

2S-CARBOXY-4R,5S-DIHYDROXYPIPERIDINE ET 2S-CARBOXY-4S,5S-DIHYDROXYPIPERIDINE A PARTIR DE *DERRIS ELLIPTICA*

MICHEL MARLIER, GASTON DARDENNE et JEAN CASIMIR

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

(Received 2 June 1975)

Key Word Index—*Derris elliptica*; Leguminosae; imino-acids; 2S-carboxy-4R,5S-dihydroxypiperidine; 2S-carboxy-4S,5S-dihydroxypiperidine; synthesis.

Abstract—Two amino-acids derived from pipercolic acid have been isolated from leaves of *Derris elliptica*. Their structure was confirmed by synthesis. They are: 2S-carboxy-4R,5S-dihydroxypiperidine and 2S-carboxy-4S,5S-dihydroxypiperidine.

INTRODUCTION

Un nombre relativement important de travaux ont été entrepris sur des plantes, appartenant très souvent à la famille des Legumineuses, qui contiennent des substances qui, tout en étant de violents poisons pour les animaux inférieurs, sont aussi parfois toxiques pour les animaux à sang chaud [1,2]. Ainsi, les plantes dites à "roténone" et le *Derris* en particulier ont fait l'objet de nombreuses publications [3,4]. Lors de l'étude de la répartition des acides aminés libres des feuilles de *Derris elliptica*, nous avons mis en évidence deux imino-acides hydroxylés qui sont des diastéréoisomères. L'un est la 2S-carboxy-4R,5S-dihydroxypipéridine (1A) ou acide L 2,4-trans-4,5-cis-4,5-dihydroxypipécolique que nous avons déjà mis en évidence dans les feuilles de *Calliandra haematocephala* [5,6]. L'autre, isolé pour la première fois du règne végétal, est la 2S-carboxy-4S,5S-dihydroxypipéridine (2A) ou acide L-2,4-cis-4,5-trans 4,5-dihydroxypipécolique. Nous avons aussi synthétisé les 4 isomères de l'acide 4,5-dihydroxypipécolique appartenant à la série L.

RESULTATS ET DISCUSSION

L'examen d'un chromatogramme bidimensionnel sur papier de l'extrait hydro-alcoolique de *D. elliptica* a permis de mettre en évidence, en plus de quantités importantes de proline, d'acide pipécolique, d'acide trans-4-hydroxypipécolique et d'acide trans-5-hydroxypipécolique, deux taches de nature indéterminées (1A et 2A) qui se colorent en vert avec la ninhydrine et l'isatine. Ces deux substances sont neutres à l'électrophorèse. Le mélange des acides aminés a été traité par l'acide nitreux; les imino-acides ont été transformés en acides N-nitrosés étherosolubles. Ces derniers, après extraction, ont été hydrolysés et les imino-acides ont été séparés sur une colonne de Lewatit S 1080. Les deux substances ont été recristallisées sous forme de chlorhydrate dans un mélange eau-acétone. Elles présentent aux UV une fluorescence rouge-brique caractéristique des imino-acides cycliques. Le test au nitroprussiate est positif dans les deux cas [7]. Les substances forment un complexe cuivrique qui indique la présence d'un acide α iminé [8]. Elles

ne sont pas hydrolysables par chauffage avec HCl 6 N. Les analyses élémentaires conduisent toutes deux à la formule $C_6H_{11}O_4N \cdot HCl$. La substance 1A a un R_{Al} identique, dans plusieurs solvants, à celui de l'acide 4,5-dihydroxypipécolique isolé de *Calliandra* (voir tableau 1); le spectre IR est identique à celui de cet imino-acide. La configuration absolue de ce dernier ayant été déterminée par RMN [9] et par diffraction aux rayons X [6], le composé 1A est donc la 2S-carboxy-4R,5S-dihydroxypipéridine.

Le composé 2A, bien que possédant un spectre IR très différent de 1A, a des propriétés chimiques très semblables à celles de ce dernier. La réduction de 2A par HI et P rouge donne de l'acide DL pipécolique. Il est rapidement oxydé par $NaIO_4$ et l'oxydation par $KMnO_4$ en milieu acide et basique donne de l'acide aspartique et de la glycine en quantité importante. Le composé 2A n'étant oxydé ni par la L-ni par la D-aminoacide oxydase semble appartenir à la série L; en effet, la L-aminoacide oxydase est inactive vis-à-vis des L-iminoacides contrairement à la D-aminoacide oxydase vis-à-vis des D-iminoacides [10]. Les divers arguments qui précèdent nous permettent de croire que 2A est un des diastéréoisomère de 1A.

