

MISE EN EVIDENCE DE L'ACIDE 2-TRIMETHYLAMINO 6-CETOHEPTANOIQUE DANS LES RAMEAUX DE *LIMONIUM VULGARE*

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 4 janvier 1975)

Key Word Index—*Limonium vulgare*; Plumbaginaceae; halophyte; bêtaïnes; choline esters; 2-triméthylamino-6-ketoheptanoic acid.

Abstract—2-Triméthylamino-6-ketoheptanoic acid was isolated from *Limonium vulgare*. Its structure was determined by spectroscopic methods. In the plant, this acid occurs as a choline ester.

INTRODUCTION

Au réactif de Dragendorff, il est possible de mettre en évidence, dans la fraction azotée soluble de *Limonium vulgare*, de nombreux composés triméthylammoniés. Parmi ceux-ci, la choline, la neurine et la glycine-bêtaïne sont facilement identifiées par cochromatographie. L'acide β -triméthylaminopropionique a été isolé, sa structure établie par spectroscopie et confirmée par synthèse [1]. Le β -triméthylaminopropionate de choline a également été caractérisé [1]. Il restait à déterminer un autre composé qui, par traitement chlorhydrique à chaud, s'hydrolyse en choline et en bêtaïne. Cette bêtaïne, purifiée par électrophoréchromatographie et recueillie sous forme de chlorhydrate est étudiée par spectroscopie: il s'agit de l'acide 2-triméthylamino 6-cétoheptanoïque.

RESULTATS ET DISCUSSION

La bêtaïne, extraite des rameaux de *L. vulgare* sous forme de chlorhydrate, est très soluble dans l'eau, l'éthanol, les acides dilués et insoluble dans le chloroforme. Elle est stable aussi bien en milieu acide (HCl 6 N, 105°, 48 hr) qu'en milieu alcalin (NaOH 6 N, 40°, 1 hr). Elle ne réagit pas à la ninhydrine, mais elle donne une réaction positive à l'aniline-glucose [2] et au réactif de Dragendorff.

Le spectre IR du chlorhydrate lyophilisé, en suspension dans le Nujol, présente la bande large caractéristique du groupement $-\text{OH}$ d'acide carboxylique à 2900 cm^{-1} , une vibration de valence $\nu\text{ C}=\text{O}$ d'acide, à 1714 cm^{-1} et une vibration de valence $\nu\text{ C}=\text{O}$ de cétone, à 1708 cm^{-1} .

Le spectre de RMN du chlorhydrate en solution dans l'eau lourde, effectué à 100 MHz, présente les signaux suivants (δ par rapport au TMPS): $\delta = 2,2\text{ ppm}$ (s 3 H); $2,62$ (m 2 H); $2,85$ (m 2 H); $3,2$ (s 9 H); $3,7$ (m 2 H); $4,5$ (m 1 H ou 2 H). La position de ce dernier signal, au pied du pic de DOH, ne permet pas de conclure, après intégration, à la présence de 1 H ou 2 H.

Le SM, comme c'est le cas pour beaucoup de sels d'ammonium quaternaire [3], ne présente pas d'ion moléculaire. Cependant, l'étude des divers fragments observés apporte des informations à l'appui de la structure acide 2-triméthylamino 6-cétoheptanoïque proposée. Les ions principaux suivants sont observés: $m/e = 143$, $m/e = 116$, $m/e = 72$, et le schéma de fragmentation de la Fig. 1 permet de rendre compte de leur apparition.

L'ion 143 résulte vraisemblablement de l'ion moléculaire par élimination de triméthylamine. L'ion 187, obtenu à partir de l'ion moléculaire par perte de MeCl peut donner, par une coupure en β , l'ion 116. L'ion 71 (187 moins 116) est égale-

