

SHORT COMMUNICATION

4,5-DIHYDROXY-L-PIPECOLIQUE A PARTIR DE *CALLIANDRA HAEMATOCEPHALA*

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

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

(Reçu le 3 février 1972)

Key Word Index—*Calliandra haematocephala*; Leguminosae; new amino acid; 4,5-dihydroxy-L-pipecolic acid.

Résumé—Un nouvel acide aminé naturel, dérivé de l'acide pipécolique a été isolé à partir de feuilles de légumineuses, *Calliandra haematocephala* Hassk. Sa structure a été déterminée et confirmée par la synthèse. Il s'agit de l'acide 4,5-dihydroxy-L-pipécolique.

Abstract—A new natural amino acid, 4,5-dihydroxy-L-pipecolic acid, has been isolated from the legume, *Calliandra haematocephala* Hassk. Its structure was determined and confirmed by synthesis.

INTRODUCTION

PLUSIEURS acides aminés libres dérivés de l'acide pipécolique ont été découverts dans le règne végétal: l'acide 5-hydroxypipécolique,¹ l'acide 4-hydroxypipécolique,² l'acide 4 aminopipécolique³ et l'acide 4,5-déhydropipécolique (baikiaine).^{4,5}

L'étude des acides aminés libres présents dans les feuilles d'une Mimosaceae, *Calliandra haematocephala* Haask. nous a permis d'isoler un nouveau dérivé de l'acide pipécolique. Il s'agit de l'acide 4,5-dihydroxy-L-pipécolique. Signalons qu'un homologue inférieur de ce produit, la 2,3-*cis* 3,4-*trans*, 3,4-dihydroxyproline a été isolée de cellules de diatomées.⁶

RESULTATS ET DISCUSSION

L'examen d'un chromatogramme bidimensionnel sur papier de l'extrait alcoolique de *Calliandra* nous a permis de mettre en évidence en plus de quantités relativement importantes d'acide pipécolique, d'acide 5-hydroxypipécolique et d'acide 4-hydroxypipécolique, deux taches de nature indéterminée (A-B) dont une A en forte concentration. Une troisième substance inhabituelle (C) se révèle en gris à la ninhydrine et migre à l'electrophorèse comme les composés basiques. Nous l'avons identifiée à la tyramine en comparant les spectres infrarouges des chlorhydrates du produit naturel et d'un produit commercial.

Les *R*_{alanine} des trois substances et d'acides aminés de référence sont repris au Tableau 1. Les produits ont été séparés par chromatographie sur colonne de résine échangeuse d'ions. Ils ont été recristallisés sous forme libre et sous forme de chlorhydrate.

¹ A. I. VIRTANEN et S. KARI, *Acta Chem. Scand.* **8**, 1290 (1954).

² A. I. VIRTANEN et S. KARI, *Acta Chem. Scand.* **8**, 170 (1955).

³ W. SCEHNK et H. R. SCHÜTTE, *Naturwissenschaften* **7**, 233 (1961).

⁴ F. E. KING, T. J. KING et A. J. WARWICK, *J. Chem. Soc.* 3590 (1950).

⁵ N. GROBBELAAR, J. K. POLLARD et F. C. STEWARD, *Nature, Lond.* **175**, 703 (1955).

⁶ T. NAKAJIMA et B. E. VOLCANI, *Science* **164**, 1400 (1969).

La substance *B* se colore en rouge à la ninhydrine et en vert à l'isatine. Elle présente aux UV une fluorescence rouge brique caractéristique des acides iminés cycliques. Elle est neutre et rapidement hydrolysée < en un composé basique qui réagit en gris olive à la ninhydrine, en vert à l'isatine et en rouge aux UV. Le composé *B* a été isolé en faible quantité. Des essais sont en cours actuellement afin de multiplier la légumineuse dans nos serres. L'étude de la structure est en cours.

