

SHORT COMMUNICATION

UN NOUVEL ACIDE AMINE DANS LES GRAINES DE *VIGNA VEXILLATA*

G. A. DARDENNE, M. MARLIER et J. CASIMIR

Laboratoire de Chimie Organique et Biologique, Faculté des Sciences Agronomiques,
Gembloux, Belgique

(Reçu le 3 février 1972)

Key Word Index—*Vigna vexillata*; Leguminosae; L-(+)-*p*-aminophenylalanine.

Résumé—Un nouvel acide aminé naturel, dérivé de la phénylalanine a été isolé à partir d'une légumineuse, *Vigna vexillata* (L.) A. Rich. Sa structure a été déterminée et confirmée par la synthèse. Il s'agit de la L-(+) *p*-aminophénylalanine.

Abstract—A new natural amino acid, L-(+)-*p*-aminophenylalanine, has been isolated from a legume, *Vigna vexillata* (L.) A. Rich. Its structure was determined and confirmed by synthesis.

INTRODUCTION

DANS LE cadre de nos recherches sur les acides aminés libres des légumineuses, nous avons isolé une nouvelle substance à partir de *Vigna vexillata*. Il s'agit de la L-(+) *p*-aminophénylalanine. La phénylalanine est un acide aminé essentiel pour l'homme mais aussi pour toute autre forme de vie. De nombreux analogues de cet acide aminé ont été synthétisés et leurs propriétés antimétaboliques ont été étudiées. Des essais de Burckhalter et Stephens,¹ il ressort que la DL-*p*-aminophénylalanine est relativement active comme inhibiteur de croissance chez *E. coli*.

RESULTATS ET DISCUSSION

L'étude de la distribution des acides aminés libres de la fraction soluble dans l'éthanol des graines de *V. vexillata* (Phaseolinae) a permis par chromatographie bidimensionnelle sur papier et par chromatographie électrophorèse sur papier de mettre en évidence une tache assez intense de nature indéterminée et de coloration brune avec la ninhydrine. Elle se situe légèrement en dessous et à droite de la glutamine. Cette substance migre à l'électrophorèse sur papier comme les acides aminés basiques. Après purification de l'extrait alcoolique sur une colonne de résine échangeuse de cations (Amberlite CG 120, forme H⁺) et évaporation à sec de l'éluat ammoniacal, le résidu d'acides aminés a été fractionné sur une colonne de résine échangeuse d'anions (Dowex 1 × 2, Cl⁻); l'élution étant effectuée par l'eau.

Après isolement à l'état pur, la substance a été recristallisée. L'analyse élémentaire conduit à la formule C₉H₁₂N₂O₂. L'acide aminé possède une fonction αNH₂ qui a été mise en évidence par le test de Larsen et Kjær.² Le test de Le Rosen,³ caractéristique du noyau aromatique est positif. La substance réagit instantanément avec le réactif d'Ehrlich⁴ pour

¹ J. H. BURCKHALTER et V. C. STEPHENS, *J. Chem. Soc.* **73**, 56 (1951).

² P. O. LARSEN et A. KJÆR, *Biochem. Biophys. Acta* **38**, 148 (1960).

³ F. FEIGL, *Spot Tests*, Vol. II, p. 104, Elsevier, New York (1954).

⁴ I. SMITH, *Nature, Lond.* **171**, 43 (1953).

donner une coloration jaune intense. Avec l' α nitroso β naphтол, l'acide aminé se colore en brun. Il subit aisément la diazotation et par couplage avec l'acide chromotropique,⁵ il donne une coloration orange rouge.

Le spectre d'absorption UV démontre le caractère aromatique de la molécule. Le spectre IR présente aussi l'allure de celui d'un acide aminé aromatique. Par spectrographie RMN, on peut mettre en évidence un noyau benzénique substitué en para ainsi que les groupements méthylène et méthine. Les divers arguments qui précèdent nous permettent de proposer la formule suivante pour le nouvel acide aminé: $\text{HOOC}-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NH}_2$ (p). Cette structure a été confirmée par la synthèse de la DL- et L-*p*-aminophénylalanine. Le composé racémique a été synthétisé par Burckhalter et Stephens.¹

Comme eux, nous avons utilisé la méthode d'Albertson⁶ qui nous a permis d'obtenir la *p*-nitrophénylalanine, laquelle a été transformée en *p*-aminophénylalanine par hydrogénation catalytique en présence de platine d'Adam comme catalyseur.

