

SÉPARATION ET CARACTÉRISATION DU L(+)- γ -(*p*-HYDROXY)ANILIDE DE L'ACIDE GLUTAMIQUE À PARTIR DE *AGARICUS HORTENSIS*

J. JADOT, J. CASIMIR ET M. RENARD

*Laboratoires de Chimie Générale et Organique, Université de Liège et Institut Agronomique de
l'Etat à Gembloux (Belgique)*

(Reçu le 29 Février, 1960)

SUMMARY

*Separation and characterisation of
the γ -(*p*-hydroxy)anilide of glutamic acid from A. hortensis*

The γ (*p*-hydroxy)anilide of glutamic acid has been isolated from the mushroom *Agaricus hortensis* by chromatography on activated charcoal and column of Dowex 1×8 .

The new compound was treated with 6 *N* hydrochloric acid and the products of hydrolysis have been identified as glutamic acid and *p*-aminophenol, the nature of these two substances being confirmed by comparison with synthetic materials. The compounds synthesized from *p*-aminophenol and pyrrolid-2-one-5-carboxylic acid appeared to be identical with the natural anilide.

INTRODUCTION

L'étude, par chromatographie bidimensionnelle et chromatoélectrorhéophorèse sur papier, de la fraction soluble dans l'alcool du champignon *Agaricus hortensis* a montré la présence dans celle-ci d'un nouveau dérivé de l'acide glutamique.

Dans une communication antérieure¹, nous avons décrit l'isolement de ce composé par adsorption sur charbon activé, élution, extraction de la phénylalanine, de la tyrosine et des autres impuretés aromatiques par l'eau glacée. Le résidu constitué, principalement par la substance à isoler a été recristallisé dans l'eau. Nous donnons également dans cette publication un tableau des valeurs des R_F de cette substance dans différents solvants. Cette technique ne donnant de bons résultats que pour des champignons absolument frais, une méthode de séparation utilisant les résines échangeuses d'ions a été mise au point. La substance donne une coloration pourpre avec la ninhydrine et rouge avec l'acide sulfanilique ou la *p*-bromoaniline, tous deux diazotés. Sur papier, la substance donne aussi une coloration jaune quand on la traite par une solution de nitrite de sodium à 10 % additionnée de 2 % d'acide acétique.

La Fig. 1 représente un chromatogramme bidimensionnel de l'extrait alcoolique de *Agaricus hortensis* réalisé en utilisant le *n*-butanol-acide formique-eau (75:15:10) et le phénol saturé par un tampon phosphate-acide citrique à pH = 4.2; la substance se trouve entre l'alanine et la proline, à droite de l'acide γ -aminobutyrique; si on



Fig. 1. Chromatogramme bidimensionnel de l'extrait d'*Agaricus hortensis* 1, acide aspartique; 2, acide glutamique; 3, sérine; 4, glycofolle; 5, thréonine; 6, alanine; 7, tyrosine; 8, valine; 9, phénylalanine; 10, leucines; 11, proline; 12, 12 bis; 13, 14, acides aminés basiques; 15, glutamine; 21, asparagine; 24, tryptophane; 26, méthionine; 27, dérivés de l'acide glutamique; 32, acide α -aminobutyrique; 55, acide γ -aminobutyrique.



Fig. 2. Chromatoélectrorhéophorèse de l'extrait d'*Agaricus hortensis* Numérotation comme Fig. 1.

utilise le phénol ammoniacal, les spots de la substance et le l'acide γ -aminobutyrique sont confondus. La chromatoélectrorhéophorèse sur papier a été effectuée avec le solvant au butanol dans le sens de la chromatographie et avec une solution d'acide acétique N pour l'électrophorèse; dans ce cas (Fig. 2) la substance se trouve au dessus de la tyrosine, nettement séparée de l'acide γ -aminobutyrique qui migre à l'électrorhéophorèse comme les acides aminés basiques.

La substance est présente en quantité importante dans le champignon et se retrouve dans un très grand nombre de champignons du genre *Agaricus*, elle semble donc, du point de vue systématique, caractéristique de ce genre².