TABLEAU I. *R_{alanine}* DE L'ACIDE 4,5-DIHYDROXYPIPÉCOLIQUE ET D'ACIDES AMINÉS DE RÉFÉRENCE

	<i>n</i> -BuOH-HCO ₂ H-H ₂ O (15:3:2)	PhOH, pH 4,2
Alanine	1,00	1,00
Acide pipécolique	1,39	1,92
Acide 5-hydroxy pipécolique	0,81	1,45
Acide 4-hydroxy pipécolique	0,81	1,63
Acide 4,5-dihydroxy pipécolique	0,43	0,77
Substance <i>B</i>	0,82	1,85
Substance <i>C</i>	1,49	1,32
Baikiaine	1,23	1,90
Asparagine	0,31	0,59
Thrénonine	0,70	0,76
Valine	1,46	1,30

La substance *A* se colore en vert à la ninhydrine et à l'isatine. Elle présente aux UV une fluorescence rouge brique caractéristique des iminoacides cycliques. Le test au nitroprussiate-acétaldéhyde⁷ permettant de mettre en évidence la fonction NH est positif. La substance forme un complexe cuivrique⁸ qui indique la présence d'un acide α iminé. Elle n'est pas hydrolysable par chauffage avec HCl 6 N; elle migre à l'électrophorèse comme les acides aminés neutres. Le spectre IR présente une bande caractéristique de la vibration de valence OH à 3320 cm⁻¹. L'analyse élémentaire conduit à la formule C₆H₁₁O₄N. Le poids moléculaire de la forme libre, déterminée par osmométrie, est de 156 (calculé: 156).

Par diffraction aux rayons X, on a montré que le poids moléculaire du chlorhydrate est de 197,62 (calculé pour C₆H₁₂O₄NCl₁, 197,60). La réduction par HI et P rouge donne comme produit principal de l'acide *D,L*-pipécolique. La substance est rapidement oxydée par NaIO₄, les produits de la réaction sont principalement l'acide aspartique et la glycine; en très faible quantité, un acide aminé migrant à la chromatographie comme l'acide glutamique et un acide aminé acide non identifié. Nous sommes donc vraisemblablement en présence d'une substance possédant 2OH vicinaux.

L'oxydation par le permanganate en milieu acide et basique, l'oxydation catalytique permanganate-periodate donnent de l'acide aspartique et de la glycine en quantité importante, un acide aminé migrant à la chromatographie comme l'acide glutamique en faible quantité et en trace plusieurs autres composés réagissant à la ninhydrine. L'acide aminé naturel n'étant oxydé ni par la *L* ni par la *D* aminoacide oxydase, il semble qu'il appartienne à la

⁷ F. FEIGL, *Spot Tests*, Vol. II, Elsevier, New York, p. 189 (1954).

⁸ P. O. LARSEN et A. KJAER, *Biochem. Biophys. Acta* **38**, 148 (1960).

série L; la L aminoacide oxydase est en effet inactive vis à vis des L imino acides contrairement à la D amino acide oxydase vis à vis des D imino acides.⁹ Les divers arguments qui précèdent nous permettent de proposer la structure d'un acide 4,5-dihydroxy-L-pipécolique.

La synthèse de l'acide aminé a été réalisée par hydroxylation de la L-baikiaine que nous avons isolée à partir du bois de *Baikiaea plurijuga*. Nous avons utilisé deux méthodes: la première avec de l'eau oxygénée en présence de tétr oxyde d'osmium comme catalyseur donne théoriquement les deux composés *cis*; la seconde avec l'acide performique (acide performique-eau oxygénée 1:1), donne les deux composés *trans*. L'acide aminé naturel est inséparable par les techniques chromatographiques et électrophorétiques d'un des composés *cis* formés. Il ne correspond à aucune des substances obtenues par la synthèse des composés *trans*. Ayant pu isoler une quantité importante de baikiaine, la séparation des formes *cis* et *trans* est en cours. La configuration absolue de l'acide aminé naturel est en voie de détermination par diffraction aux rayons X.

EXPERIMENTALE

Chromatographie sur papier. Les solvants suivants ont été utilisés: *n*-BuOH-HCO₂H-H₂O (15:3:2)¹ et PhOH tamponné à pH 4,2 (acide citrique-Na₂HPO₄-2 H₂O, 0,08 M).² Le solvant¹ a été utilisé en premier lieu pour la chromatographie bidimensionnelle.

