

NOUVELLE METHODE DE SYNTHÈSE DES PRINCIPAUX METABOLITES DES CATECHOLAMINES MARQUES AU CARBONE 14.

Louis PICHAT, Jean TOSTAIN

Service des Molécules Marquées, C.E.N.-SACLAY, B.P. n° 2
91 190 GIF-SUR-YVETTE (France)

Received October 26, 1977

ABSTRACT

Methylsulfinylcarbanion used in large excess reacts with methyl (carboxyl ^{14}C) vanillate **2 a**, methyl (carboxyl ^{14}C) isovanillate **2 b** and methyl 3,4 dibenzoyloxy (carboxyl ^{14}C) benzoate **2 d** to give 90 % yields of β -ketosulfoxides **3 a**, **3 b**, **3 d**. Submitted to the acid catalyzed Pummerer rearrangement these β -ketosulfoxides lead to the formation of methyl hemimercaptals of phenylglyoxals **4 a**, **4 b**, **4 d** in good yields. These β -keto- α -hydroxy sulfides react with sodium hydroxide to give respectively : 2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-hydroxy (2- ^{14}C) acetic acid **5 a** (V.M.A.) ; 2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-2-hydroxy (2- ^{14}C) acetic acid **5 b** (iso V.M.A.) in overall yields of 55 % based on vanillic and isovanillic acids ; and 2-(3,4 dibenzoyloxyphenyl)-2 hydroxy (2- ^{14}C) acetic acid **5 d**, hydrogenolysis of which gave 2-(3,4 dihydroxyphenyl)-2-hydroxy (2- ^{14}C) acetic acid (D.H.M.A.) in 61 % overall yield from 3,4 dihydroxy benzoic acid. The β -keto- α -hydroxy sulfides **4 a**, **4 b**, **4 d** reduced with sodium borohydride give respectively 2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl) (2- ^{14}C) ethyleneglycol (H.M.P.G.) **6 a** ; 2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl) (2- ^{14}C) ethyleneglycol **6 b** (iso H.M.P.G.) in overall yields of 64 % and 60 % based on vanillic and isovanillic acids ; and glycol **6 d** the hydrogenolysis of which gave 2-(3,4-dihydroxyphenyl) (2- ^{14}C) ethyleneglycol **6 c** (D.H.P.G.) in yield of 64 % based on 3,4 dihydroxybenzoic acid.

Les principaux catabolites (1) de l'adrénaline et de la noradrénaline sont : l'acide hydroxy-4 méthoxy-3 mandélique (VMA), l'acide dihydroxy-3,4 mandélique (DHMA) et les alcools correspondants : l'hydroxy-4 méthoxy-3 phényl-éthylèneglycol (HMPG) et le dihydroxy-3,4 phényléthylène glycol (DHPG). Récemment, a été découvert dans l'urine humaine (2) de sujets pathologiques l'acide hydroxy-3 méthoxy-4 mandélique (iso-VMA). L'existence dans le même milieu, de l'alcool correspondant : l'hydroxy-3 méthoxy-4 phényléthylèneglycol (iso-HMPG) a été suspectée (2). Néanmoins, à notre connaissance, ce produit non marqué n'a pas encore été décrit.

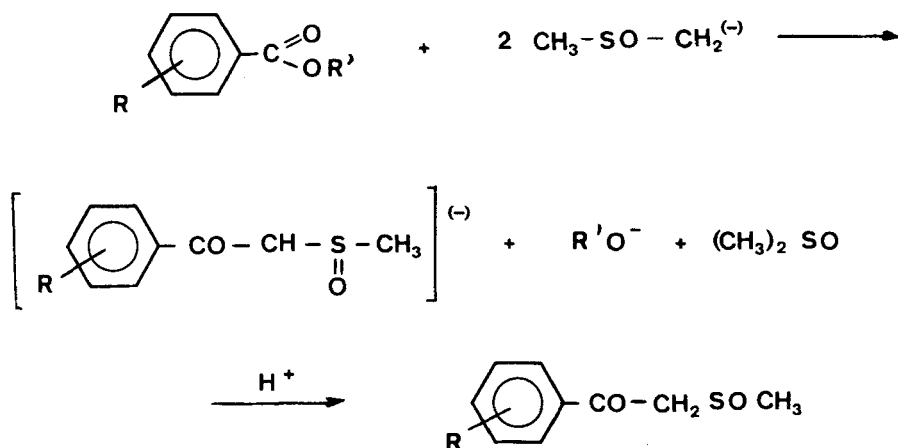
Nous avons mis au point la synthèse des composés ci-dessus marqués au carbone 14 sur la position benzylique de la chaîne latérale, et les avons mis à la disposition de nombreux biologistes et biochimistes pour l'exploration du métabolisme des catécholamines.

