

NOUVELLE SYNTHÈSE DE L'ACIDE AMINO-2 ÉTHANESULFINIQUE (HYPOTAURINE)

par

E. BRICAS, F. KIEFFER ET CL. FROMAGEOT

Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté des Sciences, Paris (France)

L'acide amino-2 éthanesulfinique (hypotaurine) résultant de la décarboxylation enzymatique de l'acide cystéinesulfinique^{1,2} a été caractérisé par diverses réactions, par son comportement chromatographique et, après isolement, par son analyse élémentaire^{2,3,4}. Nous avons pu en confirmer la nature par la comparaison avec l'acide amino-2 éthanesulfinique obtenu par une synthèse⁵ qui, à l'époque, n'était pas satisfaisante du point de vue préparatif. Cette méthode a été perfectionnée, et c'est elle que nous décrivons ici.

A notre connaissance, deux méthodes de synthèse différentes du même corps ont déjà été publiées:

AWAPARA⁴ emploie la taurine comme produit de départ. Il transforme l'acide benzoyl-amino-2 éthanesulfonique en chlorure d'acide par le chlorure de thionyle et réduit le chlorure obtenu par le sulfite de sodium. Par hydrolyse acide en tube scellé, il obtient ensuite le chlorhydrate de l'acide amino-2 éthanesulfinique. AWAPARA n'indique pas le rendement; son produit ne semble pas être parfaitement pur.

CAVALLINI et coll.⁶ suivent une voie différente: ils oxydent par l'eau oxygénée la cystamine en son disulfoxyde; ce dernier est ensuite dissimilé par la baryte en acide amino-2 éthanesulfinique et cystamine. La séparation de ces deux composés est effectuée à l'aide d'amberlite IR-100 H.

La présente méthode utilise, comme celle d'AWAPARA, la taurine comme point de départ; elle comporte les étapes suivantes: protection de la fonction amine par le groupement benzyloxycarbonyle, réduction du chlorure d'acide correspondant par la poudre de zinc, élimination du groupement protecteur par le sodium dans l'ammoniac liquide, dessalification par la permutite 50 donnant finalement l'acide amino-2 éthanesulfinique qui cristallise en aiguilles prismatiques (Fig. 1).

Dans cette synthèse, les principaux intermédiaires s'obtiennent à l'état cristallisé, et le rendement global à partir de la taurine est d'environ 40%.

Le produit cristallisé ne fournit qu'une seule tache avec la ninhydrine, l'iodoplatinate, etc., lors de chromatographies sur papier dans divers solvants et lors d'électrophorèses sur papier à divers pH. Il n'est pas hygroscopique et, conservé à l'air pendant plusieurs mois, ne montre pas d'oxydation décelable par chromatographie sur papier.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Les points de fusion ont été déterminés au moyen de l'appareil de Kofler. Les valeurs de R_F indiquées correspondent à des chromatographies descendantes sur papier Whatman No. 1. Les analyses ont été faites par le Service de Recherches Analytiques de la Société des Usines Chimiques Rhône Poulenc. Nous sommes heureux d'en remercier ici MM. FLORET ET MARTIN.

Bibliographie p. 362.

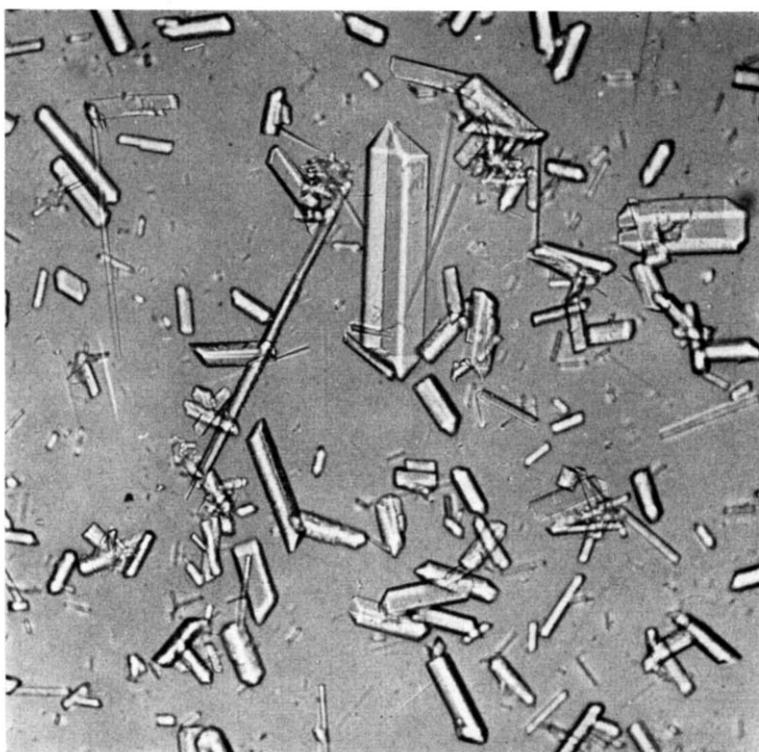


Fig. 1. Hypotaurine cristallisée par addition d'éthanol à une solution aqueuse concentrée. Grossissement: 90 \times .

