

SHORT REPORTS

2S,4R-CARBOXY-2-ACETYLAMINO-4-PIPERIDINE DANS LES FEUILLES DE *CALLIANDRA HAEMATOCEPHALA*

MICHEL MARLIER, GASTON DARDENNE et JEAN CASIMIR

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

(Reçu 2 août 1978)

Key Word Index—*Calliandra haematocephala*; Leguminosae; non protein amino acid; ^1H NMR; 2S,4R-carboxy-2-acetylamino-4-piperidine.

Abstract—A new naturally occurring piperolic acid derivative has been isolated from leaves of the legume *Calliandra haematocephala*. Its structure was shown to be 2S,4R-carboxy-2-acetylamino-4-piperidine by chemical and spectroscopic methods.

INTRODUCTION

De nombreux acides aminés libres dérivés de l'acide pipécolique ont été découverts dans le règne végétal: l'acide *trans* hydroxy-5-pipécolique [1], l'acide *trans* hydroxy-4-pipécolique [2], l'acide hydroxy-3-pipécolique [3] et l'acide céto-4-pipécolique [4], la baikiaine [5], la guvacine [6], l'acide amino-4-pipécolique [7-9].

Récemment, Kristensen [10, 11] a isolé les acides 2(S),5(S),6(S) et 2(S),5(R),5(S) hydroxy-5-méthyl-6-pipécolique de *Fagus sylvatica*, tandis que nous isolions le γ glutamyl-peptide de l'acide pipécolique [12] de *Gleditsia caspica* et l'acide *cis* hydroxy-5-pipécolique [13] de *Gymnocladus dioicus*. Dans l'étude de la répartition des acides aminés libres des feuilles de *Derris elliptica*, nous avons caractérisé deux imino-acides hydroxylés qui sont des diastéréoisomères. L'un est l'acide *L*-2,4-*trans*-4,5-*cis*-dihydroxy-4,5-pipécolique [14-16] que nous avons déjà mis en évidence dans les feuilles de *Calliandra haematocephala*; l'autre est l'acide *L*-2,4-*cis*-4,5-*trans*-dihydroxy-4,5-pipécolique [16, 17]. Les 4 isomères de l'acide *L*-dihydroxy-4,5-pipécolique ont été synthétisés [16]. Shewry et Fowden [18] viennent d'isoler un stéréoisomère de ces deux composés dans les graines de *Jubbernardia paniculata*. Il s'agit de l'acide *L*-2,4-*trans*-4,5-*trans*-dihydroxy-4,5-pipécolique. Lors de l'étude des acides aminés de *Calliandra*, nous avions signalé la présence en faible concentration d'une substance inconnue B. Ce composé a maintenant été isolé en quantité suffisante et sa structure a été déterminée comme étant l'acide 2S,4R-acetylamino-4-piperidine.

RESULTATS ET DISCUSSION

La 2D-PC de l'extrait alcoolique de *Calliandra haematocephala* révèle la présence de deux substances A et B de nature particulière dont l'une (A) a fait l'objet de précédentes publications [14-16]. La seconde (B) se présente comme un spot pourpre avec la ninhydrine et elle donne une fluorescence rouge aux UV; le spot est

bleu-vert après réaction avec l'isatine, ce qui est caractéristique des imino-acides; le test au nitroprussiate est positif [19] et la substance forme un complexe cuivrique indiquant la présence d'un acide iminé [20]; elle migre comme les acides 4 et 5 hydroxypipécoliques au butanol et légèrement plus loin que l'acide *trans*-hydroxy-4-pipécolique au phénol pH 4,2. Par électrophorèse à pH 3,6, la substance est neutre.

Après purification de l'extrait éthanolique sur Lewatit S 1080 et préparation sur une colonne de Dowex 1 \times 2 et ensuite sur une colonne de Dowex 50w \times 4, forme pyridinium, B est séparé des autres iminoacides par passage sur une colonne de Dowex 50w \times 4, H^+ , l'élution étant réalisée par HCl 1,5N. La forme libre est obtenue par passage sur une petite colonne de Lewatit S 1080, H^+ et elle est recristallisée dans un mélange eau-acétone; l'analyse élémentaire conduit à la formule $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3 \cdot 0,5 \text{H}_2\text{O}$.

