

2,5-DIHYDROXYMETHYL 3,4-DIHYDROXYPYRROLIDINE DANS LES FEUILLES DE *DERRIS ELLIPTICA*

ANDRÉ WELTER et JOSEPH JADOT

Chimie Organique, Université de Liège 1 bis, quai Roosevelt, 4000 Liège, Belgique

et

GASTON DARDENNE*, MICHEL MARLIER et JEAN CASIMIR

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

(Received 26 September 1975)

Key Word Index—*Derris elliptica*; Leguminosae; imino acids and iminoalcohols: *cis* and *trans* 4,5-dihydroxypipelicolic acid; 2,5-dihydroxymethyl 3,4-dihydroxypyrrolidine.

Abstract—A new natural imino-alcohol, 2,5-dihydroxymethyl 3,4-dihydroxypyrrolidine has been isolated from the leaves of *Derris elliptica*. Its structure was determined by chemical and physical methods.

INTRODUCTION

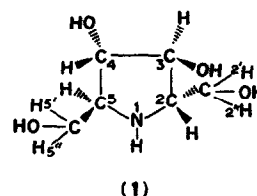
Dans le cadre de nos recherches sur les acides aminés libres des légumineuses et en particulier des Fabaceae [1-3], nous avons identifié dans les feuilles de *Derris elliptica* une nouvelle substance réagissant à la ninhydrine qui s'est avérée être un "imino-alcool" à noyau pyrrolidine. Un nombre relativement important d'imino-acides ayant ce cycle comme squelette ont été découverts dans le règne végétal [4-5]. Les substituants qui y sont attachés sont variés et nombreux [5-10].

La nouvelle substance a été isolée par les techniques traditionnelles et sa structure a été déterminée par des méthodes chimiques et physiques comme étant la 2,5-dihydroxyméthyl 3,4-dihydroxypyrrolidine. C'est la première fois qu'un imino-polyol de ce type est isolé du règne végétal.

RESULTATS ET DISCUSSION

L'étude de la distribution des acides aminés libres de la fraction soluble dans l'éthanol aqueux des feuilles de *Derris elliptica* Benth. (Fabaceae) a permis, par 2D.PC et HVE, de mettre en évidence une tache intense de nature indéterminée et se révélant en jaune à la ninhydrine. Elle se situe entre l'acide glutamique et l'acide aspartique à la chromatographie. Par HVE à pH 3,6, elle migre comme l'acide 4-aminobutyrique. L'examen du 2D.PC a permis d'identifier en plus des imino-acides courants: (proline, acide pipécolique, acide *trans* 4-hydroxypipécolique, acide *trans* 5-hydroxypipécolique), deux substances réagissant en vert à la ninhydrine et à l'isatine. La première est la 2(*S*)-carboxy 4(*S*), 5(*S*)-dihydroxypipéridine isolée de *Calliandra haematocephala* [11-12]. La seconde est un de ses isomères qui s'est révélé identique à la 2(*S*)-carboxy 4(*R*), 5(*S*)-dihydroxypipéridine [13].

Le composé inconnu a été isolé en quantité appréciable. Après purification de l'extrait alcoolique sur une



colonne de résine cationique, le résidu aminé a été fractionné sur une colonne de Lewatit S 1080, forme pyridine; l'élution a été effectuée par la pyridine et ensuite par NH_3 . L'extrait ammoniacal contient la substance inconnue avec une faible quantité d'arginine. Par recristallisation dans un mélange $\text{EtOH}-\text{Me}_2\text{CO}-\text{EtOAc}$, nous avons obtenu un produit chromatographiquement pur. L'analyse élémentaire conduit à la formule $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_4$. La substance se colore en jaune à la ninhydrine mais après un chauffage prolongé. Elle ne réagit pas à l'isatine mais le test au nitroprussiate-acétaldéhyde [14] est positif ce qui permet de mettre en évidence une fonction $-\text{NH}-$. Le spectre IR présente une bande large caractéristique de la vibration de valence $-\text{OH}$ centrée à 3300 cm^{-1} . Les bandes amino-acides sont absentes dans la région $1650-1500\text{ cm}^{-1}$. La substance se décompose rapidement lorsqu'elle est traitée par l'acide périodique. Cette réaction est caractéristique des composés contenant deux groupes OH vicinaux [15].