Chlorure de benzylloxycarbonylamino-2 éthanesulfonyle

1. La taurine (40 g) dissoute dans 200 ml d'eau et 80 ml de soude 4 N, est traitée, avec agitation mécanique, par 57 g de chlorure de benzylloxycarbonyle ajouté par petites portions en 3 à 4 heures. Le mélange est maintenu légèrement alcalin par l'addition de 300 ml d'une solution de bicarbonate de sodium à 10%, puis de 45 ml de soude 4 N. Le pH final est d'environ 7. L'excès de chlorure de benzylloxycarbonyle est extrait par l'éther. La solution aqueuse est évaporée à sec sous vide à 35-50°. Pour l'opération suivante, il n'est pas nécessaire de séparer le benzylloxycarbonyl-amino-2 éthanesulfonate de sodium des sels minéraux présents. La chromatographie sur papier montre qu'il ne reste pas de taurine non substituée.

2. Le produit précédent, pulvérisé et bien séché au dessiccateur sur P_2O_5 , est mis en suspension dans 300 ml d'éther anhydre. On ajoute 70 g de pentachlorure de phosphore pulvérisé, par petites portions, en agitant modérément. La réaction est exothermique et, si l'addition de PCl_5 a été un peu trop rapide, il peut être nécessaire de refroidir le ballon. On abandonne à la température ordinaire pendant quelques heures, puis on chasse l'éther sous vide. En triturant le résidu visqueux avec de l'eau glacée, on obtient assez rapidement la cristallisation du chlorure d'acide. Après une nuit à la glacière, le produit est essoré et lavé abondamment à l'eau glacée, puis séché au dessiccateur sur P_2O_5 .

Rendement: 78.5 g, soit 88.5% par rapport à la taurine.

Bibliographie p. 362.

Par recristallisation dans le benzène/éther de pétrole, on obtient de fines lamelles fondant à 50–51°. Rendement de la recristallisation: 91%.

Analyse		$C_{10}H_{12}O_4NSCl = 277.5$			
		C %	H %	N %	S %
Calculé		43.3	4.33	5.04	11.6
Trouvé		43.4	4.55	4.80	11.8

Benzylloxycarbonylamino-2 éthanesulfinate de zinc

68 g de chlorure d'acide recristallisé sont dissous dans 300 ml de méthanol absolu. En agitant mécaniquement, on ajoute par portions 16.5 g de poudre de zinc. La qualité du zinc est primordiale et la vitesse de réaction et le rendement varient largement selon les échantillons essayés*. On poursuit l'agitation jusqu'à ce que la plus grande partie du zinc soit transformée, c'est-à-dire 3 à 4 heures.

On essore le précipité blanc formé en le décantant de la poudre de zinc restante. Rendement: 55 g, soit 82%.

Le sel de zinc est presque insoluble dans la plupart des solvants organiques. En utilisant le méthanol à chaud, on arrive cependant à en recristalliser de petites quantités, sous forme de plaquettes soyeuses fondant à 155–157°.

Analyse		$C_{20}H_{24}O_8N_2S_2Zn, 3H_2O = 603$			
		C %	H %	N %	S %
Calculé		39.8	4.97	4.04	10.6
Trouvé		39.7	4.85	4.30	10.5

La chromatographie sur papier du produit acidifié donne une tache révélable par l'iodoplatinate⁷, et de $R_F = 0.79$ (butanol-acide formique-eau, 15:3:2); 0.79 (phénol-eau, 4:1) et 0.60 (butanol-éthanol-ammoniaque-eau, 4:4:1:1).

Acide amino-2 éthanesulfinique

La coupure du groupement protecteur par le sodium dans l'ammoniac liquide peut s'effectuer directement sur le benzylloxycarbonylamino-2 éthanesulfinate de zinc. Nous avons réduit des lots de 20 g de ce dernier dissous dans 600–700 ml d'ammoniac, en opérant selon la technique de DU VIGNEAUD ET MILLER⁸. Le sodium est ajouté par petits morceaux jusqu'à l'obtention d'une coloration bleue permanente. On poursuit l'agitation encore une heure, et l'on ajoute une quantité de chlorure d'ammonium solide suffisante pour faire disparaître la coloration bleue due à l'excès de sodium.