Le VMA et le DHMA non radioactifs ont été synthétisés par SHAW, Mc MILLAN et ARMSTRONG (3) et par RECONDO et RINDERKNECHT (4) par l'intermé-

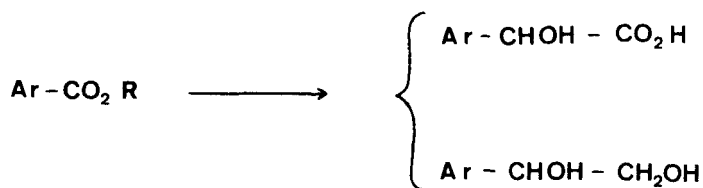
diaire des cyanhydrines dérivées respectivement des hydroxy-4 méthoxy-3 benzaldéhyde et dihydroxy-3,4 benzaldéhyde. La cyanhydrine de l'hydroxy-3 méthoxy-4 benzaldéhyde a permis à LA MANNA et GHISLANDI (5) l'accès à l'iso-VMA. Le HMPG et le DHPG ont été synthétisés par BENIGNI et VERBISCAR (6) par l'intermédiaire des mandélonitriles obtenus par action d'un grand excès d'acide cyanhydrique sur respectivement le benzyloxy-4 méthoxy-3 benzaldéhyde et le dibenzyloxy-3,4 benzaldéhyde. Quand le présent travail a été commencé, la littérature ne rapportait aucune synthèse des catabolites ci-dessus marqués au carbone 14. Dans l'intervalle, LIEBMAN, MALAREK, DORSKY et KAEGI (19) sont parvenus à adapter le travail de BENIGNI et VERBISCAR (6) à la préparation de HMPG et de DHMA marqués au ^{14}C sur la position benzylique, en dépit de l'instabilité des cyanhydrines intermédiaires.

Cette instabilité des mandélonitriles, les mauvais rendements rapportés et les difficultés éventuelles d'accès aux aldéhydes benzoïques substitués marqués nous ont incités à utiliser une approche différente, basée sur l'utilisation de β -cétosulfoxydes (3 a, b, d).

Deux équivalents du carbanion méthylsulfinyle, obtenu par action de l'hydruure de sodium sur le diméthylsulfoxyde (D.M.S.O.) selon COREY et CHAYKOVSKY (9), réagissent avec les esters d'acide arylcarboxyliques, pour conduire, après hydrolyse, aux β -cétosulfoxydes selon l'équation :

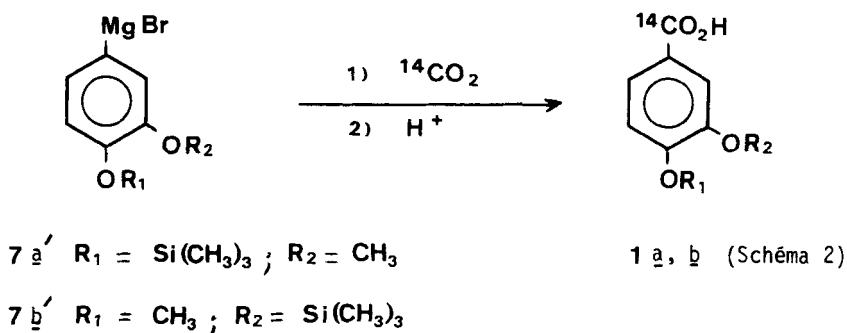


Cette réaction découverte par RUSSELL et ses collaborateurs (10) avec des esters aromatiques a été généralisée par COREY et CHAYKOVSKY (11). RUSSELL et MIKOL (7) ont montré que ces β -cétosulfoxydes sont d'intéressants intermédiaires de synthèses pour l'allongement de chaîne d'un ester carboxylique avec simultanément l'introduction de groupes fonctionnels. Entre autres transformations, le travail de RUSSELL et MIKOL (7) permet de réaliser les homologations suivantes :



Nous avons appliqué ces homologations aux esters arylcarboxyliques ^{14}C 2 a, b, d (schéma 2). Les acides vanillique (carboxyle ^{14}C) : 1 a et isovanillique (carboxyle ^{14}C) : 1 b ont été obtenus par carbonatation (schéma 1) des organomagnésiens 7 a et 7 b - qui sont nouveaux - dérivés des éthers phénoliques triméthylsilylés correspondants avec des rendements de 75 - 80 % basés sur $^{14}\text{CO}_2$.