Le spectre ^1H RMN du chlorhydrate dans le DMSO montre la présence de 4 groupes $-\text{OH}$, d'un groupe $-\text{NH}_2^+$, et de 8 protons non échangeables. Dans le spectre ^{13}C RMN de l'amine libre dans D_2O , on observe uniquement 3 pics qui correspondent à un groupe méthylnique et à 2 groupes méthynes; ils sont déplacés vers les champs faibles à cause de la proximité des fonctions $-\text{OH}$ et $> \text{NH}$. Chaque pic est en fait la coïncidence de la résonance de 2 atomes de carbone. Les arguments précédents permettent de prévoir une molécule très symétrique constituée par un cycle pyrrolidine substitué par 2 groupes $-\text{OH}$ et 2 groupes $-\text{CH}_2\text{OH}$.

* To whom reprint requests should be sent.

Tableau 1. ^1H RMN de la 2,5-dihydroxyméthyl-3,4-dihydroxypyrrolidine

	H ₂		H ₃		H ₄		H ₅		H _{2'(5')}		H _{2''(5'')}
	3.04		3.85		3.85		3.04		3.64		3.72
$J(\text{Hz})$	$J_{\text{H}_2-\text{H}_3}$	=	$J_{\text{H}_2-\text{H}_3}$	=	7.69	=	$J_{\text{H}_2'-\text{H}_2''}$	=	$J_{\text{H}_5'-\text{H}_5''}$	=	-11.60
	$J_{\text{H}_3-\text{H}_4}$	=	7.09	=	$J_{\text{H}_2(5')-\text{H}_2(5)}$	=	6.40	=	$J_{\text{H}_2(5'')-\text{H}_2(5)}$	=	4.18

Le spectre du composé en solution dans D_2O a été enregistré sur un spectromètre Varian 300 MHz. Les déplacements chimiques sont en ppm par rapport au 2,2,3,3-tétra deutério-3-(triméthylsilyl)propionate de Na.

Le SM montre un pic important de valeur $m/e = 164,0943$ ($\text{M}^+ + 1$) qui correspond à la fixation d'un proton sur l'azote cyclique de l'ion moléculaire pour former un ion ammonium très stable ($\text{C}_6\text{H}_{14}\text{NO}_4 = 164,0922$). Un pic intense mesuré à $m/e = 132,0660$ ($\text{M}^+ - \text{CH}_2\text{OH} = \text{C}_5\text{H}_{10}\text{NO}_3 = 132,0660$) est formé par clivage caractéristique de la liaison portant le substituant en α de l'azote (16-17) ($m^* = 98,45$). On observe également un pic moins abondant à $m/e = 114$ [$\text{M}^+ - (\text{CH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O})$] et un pic très intense à $m/e = 60,0454$ correspondant à la coupure de l'ion $m/e = 132$ ($m^* = 27,27$) pour former l'ion $\text{HOCH}_2-\text{CH}^+=\text{NH}_2$ ($\text{C}_2\text{H}_6\text{NO} = 60,0449$). Ceci indique que le second groupe $-\text{CH}_2\text{OH}$ est également en α de l'azote.

Les résultats précédents nous permettent donc de proposer la structure suivante: 2,5-dihydroxyméthyl 3,4-dihydroxypyrrolidine. Le spectre ^1H RMN du composé dans D_2O confirme cette structure et de plus apporte des renseignements sur la conformation et la configuration absolue de la substance. Le spectre obtenu à 300 MHz a été traité comme un système symétrique $\text{A}_2\text{B}_2\text{C}(\text{CC}')$. Les paramètres ont été obtenus par simulation à l'aide du programme SIMEQ -116 et de l'ordinateur Varian 620-i (voir Tableau 1). L'étude de la variation de δ en fonction du pH a permis l'attribution des protons en C (2) et C (5): leur δ augmente de 0,5 ppm lorsqu'on passe en milieu acide ($\text{pH} \approx 0,5 - \text{D}_2\text{O} + \text{TFA}$).