Le nouveau composé est aisément hydrolysé par chauffage dans HCl ; il fournit un acide iminé B₁, peu mobile à la 2D-PC, qui est basique par HVE à pH 3,6. L'action de l'acide nitreux [21] sur B₁, suivie d'une hydrolyse acide, fournit un mélange des isomères *cis* et *trans* de l'acide hydroxy-4-pipécolique (en quantités pratiquement équimoléculaires), indiquant que B est un dérivé de l'acide amino-4-pipécolique.

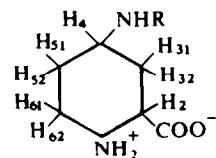
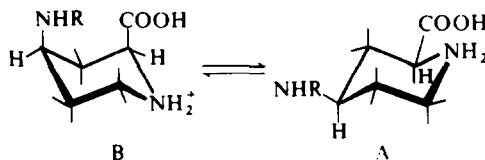
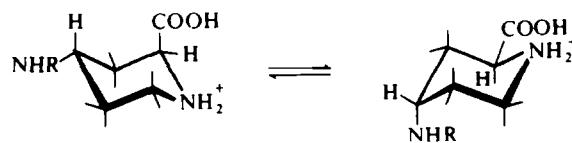


Fig. 1. R = H(B₁)
= COCH₃ (B)
↓
4'

Tableau 1. ^1H RMN de B et du monochlorydrate de B_1

<i>B</i> dans D_2O					
Protos	2, 4	61-62	4'	51-52	31-32
δ (centre du multiplet)	3,93	3,32	1,99	1,9	2,4
	2H, m	2H, m	s	m	m
<i>7H</i>					
<i>B</i> dans $\text{D}_2\text{O} + \text{TFA}$ (pH 1)					
Protos	2	61-62	4	51-52	31-32
δ (centre du multiplet)	4,25	3,34	4,03	1,98	2,20
	1H, t	2H, m	1H, m	s	m
<i>7H</i>					
Multiplicité après double résonance					
<i>J</i>	<i>s</i>	<i>s</i>	<i>s</i>	<i>x</i>	<i>x</i>
	$J_{2-31} = J_{2-32} = 6,5$				
<i>Monochlorydrate de B_1</i>					
Protos	2	61-62,4	51-52, 31-32		
δ (centre du multiplet)	4,19	3,1-3,73	1,58-2,76		
	1H, t	3H, m	4H, m		
<i>J</i>	$J_{2-31} = J_{2-32} = 5$				

Tous les spectres ont été enregistrés sur un spectromètre JEOL, JNM, PS.100. Les déplacements chimiques ont été donnés en ppm par rapport au 2, 2, 3, 3-tétradeuterio-3-(triméthylsilyl)propionate de Na. Les constantes de couplages sont en Hz. *m* = multiplet, *t* = triplet, *s* = singulet.

Fig. 2. Conformations dans le cas d'une relation 2-4 *cis*.Fig. 3. Conformations dans le cas d'une relation 2-4 *trans*.

L'examen des spectres ^1H RMN de B et B_1 , enregistrés dans diverses conditions (voir Tableau 1), permet de déterminer leur structure ainsi que leur configuration absolue (voir Fig. 1).

La comparaison des intensités intégrées cumulées fait apparaître une différence de 3 protons entre les spectres de B et B_1 , due à un singulet situé à $\delta = 1,99$ dans le spectre de B pris dans $\text{D}_2\text{O} + \text{TFA}$. Ce singulet caractérise un groupement méthyle adjacent à un groupe $-\text{CO}-\text{NR}_2$ [22, 23]: ainsi, le déplacement chimique des protons méthyles dans un groupe $-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}_3$, appartenant à divers acetamido cyclohexanols varie entre 1,88 et 2,03 δ [24]. Comme le montrent les déplacements chimiques, leurs variations en fonction de l'acidité du milieu et les expériences de double résonance, les massifs situés à $\delta = 1,91$ et 3,34 peuvent être attribués aux protons portés par les carbones 5 et 6, les massifs situés à $\delta = 2,20$, 4,03 et 4,25 sont attribués aux protons portés par les carbones 3, 4 et 2 du cycle pipéridine. B et B_1 sont insensibles à l'action de la L et de la D amino acide oxydase mais, dans les deux cas, $M_{\text{HCl}} - M_{\text{H}_2\text{O}}$ est positif. Ces résultats sont en faveur d'une configuration 'S'.