Afin de déterminer la configuration absolue de 2A, nous avons effectué une synthèse stéréospécifique des 4 isomères L à partir de la L-baikiaine que nous avons isolée du bois de *B. plurjuga*. Les composés cis, 1A et 1B, ont été obtenus par hydroxylation de la L-baikiaine avec H_2O_2 en présence de tétraoxyde d'osmium comme catalyseur. Ils ont été séparés par chromatographie préparative sur papier avec le mélange alcool amylique tert.-lutidine-eau et ils ont été recristallisés sous forme de chlorhydrate dans un mélange eau-acétone. Par hydroxylation avec l'acide performique, nous obtenons les deux formes trans, 2A et 2B, dans un rapport de concentration 1-10. Le composé 2A correspond à l'acide aminé naturel. Afin d'améliorer le rendement en 2A, nous avons effectué la synthèse à partir de la N-carboxy-benzoyloxy-L-baikiaine. Nous obtenons alors les composés trans 2A et 2B dans un rapport 3-1. Ces produits ont été séparés par chromatographie préparative sur pa-

Tableau 1. R_{Ala} et V_{Ala} des 4 isomères et d'acides aminés de référence

Composé	R_{Al}		V_{Al}
	$n\text{-BuOH-HCO}_2\text{H-H}_2\text{O}$ (15:3:2)	PhOH pH 4.2	
Ac.pipécolique	1.39	1.92	1.21
Ac.5- <i>trans</i> OH pipécolique	0.81	1.45	0.73
Ac.4- <i>trans</i> OH pipécolique	0.81	1.63	0.62
1A	0.43	0.77	0.44
1B	0.33	0.89	0.44
2A	0.35	0.54	0.39
2B	0.59	0.83	0.43
Baikiaïne	1.23	1.90	

* V_{Al} = volume de rétention relatif à l'alanine, tampon lithium pH : 2.7, analyseur automatique.

pier avec le mélange $n\text{-BuOH-HCO}_2\text{H-H}_2\text{O}$ et recristallisés dans un mélange eau-acétone; **2A** est obtenu sous forme libre et de chlorhydrate mais **2B** n'a pu être cristallisé que sous forme libre. Le Tableau 1 renseigne les valeurs des R_{Al} des divers isomères. Nous avons aussi indiqué les temps de rétention à l'analyseur automatique. Nous remarquons que seul le composé *trans* **2A** se sépare aisément des autres.

La configuration absolue des 4 isomères a été déterminée par RMN. Les résultats sont résumés aux Tableaux 2 et 3. Les spectres obtenus à 100 MHz ont été décomposés en plusieurs systèmes ABX. A partir des déplacements chimiques et des valeurs des constantes de couplage calculés, des expériences de découplage, et considérant que la configuration en C(2) est S-, la configuration en C(4) et C(5) a pu être déterminée. De l'examen des spectres IR également, il ressort que **1A** est la 2S-carboxy-4R,5S-dihydroxypipéridine; **1B** est la 2S-carboxy-4S,5R-dihydroxypipéridine; **2A** est la 2S-carboxy-4S,5S-dihydroxypipéridine; **2B** est la 2S-carboxy-4R,5R-dihydroxypipéridine. Tous les isomères possèdent une conformation chaise [11].

Les isomères **1A** et **2A** ont aussi été mis en évidence dans les racines de *D. elliptica* et ils sont toujours présents dans des poudres de racines provenant d'une récolte datant de plus de 30 ans. L'isomère dihydroxylé *trans* (**2A**) qui n'a pu être mis en évidence dans les feuilles de *Calliandra* ne peut être un artéfact car il est présent dans des extraits non purifiés sur résine et de plus, l'isomère dihydroxylé *cis* (**1A**) est absolument stable lors de toutes les techniques d'isolement. La présence de **1A** a aussi été remarquée dans d'autres espèces de *Calliandra*

[12]. Dans diverses espèces de *Baikiaea*, qui contiennent de fortes quantités de l'éventuel précurseur de biosynthèse, la baikiaïne, nous avons mis en évidence en très faible quantité un acide iminé se colorant aussi en vert avec la ninhydrine et qui migre comme un des isomères *cis*. La signification chimiotaxonomique de telles substances est difficile à entrevoir car des espèces comme *Derris*, *Calliandra* et *Baikiaea* sont très éloignées.

PARTIE EXPERIMENTALE

Matériel. Les feuilles de *Derris* proviennent de plants cultivés en serre et conservés à la Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux.

