

ACIDE 3(R)[1'(S)-AMINOCARBOXYMETHYL]2-PYRROLIDONE-5(S)-CARBOXYLIQUE DANS LES GRAINES DE *PENTACLETHRA MACROPHYLLA*

ANDRE WELTER et JOSEPH JADOT

Chimie Organique, Université de Liège, 1B, quai Roosevelt, 4000, Liège, Belgique

et

GASTON DARDENNE, MICHEL MARLIER et JEAN CASIMIR

Chimie Organique et Biologique, Faculté des Sciences Agronomiques, 5800, Gembloux, Belgique

(Reçu le 10 juillet 1974)

Key Word Index—*Pentaclethra macrophylla*; Légumineuse; acides aminés non protéiques; acide 3(R)[1'(S)-aminocarboxyméthyl]2-pyrrolidone-5(S)-carboxylique; bétaine; spectrographie ^{13}C et ^1H RMN.

Abstract—The isolation of a new naturally occurring amino acid, 3(R)[1'(S)-aminocarboxymethyl]2-pyrrolidone-5(S)-carboxylic acid, from the seeds of *Pentaclethra macrophylla* is described. The configuration of the compound has been established by ^{13}C and ^1H NMR and CD spectroscopy. These seeds also contain a large quantity of bétaine.

Résumé—Nous avons isolé un nouvel acide aminé libre à partir de graines de *Pentaclethra macrophylla*. Il s'agit de l'acide 3(R)[1'(S)-aminocarboxyméthyl]2-pyrrolidone-5(S)-carboxylique. Sa configuration a été établie par spectrographie ^{13}C et ^1H RMN et par l'examen des courbes de dichroïsme circulaire. Les graines de *P. macrophylla* contiennent aussi une grande quantité de bétaine.

INTRODUCTION

Dans le cadre de nos recherches sur les acides aminés et dipeptides libres des légumineuses [1–6] et en particulier des Mimosoideae [7–8], nous avons identifié une nouvelle substance acide dans les graines de *Pentaclethra macrophylla* Benth. Cet acide aminé a été isolé en quantité appréciable et il a été identifié par des méthodes chimiques et physiques comme étant l'acide 3(R)[1'(S)-aminocarboxyméthyl] 2-pyrrolidone-5(S)-carboxylique. C'est la première fois qu'un acide aminé ayant une telle configuration est isolé. Il est difficile de concevoir le processus de biosynthèse d'une pareille molécule. Les graines de *P. macrophylla* contiennent aussi une grande quantité de proline, d'acide pipécolique, d'acide 5-hydroxypipécolique et de bétaine.

RESULTAT ET DISCUSSION

Les graines de *P. macrophylla*, souvent appelées dans la littérature anglo-saxonne "owala seeds or pauco nuts" à cause de leur forte teneur en huile d'owala (50% en poids de substances extractibles au CHCl_3) renferment une quantité appréciable d'alcaloïdes, en particulier de la caffèoylputrescine et de la paucine [9–12a]. Krauss et Reinbothe [13,14] ont analysé un grand nombre d'espèces de la sous-famille des Mimosoideae et ont décelé par CCM uniquement, une forte concentration d'acide dichrostachinique dans les graines de *P. macrophylla*. Désireux d'isoler cet acide aminé en vue d'études ultérieures, nous avons soumis à l'examen chromatographique et électrophorétique un extrait hydro-alcoolique de ces graines. Nous avons mis en évidence une tache qui à la chroma-

Tableau 1. ^1H RMN, déplacements chimiques et constantes de couplages*

	H ₅	H ₁	H ₃	H _{4,1}	H _{4,2}
	4,79(<i>t</i>)	4,53(<i>d</i>)	3,55(<i>s</i>)	3,19(<i>o</i>)	2,44(<i>o</i>)
Double	x	2	6	4	4
résonnance	3	x	3	8	8
J (en Hz)	$J_{\text{H}_5-\text{H}_{4,1}} = 8,1$ $J_{\text{H}_5-\text{H}_{4,2}} = 8,5$	$J_{\text{H}_1-\text{H}_3} = 6,3$		$J_{\text{H}_3-\text{H}_{4,1}} = 9,2$ $J_{\text{H}_{4,1}-\text{H}_{4,2}} = 13,8$	$J_{\text{H}_3-\text{H}_{4,2}} = 9,8$
en fct					
pH: 11 (NaOD)	-0,1	-0,4	-0,13	-0,02	+0,005
pH: 0,5 (TFA)	+0,07	+0,3	+0,05	+0,09	+0,05

