

L'ACIDE β -TRIMETHYLAMINOPROPIONIQUE DES RAMEAUX DE *LIMONIUM VULGARE* MILL

F. LARHER et J. HAMELIN

Laboratoire de Biologie végétale, U.E.R. Sciences Biologiques, Groupe de Recherche de Physicochimie structurale,
U. E. R. Structure et Propriétés de la Matière, Université de Rennes, B.P. 25 A
35031 Rennes Cedex, France

(Reçu le 14 Mai 1974)

Key Word Index—*Limonium vulgare*; Plombaginacée; halophyte; bétaines; acide β -triméthylaminopropionique.

Résumé—L'acide β -triméthylaminopropionique est isolé des rameaux de *Limonium vulgare*; sa structure est établie par spectroscopie IR, de RMN et de masse, et par comparaison avec un échantillon authentique. Cet acide pourrait former un ester avec la choline, elle-même identifiée dans les rameaux.

Abstract— β -trimethylaminopropionic acid was isolated from *Limonium vulgare*; its structure was determined by spectroscopic methods and confirmed by synthesis. This acid may occur also as an ester with choline.

INTRODUCTION

Au cours de l'étude du métabolisme azoté de *Limonium vulgare* Mill., lorsque les extractions sont effectuées en milieu fortement alcalin, on met en évidence un dégagement de triméthylamine [1]. Nous avons alors essayé de nous rendre compte si cette amine existait à l'état libre ou si elle provenait de la dégradation de un ou de plusieurs composés à ammonium quaternaire.

Nous avons mis en évidence et caractérisé une bétaine en C_3 qui, par hydrolyse, libère de la triméthylamine et qui, *pro parte*, existe dans la plante sous forme d'ester de choline.

RESULTATS ET DISCUSSION

La bétaine, extraite de la plante sous forme de chlorhydrate, est soluble dans l'eau et les acides dilués, insoluble dans l'éther éthylique et le chloroforme. Elle se révèle stable dans de l'acide chlorhydrique 6 N à 105°, pendant 48 hr. En présence de soude 6 N, à 40°, on observe une transformation avec libération quantitative de triméthylamine.

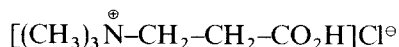
Sur les chromatogrammes, le composé ne réagit pas à la ninhydrine, mais donne un test positif au réactif de Dragendorff. Il est isolé, à l'état de chlorhydrate, par électrophorèse et chromatographie; sa structure est étudiée par spectroscopie.

Le spectre de RMN à 100 MHz (D_2O , δ par rapport au sel de sodium de l'acide triméthylsilyl-3

propane sulfonique (TMPS) pris comme référence) présente les signaux suivants: $\delta = 3,61$ (t 2 H); 3,07 (s 9 H); 2,92 (t 2 H). Le spectre IR du produit, mis en suspension dans le nujol, présente la bande large caractéristique des acides carboxyliques à 2900 cm^{-1} et une bande carbonyle à 1714 cm^{-1} . Le SM ne permet pas la mise en évidence du M^+ , cependant on observe les fragments suivants

$[CH_2 = CH-CO_2H]^+$, $m/e = 72$; $(CH_3)_2N^+ = CH_2$, $m/e = 58$ et les pics ^{35}HCl , ^{37}HCl .

A partir de ces résultats, nous proposons la structure acide β -triméthylaminopropionique



Cette attribution est confirmée suivant deux voies: comparaison des R_f et des mobilités électrophorétiques avec ceux d'un échantillon aimablement fourni par M. le Professeur Lindstedt [2]. Synthèse univoque, par action du chlorure de triméthylammonium sur l'acide acrylique, selon une technique récemment décrite [3] et comparaison des spectres IR, de RMN et de masse de la bétaine obtenue aux spectres du produit extrait de la plante.

