

## SÉPARATION ET CARACTÉRISATION DU L(–)5-MÉTHYL 2-AMINO 4-HEXÈNOÏQUE À PARTIR DE *LEUCOCORTINARIUS BULBIGER*

G. DARDENNE et J. CASIMIR

Laboratoires de Chimie Générale et Organique, Faculté des Sciences Agronomiques, Gembloux

et

J. JADOT

Université de Liège, Belgique

(Received 7 February 1968)

**Résumé**—Un nouvel acide aminé insaturé ; le L(–)5-méthyl-2-amino-4-hexénoïque a été identifié par chromatographie bidimensionnelle sur papier et par chromatographie électrophorèse sur papier dans l'extrait alcoolique d'un champignon, *Leucocortinarius bulbiger*. Il a été isolé par chromatographie sur colonne de résine échangeuse d'ions. Sa structure a été déterminée et confirmée par synthèse.

**Abstract**—A new unsaturated amino acid, L(–)5-methyl-2-amino-4-hexenoic acid has been identified from the mushroom *Leucocortinarius bulbiger* by chromatography and electrophoresis on paper. It was isolated on an ion-exchange resin column. Its structure was determined and confirmed by synthesis.

### INTRODUCTION

GRÂCE à la chromatographie sur papier et à la chromatographie sur colonnes de résine échangeuse d'ions, plusieurs acides aminés insaturés ont été découverts dans le règne végétal : l'acide  $\gamma$ -méthylène-glutamique<sup>1</sup> et la  $\gamma$  méthylène-glutamine,<sup>1</sup> l'acide  $\gamma$  méthylidène-glutamique,<sup>2</sup> la 4-méthylène-proline,<sup>3</sup> la 3-carboxyméthyl 4-isopropénylproline,<sup>4,5</sup> la 3-carboxy-méthyl 4-(2-carboxy 1-méthylhexa 1,3-diényl)proline,<sup>6</sup> la  $\beta$  (méthylène-cyclopropyl) alanine,<sup>7</sup> l' $\alpha$  (méthylène-cyclopropyl) glycine,<sup>8,9</sup> la S-allylcystéine<sup>10,11</sup> et la S-propénylcystéine sulfoxyde,<sup>12,13</sup> la S-vinylcystéine sulfoxyde<sup>14</sup> et la 2-méthylène cycloheptène 1,3-diglycine<sup>15</sup>. Signalons aussi les isollements récents de la méthylène-norvaline,<sup>16</sup> de l'acide amino-2-hydroxyméthyl-3-pentène-3-oïque<sup>16</sup> et de l'acide amino-2-méthyl-4-hexène-4-oïque.<sup>17</sup>

<sup>1</sup> J. DONE et L. FOWDEN, *Biochem. J.* **51**, 451 (1952).

<sup>2</sup> L. FOWDEN, *Biochem. J.* **98**, 57 (1966).

<sup>3</sup> D. O. GRAY et L. FOWDEN, *Nature* **193**, 1285 (1962).

<sup>4</sup> S. MURAKAMI et T. TAKEMOTO, *J. Pharm. Soc. Japan*, **73**, 1026 (1953).

<sup>5</sup> Y. UENO et K. TANAKA, *Proc. Japan Acad.* **33**, 53 (1957).

<sup>6</sup> K. DAIGO, *J. Pharm. Soc. Japan* **79**, 353 (1959).

<sup>7</sup> E. V. ELLINGTON, C. H. HASSALL et J. R. PLIMMER, *Chem. Ind.* 329 (1958).

<sup>8</sup> L. FOWDEN, *Amino Acid Pools*, p. 48. Elsevier, Amsterdam (1962).

<sup>9</sup> D. O. GRAY et L. FOWDEN, *Biochem. J.* **82**, 385 (1962).

<sup>10</sup> A. I. VIRTANEN, M. HATANAKA et M. BERLIN, *Suomen Kemistilehti B*, **35**, 52 (1962).