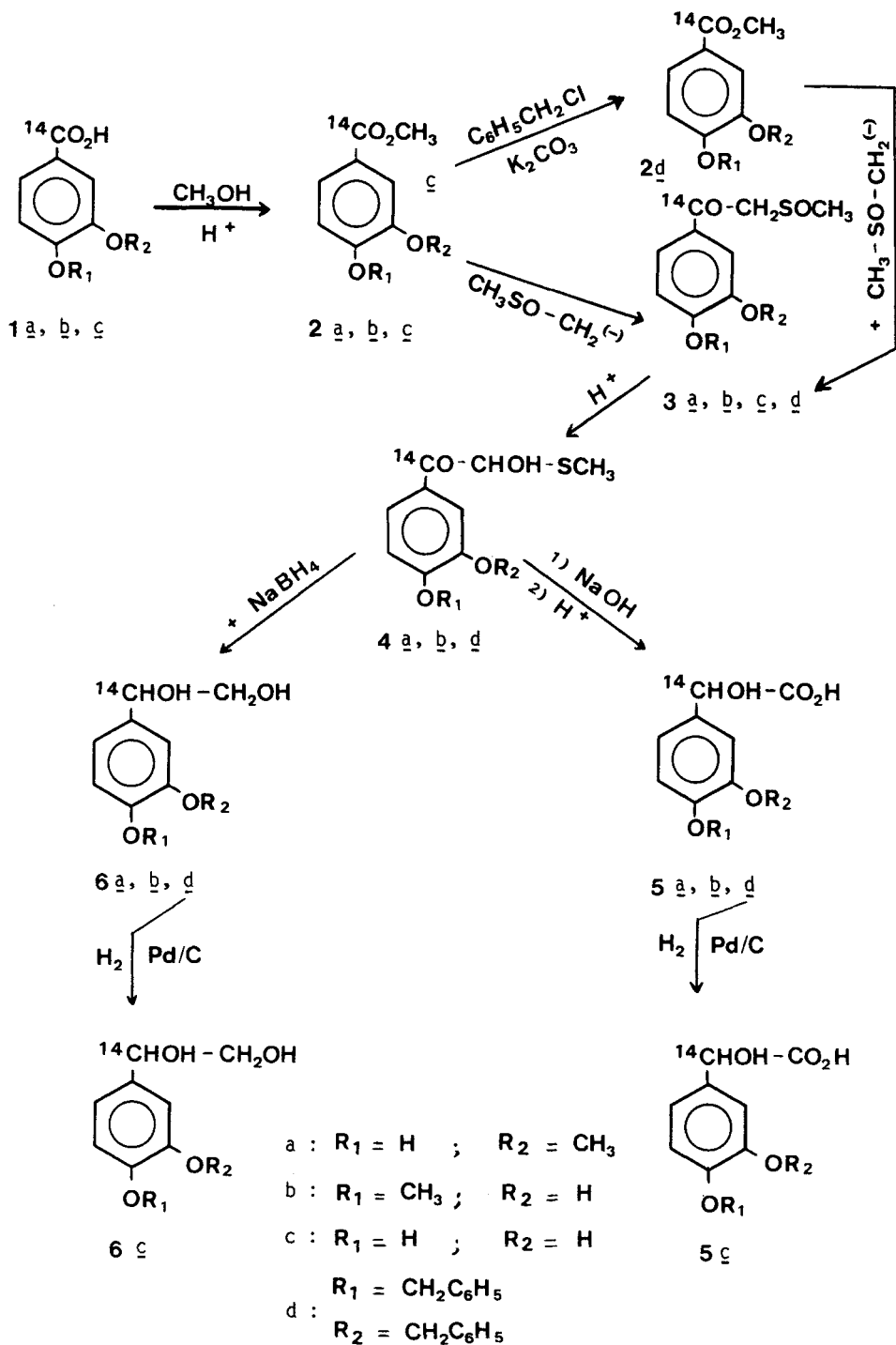
SCHEMA 1



Quant à l'acide 1 c, il a été obtenu par déméthylation bromhydrique de l'acide vératrique obtenu par carbonatation du magnésien dérivé du bromovératrol (20).