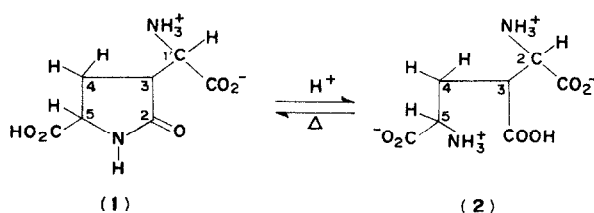
* Les constantes de couplages et les déplacements chimiques ont été déterminés dans D_2O sur un spectromètre CAMECA 250. Les valeurs sont en ppm par rapport au TMS pris comme référence externe. Les signes des constantes de couplages sont supposés positifs pour 3J et négatifs pour 2J . Les variations des déplacements chimiques en fonction du pH ont été enregistrées sur un spectromètre Varian HA 100. Les symboles *t*, *d*, *s* et *o* signifient triplet, doublet, sextuplet et octuplet.

tographie bidimensionnelle sur papier se situe à la place de l'acide dichrostachinique. Cette substance ne réagit que très faiblement avec le réactif caractéristique des acides aminés soufrés [15]; par HVE, elle est acide mais ne migre pas comme l'acide dichrostachinique ajouté comme étalon interne. Ces constatations nous ont amenés à séparer cette substance.

Après purification de l'extrait hydro-alcoolique sur une colonne de résine échangeuse de cations et évaporation à sec de l'éluat ammoniacal, le résidu d'acides aminés a été fractionné sur une colonne de résine échangeuse d'anions. Le composé acide inconnu passe entre l'acide glutamique et l'acide aspartique. Il a été recristallisé dans l'eau. Il se colore en gris-bleu avec la ninhydrine et ne réagit pas avec le réactif à l'iodoplatinate [15]. L'analyse élémentaire conduit à la formule $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_5$. Le titrage potentiométrique par NaOH 0,1 N fournit une valeur de pK_{a2} 3,14 et un équivalent de titration égal à 204. La substance possède une fonction α NH_2 qui a été mise en évidence par le test de Larsen-Kjaer [16]. Le dosage du groupe aminé par la méthode de Van Slyke [17] révèle la présence d'un seul groupe α NH_2 . Le test de Rydon-Smith [18] prouve l'existence du groupe $-\text{CONH}-$. Le test à l'hydroxamate pour la fonction lactame, adapté pour l'acide pyroglutamique, donne un résultat positif [19]. Le spectre IR pris en pastille de KBr indique la présence de vibrations NH_2^- à 3415 et 3230 cm^{-1} et C=O à 1693 cm^{-1} . Ces vibrations peuvent correspondre à une lactame à 5 pièces. On remarque à 1720 et 1220 cm^{-1} les vibrations caractéristiques d'une fonction carboxylique non ionisée. Des informa-

tions complémentaires ont été obtenues par spectrographie ^{13}C et ^1H RMN. L'examen du spectre du ^{13}C RMN, du spectre découplé "hors résonance" et les valeurs des déplacements chimiques nous permettent de déterminer la présence d'un groupement méthylénique ($\delta = 34,2$), de trois groupes méthynes et de trois groupes carbonyles (voir Partie Expérimentale).

Les résultats du ^1H RMN sont résumés au Tableau 1. Le spectre obtenu à 250 MHz a été traité comme un système du premier ordre. Le proton H(5), fortement déblindé, résonne à un champ normal pour un proton situé en α de l'atome d'azote de la fonction lactame. On observe un déplacement semblable (4,78 ppm) du même proton dans l'acide pyroglutamique et les résultats de la littérature confirme cette hypothèse [20]. Le déplacement chimique du proton H(1'), très sensible au variation de pH, caractérise sans ambiguïté un proton situé sur le C porteur de la fonction acide aminée. Le déplacement du proton H(3) correspond à celui d'un proton situé en α du carbonyle d'une fonction lactame [20]. Les protons H(4), pour lesquels on observe un couplage géminale de -13,8 Hz, constituent le groupe méthylénique décelé par ^{13}C RMN. Ces considérations, associées à l'examen des couplages vicinaux, permettent de proposer la formule 1.