<sup>11</sup> A. STOHL et E. SEEBECK, *Experientia* **3**, 114 (1947).

<sup>12</sup> A. I. VIRTANEN, *Angew. Chem.* **1**, 299 (1962).

<sup>13</sup> J. F. CARSON, R. E. LUNDIN et T. M. LUKES, *J. Org. Chem.* **31**, 1634 (1966).

<sup>14</sup> E. DAEBRITZ et A. I. VIRTANEN, *Chem. Ber.* **98** (3), 781 (1965).

<sup>15</sup> E. HONKANEN, T. MOISIO, A. I. VIRTANEN et A. MELERA, *Acta Chem. Scand.* **18**, 1319 (1964).

<sup>16</sup> R. R. DOYLE et B. LEVENBERG, *Fed. Proc.* **26**, 2 (1967).

<sup>17</sup> L. FOWDEN et A. SMITH, *Phytochem.* **7**, 809 (1968).

Nous avons isolé du champignon, *Leucocortinarius bulbiger* (Alb. et Schwein) Singer, le L(-)5-méthyl 2-amino 4-hexénoïque; nous en avons déterminé la structure et nous en avons fait la synthèse.

### RESULTATS ET DISCUSSION

L'étude de la distribution des acides aminés libres de la fraction soluble dans l'éthanol de *Leucocortinarius bulbiger* a permis par chromatographie bidimensionnelle et par chromatographie électrophorèse sur papier de mettre en évidence une tache assez intense de nature indé-

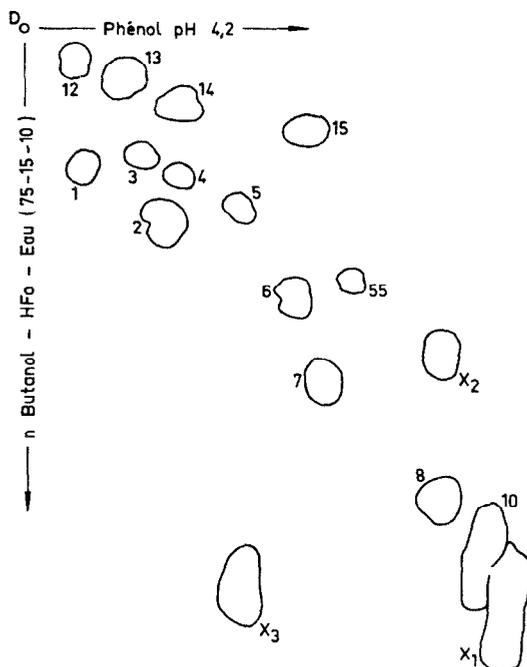


FIG. 1. CHROMATOGRAPHIE BIDIMENSIONNELLE SUR PAPIER DE L'EXTRAIT ALCOOLIQUE PURIFIÉ DE *Leucocortinarius bulbiger* (1RE DIMENSION: n-BUTANOL-ACIDE FORMIQUE-EAU 75-15-10, v/v; 2ME DIMENSION: PHÉNOL SATURÉ EN TAMPON DE pH 4.2).

1: acide aspartique, 2: acide glutamique, 3: sérine, 4: glycine, 5: thréonine, 6: alanine, 7: tyrosine, 8: valine, 10: leucines, 12-14: acides aminés basiques, 15: glutamine, 55: acide  $\gamma$  aminobutyrique,  $X_1$ : acide aminé inconnu isolé,  $X_2$  et  $X_3$ : acides aminés inconnus colorés en jaune.

minée et de coloration jaune avec la ninhydrine (tache  $X_1$  sur le chromatogramme). Elle se situe légèrement en dessous et à droite de la leucine (voir Fig. 1). Cette substance migre à l'électrophorèse comme les acides aminés neutres.

Après purification de l'extrait alcoolique sur une colonne de résine échangeuse de cations (Amberlite CG 120, forme  $H^+$ ) et évaporation à sec de l'éluat ammoniacal, le résidu d'acides aminés a été fractionné sur une colonne de résine échangeuse d'anions (Dowex 1 X2, forme  $Cl^-$ ); l'éluéon ayant été effectuée par l'eau.