Nous avons synthétisé l'acide aminé L par nitration de la L phénylalanine avec de l'acide nitrique fumant, suivie d'une réduction de la L *p*-nitrophénylalanine formée en L-*p*-aminophénylalanine. Cette méthode est analogue à celle utilisée par Harington et Pitt-Rivers⁸ et Wasser et Lewandowski⁷ pour la synthèse de la 3 amino-L-tyrosine. Plusieurs auteurs^{9,10} avaient déjà obtenu la L- et la D,L-*p*-aminophénylalanine par une méthode comparable. Les spectres IR des composés de synthèse DL et L sont identiques à celui du produit naturel. La configuration L de l'acide aminé naturel ainsi que celle du composé de synthèse a été confirmée par la réaction positive des acides aminés avec la L aminoacide oxydase.

Pour le produit naturel, les valeurs du pouvoir rotatoire dans l'eau et dans HCl sont aussi des arguments en faveur de la configuration L- (configuration-S-dans la nomenclature de Cahn *et al.*^{11,12}).

Une étude de la distribution des acides aminés libres des feuilles de *V. vexillata* nous a permis de démontrer également la présence de la *p*-aminophénylalanine dans le système foliaire.

Une analyse des acides aminés totaux des graines de *Vigna* par la méthode de Stein et Moore nous a permis de déceler l'acide aminé à la concentration de 0,44 % (poids frais) ce qui correspond à 1,9 % des acides aminés totaux.

Du point de vue chimiotaxonomique, nous avons étudié un grand nombre de Phaseolinae (*Phaseolus*, *Macroptillium*, *Macrotyloma*, *Dolichos* et *Vigna*). Le nouvel acide aminé n'est présent que dans *V. vexillata* et *V. nuda* N.E.Br.

Maréchal¹³ nous signale que ces deux espèces africaines présentent en commun un caractère morphologique particulier: carène largement recourbée et munie d'une poche latérale du côté droit. Ce caractère existe dans toutes les espèces asiatiques du subgén. *Ceratotropis* et chez les quelques espèces africaines: *V. longissima* Hutch., *V. stenophylla* Harms. et *V. kirkii* (Bak) Gillet. Il serait intéressant de vérifier la présence de la *p*-aminophénylalanine dans ces taxa. S'il en est ainsi, ce caractère pourrait présenter une valeur taxonomique à l'intérieur du genre *Vigna*.

⁵ F. O. GREEN et R. N. FEINSTEIN, *Analyt. Chem.* **29**, 1658 (1957).

⁶ N. F. ALBERTSON, *J. Am. Chem. Soc.* **68**, 451 (1946).

⁷ E. WASER et M. LEWANDOWSKI, *Helv. Chem. Acta* **4**, 657 (1921).

⁸ C. R. HARINGTON et R. PITT-RIVERS, *Biochem. J.* **38**, 320 (1944).

⁹ E. ERLÉNMEYER et A. LIPP, *Ann.* **219**, 219 (1883).

¹⁰ F. BERGEL et J. A. STOCK, *J. Chem. Soc.* 2409 (1954).

¹¹ R. S. CAHN et C. K. INGOLD, *J. Chem. Soc.* 612 (1951).

¹² R. S. CAHN et C. K. INGOLD, *Experientia* **12**, 81 (1956).

¹³ R. MERÉCHAL, communication personnelle.

EXPERIMENTALE

Matériel. Les analyses ont été effectuées sur des graines provenant de plants cultivés en serre. Les échantillons étudiés correspondent à un numéro d'introduction et à des herbiers de référence déposés à la chaire de Phytotechnie des régions chaudes à Gembloux. *Vigna vexillata*, No, d'introduction 111., provenance C.S.I.R.O. Camberra, Australie; *V. nuda* N.E.Br., No. d'introduction 400, graines prélevées de l'herbier F. L. Hendrickx 8588, provenance Kabompo, Zambie.