Si nous considérons que la configuration en C(1') est *S*-(ou *L*-) (voir rotations moléculaires et dichroïsme circulaire), il reste à fixer la positions des substituants en C(3) et C(5) pour connaître la configuration absolue de la molécule. Les angles dièdres mesurés sur les modèles Dreiding représentant les configurations 3(*S*), 5(*S*) et 3(*R*), 5(*R*) (formes *trans*) sont incompatibles avec les constantes de couplages observées, quelle que soit la conformation du cycle. La relation entre les angles et les couplages est la mieux satisfaite lorsque les substituants du cycle se trouvent en position *cis* pseudoéquatoriale 3(*S*), 5(*R*) ou 3(*R*), 5(*S*). Dans ces deux cas, les angles observés sur modèles sont de environ 150° entre H(3)-H(4,1 ou 4,2) et H(5)-H(4,1 ou 4,2), de environ 30° entre H(3)-H(4,2 ou 4,1) et H(5)-H(4,2 ou 4,1). La lactame pentagonale prend une conformation enveloppe analogue à la forme *C_s* du cyclopentane [21,22]. Cette conformation est d'ailleurs celle attendue pour un cycle pyrrolidone 3,5 disubstitué en raison de la planéité du groupe amide [23,24] et des interactions stériques qui poussent les substituants à occuper des positions pseudoéquatoriales [21]. Le spectre pris dans l'acide trifluoroacétique pur montre une constante de couplage vicinal $J_{1,3}$ de 10 cps. L'acide aminé, qui se trouve sous forme protonée, présenterait une stabilisation due à des liaisons hydrogènes entre le C=O du cycle et le COOH du résidu glycyle. L'examen des projections gauches de Newmann entre les carbones asymétriques C(1') et C(3), pour chacun des diastéréoisomères *cis*, semble indiquer que seule la forme 1'(*S*), 3(*S*), 5(*R*) est compatible avec la constante de couplage de 10 cps. Cependant, si on considère les projections de Newmann sous leurs formes presque éclipsées, en raison des forces attractives dues à la liaison hydrogène, la forme 1'(*S*), 3(*R*), 5(*S*) semble être la plus probable. La configuration absolue à l'état solide cristallin est actuellement à l'étude par diffraction aux rayons X. Si on considère que la configuration en C(1') est *-S*, les premiers résultats confirment la deuxième hypothèse 1'(*S*), 3(*R*), 5(*S*) [25].

La facilité de rupture de la fonction lactame est étudiée. L'hydrolyse acide (HCl conc.) donne lieu à un équilibre cycle-chaîne ouverte; ce comportement est semblable à celui obtenu pour l'acide pyroglutamique [26,27] et pour la saccharopine [28]. Le produit à chaîne ouverte (2), a été isolé. Il possède deux fonctions α NH₂ déterminées par la

méthode de Van Slyke. L'analyse élémentaire et l'étude du spectre ¹H RMN (voir Partie Expérimentale) nous permet de proposer la structure: acide 2,5-diamino-3-carboxyadipique; ce résultat confirme la formule proposée pour le produit naturel. Lorsque l'hydrolyse est effectuée par HCl 0,5 N, il y a formation, en plus du produit à chaîne ouverte, de plusieurs substances acides réagissant en jaune avec la ninhydrine et qui pourraient être les lactames à 6 pièces formées à partir de l'acide 2,5-diamino-3-carboxyadipique. L'étude de ces produits d'hydrolyse fera l'objet d'une prochaine publication.

Le chromatogramme bidimensionnel de l'extrait de *Pentaclethra* révèle aussi une tache importante à l'endroit de l'acide 5-OH pipécolique ainsi qu'un spot très jaune à la ninhydrine à la place de la proline. Ces deux substances ont été isolées et déterminées par IR. Cependant lors de la séparation de la fraction "acides aminés neutres" sur une colonne de cations et élution par HCl 1 N, nous avons isolé une substance qui passait avec la proline et qui, par recristallisation fractionnée, a pu être séparée à l'état pur. La forme libre de ce composé a été identifié comme étant la bétaine par IR et RMN. Ce dérivé de la glycine se trouve dans les graines à une concentration de environ 1% du poids frais.