Après isolement à l'état pur, la substance a été recristallisée. Son spectre infra-rouge présente l'allure de celui d'un acide aminé. L'analyse élémentaire et la valeur du poids moléculaire conduisent à la formule  $C_7H_{13}O_2N$ .

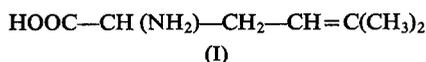
L'acide aminé possède une fonction  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> qui a été mise en évidence par la méthode de Larsen et Kjaer.<sup>18</sup>

Les essais positifs au brome et au permanganate de potassium indiquent que la nouvelle substance est insaturée. L'hydrogénation catalytique (PtO<sub>2</sub>) nous a permis d'isoler un acide aminé pur qui ne réagit plus ni avec le brome ni avec le permanganate de potassium.

Nous avons montré par chromatographie en phase gazeuse et après transformation en nitrile, que l'acide aminé naturel hydrogéné était le 5-méthyl 2-aminohexanoïque.<sup>19,20</sup>

L'oxydation par le permanganate de potassium en milieu fortement acide scinde l'acide aminé naturel en acétone et en acide aspartique. Ces deux substances provenant de la dégradation ont été isolées et leurs structures ont été déterminées avec certitude par chromatographie et par spectrographie infra-rouge.

Les divers arguments qui précèdent nous permettent de proposer la formule (I) pour le nouvel acide aminé. Cette structure a été confirmée par la synthèse du DL-5-méthyl 2-amino 4-hexénoïque.



Nous avons utilisé la méthode générale d'Albertson.<sup>21</sup> L'hydrolyse de l'ester intermédiaire a été effectuée en milieu alcalin et les ions Na<sup>+</sup> ont été éliminés par passage sur une colonne

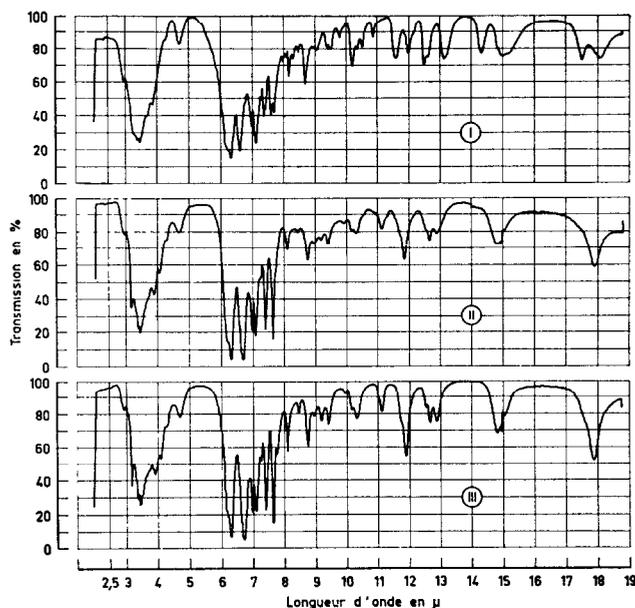


FIG. 2. SPECTRES INFRA-ROUGES DU 5-MÉTHYL 2-AMINO 4-HEXÉNOÏQUE.

I: Acide aminé naturel.

II: Acide aminé naturel racémisé.

III: Acide aminé de synthèse.

<sup>18</sup> P. OLARSEN et A. KJAER, *Biochem. Biophys. Acta* **38**, 148 (1960).

<sup>19</sup> M. SEVERIN et M. RENARD, *Riv. Ital. Sostanze Grasse* **12**, 649 (1963).

<sup>20</sup> G. DARDENNE, M. SEVERIN et M. MARLIER, Résultats non publiés.