Chromatographie sur papier. Les solvants suivants ont été utilisés: $n\text{-BuOH-HCO}_2\text{H-H}_2\text{O}$ (15:3:2) [1], PhOH tamponné à pH 4.2 (acide citrique-Pi, 2 H₂O; 0.08 M [2]; alcool amylique ter.-2,4-lutidine-H₂O (5:5:3) [3]. Le solvant 1 a été utilisé en premier lieu pour la 2D PC.

Séparation des acides aminés. Un extrait purifié des acides aminés sur Lewatit S 1080, H⁺ (20 g) a été traité par 600 ml H₂O, 40 g de NaNO₂ et 60 ml HCl conc. Après une nuit d'agitation on ajoute de nouveau 10 g de NaNO₂ et 25 ml HCl conc. Après 1 h, le test à la ninhydrine est négatif. La soln est évaporée à demi et les acides N-nitrosés sont extraits par 4 × 1 l Et₂O. Après évaporation, le résidu est hydrolysé par HCl 6 N. Après élimination de HCl, les aminoacides sont repris par le minimum H₂O et séparés sur une colonne de Lewatit S 1080 (100-200 mesh), H⁺, élution par HCl 1 N. La substance **2A** est éluee en premier lieu suivie par **1A** et ensuite les autres iminoacides. **1A** et **2A** ont été repurifiés sur une très petite colonne de Lewatit M 5080, forme acétate et élution par H₂O. **1A** est identique à la substance isolée de *Calliandra* [5]. **2A** (C, 44.8; H, 6.78; N, 8.68 calculé pour

Tableau 2. Déplacements chimiques calculés à partir des spectres des chlorhydrates des 4 isomères dans D₂O

Déplacements chimiques	1A	1B	2A	2B
H ₂	4.26(q)	4.08(q)	4.21(q)	4.16(q)
H _{3a}	2.11(o)	2.11(o)	1.98(o)	2.20-2.30(m)
H _{3e}	2.42(o)	2.33(o)	2.55(s)	2.20-2.30(m)
H ₄	3.95-4.21(m)	3.91-4.15(m)	3.70-3.98(m)	3.88-4.08(m)
H ₅	3.95-4.21(m)	3.91-4.15(m)	3.70-3.98(m)	3.88-4.08(m)
H _{6a}	3.23(q)	3.21(q)	3.03(q)	3.28(q)
H _{6e}	3.37(q)	3.47(q)	3.59(q)	3.41(q)

Les spectres RMN ont été enregistrés à 100 MHz. Les déplacements chimiques sont en ppm par rapport au 2,2,3, tétradeutério-3-(triméthylsilyl) propionate de sodium. Les symboles q, s, o et m représentent des quadruplets, sextuplets, octuplets et multiplets.

Tableau 3. Constantes de couplage des 4 isomères à partir des spectres des chlorhydrates dans D₂O†

Constantes de couplage	1A	1B	2A	2B
$J_{2a}-J_{3a}$	11.1	12.1	10.6	9.8*
$J_{2a}-J_{3e}$	4.0	3.6	3.8	6.8*
$J_{3a}-J_{4a}$		10.9	9.6	
$J_{3a}-J_{4e}$	2.7	3.7		
$J_{3e}-J_{4a}$		3.7	3.8	
$J_{3e}-J_{4e}$	5.6			
$J_{5e}-J_{6e}$		3.7		2.3
$J_{5e}-J_{6a}$		1.7		3.5
$J_{5a}-J_{6a}$	3.5		3.9	
$J_{5a}-J_{6e}$	9.9		8.9	
$J_{3a}-J_{3e}$	14.8	13.4	14.4	
$J_{6a}-J_{6e}$	12.4	13.3	12.6	13.6

a = proton axial; e = proton équatorial, *approximation dans l'hypothèse d'un système du premier ordre. † Les constantes de couplages sont en Hz.

C₈H₁₁O₄N: C, 44.72; H, 6.83; N, 8.69% ($[\alpha]_{D}^{20}$, nm 0.0 (c, 0.18, H₂O), $[\alpha]_{D}^{20}$, nm +17.3 (c, 0.15, HCl 2 N).