PARTIE EXPERIMENTALE

Isolement de l'acide 3-aminocarboxyméthyl-2-pyrrolidone-5-carboxylique. Les graines de *P. macrophylla* (Zaire, Kinshasa, 106 g) ont été grossièrement broyées et extraites 3 fois par CHCl₃. Elles ont ensuite été pulvérisées finement et extraites avec 2 fois 2 l. d'EtOH à 70%. L'extrait filtré a été purifié sur une colonne de Lewatit® S 1080, H⁺, 100–200 mesh, 3 × 40 cm. Après passage de l'extrait alcoolique, la résine a été élue par NH₃ 1 N. Le résidu (3,66 g) a été repris par le minimum d'eau et les acides aminés ont été fixés sur une colonne de Lewatit® M 5080, forme AcO⁻, 100–200 mesh, 2,8 × 35 cm. Les fractions basiques et neutres ont été éluées par H₂O. Les acides aminés acides ont alors été élués par HOAc 0,5 N. Des fractions de 20 ml ont été recueillies. La substance passe entre l'acide glutamique et l'acide aspartique. Elle a été recristallisée par l'eau (450 mg) (C, 41,30; H, 4,84; N, 13,71. Calc. pour C₇H₁₀O₅N₂: C, 41,53; H, 4,95; N, 13,86%) IR: $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ 3410 cm⁻¹ (m), 3230(m), 2930(fb), 1720(fb), 1712(ft), 1963(fb), 1600(ft), 1550(m), 1517(m), 1410(ft), 1370(fb), 1318(m), 1220(ft), 1150(m), 1118(m), 1080(m), 1030(m), 950(m), 842(m), 717(m). ¹³C RMN: δ (TMS interne) dans D₂O + TFA: 34,5, 48,2, 59,5, 60,5, 173,7, 179,0, et 180,6. ppm. $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 6,0^\circ$ (c 0,034, H₂O), $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 35,0^\circ$ (c 0,070, 0,1 N HCl). Un effet Cotton positif a été observé par la mesure des courbes de dichroïsme circulaire (212 nm dans H₂O et 223 nm dans HCl).

Hydrolyse du nouvel acide aminé. La substance a été hydrolysée par HCl conc. (chauffage à reflux, 12 hr). Après 3 dissolu-

tions successives et évaporation dans l'eau, le résidu a été passé sur une colonne de résine échangeuse d'anions (Lewatit® M 5080, forme acétate, $2,4 \times 54$ cm, élution par HOAc 0,5 N, 1 ml/min). Le produit non hydrolysé passe dans les tubes 135–170 tandis que un nouvel acide aminé à chaîne ouverte, l'acide 2,5-diamino-3-carboxyadipique, passe dans les tubes 42–53. Ce dernier a été recristallisé dans l'eau. (C, 38,00; H, 5,63; N, 11,90. Calc. pour $C_7H_{12}N_2O_6$ C, 38,18; H, 5,49; N, 12,72%) RMN: C(2) δ 4,63, *d*, 1H; C(3) δ 3,78, *m*, 1H; C(4) δ 2,43, *m*, 2H; C(5) δ 4,42, *t*, 1H. Les déplacements chimiques sont calculés en ppm par rapport au 2,2,3,3-tétradeutéro-3-(triméthylsilyl) propionate de Na dans D_2O + TFA. Le spectre pris dans TFA pur confirme la présence de 2 groupes NH_3^+ .

Structure de la bétaine. Le chlorohydrate de bétaine isolé après passage sur une colonne de Lewatit® S 1080, H^+ , élution par HCl 1 N a été purifié sur une petite colonne de Lewatit® S 1080, H^+ , élution par NH_3 . RMN: δ (ppm) dans D_2O : 4,44, *s*, $-CH_2$; 3,79, *s*, $-(CH_3)_3$. Etalon externe: TMS.