Il faut noter cependant que ces virages ne sont pas nets en raison de la coloration brunâtre due à la présence du zinc. Aussi peut-il paraître préférable d'effectuer cette opération sur le benzylloxycarbonylamino-2 éthanesulfinate de sodium obtenu à partir du sel de zinc de la manière suivante: le sel de zinc, en suspension dans l'eau, est agité pendant une quinzaine d'heures avec de la permuthite 50 saturée de Na^+ . On filtre, on évapore à sec sous vide, dans un courant d'hydrogène, à 35°, et l'on sèche au dessiccateur sur P_2O_5 . On peut également opérer sur l'acide libre, que l'on obtient comme il est dit p. 362.

Quel que soit le produit traité, on laisse évaporer librement l'ammoniac et l'on achève cette évaporation à la trompe à eau. On dissout le résidu dans l'eau, on filtre et l'on extrait par l'éther le dibenzyle et le toluène formés.

* Les meilleurs résultats ont été obtenus avec le zinc "pulv. puriss. z. A.", Fluka, Buchs, S.G., Suisse. Après une conservation prolongée, il est toutefois nécessaire de réactiver ce zinc⁹.

On acidifie la solution à pH 3 à 4 pour éliminer l'anhydride carbonique qui autrement, se dégagerait pendant le passage sur la permutite acide. On achève ce dégagement sous le vide de la trompe à eau; on dilue la solution à environ 3 l et on la passe sur une colonne de permutite 50 sous forme acide³, (dimensions: 100 × 2 cm, environ 300 g de résine). L'acide amino-2 éthanesulfinique est retenu en même temps que les cations métalliques. Une certaine quantité de taurine passe dans l'effluent et les eaux de lavage. L'élution s'effectue avec l'ammoniaque normale. On peut en suivre la marche par le déplacement d'une zone chaude. Lorsque cette zone approche de l'extrémité inférieure de la colonne, il faut commencer à rechercher l'acide amino-2 éthanesulfinique dans l'éluat, à l'aide du réactif à l'iодoplatinate. Tout le produit se trouve généralement dans un volume inférieur à 200 ml. Cette solution est quelquefois un peu jaunâtre. Elle peut alors être décolorée par traitement à chaud avec du charbon végétal activé ou du noir animal débarrassé de fer. Ce traitement ne provoque aucune oxydation.

On évapore presque à sec, sous vide, dans un courant d'hydrogène, à 35°. De la solution concentrée obtenue, on précipite l'acide amino-2 éthanesulfinique par addition d'éthanol. Nous en avons obtenu ainsi 4.5 g à partir de 20 g de benzyloxy-carbonylamino-2 éthanesulfinate de zinc, soit un rendement de 56%; le rendement global à partir de la taurine est ainsi de 40%.

On recristallise en dissolvant dans le minimum d'eau et en reprécipitant par l'éthanol. Le produit obtenu, non hygroscopique, fond à 171-172°. L'acide amino-2 éthanesulfinique, obtenu par CAVALLINI, fond à 186-188° et est hygroscopique*.

Analyse	C ₂ H ₇ O ₂ NS = 109			
	C %	H %	N %	S %
Calculé	22.0	6.4	12.8	29.4
Trouvé	22.3	6.7	12.8	29.4

Le comportement de ce produit lors d'électrophorèses sur papier à divers pH et lors de chromatographies sur papier est identique à celui de l'hypotaurine isolée à partir de l'organisme. Les *R*_F sont indiqués dans le Tableau I.

TABLEAU I
COMPARAISON ENTRE LES *R*_F DE LA TAURINE ET DE L'HYPOTAUrine

Solvents	<i>R</i> _F	
	Taurine	Hypotaurine
<i>n</i> -Butanol-acide formique-eau (15:3:2)	0.05	0.07
<i>n</i> -Butanol (saturé d'HCl N)	0.05	0.09
<i>n</i> -Butanol-phénol (3:2, saturé d'eau)	0.11	0.33
Phénol-eau (4:1)	0.29	0.63
Phénol tamponné (pH 10)	0.29	0.50
<i>m</i> -Crésol (saturé d'eau)	0.08	0.33
Collidine-2,4,6-lutidine-2,6-eau (1:1:1, + 1% de diéthylamine)	0.35	0.24
<i>n</i> -Butanol-éthanol-ammoniaque-eau (4:4:1:1)	0.16	0.13
<i>n</i> -Butanol-pyridine-eau (1:1:1)	0.36	0.29

* Ajouté au cours de la correction: Dans une note plus récente dont il nous a communiqué le manuscrit, D. CAVALLINI décrit une modification de sa synthèse, donnant un produit de point de fusion 175-177°.