<sup>21</sup> N. F. ALBERTSON, *J. Am. Chem. Soc.* **68**, 451 (1946).

d'Amberlite CG 120, forme H<sup>+</sup>. Nous avons ainsi isolé un acide aminé insaturé dont le spectre infra-rouge est différent de celui de l'acide aminé naturel alors que ces deux acides aminés sont inséparables par les techniques chromatographiques.

L'acide aminé naturel a alors été racémisé en milieu fortement alcalin et à température élevée. Son spectre infra-rouge devient identique à celui du produit de synthèse (voir Fig. 2). Les valeurs du pouvoir rotatoire prises dans l'eau et dans HCl 1 N nous permettent d'affirmer que le nouvel acide aminé isolé de *Leucocortinarius bulbiger* est le: L(-)-5-méthyl 2-amino 4-hexénoïque (I).

## PARTIE EXPERIMENTALE

### Matériel

*Leucocortinarius bulbiger* (Alb. et Schwein) Singer<sup>22</sup> (Synonymes: *Cortinarius bulbiger* (Alb. et Schwein) Lange, *Cortinellus bulbiger* (Alb. et Schwein) Gillet). Les spécimens récoltés ont été déterminés par le Professeur Dr. P. Heinemann. Ils sont parfaitement conformes à la description et à la planche de J. Lange.<sup>23</sup>

### Chromatographie et Electrophorèse

La chromatographie bidimensionnelle sur papier Whatman 3 a été réalisée en utilisant comme solvant: pour la première dimension, le mélange n-butanol-acide formique-eau (75:15:10, v/v) et pour la seconde dimension, le phénol saturé par un tampon à pH 4.2 (acide citrique-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2H<sub>2</sub>O).

Les chromatoelectrophorèses ont été réalisées sur du papier SS 2043 b. Nous avons effectué une chromatographie avec comme solvant le n-butanol-acide formique-eau (75:15:10, v/v) et une électrophorèse à pH 2.4 (acide acétique 1 N) ainsi qu'une chromatographie avec le phénol saturé par un tampon à pH 5.6 et une électrophorèse à pH 5.6 (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O et KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>).

### Isolement de l'Acide Aminé

Les champignons fraîchement récoltés (1134 g) ont été broyés au Waring Blendor avec 4.5 l. d'éthanol à 95°. Les extraits filtrés ont été purifiés sur une colonne d'Amberlite CG 120, forme H<sup>+</sup>, 100-200 mesh (15 × 2.6 cm). Après passage de l'extrait alcoolique, la résine a été lavée à l'alcool et à l'eau. Les acides aminés ont été élués par NH<sub>3</sub> 1 N. L'éluat a été évaporé sous pression réduite à 40° et le résidu d'acides aminés (5.06 g) a été repris par le minimum d'eau.

Les acides aminés ont alors été fractionnés sur une colonne de Dowex 1-X2, forme Cl<sup>-</sup>, 200-400 mesh (119 × 5.5 cm). L'éluat a été effectuée par l'eau, le débit étant réglé à 1.3 ml par minute. Des fractions de 36 ml ont été recueillies.

L'acide aminé X a été décelé à l'état pur dans les fractions 67 à 76. Ces fractions ont été évaporées à volume réduit, décolorées par le charbon et ensuite filtrées. Le filtrat a été évaporé à sec sous pression réduite à 40° et l'acide aminé a été recristallisé dans l'eau; le filtrat a été de nouveau concentré à sec et l'acide aminé restant a été recristallisé dans l'éthanol aqueux. Nous avons ainsi obtenu 388 mg de cristaux transparents, incolores, se présentant sous la forme de paillettes; ils ressemblent à ceux de la leucine mais ils sont moins solubles dans l'eau.