Sachant donc que la configuration du carbone 2 est 'S', il est possible de déterminer la position relative des substituants dans la molécule, bien que la complexité des spectres ne permette pas la mesure de toutes les constantes de couplage.

En milieu acide, le proton 2 fournit un triplet et *J* mesuré est d'environ 6,5 Hz pour B et 5 Hz pour B_1 . L'aspect de ce massif rend improbable une configuration 2-4 *cis* entre les substituants du cycle: si on admet que la molécule adopte une forme chaise, deux conformères pourraient théoriquement exister, l'un où les deux substituants sont en position équatoriale (a), l'autre où ils sont en position axiale (b) (Fig. 2); toutefois, la différence d'énergie libre entre les deux formes est de l'ordre de 3 à 4 Kcal/mol et favorise nettement le conformère (a). Le proton porté par le carbone 2 serait donc en position axiale prédominante et l'on observerait un quadruplet possédant deux constantes de couplage distinctes, ce qui n'est pas le cas. Dans le cas d'une configuration 2-4 *trans*, il existe également deux conformères chaise (Fig. 3); le triplet du proton 2 implique une équivalence de J_{2-31} et J_{2-32} qui se conçoit si le proton est en position équatoriale, le groupement carboxyle

étant en position axiale; le groupement acétylamino se trouve à ce moment en position trans équatoriale.

La différence d'énergie libre entre le conformère ainsi défini et son inverse est très faible; la présence de deux conformères en solution est donc probable et les valeurs des constantes J_{2-3} favorisent cette hypothèse pour B comme pour B₁. Le composé B est donc l'acide (L)-*trans*-acétylamino-4-pipécolique ou 2S,4R-carboxy-2-acétylamino-4-pipéridine. L'existence de cet acide aminé n'a jamais été signalé; l'acide amino-4-pipécolique a été identifié dans *Strophanthus scandens* [7-9] mais sa configuration absolue n'est pas précisée; l'insuffisance des données ne nous a pas permis de le comparer avec notre composé B₁.

PARTIE EXPERIMENTALE

Matériel. Les feuilles de *Calliandra* proviennent de plantes cultivées en serre et conservées à la Faculté des Sciences Agronomiques de Gembloux.

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

EHV—pH 1,9 (33,2 ml HCOOH, 147 ml CH₃—COOH, H₂O ad 2 l.); tension 60 V/cm, durée 60'. pH 3,6 (10 ml Py, 100 ml CH₃—COOH, H₂O ad 2 l.); tension 60 V/cm, durée 45'.

Séparation des acides aminés. Un extrait des acides aminés (7 g provenant de 1 kg de feuilles fraîches) est purifié sur Lewatit S 1080, H⁺ puis soumis à un fractionnement sur une colonne de Dowex 1 × 2, Cl⁻ (109 × 3,5 cm); les acides aminés provenant de cette séparation sont fractionnés sur une colonne de Dowex 50 wx × 4, forme pyridinium (3,5 × 100 cm), l'élution étant réalisée par un tampon Py-HCOOH-H₂O (40:55:4905) de pH 3,3. Les fractions contenant B sont passées sur une colonne de Dowex 50W × 4, H⁺ et élue par HCl 1,5 N (3 × 80 cm, débit = 25 ml/20 min): dans ces conditions, B passe après la proline dans les fractions 307 à 360 et est accompagné d'une petite quantité de B₁ formé par hydrolyse sur la colonne. HCl est éliminé par évaporation sous vide et passage sur une colonne de Dowex 1 × 8, forme acétate; B est séparé de B₁ par passage sur une colonne de Dowex 1 × 2, Cl⁻. Après évaporation et recristallisation dans un mélange eau-acétone, on obtient 410 mg de B (C = 49,22; H = 7,75; N = 14,35. Calculés pour C₈H₁₄N₂₀ 0,5 H₂O: C = 49,36; H = 7,59; N = 14,04%), $_{589}^{20}$ nm = -6° (c, 0,20; H₂O); $_{589}^{20}$ nm = +0,5° (c, 0,196; HCl 2N).