Synthèse des composés cis. 600 mg de L-baikiaïne et 25 mg de OsO₄ sont ajoutés à 50 ml de tert. BuOH-H₂O₂ 30% (4:1) [13]. Après agitation pendant 2 hr à 60°, le mélange est passé sur une colonne de Lewatit S 1080 dans tert. BuOH, lavée à l'eau et éluée par NH₃ 1N. PC met en évidence de la baikiaïne non transformée, de l'acide aspartique et de la glycine provenant de l'oxydation de celle-ci et les dérivés cis **1A** et **2B** ainsi qu'une faible quantité des diols trans. Les composés dihydroxylés sont séparés en mélange sur une grande colonne de Lewatit S 1080, H⁺ (110 × 3 cm) élué. HCl 1.5 N. Après élimination de HCl, les diols sont séparés sur Whatman 3 MM pendant 8 jours avec le mélange 3. **1A**, HCl est recristallisé dans H₂O-EtOH, R_A : 0.74; 110 mg; IR (KBr) ν_{\max} cm⁻¹: 3465 (m) et 3345 (s) (OH), 1090(s) (C-O), 3300-2300(m) (NH), 1745(s) (C=O), 1210(s), 1090(vs), 1010(s) 958(m), 935(m), 868(s), 730(s), 690(m). **1B**, HCl est séparé avec des traces du dérivé trans et est purifié par recristallisation dans H₂O-EtOH. R_A : 0.50; 40 mg; IR (KBr) ν_{\max} cm⁻¹: 3510(vs) et 3295(vs) (OH), 1085(s) (C-O), 3300-2300(s) (NH), 1740(vs) (C=O), 1207(s), 1068(vs), 1021(vs), 940(s), 890(s), 855(s), 835(vs), 825(vs), 700(vs), 662(vs), 625(s).

Synthèse des composés trans. Deux synthèses différentes ont été effectuées afin d'obtenir préférentiellement l'un ou l'autre des composés. **2A** à partir de N-carbobenzyloxybaikiaïne (14). 1800 mg de N-Chz baikiaïne sont mis en suspension dans

80 ml de mélange HCO₂H-H₂O₂ 30% (3:7) et agités 1 hr à 40°. Après évaporation, le résidu est repris par 100 ml MeCO₂H 1 N dans EtOH. On hydrogénise en présence de 100 mg de Pd à 5% sur d, 30 psi, 4 hr. Les acides aminés sont séparés sur une colonne de Lewatit S 1080 comme précédemment. **2A** est obtenu pur par PC avec le solvant 1. **2A**, HCl 390 mg; IR(KBr) ν_{\max} cm⁻¹: 3435(vs) et 3380(vs) (OH), 1087(m) (C-O), 3250-2300(s) (NH), 1740(vs) (C=O), 1200(s), 1085(vs), 1050(s), 1040(s), 930(s), 835(s), 758(m), 695(m), 625(m). **2B** à partir de baikiaïne. La méthode de synthèse, séparation et purification est identique à la précédente (**2A**). A partir de 1500 mg de baikiaïne, nous obtenons 270 mg cristallisés uniquement sous forme libre. IR(KBr) ν_{\max} cm⁻¹: 3300(m) (OH), 1070(m) (C-O), 3140-2300(m) (NH), 1640(s) (COO⁻), 1428(s), 1305(s), 1240(m), 1235(m), 1080(m), 1070(vs), 960(m), 950(m), 890(m), 740(m), 650(m).

Remerciements—Nous tenons à remercier le Professeur J. De-buisson (Gembloux) qui nous a fourni les plants de Derris ainsi que le Professeur Alderweireldt chez qui les spectres RMN ont été pris sur un appareil JEOL JNM PS-100 (R.U.C.A., Antwerpen).

REFERENCES

1. Janzen, D. H. (1969) *Evolution* 23, 1.
2. Rehr, S. S., Bell, E. A., Janzen, D. H. et Feeny, P. P. (1973) *Biochem. System.* 1, 63.
3. Castagne, E. (1938) *Inst. Royal Colonial Belge*, Mém. T.6, fasc. 3.
4. Meyer, T. M. et Koolhaas, D. R. (1939) *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas*, LVIII 2, 206.
5. Marlier, M., Dardenne, G. et Casimir, J. (1972) *Phytochemistry* 11, 2597.
6. Evrard, G., Durant, F. et Marlier, M. (1972) *Cryst. Struct. Commun.* 1, 215.
7. Feigl, F. (1954) *Spot Tests*, Vol. II, p. 189. Elsevier, New York.
8. Larsen, P. O. et Kjaer, A. (1960) *Biochem. Biophys. Acta* 38, 148.
9. Marlier, M. et Alderweireldt, F. Résultats non publiés.
10. Greenstein, J. P. et Winitz, M. (1961) *Chemistry of the Amino Acids*, Vol. 2, p. 1782. Wiley, New York.
11. Marlier, M. (1975) Thèse de Doctorat, Faculté des Sciences Agronomiques, 5800, Gembloux.
12. Marlier, M. et Dardenne, G. Résultats non publiés.
13. Vogel, A. I. (1962) *Practical Organic Chemistry*, p. 893, Longmans.
14. Witkop, B. et Foltz, C. M. (1957) *J. Am. Chem. Soc.* 79, 192.