### Structure de l'Acide Aminé

L'acide aminé s'opacifie vers 210° et fond en se décomposant entre 260 et 270°. Il possède la composition centésimale suivante C, 58.72; H, 9.15; N, 9.78%; ce qui correspond à la formule brute C<sub>7</sub>H<sub>13</sub>O<sub>2</sub>N avec les valeurs calculées: C, 58.21; H, 8.59; N, 9.72%. L'acide aminé a été oxydé par le KMnO<sub>4</sub> et les produits de dégradation ont été déterminés avec certitude:

A 3 mg d'acide aminé dissous dans 1 ml d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N, on ajoute goutte à goutte 0.3 ml d'une solution contenant 750 mg de KMnO<sub>4</sub>, 10 ml d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N et 20 ml d'eau. On chauffe pendant une heure en tube scellé à 70°. Après refroidissement, la solution est versée rapidement dans un appareil de microentraînement à la vapeur d'eau. On entraîne l'acétone qui est précipitée sous forme de 2,4-dinitrophénylhydrazone (Pf: 125.5°; Pf mixte: 125.5°; spectre i.r. identique à celui de la 2,4-dinitrophénylhydrazone préparée à partir du produit pur).

<sup>22</sup> R. SINGER, *Lloydia* 8, 141 (1945).

<sup>23</sup> J. E. LANGE, *Flora Agaricina Danica* 3, 14, pl. 81(A) (1938).

L'acide aspartique non entraîné est purifié sur une petite colonne d'Amberlite CG 120, forme H<sup>+</sup>. Il est inséparable à la chromatographie sur papier et sur couche mince de l'acide aspartique pur; son spectre infra-rouge est identique au produit de référence.

Les mesures du pouvoir rotatoire ont été prises avec un spectropolarimètre à cellule photoélectrique "Pepol 60, Bellingham Stanley LTD".

$$\begin{aligned} [\alpha]_{580}^{23} &= -45.9^\circ \text{ (eau, } c=0.47) \\ &= -7^\circ \text{ (HCl 1 N, } c=0.4) \\ \Delta[M] &= +55.6 \end{aligned}$$

#### Synthèse du 5-méthyl 2-amino 4-hexénoïque<sup>24</sup>

*Préparation du 1-bromo-3-méthyl-2-butène.* 100 g de 2-méthyl-3-butène-2-ol et 465 ml d'HBr à 48 % sont agités pendant 30 min. La couche huileuse est séparée et lavée avec 200 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> à 10 % puis deux fois avec 200 ml d'eau glacée. On sèche ensuite (CaSO<sub>4</sub>) et on fractionne sous un vide de 12 mm de mercure. La portion distillant entre 39–41° est recueillie (109 g), rendement: 65 %

*Préparation du diméthylallylacétamidocyanoacétate d'éthyle.* 5 g de Na, 34.2 g d'acétamidocyanoacétate d'éthyle et 120 ml d'alcool absolu sont chauffés sur une plaque munie d'un agitateur magnétique jusqu'à dissolution du sodium. On laisse couler goutte à goutte sur le mélange bouillant 36 g de 1-bromo-3-méthyl-2-butène. Le chauffage est poursuivi pendant 6 hr à reflux. Le mélange encore chaud est centrifugé et le NaBr est éliminé. L'ester précipite immédiatement par refroidissement. Après une nuit en chambre froide, le précipité jaune est filtré, lavé abondamment à l'eau glacée, séché puis recristallisé dans l'éthanol aqueux.

On obtient ainsi 37.6 g de cristaux soit un rendement de 78 %. Pf: 124°; C, 60.48; H, 7.61; N, 11.76 %; calculé pour C<sub>12</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>N<sub>2</sub>, C, 60.14; H, 7.50; N, 11.84 %.

*Hydrolyse du diméthylallylacétamidocyanoacétate d'éthyle.* 6 g d'ester sont dissous dans 100 ml de NaOH 5 %. La solution est chauffée à reflux pendant 7 hr puis refroidie, on ajoute alors 100 ml d'eau et on passe sur une colonne d'Amberlite CG 120, forme H<sup>+</sup>, 100–200 mesh (23 × 3 cm). Après passage de toute la solution alcaline, on lave à l'eau puis on élue avec de l'ammoniac 0.3 N.

Des fractions de 10 ml donnant une réaction de coloration jaune avec la ninhydrine sont recueillies.