Le composé possède une activité optique $[\alpha]_D^{20} = +56,4^\circ$ ($c = 7$, H_2O) ce qui permet de rejeter les formes méso de cet imino-alcool. Dès lors, seule la forme représentée en 1 ou son énantiomère est compatible avec les valeurs presque identiques des constantes de couplages des protons du cycle. Cette structure est d'ailleurs la seule pouvant rendre compte de la symétrie observée par RMN. La configuration absolue du nouvel amino-polyol est donc: 2(R), 3(R), 4(R), 5(R) ou 2(S), 3(S), 4(S), 5(S). Les valeurs des 3J du cycle sont également en faveur d'une conformation privilégiée demi-chaîne [18,19] dont l'axe de symétrie passe par l'atome d'azote.

Un certain nombre de plantes, appartenant souvent à la famille des Légumineuses, contiennent des substances toxiques pour les animaux inférieurs et aussi parfois pour les animaux à sang chaud. Les *Derris* sont recensés parmi les plantes insecticides [20] et la plupart des espèces contiennent un certain nombre de principes actifs dont le principal est la roténone. Dans une espèce récemment étudiée, *D. rariflora* (Mart.) Macbr., l'absence de ce produit a été démontrée par TLC [21]. De plus, Ginsburg [22] a reconnu des propriétés insecticides à des poudres de *Derris* réputées complètement épuisées en roténone.

Les feuilles fraîches de *D. elliptica* contiennent le nouvel imino-alcool à la concentration de 0,1%. Il est aussi présent dans les racines. Des espèces de genres voisins, *Tephrosia*, *Milletia*, *Lonchocarpus* et *Pachyrrhizus* ont été

étudiées quant à leur teneur en ce dérivé de la pyrrolidine mais sans succès. Rien n'est connu au sujet de la toxicité ou des effets antimétabolites de cette substance. Les propriétés pharmacologiques de molécules possédant un cycle pyrrolidine ont cependant été étudiées et certaines possèdent des propriétés adrénolytiques, antiadrénergiques [23] et vasodilatatrices [24]. Lors de la synthèse de la perosamine [25] qui est la partie carbohydrate de l'antibiotique perimycine, un composé très voisin a été mis en évidence. Il s'agit de la 2(S)- α (R)-hydroxyéthyl-3(S), 4(R)dihydroxypyrrolidine. Un monosaccharide à cycle azoté qui est un isomère du produit de *Derris* a été synthétisé par Paulsen [26]. Il s'agit de la 2-(dihydroxy-1,2-éthyl)-3,4-dihydroxypyrrolidine. La biosynthèse de tels composés n'est pas connue; il serait possible que l'imino-polyol provienne du fructose via un azidosucre. Signalons que dans des extraits aqueux de *D. elliptica*, on a pu mettre en évidence des quantités non négligeables de glucose et surtout de fructose [27].

Nous avons aussi tenté de déceler la présence de l' α iminoacide correspondant à l'imino-alcool par 2D-PC. Aucun spot spécial n'a pu être observé.

PARTIE EXPERIMENTALE

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

Méthodes d'analyses. Les techniques d'analyse chromatographique sont détaillées dans de précédentes publications [1-3].

Isolément de l'imino-alcool. 2,7 kg de feuilles fraîches de *D. elliptica* ont été extraites par $\text{EtOH}-\text{H}_2\text{O}$ (7:2). Après évaporation à faible volume, la chlorophylle a été extraite par CHCl_3 et l'extract aq a été purifié sur une colonne de Lewatit S 1080, forme pyridine, 100-200 mesh, 4×60 cm. Après l'élué par la pyridine 1 N, la substance basique a été éluée par NH_4OH 2N. Elle a été recristallisée dans EtOH absolu- $\text{HOAc}-\text{EtOAc}$ (3,041 g) C,44,11; H,8,18; N,8,54 calculé pour $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{O}_4\text{N}$: C,44,16; H,8,03; N,8,58%. IR(KBr) $\delta_{\text{max}}^{\text{cm}^{-1}}$: 3380(s); 3300(s); 3260(vs); 2915(m); 2908(m); 2740(m); 1465(m); 1440(m); 1400(s); 1250(m); 1150(vs); 1060(vs); 1020(m); 818(s). Le spectre de ^1H RMN, dans le DMSO a été pris sur un Varian HA 100. δ (TMS interne) en ppm: 4,75(OH); 9(NH_2^+); 3,2-3,8(8 H). Le spectre ^{13}C RMN a été enregistré dans D_2O sur un Bruker 22,63 MHz avec l'acétone comme étalon interne. δ (TMS) = δ (acétone) + 30,4 ppm: 62,2(CH en α); 61,8(CH_2); 78,2(CH). Le SM a été relevé sur un spectromètre A.E.I. MS 902 S par introduction directe en travaillant à 70 eV. Les mesures précises de masse ont été faites avec un pouvoir de résolution de 20000.