Chez *L. vulgare*, l'acide β -triméthylaminopropionique peut se trouver soit sous forme libre soit sous forme combinée, toutes deux instables en milieu alcalin. La forme combinée est très labile en milieu aqueux ou acide et s'hydrolyse très rapide-

ment au cours de l'extraction et des différentes étapes de la purification. Par suite, toutes les tentatives pour isoler cette forme nous conduisent à l'acide β -triméthylaminopropionique et à un second composé qui présente une réaction positive au réactif de Dragendorff. Celui-ci, isolé par électrophorèse et chromatographie, est étudié par spectroscopie de RMN dans l'eau lourde: $\delta = 4,03$ (*m* 2H); 3,49 (*m* 2H) et 3,19 (*s* 9H). Ces caractéristiques sont aussi celles d'un échantillon commercial de chlorhydrate de choline [4]. L'identité des deux produits se vérifie également en électrophorèse et chromatographie.

La caractérisation de la bétaine et de la choline d'une part, les conditions dans lesquelles il est possible de mettre en évidence la forme liée d'autre part, nous permettent de supposer la présence dans la plante d'un ester dont nous envisageons la synthèse.

Actuellement, la bétaine extraite de la plante étant identifiée, sa synthèse étant réalisée en quantité suffisante, il nous est possible de rechercher son origine et son devenir dans les organes de *L. vulgare*, par l'emploi de molécules marquées.

Il faut signaler qu'à côté de l'acide β -triméthylaminopropionique et de la choline toujours bien représentés, il existe, dans *L. vulgare*, d'autres composés à ammonium quaternaire. Ceci pose le problème du rôle de ces molécules amphotères dans l'adaptation de la plante à la vie sur vases salées; en effet, chez les bactéries halophiles, Rafaëli-Eshkol considère que la glycine bétaine et la choline peuvent jouer un rôle déterminant dans la résistance au sel [5, 6].

PARTIE EXPERIMENTALE

La triméthylamine est séparée au CPV à microcatharomètre. Les spectres de RMN sont réalisés sur un appareil 100 MHz.

Extraction et purification. La fraction soluble totale est obtenue, en milieu hydroalcoolique à froid (EtOH, 80° GL 0°), à partir de 5 g de rameaux de *L. vulgare* lyophilisés et réduits en poudre. L'extrait alcoolique est évaporé à sec sous vide à 37° et le résidu est repris dans 4 ml H₂O. Cet extrait aqueux concentré est directement utilisable pour l'isolement du produit.

Pour l'isolement, on effectue, dans un premier temps, une électrophorèse à pH 3,4, sur papier Whatman 3 MM, en sol. tamponnée (C₅H₅N-HOAc-H₂O, 0,6:10:98,4). Le champ électrique est maintenu à 80 V/cm pendant 1 hr 30 min. La bétaine se sépare partiellement des acides aminés basiques et neutres en une bande qui, découpée, est fixée par piqûres en zigzag, sur une feuille de papier Whatman 3 MM, selon la technique de Efron [7]; ceci permet une migration en chromatographie dans le solvant (*n*-BuOH-HOAc-H₂O, 12:3:5) sans

opération intermédiaire. Dix électrophore-chromatogrammes de ce type suffisent pour traiter la totalité de l'extrait aq. (4 ml). Après élimination des solvants de chromatographie, par chauffage à 80° au four ventilé pendant 14 hr, on élue le produit à l'aide d'HCl 0,01 N. L'éluat, concentré sous vide, est alors soumis à une électrophorèse sur papier Whatman 3 MM dans HCOOH 0,75 N, le champ électrique étant fixé à 40 V/cm pendant 1 hr 15 min. Les bandes contenant le produit isolé sont purgées de l'acide formique en excès, par un chauffage à 80° au four ventilé pendant 14 hr, puis éluées à l'aide d'HCl 0,01 N. L'éluat est filtré sur verre fritté, concentré sous vide à 37°, puis lyophilisé. La masse du produit lyophilisé recueilli est de l'ordre de 50 mg.