Isolément de la substance

Les champignons (2 kg) ont été pulvérisés dans un Waring blender en présence de 8 l d'éthanol 95 % de façon à obtenir une concentration approximative de 80 % en éthanol dans l'extrait filtré. Après concentration par distillation sous pression réduite, l'extrait a été évaporé à sec. La substance, la phénylalanine et les autres impuretés aromatiques ont été adsorbées sur du charbon traité par l'acide acétique selon la méthode de PARTRIDGE³, puis éluées par de l'acide acétique à 25 % contenant 5 % de phénol; l'éluat obtenu a été agité avec de l'éther pour éliminer le phénol, concentré par distillation sous pression réduite et évaporé à sec. La fraction aromatique a été ensuite dissoute dans l'eau et passée sur une colonne d'amberlite IR-120 forme H⁺ et éluée par NH₃ N. L'éluat, évaporé à sec, a été dissous dans 100 ml d'acide acétique 0.5 N. La phénylalanine, la tyrosine et la nouvelle substance ont été séparées sur une colonne de Dowex 1 \times 8 forme acétate: 50 ml de la solution

dans l'acide acétique 0.5 *N* ont été passés sur une colonne de Dowex I (60 mm × 500 mm) et par élution avec une solution d'acide acétique de même concentration à la vitesse de 138 ml/h, des fractions de 45 ml ont été recueillies. On a retrouvé la phénylalanine dans les fractions 10 à 22, la tyrosine dans les fractions 28 à 36 et la substance dans les fractions 71 à 91. Cette première séparation nous a permis d'obtenir après recristallisation dans l'eau chaude 140 mg de cristaux incolores. Une seconde séparation portant sur les autres 50 ml de solution acétique et menée de façon identique a permis d'obtenir après recristallisation 110 mg de cristaux. La substance ainsi isolée possède un point de fusion de 231.5°, elle fond en brunissant sans se décomposer, elle est assez peu soluble dans l'eau; $\alpha_D^{20} = +30^\circ$ ($c = 0.217$ g dans 100 ml de HCl *N*).

Analyse élémentaire

Le produit possède la composition centésimale suivante: C, 55.25 %; H, 5.94 %; N, 11.62 %; O, 27.3 % (dosé); ce qui conduit à la formule brute $C_{11}H_{14}O_4N_2$. Les valeurs calculées à partir de cette dernière formule sont respectivement: C, 55.45 %; H, 5.92 %; N, 11.76 %; O, 26.86 %.

Détermination de l'équivalent gramme

(a) Titration par l'acide perchlorique en milieu anhydre (acide acétique glacial): 12.27 mg de substance ont été titrés par 0.56 ml de $HClO_4$ 0.1 *N*, ce qui correspond à une valeur de 219 pour l'équivalent gramme. (b) Titration par le formaldéhyde: cette méthode donne un équivalent gramme de 230. (c) Titration par la méthode de TAGUE⁴: la titration par la soude 0.1 *N* permet de calculer un équivalent gramme de 219; signalons que, dans ces conditions, la tyrosine réagit non seulement par sa fonction acide mais aussi par sa fonction phénol.

Détermination du poids moléculaire

La détermination du poids moléculaire par la méthode de RAST modifiée par WENDT⁵ donne une valeur de 236.

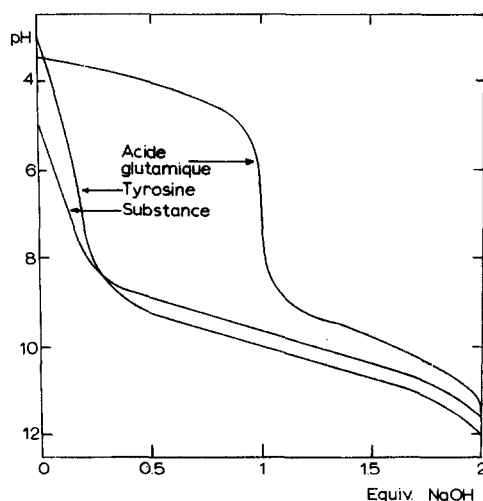


Fig. 3. Courbe de titration de la substance naturelle, de la tyrosine et de l'acide glutamique.

Le poids moléculaire trouvé est très voisin de 238, valeur calculée à partir de la formule $C_{11}H_{14}O_4N_2$. On peut donc adopter cette dernière comme formule moléculaire. La titrimétrie en milieu anhydre par $HClO_4$ donne un équivalent approché de 219 qui implique une fonction- NH_2 libre. L'équivalent de 230 obtenu par formol-titration implique la présence d'une fonction $COOH$ libre. L'équivalent de 219 déterminé par la méthode de TAGUE prouve qu'il y a deux fonctions à caractère acide, la première acide carboxylique et la seconde acide très faible, vraisemblablement une fonction phénolique comme le suggère la comparaison des courbes de titration de la tyrosine et de la substance (Fig. 3).