Hydrolyse. 100 mg de B sont chauffés en tube fermé à 100° pendant 3 hr en présence de 10 ml HCl 2N. L'hydrolysat évaporé à sec est débarrassé de l'HCl résiduel par passage sur une colonne de Dowex 1 × 8; la forme libre de B₁, difficile à cristalliser, est transformée en monochlorhydrate par passage sur une colonne de Dowex 1 × 2, et élution à l'eau. On obtient 75 mg de monochlorhydrate de B₁.

Action de HNO₂ sur B₁. 50 mg de B₁ sont dissous dans 2 ml

d'HCl et maintenus dans un bain d'eau bouillante; on ajoute 150 mg de NaNO₂ en 3 portions et après 1 hr de réaction, le mélange nitrosé refroidi et fixé à pH 2 est extrait par 3 × 10 ml d'éther. On évapore à sec et le résidu est redissous dans 1 ml HCl 1N en présence de 5 mg de sulphonate d'ammonium; on chauffe à 110° 3 hr en tube fermé; après élimination de HCl on réalise une chromatographie sur papier du mélange réactionnel avec *n*-BuOH-HOAc-H₂O (4:5:1) [25].

Remerciements—Nous tenons à remercier le Professeur J. Debuission (Gembloux) qui a fourni le matériel végétal, ainsi que le Professeur Alderweireldt chez qui les spectres RMN ont été enregistrés (RUCA, Antwerpen).

BIBLIOGRAPHIE

1. Virtanen, A. I. et Kari, S. (1954) *Acta Chem. Scand.* **8**, 1290.
2. Virtanen, A. I. et Kari, S. (1955) *Acta Chem. Scand.* **9**, 1540.
3. Sheedan, J. C., Zachau, H. G. et Lawson, W. B. (1958) *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 3349.
4. Vanderhaege, H. et Parmentier, G. (1960) *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 4414.
5. King, E. E., King, T. J. et Warwick, A. J. (1959) *J. Chem. Soc. B* 3590.
6. Jahns (1891) *Chem. Ber.* **24**, 2615.
7. Schenk, W. et Schutte, H. R. (1961) *Naturwissenschaften* **48**, 223.
8. Schenk, W., Schutte, H. R. et Mothes, K. (1962) *Flora* **152**, 590.
9. Schenk, W. et Schutte, H. R. (1963) *Flora* **153**, 426.
10. Kristensen, I. (1973) Thèse doctorat. Université de Copenhague.
11. Kristensen, I., Larsen, P. O. et Sorensen, H. (1974) *Phytochemistry* **13**, 2803.
12. Dardenne, G., Casimir, J. et Sorensen, H. (1974) *Phytochemistry* **13**, 1575.
13. Despontin, J., Marlier, M. et Dardenne, G. (1977) *Phytochemistry* **16**, 387.
14. Marlier, M., Dardenne, G. et Casimir, J. (1972) *Phytochemistry* **11**, 2597.
15. Evrard, G., Durant, F. et Marlier, M. (1972) *Cryst. Struct. Commun.* **1**, 215.
16. Marlier, M., Dardenne, G. et Casimir, J. (1976) *Phytochemistry* **15**, 183.
17. Evrard, G., Durant, F. et Marlier, M. (1974) *Cryst. Struct. Commun.* **3**, 61.
18. Shewry, P. R. et Fowden, L. (1976) *Phytochemistry* **15**, 1981.
19. Feigl, F. (1966) *Spot Tests in Organic Analysis* 7e edn. Elsevier, Amsterdam.
20. Larsen, P. O. et Kjaer, A. (1960) *Biochim. Biophys. Acta* **38**, 148.
21. Hatanaka, S. (1968) *Phytochemistry* **8**, 1305.
22. Scheinman, F. (1970) *Introduction to Spectroscopic Methods for the Identification of Organic Compounds*. Pergamon Press, Oxford.
23. Booth, H. (1969) *Progr. Nucl. Magn. Res. Spect.* **5**, 749.
24. Lichtenhaller, F. W. et Emig, P. (1967) *Tetrahedron Letters*.
25. Clarck-Lewis, J. W. et Mortimer, P. I. (1961) *J. Chem. Soc.* 184.