Separation des acides aminés. Un extrait purifié sur Amberlite CG 120, forme H⁺ des acides aminés (7 g) obtenu à partir d'un extrait alcoolique de feuilles de *Calliandra* a été soumis à un premier fractionnement sur une colonne de Dowex 1 × 2, forme Cl⁻ (109 × 3,5 cm), débit 2 ml/min. On a pu isoler à l'état pur la substance C. Les acides aminés neutres provenant de cette séparation ont alors été passés sur une colonne de Dowex 50 W × 4, forme pyridine (H = 100 cm, D = 3,8 cm). L'élution a été réalisée par un tampon pyridine-HCO₂H-H₂O (40:55:4905) de pH 3,3 (débit = 1,5 ml/min). La substance A a été élueée en premier lieu. Elle est pure dans les fractions 80-95. Elle passe ensuite en mélange avec la substance B, l'acide 5 hydroxypipécolique et l'acide 4 hydroxypipécolique (fractions de 96-232). Ces fractions ont ensuite été passées sur colonne de Dowex 50 W × 4, forme acide (80 × 3 cm) et élueées par HCl 1,5 N. Les produits A et B ont été séparés sous forme de chlorhydrate à l'état pur; leurs formes libres ont été obtenues par passage sur une colonne de Dowex 1 × 2. Les acides aminés ont été recristallisés dans un mélange eau-éthanol.

Structure du produit A. L'acide aminé s'opacifie à 233° et il fond en se décomposant entre 239 et 243°. Il possède la composition centésimale suivante: C, 44,86; H, 6,38; N, 9,81; O, 39,86%; Calculé pour C₆H₁₁O₄N: C, 44,72; H, 6,83; N, 8,69; O, 39,74%. [α]₅₈₉²⁰ nm -22,9° (c, 2, eau), [α]₅₈₉²⁰ nm -13,5° (c, 2, HCl 2 N).

Oxydation par KMnO₄-H₂SO₄. A 5 mg d'acide aminé dissous dans 5 ml H₂SO₄ à 10%, une solution de KMnO₄ à 1% dans de l'H₂SO₄ à 10% est ajoutée goutte à goutte jusqu'à coloration rouge persistante. La réaction a été menée à 20 et à 60°. La plus grande partie de l'H₂SO₄ est éliminé par le BaCO₃. Après filtration du BaSO₄, la solution est passée sur une colonne d'Amberlite CG 120, forme H⁺. Les produits de la réaction sont alors analysés par chromatographie sur papier et par électrophorèse à haut voltage.

Oxydation par NaIO₄-KMnO₄. On prépare une solution 0,02 M en NaIO₄ et 0,0004 M en KMnO₄ qui est ajustée à pH 8. On ajoute alors à 4 ml de cette solution 5 mg d'acide aminé; après 3 hr d'agitation à 20°, et passage sur une colonne d'Amberlite, les produits de la réaction sont soumis à la chromatographie.

Oxydation par NaIO₄. On fait réagir pendant 2 hr à la temp. du laboratoire 5 mg d'acide aminé et 5 ml d'une solution de NaIO₄ 0,3 M. La solution est passée sur Amberlite puis soumise à la chromatographie sur papier.

Reduction. On chauffe, pendant une nuit à 150° et en tube scelle, 5 mg d'acide aminé, 8 ml d'HI et 60 mg de P rouge. La solution résultante est purifiée sur Amberlite puis soumise à la chromatographie sur papier.

Synthèse des dérives cis. Un mélange *t*-BuOH-H₂O₂ 30% v/v (8:2, v/v) est parfaitement séché sur MgSO₄ anhydre. 10 mg de baikiaine sont dissous dans 5 ml de cette solution en présence de 2 mg de OsO₄. Après une agitation pendant 24 hr à temp. ordinaire, les produits de réaction sont chromatographiés.

Synthèse des dérives trans. On agite pendant 1 hr à 40°, 10 mg de baikiaine dissous dans un mélange HCO₂H-H₂O₂ 30% (5:5, v/v). Après évaporation à sec, le résidu est repris par l'eau et les produits de la réaction sont chromatographiés.

Remerciements—Nous tenons à remercier le Professeur Debuisson (Faculté des Sciences Agronomiques de l'Etat à Gembloux) qui nous a fourni les échantillons de plantes.

⁹ J. P. GREENSTEIN et M. WINTZ, *Chemistry of the Amino Acids*, Vol. 2, p. 1782, Wiley, New York (1961).