Détermination du spectre u.v.

La substance possède un caractère aromatique marqué comme le montre son comportement lors de la chromatographie sur charbon activé et comme le confirme son absorption dans l'u.v. Son spectre u.v. est semblable à celui des autres acides aminés aromatiques, ce qui ressort du tableau suivant:

TABLEAU I
ABSORPTION DE DIFFÉRENTS ACIDES AMINÉS DANS L'U.V.

Acides aminés	HCl 0,1 N		NaOH 0,1 N	
	λ_{max} (Å)	ϵ_{max}	λ_{max} (Å)	ϵ_{max}
Phénylalanine	2575	195	2585	200
Tyrosine	2775	1500	2940	2550
Tryptophane	2780	5500	2810	5000
Substance	2460	11000	2630	9300

Le déplacement du λ_{max} vers les grandes longueurs d'onde quand on passe du milieu acide au milieu basique est de 165 Å pour la tyrosine et de 161 Å pour la substance étudiée. La valeur du ϵ_{max} est beaucoup plus grande dans le spectre u.v. de la substance que dans celui des autres acides aminés aromatiques.

Hydrolyse de la substance

Pour obtenir une hydrolyse complète, sans noircissement, il a suffi de chauffer à reflux la substance en solution dans HCl 6 N pendant 8 h. La solution a été ensuite évaporée dans un exsiccateur en présence de KOH solide, le vide se faisant à la pompe à huile. On obtient de cette façon des cristaux incolores. Par chromatographie sur papier avec le solvant *n*-butanol-acide acétique-eau (4:1:5), on a pu mettre en évidence deux spots intenses. Le premier, coloré en jaune déjà lors du séchage du chromatogramme est devenu brun-rouge après révélation avec la ninhydrine; son R_F est de 0.4. Le second, violet après réaction avec la ninhydrine, est caractérisé par un R_F de 0.2. L'hydrolyse alcaline du composé par la baryte saturée pendant 1 h à 100° donne les mêmes résultats.

La migration des produits de l'hydrolyse a été étudiée par électrophorèse sur papier en présence d'un tampon phosphaté à pH = 5.6 pendant 1 h à 250 V. La substance correspondant au spot violet a migré comme l'acide glutamique et l'autre substance dans le sens des composés basiques.

Les deux produits d'hydrolyse ont été séparés sur une colonne de papier pressu-

risée à 0.35 kg/cm² dans un appareil Chromax L.K.B. à l'aide du solvant butanol-acide acétique-eau déjà cité. Ces produits ont également été séparés sur une colonne de Dowex 1 × 8 forme acétate à l'aide d'une solution d'acide acétique 0.5 N; la substance basique passant très rapidement à travers la colonne a été facilement séparée du composé acide fortement retenu.

Caractérisation de la substance basique

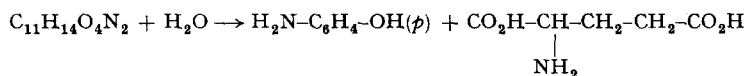
Celle-ci a été recristallisée deux fois dans l'éthanol absolu, ce qui a permis d'obtenir des cristaux fondant à 184°. Cette substance est à la fois soluble dans les acides et les bases mais ne décompose pas une solution de NaHCO₃; elle présente une absorption marquée dans l'u.v. (λ max = 286 m μ) et a donc un caractère aromatique; elle s'oxyde très rapidement en milieu basique.

L'analyse élémentaire donne les résultats suivants: C, 65.85 %; H, 6.36 %; N, 12.72 % (calculé pour C₆H₇ON: C, 66.03 %; H, 6.47 %; N, 12.84 %).

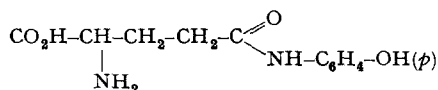
Ceci fait penser à un aminophénol. Le *p*-aminophénol fond à 184°. Le point de fusion mixte du mélange à 50 % de la substance à identifier et du *p*-aminophénol demeure à 184°. Comme les spectres i.r. des deux substances sont tout à fait comparables, on peut affirmer que le premier produit de l'hydrolyse est constitué par le *p*-aminophénol.