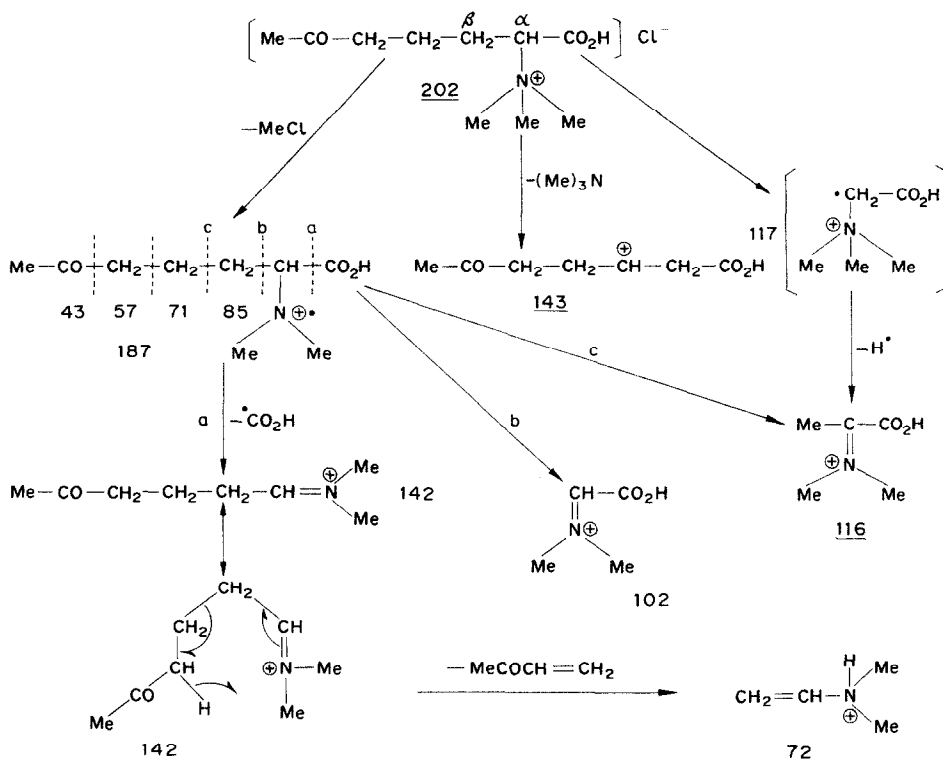


Fig. 1. Schéma de fragmentation de l'acide 2-triméthylamino 6-cétoheptanoïque en SM.

ment présent dans le spectre. Il faut toutefois signaler qu'une coupure en α de l'acide initial conduirait à l'ion 117 qui, par élimination d'un proton, donnerait aussi l'ion 116.

La présence de l'ion 72 est un argument en faveur de la position en α du groupement triméthylamino. Il pourrait se former, par l'intermédiaire de l'ion 142, obtenu par perte du carboxyle de l'ion 187 (a); l'ion 142 conduisant, après réarrangement de MacLafferty, à l'ion 72. Cette formation est incompatible avec une position en β du groupement amino. De plus, dans cette dernière hypothèse, la formation du fragment 142, $Me-CO-CH_2-CH_2-CH=CH-CO_2H$, devrait être très importante, car elle résulterait d'une β -élimination de diméthylamine; or, ce fragment n'est que très faiblement représenté dans le spectre. Signalons, enfin, la présence des ions 102 et 85 qui rendent compte de la coupure en α de l'ion 187, et celle des fragments 43 et 57 qui correspondent à la fragmentation de la chaîne linéaire de l'acide. De plus, la structure α -amino-acide de cette bétaine est confirmée par sa stabilité en milieu alcalin; car, dans ce milieu, la forme β -

amino-acide conduirait à une β -élimination rapide du groupement triméthylamino, ce que l'on observe d'ailleurs dans le cas de l'acide β -triméthylaminopropionique [1].

L'ensemble de ces déterminations spectroscopiques nous permet, alors, de retenir la structure acide 2-triméthylamino 6-cétoheptanoïque que nous nous proposons de vérifier par synthèse univoque.

Contrairement à l'acide β -triméthylaminopropionique qui existe, en partie, sous forme libre dans la plante [1], l'acide 2-triméthylamino 6-cétoheptanoïque se trouve entièrement sous forme d'ester de choline; en effet, par hydrolyse, on libère la bétaine et un composé identifié à la choline par RMN [1] et par cochromatographie.

In situ, le produit est donc le 2-triméthylamino 6-cétoheptanoate de choline de structure: $MeCO(CH_2)_3CHN^+(Me)_3COO(CH_2)_2N^+(Me)_3$. L'analogie de structure existant entre cet ester et le β -triméthylaminopropionate de choline, également caractérisé dans la plante [1], nous conduit à poser le problème du rôle de ces composés dans l'adaptation à la vie en milieu salé. La présence

simultanée de deux pôles ammonium quaternaire hydrophiles suggère leur intervention dans le maintien de l'intégrité des structures des acides nucléiques, des protéines et des membranes. Par ailleurs, l'existence chez *L. vulgare* de ces deux esters, à côté de la choline, la neurine, la glycine-bétaïne et surtout l'acide β -triméthylaminopropionique suggère un rôle plus général. Il faut rappeler que les composés de ce type ont surtout été mis en évidence dans les végétaux soumis à l'influence du chlorure de sodium; la glycine-bétaïne chez de nombreuses Chenopodiacees halophytes [4], la β -homobétaïne, la γ -butyrobétaïne, la laminine, la choline, la triméthylamine et l'oxyde de triméthylamine dans de nombreuses algues marines [5-9]. Le chlorure de chloroéthyltriméthylammonium (CCC), de structure semblable, a été lui-même utilisé pour augmenter la résistance au sel des végétaux [10].

PARTIE EXPERIMENTALE

Les spectres de RMN sont réalisés à 100 MHz.

