügers Arch. ges. Physiol. 286, 199 (1965).
- 13 J. BAHLMAN, B. OCHWADT and E. Schröder, Pflügers Arch. ges. Physiol. 286, 207 (1965).
- 14 H. A. KREBS and J. M. LOWENSTEIN, in *Metabolic Pathways* Ed. D. M. GREENBERG; Academic Press New York) vol. 1, p. 129.
- 15 E. D. FRÖLICH, Am. J. Physiol. 208, 149 (1965).

Constituants amers de *Brucea amarissima*¹, structures des brucéines A, B et C

Un certain nombre de composés cristallisés isolés de plusieurs espèces du genre *Brucea* (Simarubacées) ont été décrits dans la littérature^{2,3}. Cependant, leur formule brute et les résultats préliminaires rapportés restent sujets à caution.

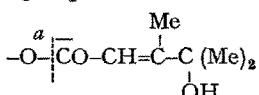
Nous avons étudié les fruits de *Brucea amarissima* dont nous avons isolé jusqu'à présent quatre composés cristallisés que nous proposons d'appeler brucéines A, B, C et D.

Nous désirons exposer les principaux arguments qui conduisent à attribuer les structures (II a⁵), (II b) et (II c), respectivement à la brucéine A, C₂₆H₃₄O₁₁, [α]_D⁶ - 86,3°, à la brucéine B, C₂₃H₃₈O₁₁, [α]_D - 77,2° et à la brucéine C, C₂₈H₃₆O₁₂, [α]_D - 34,2°.

Les formules brutes des brucéines et de leurs dérivés ont été déterminées par spectrométrie de masse à haute résolution (MS 9) (voir Tableau).

L'hydrolyse alcaline douce des 3 brucéines conduit au même composé cristallisé que nous appelons brucéolide (II d), $C_{21}H_{28}O_{10}$, $[\alpha]_D = -95.4^\circ$. Les brucéines A, B et C sont respectivement l'ester isovalérianique, acétique et diméthyl-3,4 hydroxy-4 pentène-2 oïque du brucéolide.

La présence du groupement

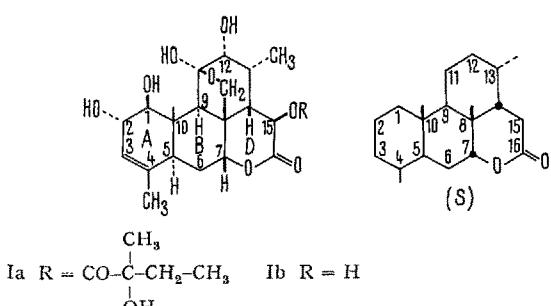


dans la brucéine C a été déduite des données de la RMN⁷ (singulet de 6 H à δ 1,41 et singulet de 3 H à δ 2,36) et de l'examen de son spectre de masse; celui-ci montre des pics à m/e 127 ($C_7H_{11}O_3$) et à m/e 109 (C_7H_9O) attribuables respectivement à l'ion provenant de la fragmentation α et à celui qui en résulte par perte d'une mole d'eau. De plus, l'ozonolyse de la brucéine C fournit, à côté d'une faible quantité d'acétone, de l'hydroxy-3 méthyl-3 butanone-2, identifiée sous forme de sa dinitro-2,4 phénol hydrazone, F. 142-145°⁸, $C_{11}H_{14}O_5N_4$ (M^+ 282), dont le spectre de RMN ($CDCl_3$) montre un singulet (6 H) à 1,49 et un singulet 3 H à δ 2,13.

Le brucéolide (II d) et la brucéine B (II b) fournissent par acétylation le même tétra-acétate (III b), $C_{29}H_{34}O_{14}$, $[\alpha]_D = -16.6^\circ$, dépourvu de bandes OH en IR. Dans les mêmes conditions d'acétylation, la brucéine A (II a) fournit le triacétate (III a) et la brucéine C (II c) conduit à un mélange de tétraacétate (III c') et de triacétate (III c).

Les brucéines possèdent un groupement $-COOCH_3$. En effet, sous l'action d'alcali, elles fournissent l'acide (VI d). Traité par le diazométhane, ce dernier redonne le brucéolide (II d), tandis que traité par le diazoéthane, il conduit à l'ester éthylique (VII d).

