

### Chromatographic Isolation of Monofluoroacetic Acid from *Palicourea marcgravi* St. Hil

'Erva de rato' (rat weed), *Palicourea marcgravi* (Rubiaceae) whose natural habitat is moist woodland, is a shrub found in several Brazilian States<sup>1</sup>. It has long been known as one of the most toxic plants of our pastures, although its active principle had not previously been identified. The present note deals with the isolation of the substance mainly by chromatographic methods, and its identification as monofluoroacetic acid.

Difficulty was experienced initially in the biological detection of the active principle because the residues obtained by the vacuum evaporation of fractions eluted from both column and paper chromatograms no longer showed any activity. This finding and the fact that the active principle was retained on alumina led us to believe it might be a volatile acid<sup>2</sup>. Moreover, biological assays on guinea-pigs, using an aqueous extract of the plant or the purified substance, showed results typical of animals intoxicated by organic fluorine compounds<sup>3</sup>.

**Experiments and Results.** The plant material, consisting of leaves, was dried at room temperature, ground and extracted in a soxhlet with 95% ethanol for 36 h. After vacuum concentration the chlorophyll and liposoluble substances were extracted with carbon tetrachloride and ether. The aqueous solution was again concentrated to a thick paste, mixed with silica gel and dried. The whole was then transferred to the top of a silica gel column and chromatographed with increasing amounts of methanol in chloroform. The fractions were neutralized with dilute NaOH and given orally to guinea-pigs. The 50% and 80% methanol fractions contained the biological activity. These fractions were combined and rechromatographed on cellulose with *n*-propanol-ethyl acetate-water (7:1:2 by volume).

A second extraction procedure<sup>4</sup> involved removal of the chlorophyll and lipids followed by acidification with sulfuric acid and ether extraction in a liquid-liquid extractor. After 20 h the aqueous solution was no longer active. The ether extract was neutralized with aqueous KOH, the potassium salt solution was evaporated on a waterbath and the residue chromatographed on a celite column using chloroform containing 5% v/v butanol<sup>5</sup>. This method of purification was chosen instead of fractional distillation<sup>4</sup> owing to the small amount of material available. The course of titration of the toxic fraction with 0.05 N NaOH is shown in the Figure.

The same elution band on a celite column using chloroform-*n*-butanol as solvent was obtained with the active fraction from the powdered cellulose column described above.

**Qualitative Tests.** Monofluoroacetic acid: (a) test for acid compounds with iodide-iodate mixture: positive (<sup>6</sup>, p. 117), (b) test with lanthanum and iodine: positive (<sup>6</sup>, p. 369), (c) detection of benzene-soluble compounds (with rhodamine B plus uranyl acetate): positive (<sup>6</sup>, p. 121).

Fluorine: (a) chromic-sulfuric acid: positive (<sup>6</sup>, p. 92), (b) molybdenum blue: positive<sup>7</sup>, after alkaline fusion.

These same tests were positive in an aqueous solution obtained by the treatment of a small sample of the active substance with concentrated sulphuric acid and submitted to vacuum distillation, the distillate being received in water. This solution was also biologically active.

**Paper chromatography analysis (Rf).** (a) Ammonium salts used:

	FAC.	Subs.	
<i>n</i> -propanol/ethyl acetate/water (7:1:2)	0.34	0.33	<sup>8</sup>
<i>n</i> -butanol/aqueous NH <sub>3</sub> 1.5N (1:1)	0.087	0.083	<sup>9</sup>

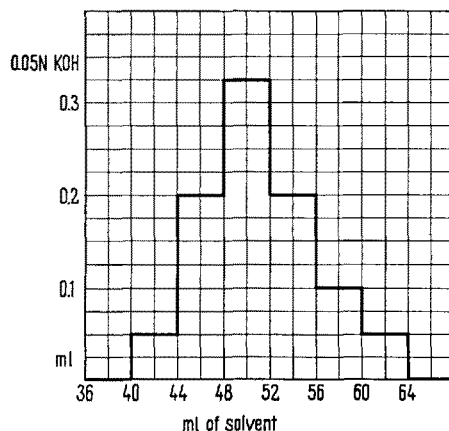
### (b) Hydroxamic acids:

	Subs.	FAC. (lit.)	FAC.	Ac.	Ac. (lit.)
A 5% NH <sub>3</sub>	<sup>10</sup> 0.40	0.37	0.40	0.56	0.59
A 1% NH <sub>3</sub>	<sup>10</sup> 0.55	0.53	0.53	0.69	0.67
B	<sup>10</sup> 0.70	0.70	0.70	0.53	0.54
C	<sup>11</sup> 0.28		0.30	0.52	0.50

A = 95% Ethanol (with added base as indicated calculated as NH<sub>3</sub>) (pyridine) water (3:1:1). B = Dioxan/acetic acid (4:1). C = *n*-Propanol/ammonium carbonate solution (2:1). FAC = Fluoroacetic acid. Ac = Acetic acid.