Sur chacune de ces fractions, nous avons effectué une chromatographie monodimensionnelle avec les solvants: n-butanol-acide formique-eau (75–15–10, v/v) et phénol tamponné à pH 4.2. Après révélation avec la ninhydrine; nous avons observé une seule tache correspondant au R<sub>f</sub> de l'acide aminé naturel (voir Tableau 1).

TABLEAU 1. VALEURS DE R<sub>f</sub> DE L'ACIDE AMINÉ NATUREL ET DE L'ACIDE AMINÉ DE SYNTHÈSE

Acides aminés	R <sub>f</sub> × 100	
	n-butanol/HFo/eau	Phénol pH 4.2
Acide aminé de synthèse	65	82
Acide aminé naturel	63	81
Acides aminés de synthèse et naturel	65	82

Sur la base de ces résultats, les différentes fractions sont réunies et évaporées sous pression réduite jusqu'à début de cristallisation; les cristaux sont dissous dans 50 ml d'eau et on réévapore jusqu'à cristallisation pour s'assurer de l'élimination complète de l'ammoniac. Les cristaux sont alors dissous dans le minimum d'eau à 40° et la solution est agitée avec du charbon pour éliminer la légère coloration jaune, filtrée et mise en chambre froide jusqu'au lendemain.

Cette première recristallisation dans l'eau seule nous a permis d'isoler 321 mg de cristaux blancs se présentant comme l'acide aminé naturel c'est à dire sous la forme de grandes paillettes. Une deuxième recristallisation nous a permis d'isoler 343 mg de substance. Le filtrat a été ensuite réévaporé de moitié et une nouvelle cristallisation a été amorcée en ajoutant goutte à goutte de l'alcool jusqu'à trouble. Cette opération recommencée trois fois nous a encore permis de recueillir 782 mg de cristaux se présentant sous la forme de petites paillettes. Pf: 225°; C, 58.24; H, 8.83; N, 9.81 %; calculé pour C<sub>7</sub>H<sub>13</sub>O<sub>2</sub>N, C, 58.72; H, 9.15; N, 9.78 %. Spectre infra-rouge: voir Fig. 2 (III).

*Racémisation de l'acide aminé naturel.* On chauffe à l'étuve à 195° pendant 26 hr 19 mg d'acide aminé naturel dissous dans 2 ml de soude 10 N. La solution refroidie est diluée à 100 ml par l'eau et est passée sur une colonne d'Amberlite CG 120, forme H<sup>+</sup>; la colonne est lavée avec 10 ml d'eau et l'acide aminé est élué

<sup>24</sup> Cf. 21.

par l'ammoniac 0.3 N. La solution ammoniacale est évaporée à sec sous pression réduite, on ajoute 5 ml d'eau et on réévapore à sec. Après addition de 5 ml d'alcool absolu, on évapore à sec et le résidu est lavé à l'éther anhydre puis séché en exsiccateur. Le spectre infra-rouge est représenté à la Fig. 2 (II).

#### *Spectres Infra-Rouges*

Les spectres i.r. ont été pris en pastilles de KBr (2 mg d'acide aminé pour 1 g de KBr). L'appareil était un Leitz, modèle G 3 à 4 réseaux, linéaire en longueur d'ondes et à haute résolution. Une étude spectroscopique approfondie est entreprise actuellement par les services du Professeur C. Duculot.

*Remerciements*—Nous tenons à remercier Monsieur le Professeur M. Renard\* pour les conseils éclairés qu'il n'a cessé de nous prodiguer au cours de ce travail, Monsieur le Professeur C. Duculot\* et Monsieur Evrard,\* Assistant, pour l'aide qu'ils nous ont apportée dans l'étude par spectrographie infra-rouge de la nouvelle substance ainsi que Monsieur le Professeur P. Heinemann\* qui a bien voulu se charger de la détermination des champignons.

\* Faculté des Sciences Agronomiques, Gembloux (Belgique).