Les brucéines étant des dérivés d'un composé en C_{20} , on pouvait supposer qu'elles appartaient, comme la glaucarubine (I a), au groupe des principes amers des Simarubacées ayant le squelette de base (S). Les spectres de RMN des brucéines révèlent le triplet caractéristique du proton $H_{(7)}$ vers 5,5 ppm⁹ et un doublet vers 6,6 ppm ($J = 12.5$ c/sec), apparaissant à 6,0 ppm dans celui du brucéolide (II d), attribuable, comme c'est le cas pour la glaucarubine (I a) et le glaucarubol (I b), au proton $H_{(15)}$ ⁹.

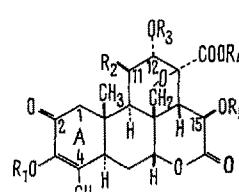


Le brucéolide (II d) possède un méthyle tertiaire (singulet à 1,61 ppm) et un méthyle vinylique (doublet à 1,93 ppm, $J = 2$ c/sec).

La présence du groupement diosphénol $-\text{C}=\overset{\text{O}}{\underset{\text{OH}}{\text{C}}}=\text{C}(=\text{O})\text{CH}_3$

ressort des faits suivants: (a) le spectre IR (nujol) du brucéolide (II d) présente une large bande à 1744 cm^{-1} et des bandes à 1663 et 1634 cm^{-1} ; (b) les brucéines et le

brucéolide donnent une coloration avec Cl_3Fe et leurs spectres UV présentent un maximum à 279 nm ($\epsilon = 8140$) qui se trouve déplacé vers 246 nm dans les dérivés acétylés; (c) l'hydrogénéation catalytique de la brucéine B conduit à la dihydro-brucéine B (VIII b), ne présentant plus d'absorption UV notable; son spectre de RMN montre l'apparition d'un méthyle secondaire (doublet centré à 1,03 ppm) alors que le signal du méthyle vinylique a



a: $R_5 = CO-CH_2-CH(Me)_2$

b: $R_5 = Ac$

c: $R_5 = CO-CH=C-C(Me)_2$

Me
|
OH

c': $R_5 = CO-CH=C-C(Me)_2$

Me
|
OAc

d: $R_5 = H$

(V) $R_1 = R_3 = Ac$

$R_2 = O; R_4 = CH_3$

(VI) $R_1 = R_3 = R_4 = H$

$R_2 = H; \beta-OH$

(VII) $R_1 = R_3 = H; R_4 = C_2H_5$

$R_2 = H; \beta-OH$

(VIII) $R_1 = R_3 = H; R_4 = CH_3$

$R_2 = H; \beta-OH$

dihydro-3,4

Composés	Formules	Ions mol. M^+	°F.
II a	$C_{26}H_{34}O_{11}$	522	267-270
II b	$C_{25}H_{28}O_{11}$	480	262-266
II c	$C_{26}H_{36}O_{12}$	546 ^e	175-180
II d	$C_{21}H_{28}O_{10}$	438	300-302
III a	$C_{32}H_{40}O_{14}$	648	195-200
III b	$C_{29}H_{34}O_{14}$	606	295-298
III c	$C_{34}H_{42}O_{15}$	672 ^e	258-260
III c'	$C_{36}H_{44}O_{16}$	672 ^f	265-268
IV a	$C_{30}H_{38}O_{13}$	606	237-240
IV b	$C_{27}H_{32}O_{13}$	564	230/295
V a	$C_{36}H_{38}O_{13}$	604	268-271
V b	$C_{27}H_{30}O_{13}$	562	282-285
VI d	$C_{26}H_{24}O_{10}$	424	220/270
VII d	$C_{22}H_{28}O_{10}$	452	290-292
VIII b	$C_{25}H_{30}O_{11}$	482	283-285
X	$C_{27}H_{34}O_{14}$	582	285-288
XI	$C_{19}H_{22}O_{10}$	410	330
XII	$C_{26}H_{24}O_{10}$	424	305-310

^e et ^f: pics correspondant resp. à $(M-18)^+$ et $(M-60)^+$.

¹ 18ème Communication sur les constituants amers des Simarubacées; 17ème Communication, voir².

² J. POLONSKY, Planta med. supplément 1966, 107.

³ T. GEISSMAN et J. SIMS, Colloques int. Cent. natn. Rech. Scient. 144, 205 (1966).

⁴ C. L. HUANG, Chem. Abstr. 62, 4493-d (1965).