Chromatographie et électrophorèse. La chromatographie bidimensionnelle sur papier Whatman 3 MM a été réalisée en utilisant comme solvant pour la première dimension le n -BuOH-HCO₂H-H₂O (15:3:2) et pour la seconde dimension PhOH saturé par un tampon à pH 4,2 (acide citrique-Na₂HPO₄·2H₂O 0,08 M). Les chromatoelectrophorèses ont été réalisées sur du papier SS 2043 b mgl. Nous avons effectué une chromatographie avec n -BuOH-HCO₂H-H₂O suivie d'une électrophorèse à pH 4,2 (HOAc 1 N) ainsi qu'une chromatographie avec PhOH saturé par un tampon à pH 5,6 suivie d'une électrophorèse à pH 5,6 avec le même tampon (Na₂HPO₄·2H₂O, KH₂PO₄ 0,025 M). Les acides aminés ont été révélés par pulvérisation avec une solution de ninhydrine à 0,25% dans de l'éthanol et chauffage à 110° pendant 10 min. Nous avons aussi utilisé le réactif d'Ehrlich modifié: solution à 1% de *p*. diméthylaminobenzaldéhyde dans un mélange acétone-HCl concentré 9-1, v/v. Le Tableau 1 montre les valeurs de R_f du nouvel acide aminé ainsi que celles d'acides aminés de référence.

TABLEAU 1. VALEURS DE R_f DE L'ACIDE AMINE NATUREL ET DE PLUSIEURS ACIDES AMINES DE REFERENCE

| | $R_f \times 100$ n -BuOH-HCO ₂ H-H ₂ O | PhOH pH 4,2 |
|----------------------------------|---|-------------|
| Acide aminé naturel | 7 | 65 |
| L- <i>p</i> -Aminophénylalanine | | |
| de synthèse | 7 | 65 |
| Alanine | 17 | 48 |
| Glutamine | 5 | 46 |
| DL- <i>p</i> -Nitrophénylalanine | 48 | 80 |
| Phénylalanine | 58 | 84 |
| Tyrosine | 21 | 48 |

Isolement de l'acide aminé. Les graines (200 g) ont été finement broyées et extraites avec 3×1 l. d'éthanol à 70%. Les extraits filtrés ont été purifiés sur une colonne d'Amberlite CG 120, forme H⁺, 100-200 mesh ($20 \times 2,6$ cm). Après passage de l'extrait alcoolique, la résine a été lavée à l'alcool puis à l'eau. Les acides aminés ont été élués par NH₃ 1 N. L'éluat ammoniacal a été évaporé sous pression réduite à 40° et le résidu d'acides aminés (4,3 g) a été repris par le minimum d'eau. Les acides aminés ont alors été fractionnés sur une colonne de Dowex 1 \times 2, forme Cl⁻, 200-400 mesh ($120 \times 5,5$ cm). L'élution a été effectuée par l'eau, le débit à 1 ml par minute. Des fractions de 20 ml ont été recueillies. Les acides aminés basiques se retrouvent dans les fractions 60-87 et les acides aminés neutres dans les fractions 107-138. L'acide aminé inconnu traîne très fort sur la colonne; il passe dans les fractions 88-280. Il est pur dans les tubes 88-106 et 139-280. Ces fractions sont mélangées et évaporées à volume réduit. L'acide aminé cristallise facilement dans l'eau. Après deux recristallisations, on obtient 420 mg de cristaux transparents, incolores, se présentant sous la forme de fines aiguilles; ils sont très insolubles dans l'eau.

Structure de l'acide aminé. L'acide aminé s'opacifie vers 250° et il fond en se décomposant entre 260 et 264°. Il possède la composition centésimale suivante: C, 59,80; H, 6,86; N, 15,45; O, 18,01% ce qui correspond à la formule brute C₉H₁₂N₂O₂ avec les valeurs calculées: C, 60,00; H, 6,66; N, 15,55 O, 17,77%. Le spectre d'absorption UV démontre le caractère aromatique de la molécule: λ_{\max} 198 (ϵ 36 900) et 235 nm (ϵ 8800). Le spectre IR présente deux bandes d'absorption dans la région 3300-3500 cm⁻¹ ce qui permet de croire à l'existence d'un groupe NH₂ libre. La vibration asymétrique de NH₃⁺ se traduit par une absorption large située entre 3130 et 3030 cm⁻¹. Les amines aromatiques primaires présentent une bande intense entre 1340 et 1250 cm⁻¹, nous remarquons une bande à 1320 cm⁻¹; le noyau aromatique substitué en 1-4 est caractérisé par une bande large entre 860 et 800 cm⁻¹, nous avons une bande à 840 cm⁻¹. Le spectre NMR a été enregistré sur un appareil Varian Associates A 60, à température ambiante et avec le DSS comme standard interne (50 mg dans 0,5 ml de NaOD 2 N). Dans ces conditions, l'acide aminé présente trois massifs d'absorption (a), (b), (c): HOOC-CH (a) (NH₂)-CH₂(b)-C₆H₄(c)-NH₂. A δ = 3,46, un massif de surface relative égale à 1 est attribué au groupe méthine (a) du chaînon aminoacide. Le proton du groupe méthine est couplé avec les deux protons d'un groupe méthylène (b) représenté par un massif de surface relative égale à