Remerciements.—Nous tenons à remercier Monsieur le Professeur M. Anteunis (Université de Gand) pour l'obtention du spectre de RMN à 300 MHz et pour le calcul des paramètres par ordinateur. Nos remerciements vont aussi au Professeur J. Dubuisson (Gembloux) qui nous a fourni les plants de *Derris*.

REFERENCES

1. Dardenne, G., Marlier, M. et Casimir, J. (1972) *Phytochemistry* **11**, 2567.
2. Dardenne, G., Thonart, Ph., Otoul E. et Maréchal, R. (1973) *Phytochemistry* **12**, 1983.
3. Otoul, E., Maréchal, R., Dardenne, G. et Desmedt, F. (1975) *Phytochemistry* **14**, 173.
4. Fowden, L., *Progress in Phytochemistry* (1970) Edited by L. Reinhold and Liwschitzky, Vol. 2, p. 203, Wiley, New York.
5. Sung, M. L. and Fowden, L. (1968) *Phytochemistry* **7**, 2061.
6. Hulme, A. C. (1954) *Nature* **174**, 1055.
7. Gray, D. O. (1972) *Phytochemistry* **11**, 751.
8. Kustensens, I., Larsen, P. O. et Sørensen, H. (1974) *Phytochemistry* **13**, 2803.
9. Fowden, L., Smith, A., Millington, D. S. and Sheppard, R. C. (1969) *Phytochemistry* **8**, 437.
10. Hatanaka, S. I. (1969) *Phytochemistry* **8**, 1305.
11. Marlier, M., Dardenne, G. et Casimir, J. (1972) *Phytochemistry* **11**, 2597.
12. Evrard, G., Durant, F. et Marlier, M. (1972) *Cristal. Struct. Comm.* **1**, 215.
13. Marlier, M., Dardenne, G. et Casimir, J. (1975) *Phytochemistry* sous presse.
14. Feigl, F. (1954) *Spots Tests* vol. II p. 198 Elsevier, New York.
15. Feigl, F. (1960) *Spots Tests in Organic Analysis* p. 127 6th Ed. Elsevier, Amsterdam.
16. Duffield, A. M., Budzikiewicz, H., Williams, D. H. and Djerassi, C. (1965) *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 810.
17. Porter, Q. N. and Baldas, J. (1971) *Mass Spectrometry of Heterocyclic Compounds*, p. 306, General heterocyclic chemistry series, Wiley, New York.
18. Eliel E. (1962) *Stereochemistry of Carbon Compounds: Series in Advanced Chemistry* Chapt. 9 McGraw-Hill, New York.
19. Kilpatrick, E. (1947) *J. Am. Chem. Soc.* **69**, 2483.
20. Castagne, E. (1938) *Contribution à l'Étude des Légumineuses Insecticides du Congo Belge*, Ed. G. Van Campenhout, Bruxelles.
21. Silho, R. B., Gotlieb, O. R. et Mourao, A. P. (1975) *Phytochemistry* **14**, 261.
22. Gingsburg, E. (1934) *J. Econ. Entomol.* **27**, 2, 393.
23. Gignarella, G., Nathansohn, G. G., Bianchi, G. et Testa, E. (1962) *Gazz. Chem. Ital.* **93**, 3.
24. Lepetit, S. (1963) *Brit.* **935**, 429 de C.A. 60, 1707.
25. Stevens, G. L., Glinski, R. P., Taylor, K. G., Blumbergs, P. and Gupta S. K. (1970) *J. Am. Chem. Soc.* **92**, 10, 3160.
26. Paulsen H., Propp, K. and Heyns, K. (1969) *Tetrahedron Letters* **9**, 683.
27. Goodhue, L. D. and Haller, H. L. (1939) *J. Econ. Entomol.* **32**, 6, 877.