**Potassium monofluoroacetate.** The potassium salt of the toxic acid, obtained by neutralization of fractions from the celite column described above, was further purified through a cellulose column using *n*-propanol (ethyl acetate) water as solvent, fractions of 0.7 ml being collected each half an hour. The fluoroacetate containing fractions were evaporated on waterbath and recrystallized from methanol-ether as needles m.p. 209°, with decomposition. (Found: C, 20.64; H, 2.07; F, 16.70; FC<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>K requires: C, 20.68; H, 1.74; F, 16.36)<sup>12</sup>.

***p*-Nitrobenzylfluoroacetate.** Treatment of an aqueous methanolic solution of the potassium salt (100 mg) with *p*-nitrobenzylbromide (90 mg) followed by refluxing for



<sup>1</sup> F. C. HOEHNE, *Plantas e substâncias tóxicas e medicinais* (Graphicas, S. Paulo 1939), p. 284.

<sup>2</sup> TH. PECKOLT, *Materia médica brasileira* (Eduardo & Henrique Lemmert, Rio de Janeiro 1868), p. 36.

<sup>3</sup> E. GRZYKIEWICZ-TROCHIMOWSKY et al., *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas* 66, 419 (1947).

<sup>4</sup> J. S. C. MARAIS, *Onderstepoort J. Vet. Sci. Animal Ind.* 18, 203 (1943).

<sup>5</sup> S. L. RANSON, *Non-Volatile Mono-, Di- and Tricarboxylic Acids. Modern Methods of Plant Analysis* (Springer-Verlag, Berlin 1955), vol. 2, p. 569.

<sup>6</sup> F. FEIGL, *Spot Test in Organic Analysis* (Elsevier, Amsterdam 1960).

<sup>7</sup> A. VOGEL, *Qualitative Chemical Analysis Including Semimicro Qualitative Analysis* (Longman's Green & Co., London 1947), p. 271.

<sup>8</sup> N. ALBON and D. GROSS, *Analyst* 77, 410 (1952).

<sup>9</sup> R. L. LEID and M. LEDERER, *Biochem. J.* 50, 60 (1952).

<sup>10</sup> F. BERGMAN and R. LEGAL, *Biochem. J.* 62, 542 (1956).

<sup>11</sup> *Chromatography*, 2nd ed. (E. Merk AG, Darmstadt, Germany), p. 92.

<sup>12</sup> Microanalyse was carried out by Microanalytical Laboratory, Oxford (England).

2 h, gave on cooling in ice *p*-nitrobenzylfluoroacetate m.p. 64–72°, which after two recrystallizations from ethanol melted at 72–74° (lit. m.p. 73–74°)<sup>13</sup>. Qualitative test for F was positive with this material.

**Biological tests.** Biological tests, oral and intraperitoneal administration to guinea-pigs, were carried out throughout this work to follow toxicity of the several steps. Wherever sulphuric acid was present it was eliminated with barium carbonate<sup>14</sup>.

**Résumé.** Nous avons utilisé, de préférence, des méthodes chromatographiques pour isoler le principe actif de *Palicourea marcgravia* St. Hil. (Rubiaceae), un végétal extrêmement toxiques des pâturages du Brésil. Ce prin-

cipe a été identifié comme étant l'acide monofluoroacétique.

MARILDA M. DE OLIVEIRA

*Department of Biochemistry and Pharmacodynamics, Instituto Biologico, S. Paulo (Brazil), June 18, 1963.*

<sup>13</sup> J. S. C. MARAIS, Onderstepoort J. Vet. Sci. Animal Ind. 20, 67 (1944).

<sup>14</sup> **Acknowledgment.** Many thanks to Prof. M. M. CAMPOS and to Dr. B. GILBERT for their interest, to the Department of Chemistry of S. Paulo University for kindly giving us some of the substances used on qualitative tests and to the Foreign Agriculture Research Grant Program of the U.S. Department of Agriculture (P. L. 480) for financial assistance.