Autres tentatives de scission du groupement benzyloxycarbonyle

L'hydrogénéation catalytique a été essayée sur l'acide benzyloxycarbonylamino-2 éthanesulfinique et sur son sel de zinc, l'acide étant préparé à partir de ce dernier, de la manière suivante: on le transforme d'abord en sel de sodium en le trituant au mortier avec un excès de bicarbonate de sodium et de l'eau. Le carbonate de zinc précipité est éliminé par filtration, le filtrat est acidifié (rouge Congo) et extrait à froid une dizaine de fois par l'éther débarrassé de tout peroxyde. On évapore à sec la solution éthérée séchée sur sulfate de sodium, sous vide, dans un courant d'hydrogène. Le produit qui s'altère rapidement doit être utilisé immédiatement pour l'étape suivante.

La scission du groupement benzyloxycarbonyle par hydrogénéation catalytique en présence de noir de palladium a été essayée suivant la technique habituelle dans le méthanol en présence d'un peu d'acide acétique. La réaction débute normalement, mais cesse rapidement. L'addition répétée de catalyseur frais permet chaque fois une reprise de la réaction, mais celle-ci est de nouveau arrêtée par empoisonnement du catalyseur. La chromatographie sur papier montre que la scission n'affecte qu'une petite fraction du produit. Cette méthode ne peut donc convenir pour des buts préparatifs.

D'autre part, l'élimination du groupement benzyloxycarbonyle par l'acide bromhydrique dans l'acide acétique glacial, selon BEN ISHAI ET BERGER¹⁰ conduit en même temps à l'oxydation quantitative en taurine; cette méthode est donc encore moins utilisable que la précédente.

RÉSUMÉ

La synthèse de l'acide amino-2 éthanesulfinique décrite comporte les étapes suivantes: protection de la fonction amine de la taurine par le groupement benzyloxycarbonyle, réduction du chlorure d'acide correspondant par la poudre de zinc, élimination du groupement protecteur par le sodium dans l'ammoniac liquide et dessalification par la permutite 50 donnant finalement l'acide amino-2 éthanesulfinique (hypotaurine). Le produit cristallise en aiguilles prismatiques, non hygroscopiques, stables à l'air. Les valeurs de R_F sont données pour une série de solvants.

SUMMARY

2-amino-ethanesulfinic acid is synthesised as follows: The amino group of taurine is protected with a carbobenzyloxy group, the corresponding acyl chloride is reduced by powdered zinc, and the protecting group is removed by sodium in liquid ammonia. The free acid is finally obtained by passing through a permutit 50 column. It crystallises in non-hygroscopic, air-stable, prismatic needles. R_F values are given for several solvents.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird eine Synthese von 2-Amino-aethansulfinsäure beschrieben, welche folgende Zwischenstufen aufweist: Maskierung der Aminogruppe des Taurins durch einen Benzylester-Kohlsäurerest, Reduktion des entsprechenden Säurechlorids durch Zinkpulver, und Abspaltung der maskierenden Gruppe durch Natrium in flüssigem Ammoniak. Die freie Säure wird mit Hilfe einer Chromatographie mit Permutit-50, welches die Kationen zurückhält, erhalten. 2-Amino-äthansulfinsäure (Hypotaurine) kristallisiert in nadelförmigen Prismen, welche nicht hygrokopisch sind und sich an der Luft als beständig erweisen. Die R_F -Werte der Säure werden für verschiedene Lösungsmittelmischungen angegeben.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 F. CHATAGNER ET B. BERGERET, *Compt. rend.*, 232 (1951) 448.
- 2 B. BERGERET, F. CHATAGNER ET C. FROMAGEOT, *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (1952) 147.
- 3 B. BERGERET ET F. CHATAGNER, *Biochim. Biophys. Acta*, 14 (1954) 543.
- 4 J. AWAPARA, *J. Biol. Chem.*, 203 (1953) 183.
- 5 E. BRICAS, IN C. FROMAGEOT, *Harvey Lectures*, 49 (1955) p. 9.
- 6 D. CAVALLINI, C. DE MARCO ET B. MONDOVI, *Giorn. biochim.*, 2 (1953) 338.
- 7 G. TOENNIES ET J. KOLB, *Anal. Chem.*, 23 (1951) 823.
- 8 *Biochem. Preparations*, 2 (1952) 77 et 88.
- 9 *Org. Synth.*, Coll. Vol. 3 (1955) 74.
- 10 D. BEN ISHAI ET A. BERGER, *J. Org. Chem.*, 17 (1952) 1564.

Reçu le 6 mai 1955