⁵ Les lettres qui suivent les chiffres romains indiquent la nature du substituant en C(₁₅).

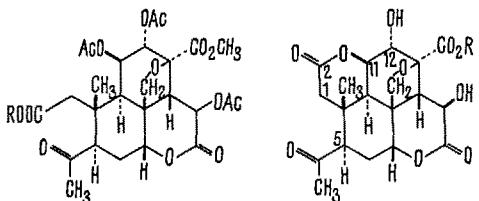
⁶ Les pouvoirs rotatoires ont été mesurés dans la pyridine.

⁷ Sauf mention spéciale, tous les spectres de RMN ont été mesurés à 60 Mc dans la pyridine par Mme L. ALAIS, que nous remercions très vivement; les déplacements chimiques δ sont exprimés en ppm par rapport à la raie de $Si(CH_3)_4$.

⁸ J. G. ASTON et R. B. GREENBURG, J. Am. chem. Soc. 62, 2594 (1940).

⁹ J. POLONSKY, C. FOUCHEY et A. GAUDEMER, Bull. Soc. chim. Fr., 1827 (1964).

disparu; (d) soumis à l'ozonolyse, le tétra-acétate du brucéolide (III b) fournit en bon rendement le triacétate du méthyl-céto-acide (IX). Cet acide, dont le test à l'iodoforme est positif, a été caractérisé par son ester méthylique (X). Le spectre de RMN (CDCl_3) de ce dernier révèle la présence de pics attribuables à un méthyle tertiaire (1,25 ppm), à 3 groupements acétoxy et 1 groupement acétyle (2,03; 2,06; 2,10 et 2,16 ppm) et à 2 groupements OCH_3 (3,63 et 3,70 ppm).

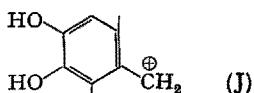


IX: R = H X: R = CH_3 XI: R = H XII: R = CH_3

La comparaison des spectres de RMN des brucéines et de leurs acétates (III a, III b et III c) indique que deux protons se sont déplacés vers des champs plus faibles à la suite de l'acétylation. L'obtention des dérivés acétyles (IV a) et (IV b) et de leurs produits d'oxydation (V a) et (V b) montre que les brucéines possèdent deux hydroxyles secondaires.

Le dixième atome d'oxygène du brucéolide (II d), dont les résultats exposés n'ont pas rendu compte, doit être engagé dans un éther-oxyde. Les brucéines et leurs dérivés révèlent en RMN dans la région de 4 ppm un quadruplet (2H) caractéristique d'un système AB, attribuable à un groupement $-\text{CH}_2\text{O}-$.

Position relative groupements fonctionnels. Les données de la spectrométrie de masse permettent de placer le groupement diosphénol (à l'exclusion de toute autre fonction oxygénée) sur le cycle A du squelette de base (S). En effet, les spectres de masse des brucéines et de leurs dérivés (III à VII) révèlent, entre autres pics importants, un pic à m/e 151 ($\text{C}_9\text{H}_{11}\text{O}_2$) qui peut être attribué à l'ion (J). Or, un ion analogue avec la même composition centésimale se forme dans le cas de plusieurs autres constituants amers des Simarubacées qui ont un cycle A présentant le même degré d'oxydation que celui de la formule (II)¹⁰.



Par ailleurs, le traitement du brucéolide (II d) par DCl N à 100° conduit à un mélange de brucéolides tri-, tétra- et pentadeutériés, dont au moins les hydrogènes du méthyle vinylique ont été échangés (absence du signal à 1,93 ppm). Le spectre de masse du brucéolide ainsi deutériisé montre que le pic à m/e 151 a été remplacé par des pics à m/e 154, 155 et 156 ayant des intensités relatives identiques à celles des pics moléculaires.

La présence du diosphénol en positions 3 et 4 ressort de l'examen du spectre de RMN¹¹ du composé (V b), qui présente à 2,64 ppm et à 3,08 ppm deux doublets ($J_{AB} = 17 \text{ c/sec}$) attribuables aux deux protons en $C_{(1)}$ ¹².

La structure du cycle A ainsi définie ne permet qu'un seul arrangement pour les autres groupements fonctionnels sur le squelette de base (S): celui indiqué sur la formule (II).