### Förderung der P-Aufnahme von Bohnenpflanzen durch Kinetin

Durch Arbeiten von MOTHES et al.<sup>1</sup> war bekannt geworden, dass Kinetin von entscheidendem Einfluss auf die Verlagerung von Aminosäuren in abgetrennten, unbewurzelten Blättern von *Nicotiana rustica* ist. Offenbar steht seine Wirkung in Zusammenhang mit Vorgängen der Eiweißsynthese. Dies geht vor allem daraus hervor, dass Chloramphenicol, welches die Eiweißsynthese unterbindet, auch die Wirkung des Kinetins auf den Aminosäuretransport innerhalb der Blätter zu den Synthesorten hin abschwächt bzw. unterbindet (MOTHES<sup>2</sup>). Steht somit das Kinetin einerseits im Zusammenhang mit der Eiweißsynthese, die Nährstoffe benötigt, andererseits aber auch mit Transportleistungen, welche benötigte Baustoffe heranschaffen, so lag es nahe, die Frage zu prüfen, inwieweit diese Wirkungen des Kinetins, die es beim Aufbringen auf Blätter ausübt, sich auf die Nährstoffaufnahme der Pflanzen durch die Wurzeln auswirken können.

Um eine erste Orientierung zu ermöglichen, wurden zwei Versuche mit analoger Versuchsanstellung durchgeführt, bei welchen 10 Tage alte, auf Boden gezogene Pflanzen von *Vicia faba* der ägyptischen Sorte «Rebaya 34» (im Zweiblattstadium) in Wasserkultur überführt wurden und zwar entweder in destilliertes Wasser oder in Kinetinlösungen der in Tabelle I angegebenen Konzentrationen. Die in destilliertes Wasser gebrachten Pflanzen erhielten eine Spritzung mit den gleichen Kinetinlösungen, und zwar die zu jeder Versuchsreihe gehörenden 10 Pflanzen insgesamt 10 ml Spritzlösung, der ausserdem 0,05% eines handelsüblichen Netzmittels beigemischt war. Zwei Tage nach der Spritzung bzw. nach Überführen in die Kinetinlösung wurden die Pflanzen in eine verdünnte

Knopsche Nährlösung überführt, von der 9 l mit 2,25 mC <sup>32</sup>P markiert waren. Die Nährstoffaufnahme erfolgt in grossen, 70 ml Nährlösung enthaltenden Reagenzgläsern, in deren jedes zwei Pflanzen eingesetzt waren. Nach 4 h wurden die Pflanzen geerntet, Blätter, Stengel und Wurzeln getrennt. Letztere wurden mehrfach mit Leitungswasser gewaschen. Nach Trocknung und anschliessender nasser Veraschung wurde in den einzelnen Pflanzenteilen der während 4 h aufgenommene radioaktive Phosphor im Flüssigkeitszählrohr gemessen. Jedes Versuchsglied umfasste 10 Pflanzen, von denen je zwei zusammen verarbeitet und gemessen wurden.

Die Ergebnisse sind in Tabelle I und II zusammengefasst; die Zahlen stellen Mittelwerte aus 5 Parallelbestimmungen dar. Sie zeigen, dass die mit steigenden Mengen Kinetin vorbehandelten Pflanzen sich gegensätzlich verhielten, je nachdem, ob die Sprosse oder die Wurzeln unter der Einwirkung von Kinetin gestanden hatten. In beiden Versuchen nahm die <sup>32</sup>P-Aufnahme der Gesamtpflanze bei Kinetingaben von mehr als 1,0 mg/l mit steigenden Kinetinkonzentrationen ab, wenn das Kinetin über die Wurzeln verabreicht, das heisst der Nährlösung zugesetzt worden war. Dagegen nahm nach Vorbehandlung der Sprosse mit Kinetin die <sup>32</sup>P-Aufnahme der Gesamtpflanze aus der Nährlösung bei Kinetingaben von mehr als 1,0 mg/l mit steigenden Kinetingaben bei Versuch 1 wenig, bei Versuch 2 sehr stark zu. Kinetingaben von 0,1 mg/l zeigten eine gegensätzliche Tendenz: sie ergaben bei Verabreichung durch die Wurzel eine geringe Förderung der

<sup>1</sup> K. MOTHES, L. ENGELBRECHT und O. KULAJEWA, Flora (Jena) 147, 445 (1959).

<sup>2</sup> K. MOTHES, Naturwissenschaften 15, 337 (1960).

Tabelle I. Aufnahme von <sup>32</sup>P durch die Wurzel mit Kinetin vorbehandelter Pflanzen in die Gesamtpflanze bzw. die Pflanzenteile von *Vicia faba*. Impulse (cpm) je g Trockenmasse

Versuch 1: Kinetin mg/l	über die Wurzeln verabreicht				über das Blatt verabreicht			
	Summe	Wurzeln	Stengel	Blätter	Summe	Wurzeln	Stengel	Blätter
0	89692	76874	10096	2722	101770	89104	9268	3398
0,1	98014	84921	10334	2759	97064	84103	7545	5116
1,0	81032	68410	7801	4821	109963	91489	11430	7044
10,0	75048	60714	10253	4081	113804	95678	11288	6838
20,0	59398	46110	11201	2087	119904	98534	12002	9368
30,0	55011	41176	11848	1987	128166	102513	14110	11543