Caractérisation de la substance acide

Celle-ci a été recristallisée deux fois dans l'eau chaude, ce qui a permis d'obtenir des cristaux fondant à 213° avec décomposition. Par chromatographie sur papier à l'aide de différents solvants, il a été impossible de séparer cette substance de l'acide glutamique. L'analyse élémentaire des cristaux donne: C, 41.07 %; H, 6.27 %; N, 9.5 % (calculé pour C₅H₉O₄N: C, 40.81 %; H, 6.17 %; N, 9.52 %; poids moléculaire 147). Ce second produit d'hydrolyse titré par la méthode de TAGUE donne un équivalent gramme de 70 correspondant à un poids moléculaire de 140. Le point de fusion mixte du mélange de la substance et de l'acide glutamique provenant de diverses firmes commerciales se situe à 210°. Le spectre i.r. de la substance est identique à celui de l'acide glutamique et on peut affirmer que le second produit d'hydrolyse est constitué par de l'acide glutamique. La substance extraite de *Agaricus hortensis* a donc subi l'hydrolyse suivante:



Le groupement NH₂ libre de C₁₁H₁₄O₄N₂ étant en α par rapport à la fonction CO₂H, la liaison amide doit se faire en γ et le nouvel acide aminé est le L (+)- γ -(*p*-hydroxy)-anilide de l'acide glutamique:



*Synthèse du L (+)- γ -(*p*-hydroxy)anilide de l'acide glutamique*

Une solution aqueuse à 30 % d'un mélange équimoléculaire de *p*-aminophénol et d'acide pyrrolid-2-one-5-carboxylique a été chauffé à 115° en tube scellé pendant

10 h. Après refroidissement et ouverture du tube, la solution a été évaporée sous vide. On a retrouvé dans le résidu, par chromatographie sur papier en présence de butanol saturé d'eau et d'acide formique, le γ -(*p*-hydroxy)anilide de l'acide glutamique ainsi qu'une partie de l'acide glutamique et du *p*-aminophénol non transformés. Le mélange a été séparé en ses composants par chromatographie sur une colonne de Dowex 1×8 et élution par l'acide acétique. 0.5 *N*. Les fractions correspondant au nouveau dérivé de l'acide glutamique ont été concentrées et évaporées à sec. La substance recristallisée dans l'eau chaude fond à 228° et ne donne pas d'abaissement du point de fusion avec un échantillon du produit naturel. Elle contient 11.75 % d'azote (calculé pour $C_{11}H_{14}O_4N_2$: 11.76 %). Les spectres infrarouge et u.v. de la substance synthétique et du produit naturel sont identiques comme le montrent les Figs. 4 et 5.

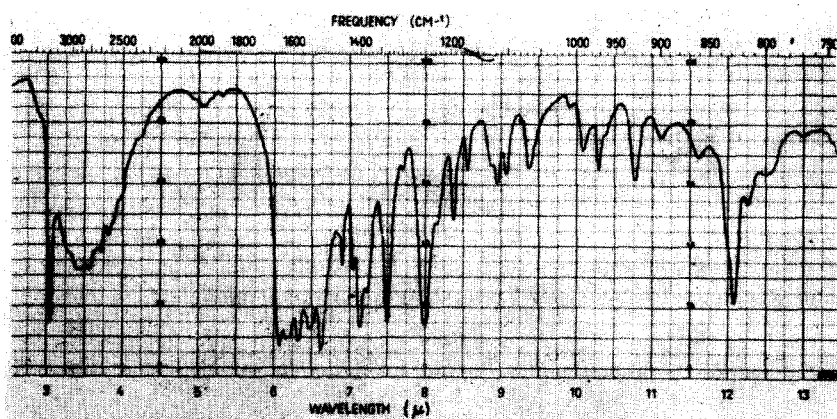


Fig. 4. Spectre infrarouge de la substance naturelle.

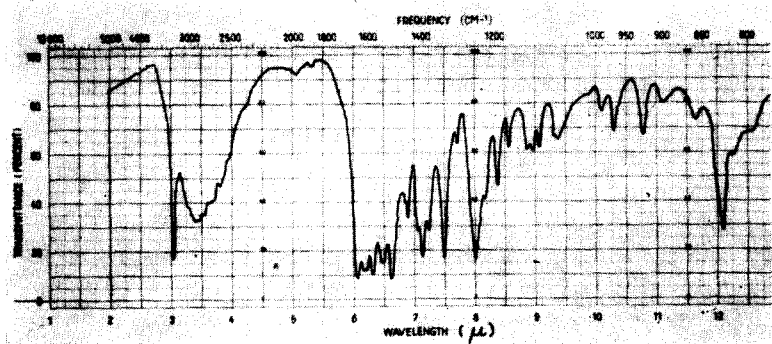


Fig. 5. Spectre infrarouge de la substance synthétique.