La position relative du diosphénol et de l'hydroxyde en $C_{(1)}$ est confirmée par les résultats suivants: l'acide (IX), obtenu par ozonolyse du brucéolide acétyle (III b), fournit, par hydrolyse alcaline suivie de chauffage en

milieu acide, le composé (XI), $\text{C}_{19}\text{H}_{22}\text{O}_{10}$ (dépourvu de méthoxyle). Traité par le diazométhane, ce dernier donne l'ester méthylique (XII), $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_{10}$, dont le spectre de RMN montre un seul pic OCH_3 , à 3,7 ppm; les 2 protons en $C_{(1)}$ de ce monoester, contrairement au diester (X), apparaissent comme 2 doublets à 2,45 ppm et à 3,13 ppm ($J_{AB} = 17 \text{ c/sec}$).

Les formules (II a, II b et II c) des brucéines sont confirmées par l'étude détaillée de leurs spectres de RMN et de ceux de leurs dérivés. En particulier, l'analyse par double résonance du spectre du composé (V b) confirme la position de tous les protons sur le squelette de base (S) initialement envisagé. La présence du carbone en $C_{(1)}$ dans le composé (V b) se manifeste par l'apparition du proton $H_{(9)}$ comme singulet (δ 3,72) et l'acétylation difficile de l'hydroxyle des brucéines en cette position est en faveur de la configuration axiale de celui-ci. Le proton $H_{(12)}$ (doublet à δ 5,1) présente un couplage à distance ($^4J = \text{c/sec}$) avec $H_{(14)}$, ce qui indique une conformation équatoriale de $H_{(12)}$ et une jonction cis du cycle C et du cycle lactonique. La jonction trans des cycles A et B est indiquée par l'effet Cotton positif de la dihydro-brucéine B (VIII b). La jonction des cycles B et C est probablement trans, comme c'est le cas pour tous les autres constituants amers des Simarubacées.

Les brucéines sont les principes amers les plus oxygénés que l'on ait isolés jusqu'à présent de la famille des Simarubacées. Elles révèlent des traits structuraux nouveaux: elles possèdent un groupement carbométhoxy en $C_{(15)}$ et elles sont les premiers composés amers de cette famille possédant des fonctions oxygénées en $C_{(2)}$ et $C_{(9)}$ et non en $C_{(1)}$ et $C_{(2)}$ ². Remarquons également que le groupement acyle en $C_{(15)}$ dans la brucéine C ne semble pas encore avoir été trouvé dans d'autres produits naturels.

La structure du cycle A des brucéines pourrait avoir une signification biogénétique, en ce qui concerne notamment l'élimination d'un des méthyles en $C_{(4)}$ du précurseur triterpénique¹³ et l'absence de fonction oxygénée en position 3 dans tous les autres constituants amers des Simarubacées¹⁴.

Summary. Evidence is presented for the structures (II a), (II b) and (II c) for the bruceines A, B and C, the bitter principles isolated from the seeds of *Brucea amarissima*.

JUDITH POLONSKY, ZOIA BASKÉVITCH,
A. GAUDEMÉR et B. C. DAS

*Institut de Chimie des Substances Naturelles,
C.N.R.S., 91-Gif-sur-Yvette (France), 28 décembre 1966.*

¹⁰ B. C. DAS, J. L. FOURREY et J. POLONSKY, Abstr. IVth IUPAC Symp. on the Chemistry of Natural Products, Stockholm (1966), p. 68.

¹¹ Spectre mesuré dans $\text{C}_6\text{D}_6\text{N-CD}_3\text{SOCD}_3$, à 100 Mc par le Dr. A. MELERA (Varian, Zürich).

¹² P. K. GRANT et M. H. G. MUNRO, Tetrahedron 21, 3599 (1965).

¹³ J. MORON, J. RONDEST et J. POLONSKY, Experientia 22, 511 (1966).

¹⁴ Remerciements: Nous remercions vivement M. E. LEDERER pour l'intérêt témoigné à ce travail, la direction des Etablissements CIBA (Bâle) pour un envoi de graines de *Brucea amarissima* et le Dr. J. MULLER (Ciba) pour des échantillons des composés qu'il avait isolés et dont deux se sont révélés identiques aux brucéines A et B. Nous remercions M. G. HENRY pour sa collaboration à l'extraction des brucéines. Nous adressons nos vifs remerciements au Dr. A. MELERA pour l'expérience de double résonance.