Extraction-fractionnement. La fraction soluble totale est obtenue en EtOH (80%) à 0°. L'extract est fixé sur une colonne de résine Dowex AG 50 W-X8 (forme H⁺) qui retient tous les composés cationiques et, en particulier, l'acide β -triméthylaminopropionique. Tous les composés non cationiques, c'est-à-dire les composés acides et neutres, se retrouvent dans l'effluent. Celui-ci est passé à son tour sur une colonne de résine Amberlite IRA 400 (forme CO₃⁼) qui ne retient que les composés acides. Les composés neutres sont exclus dans l'effluent qui, concentré sous vide à 37°, est soumis à l'hydrolyse (HCl 6 N, 105°, 48 hr). L'excès d'HCl de l'hydrolysat est éliminé par évaporation et le résidu, qui conserve la bêtaïne intacte, est repris dans H₂O, puis utilisé pour la purification.

Purification. Le produit est isolé et purifié par électrophoréchromatographie sur papier Whatman 3 MM (1); toutefois, la première électrophorèse est effectuée à pH 2 (HCO₂H 0,75 N-40 V/cm-75 min) pour éviter toute interférence avec la pyridine au cours des mesures spectroscopiques. Dans les conditions retenues, la masse du produit recueilli est de l'ordre de 60 mg pour 10 g de matériel végétal sec.

Propriétés électrophorétiques. Les mobilités électrophorétiques (ME) de la bêtaïne, exprimées par rapport à celle de

la choline, sont déterminées à différents pH sur papier Whatman 3 MM; pH 2 (HCOOH 0,75 N), ME = 0,72; pH 3,4 (C₅H₅N-HOAc-H₂O; 0,6:10:989,4), ME = 0,71; pH 3,9 (C₅H₅N-HOAc-H₂O; 7,5:25:967,5), ME = 0,73; pH 5,3 (C₅H₅N-HOAc-H₂O; 10:4:986), ME = 0,71; pH 8 (CO₃(NH₄)₂ 0,1 M), ME = 0,77.

Propriétés chromatographiques. Le rapport R_c, (distance parcourue par la bêtaïne)/(distance parcourue par la choline), est calculé, après développement des chromatogrammes sur papier Whatman 3 MM dans différents solvants: *n*-BuOH-HOAc-H₂O (12:3:5), R_c = 1,38; 2BuOH-HCOOH-H₂O (15:3:2), R_c = 1,41; *n*-BuOH-HCOOH-H₂O (3:1:1), R_c = 1,35; *n*-BuOH-C₅H₅N-HOAc-H₂O (4:1:1:2), R_c = 1,30.

Mise en évidence de l'ester de l'acide 2-triméthylamino 6-cétoheptanoïque et de la choline. La fraction des composés neutres, concentrée sous vide, donne, en électrophorèse sous haute tension à pH 2 (HCOOH 0,75 N-40 V/cm-2 hr), une bande proche de l'origine qui réagit au réactif de Dragendorff. Cette bande est éluee par HCl 0,01 N; l'éluat concentré, repris en chromatographie, ne révèle la présence que d'un seul composé. Ce composé, après hydrolyse (HCl 6 N, 105°, 48 hr), se sépare par électrophoréchromatographie en deux composants identifiés à l'acide 2-triméthylamino-6-cétoheptanoïque et à la choline.

Remerciements—M. Guénou, ingénieur chimiste, au Centre Régional de Mesures Physiques de l'Ouest, a enregistré les spectres de masse sur un appareil Varian MAT 311. Nous l'en remercions très vivement.

BIBLIOGRAPHIE

1. Larher, F. et Hamelin, J. (1975) *Phytochemistry* **14**, 205.
2. Carles, J., Schneider, A. et Lacoste, A. M. (1958) *Bull. Soc. Chim. Biol.* **40**, 221.
3. Bercht, C. A. L., Lousberg, R. J. J., Kuppers, F. J. E. M. and Saleminck, C. A. (1973) *Phytochemistry* **12**, 2457.
4. Hegnauer, R. (1962) *Chemotaxonomie der Pflanzen*, Vol. III, pp. 416. Birkhauser Verlag, Basel.
5. Abe, S. and Kaneda, T. (1973) *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **39**, 383.
6. Abe, S. and Kaneda, T. (1973) *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **39**, 239.
7. Takemoto, T., Daigo, K. and Takagi, N. (1964) *Yakugaku Zasshi* **84**, 1176.
8. Da Silva, E. and Jensen, A. (1973) *J. Sci. Food. Agr.* **24**, 855.
9. Fujiwara-Arasaki, T. and Mino, N. (1971) *Proc. 7th Int. Seaweed Symposium*, Sapporo, Japan, August 8-12, 506.
10. Marth, P. C. and Franck, J. R. (1961) *J. Agr. Fd. Chem.* **9**, 359.