Propriétés électrophorétiques. Les mobilités électrophorétiques (ME) de l'acide β -triméthylaminopropionique, exprimées par rapport à la mobilité de la choline, sont déterminées à différents pH: pH 2,0 (HCOOH 0,75 N), ME = 0,79; pH 3,4 (C₅H₅N-HOAc-H₂O, 0,6:10:98,4), ME = 0,54; pH 3,9 (C₅H₅N-HOAc-H₂O, 7,5:25:96,7), ME = 0,31; pH 5,3 (C₅H₅N-HOAc-H₂O, 10:4:98,6), ME = 0,12; pH 11,3 (NH₄OH 0,2 N), ME = 0,06.

Propriétés chromatographiques. Les *R_f* obtenus sur papier Whatman 3 MM sont les suivants: *n*-BuOH-HOAc-H₂O (12:3:5), *R_f* = 0,34; 2-BuOH-HOAc-H₂O (90:10:29), *R_f* = 0,38; *n*-BuOH-C₅H₅N-HOAc-H₂O (4:1:1:2), *R_f* = 0,32; 2-BuOH-HCOOH-H₂O (15:3:2), *R_f* = 0,28; PhOH-EtOH-H₂O (15:4:1), *R_f* = 0,93. CCM sur gel de silice G selon la technique de Eneroth et Lindstedt [7], permet de déterminer, pour l'acide β -triméthylaminopropionique, les mobilités suivantes par rapport à la créatinine (Rc): MeOH-NH₄OH (75:25), Rc = 0,55; MeOH-Me₂CO-HCl (90:10:4), Rc = 0,64.

Mise en évidence de l'ester de l'acide β -triméthylaminopropionique et de la choline. Seule l'électrophorèse, en haute tension à pH 3,4 (C₅H₅N-HOAc-H₂O, 0,6:10:98,4), permet de mettre en évidence l'ester en le dissociant de la bétaine libre. La bande correspondant à cet ester donne une coloration rouge brique très intense au réactif de Dragendorff; elle libère de la triméthylamine par action de la soude 6 N à 40°. Au cours de son élution par 0,01 N HCl, l'ester s'hydrolyse en un composé A qui est l'acide β -triméthylaminopropionique et un composé B. On peut dissocier ces deux composés par électrophorèse sur papier Whatman 3 MM en sol. tamponnée de pH 5,3 (C₅H₅N-HOAc-H₂O, 4:10:98,6). Le composé B est ensuite facilement isolé, par une chromatographie de 20 hr dans le solvant *n*-BuOH-HOAc-H₂O (12:3:5); isolé en quantité suffisante, il est identifié à la choline, par spectroscopie IR et de RMN et par cochromatographie.

Remerciements.—M. Guénot ingénieur chimiste, au Centre Régional de Mesures Physiques de l'Ouest, a enregistré les spectres de masse, nous le remercions très vivement de son aimable assistance.

BIBLIOGRAPHIE

1. Larher, F. et Bernard, T. (1970) *Compt. Rend., Paris* **270**, 1458.
2. Lindstedt M. (Centrallaboratoriet, Sahlgrenska Sjukhuset, Göteborg, Suède) nous a également fourni les bétaines linéaires en C₄, C₅ et C₆. L'étude de cette série et de la bétaine en C₂ montre que seule la bétaine en C₃ perd facilement la triméthylamine selon la réaction de dégradation d'Hoffman.
3. Le Berre, A. et Delacroix, A. (1973) *Bull. Soc. Chim.*, (7-8), 2404.

4. Le chlorhydrate de choline de référence est un produit Sigma.
5. Rafaeli-Eshkol, D. (1968) *Biochem. J.* **109**, 679.
6. Rafaeli-Eshkol, D. et Avi-Dor, Y. (1968) *Biochem. J.* **109**, 687.
7. Ffron, M. L. (1968) *Chromatographic and Electrophoretic Techniques* (Smith, I., ed.), vol. II, 166.
8. Eneroth, P. and Lindstedt, G. (1965) *Analyt. Biochem.* **10**, 479.