2 et centré à 2,82 δ . La position du groupe méthylène nous permet de penser qu'il subit un effet moyennement déblindant. Ceci s'explique par l'existence d'un groupement benzénique représenté par un multiplet de surface relative égale à 4 ($\delta = 6,98$) que nous pouvons attribuer à un cycle substitué en para. Les mesures du pouvoir rotatoire ont été prises avec un spectropolarimètre à cellule photoélectrique Pepol 60, Bellingham Stanley. $[\alpha]_{580\text{ nm}}^{23^\circ} = +1^\circ$ (eau, $c = 0,3$); $[\alpha]_{580\text{ nm}}^{23^\circ} = +28^\circ$ (HCl 1 N, $c = 0,3$)

Synthèse de la DL-*p*-aminophénylalanine. Préparation du *p*-nitrobenzylacétamidocycanoacétate d'éthyle et de la DL-*p*-nitrophénylalanine: 5 g de Na, 34,2 g d'acétamidocycanoacétate d'éthyle et 150 ml d'EtOH sont chauffés sur une plaque munie d'un agitateur magnétique jusqu'à dissolution du Na. On ajoute alors, par petites portions 41 g de chlorure de *p*-nitrobenzyle. On agite 3 hr à la température du laboratoire puis on centrifuge. La solution résultante est évaporée à sec. L'ester se présente sous forme d'une masse semi-cristalline qui est immédiatement hydrolysée par chauffage à reflux pendant 6 hr avec 150 ml d'HCl concentré. L'HCl est évaporé sous vide, on reprend par l'eau et on évapore à sec plusieurs fois. Le résidu est alors repris par le minimum d'eau et le chlorhydrate d'acide aminé est passé sur une petite colonne d'Amberlite CG 120, forme H⁺. L'acide aminé est élué par NH₃ 1 N et l'éluat est évaporé sous vide. L'acide aminé est recristallisé dans un mélange eau-éthanol. $P_f = 245^\circ$ (lit.: 222–240^{°1} et 240–245^{°10}) C, 51,33; H, 4,75; N, 13,23%. Calculé pour C₉H₁₂N₂O₄: C, 51,43; H, 4,80; N, 13,33%.

Hydrogénation de la DL-*p*-nitrophénylalanine: 3 g de *p*-nitrophénylalanine dissous dans 150 ml d'HOAc 0,5 N sont soumis à l'hydrogénation en présence de platine d'Adam comme catalyseur. La réaction est menée sous trois atmosphères pendant une journée. Le catalyseur est filtré et la solution est passée sur une petite colonne de Dowex 1 \times 8 forme acétate pour éliminer la coloration jaune. Après évaporation de l'éluat, l'acide aminé est recristallisé dans un mélange eau-éthanol. $P_f = 248^\circ$; C, 59,91; H, 6,64; N, 15,46% ce qui correspond à la formule brute C₉H₁₂N₂O₂ avec les valeurs calculées C, 60,00; H, 6,66; N, 15,55%. Contrairement aux indications de Burckhalter et Stephens,¹ l'acide aminé cristallise sans molécule d'eau de cristallisation. Le spectre infrarouge du composé de synthèse est tout à fait identique à celui du produit naturel.

Synthèse de la L-*p*-aminophénylalanine. 4 g de L-phénylalanine sont agités à température ambiante pendant 6 hr avec 25 ml d'HNO₃ fumant. On évapore alors jusqu'à début de cristallisation et on laisse au repos au frigo pendant une nuit. Le nitrate de *p*-nitrophénylalanine est filtré et lavé rapidement avec de l'eau glacée. Le résidu est alors dissous dans le minimum d'eau bouillante et on ajoute alors de l'ammoniaque jusqu'à précipitation de l'acide aminé. On filtre et on soumet immédiatement la *p*-nitrophénylalanine ainsi formée à l'hydrogénation comme précédemment. La L-*p*-aminophénylalanine de synthèse est rapidement attaquée par la L-aminoacide oxydase.

Remerciements—Nous tenons à remercier le service de phytotechnie des régions chaudes (Professeur F. Hendrickx) pour l'aide qu'il nous a apportée au cours de ce travail.