Méthodes d'analyses. La chromatographie sur papier Whatman 3 MM a été réalisée en utilisant comme solvants le mélange *n*-BuOH-HCOOH- H_2O (15:3:2) et le phénol saturé par un tampon à pH 4,2 (acide citrique- Na_2HPO_4 , 2 H_2O , 0,08 M). R_{ASP} : BuOH, **1** = 0,38, **2** = 0,20; PhOH, **1** = 1,1, **2** = 0,50. HVE a été réalisé à pH: 3,6, 70 V/cm, 90 min; les mobilités par rapport à l'anode sont en cm: Ac. glut. 1,2; Ac. asp. 4,3; **1**, 6,8; **2**, 4,5.

Remerciements—Nous tenons à remercier les Professeurs C. Evrard et Cl. Delaude qui ont récolté les graines *P. macrophylla*.

REFERENCES

- Dardenne, G., Casimir, J., Bell, E. A. et Nulu, J. R. (1972) *Phytochemistry* **11**, 787.
- Dardenne, G., Bell, E. A., Nulu, J. R. et Cone, C. (1972) *Phytochemistry* **11**, 791.
- Evrard, G., Durant, F. et Dardenne, G. (1974) *Cristal Struct. Comm.* **3**, 65.
- Dardenne, G., Marlier, M. et Casimir, J. (1972) *Phytochemistry* **11**, 2657.
- Dardenne, G. et Thonart, Ph. (1973) *Phytochemistry* **12**, 473.
- Dardenne, G., Casimir, J. et Sørensen, H. (1974) *Phytochemistry* no. 889/III.
- Marlier, M., Dardenne, G. et Casimir, J. (1972) *Phytochemistry* **11**, 2597.
- Evrard, G., Durant, F. et Marlier, M. (1974) *Cristal Struct. Comm.* **3**, 61.
- Harborne, J. B., Boulter, D. et Turner, B. L. (eds.) (1971) *Chemotaxonomy of the Leguminosae*. Academic Press. London.
- Hollerbach, A. et Spiteller, G. (1970) *Monatsh Chem.* **101**, 141.
- Merks J. Neuer. Geb. Pharmakother. **11**, 1894.
- Eliel, E. (1962) *Stereochemistry of Carbon Compounds*, series *Fats*. Chapman & Hall, London.
- Mbadiwe, E. I. (1973) *Phytochemistry* **12**, 2576.
- Krauss, G. J. et Reinbothe, H. (1970) *Biochem. Physiol. Pflanz. (BPP)* **161**, 243.
- Krauss, G. J. et Reinbothe, H. (1973) *Phytochemistry* **12**, 125.
- Smith, I. (1969) *Chromatographic and Electrophoretic Techniques*, I, p. 119. Heinemann, London.
- Larsen, P. O. et Kjaer, A. (1960) *Biochem. Biophys. Acta* **38**, 148.
- Van Slyke, D. (1929) *J. Biol. Chem.* **83**, 425.
- Rydon, H. N. et Smith, P. W. G. (1952) *Nature* **169**, 922.
- Greestien, J. P. et Winitz, M. (1961) *Chemistry of the Amino Acids*, Vol. 3, p. 1940. Wiley, New York.
- Jackman, L. M. et Sternhells, S. (1969) *Application of NMR Spectroscopy in Organic Chemistry*, Vol. 5. Pergamon, Oxford.
- Eliel, E. (1962) *Stereochemistry of Carbon Compounds*, series in advanced chemistry, Chap. 9. McGraw-Hill, New York.
- Kilpatrick, E. (1947) *J. Am. Chem. Soc.* **69**, 2483.
- McL Mathieson, A. (1963) *Tetrahedron Letters* **2**, 81.
- Pauling, L. et Corey, R. B. (1952) *J. Am. Chem. Soc.* **44**, 3964.
- Dupont, L., Dideberg, O. et Welter, A. *Acta Cryst.* à paraître.
- Wilson, H. (1939) *J. Biol. Chem.* **119**, 309.
- Foreman, F. W. (1947) *Biochem. J.* **8**, 481.
- Nabeta, K., Koyama, M. et Sakamura, S. (1973) *Agr. Biol. Chem.* **37**, 1401.