Synthèse du (p-hydroxy)anilide de l'acide pyrrolid-2-one-5-carboxylique

En vue d'améliorer le rendement de la synthèse, nous avons voulu modifier le mode opératoire; les nouvelles conditions expérimentales ne donnent pas le produit attendu mais bien le (*p*-hydroxy)anilide de l'acide pyrrolid-2-one-5-carboxylique.

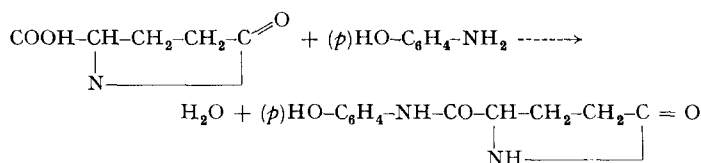
Un mélange à parties égales de *p*-aminophénol et d'acide pyrrolid-2-one-5-carboxylique a été chauffé à 190° sous atmosphère d'azote privé d'oxygène. Après fusion du mélange, on a laissé descendre la température à 160° et on l'y a maintenu pendant 20 min. Après refroidissement, la masse a été pulvérisée et lavée à l'éthanol chaud de façon à en assurer une décoloration complète. Le résidu a été extrait à l'eau chaude et par refroidissement de la solution aqueuse des cristaux blancs se sont formés. Après deux cristallisations dans l'eau, la substance présente un point de fusion constant de 285°. L'analyse élémentaire donne: C: 59,79 %; H, 5,44 %; N, 12,68 %; calculé pour $C_{11}H_{12}O_3N_2$; C, 59,99 %; H, 5,49 %; N, 12,72 %.

Le spectre I.R. de cette substance est différent de celui du γ -(*p*-hydroxy)anilide de l'acide glutamique. La bande C = O est située à 5,93 μ , valeur caractéristique de la vibration C = O d'une γ -lactame tandis que la bande C = O de la fonction amide secondaire se trouve à 6,07 μ dans le spectre de la substance naturelle.

On retrouve cependant des bandes d'absorption situées à la même longueur d'onde, notamment à 6,25 et 6,64 μ , les deux bandes du noyau aromatique, à 3,05 μ la bande NH de l'amide secondaire et à 6,47 μ la bande II de l'amide secondaire.

Les spectres I.R. du phénol, du produit naturel, du (*p*-hydroxy)anilide de l'acide pyrrolid-2-one-5-carboxylique, de la tyrosine, du *p*-aminophénol présentent des bandes fort semblables aux environs de 7,3 μ et de 8,1 μ que l'on ne retrouve pas dans le spectre I.R. de la phénylalanine et qui semblent caractéristiques de la fonction phénolique. Les spectres ont été pris en phase solide.

La présente synthèse a donc donné le (*p*-hydroxy)anilide de l'acide pyrrolid-2-one-5-carboxylique et la réaction s'interprète de la façon suivante:



REMERCIEMENTS

Nous remercions très sincèrement le Centre de Recherche sur les Champignons et le Centre Interuniversitaire de Chimie Organique pour l'aide qu'ils nous ont apportée au cours de cette recherche.

RÉSUMÉ

Le γ (*p*-hydroxy)anilide de l'acide glutamique a été isolé à partir du champignon *Agaricus hortensis* par séparation chromatographique sur charbon activé et colonne de Dowex 1 \times 8. Le nouveau composé donne par hydrolyse avec HCl 6 N de l'acide glutamique et du *p*-aminophénol, la nature de ces deux derniers étant confirmée par comparaison avec les substances synthétiques. La substance synthétisée à partir du *p*-aminophénol et de l'acide pyrrolid-2-one-5-carboxylique présente des propriétés identiques à celles de l'anilide naturel.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ J. CASIMIR, S. GERLAXHE, M. RENARD, *Bull. des Fermentations*, No. 5 Sept. Oct. (1956).
- ² J. CASIMIR, P. HEINEMANN, résultats non publiés.
- ³ S. M. PARTRIDGE, *Biochem. J.*, 44 (1949) 521.
- ⁴ E. L. TAGUE, *J. Am. Chem. Soc.*, 42 (1920) 183.
- ⁵ G. WENDT, *Ber.*, 75 (1942) 425.