Les exemples de β -cétosulfoxydes présentés par RUSSELL et collaborateurs (10) ne comportent qu'un seul ester arylcarboxylique porteur d'une fonction phénol : l'orthosalicylate de méthyle. Dans ce cas, le rendement en β -cétosulfoxyde n'était que de 18 %. L'anion méthylsulfinyle étant une base forte, il nous a paru nécessaire d'employer un fort excès de carbanion (9 mMoles) afin de neutraliser les hydrogènes phénoliques acides des esters 2 a, b (1 mMole). L'évolution de la réaction suivie en CCM sur plaque de silicagel montre que, dans ces conditions, le rendement en β -cétosulfoxydes est quantitatif. Les β -cétosulfoxydes 3 a et 3 b ont été isolés dans des essais inactifs avec des rendements de 70 à 80 % après cristallisation. Dans la synthèse active

SCHEMA 2



3 a et 3 b ne sont pas isolés à l'état pur, les rendements sont alors de 90 %. Avec 2 c, le β -céto-sulfoxyde 3 c se forme bien mais les deux groupes phénoliques le rendent très soluble dans l'eau. Il ne peut être extrait du milieu réactionnel.

Par contre, après protection des OH phénoliques par benzylation, 3 d, très soluble dans le chloroforme a été isolé avec un rendement de 90 %. Dans les essais inactifs, la structure des composés obtenus a été confirmée par IR, RMN et analyse élémentaire.

Les β -céto-sulfoxydes 3 a, b, d ont été transformés en milieu acide fort, par réarrangement de PUMMERER (18) en β -céto- α -hydroxysulfures (hémimercaptals de glyoxales) selon la technique de RUSSELL et MIKOL (7). Dans les essais inactifs, seul le produit 4 b a été obtenu à l'état cristallisé et pur. Les structures de 4 a, 4 b et 4 d ont été confirmées par RMN. Traité de la même manière 3 c qui possède deux groupes phénoliques libres n'a pas donné le produit attendu 4 c. Au cours de la synthèse radioactive ces intermédiaires ont été utilisés sans purification, pour préparer les acides mandéliques 5 a, b, d et les glycols 6 a, b, d.

Les β -céto- α -hydroxysulfures 4 a, b, d traités par la soude éthanolique, à la température ambiante selon (7) ont conduit respectivement au VMA : 5 a, l'iso-VMA : 5 b et à l'acide dibenzyloxy-3,4 mandélique : 5 d. L'hydrogénéolyse de ce dernier (Pd /C-éthanol) a fourni le DHMA : 5 c. Les rendements globaux en acides 5 a, 5 b, 5 c (pureté radiochimique : 97-98 %) par rapport aux acides 1 a, 1 b, 1 c ont été respectivement de 55 - 54 - 61 %.

Les β -céto- α -hydroxysulfures 4 a, b, d réduits par le borohydrure de sodium dans l'éthanol selon (7) ont conduit à l'HMPG : 6 a, l'iso-HMPG : 6 b et au (dibenzyloxy-3,4 phényl)-2 éthylèneglycol : 6 d. Ce dernier hydrogénéolysé a fourni de DHPG 6 c. Les rendements globaux en glycols 6 a, 6 b, 6 c (pureté radiochimique ≥ 99 %) par rapport aux acides 1 a, 1 b, 1 c ont été respectivement de 64-60-64 %.

En conclusion, les β -céto-sulfoxydes sont des intermédiaires bien appropriés à la synthèse de catabolites des bioamines marqués au ^{14}C , par une voie plus courte et avec de meilleurs rendements que les méthodes déjà décrites dans la littérature.

P A R T I E E X P E R I M E N T A L E

Les spectres de RMN ont été enregistrés sur appareil JEOL C 60 HL à 60 MHz. Les spectres UV ont été enregistrés sur spectrophotomètre Beckman DK 2 A et les spectres IR sur Perkin Elmer 221. Les spectres de masse ont été

TABLEAU A

CCM et Chromatographie sur papier des composés préparés
Composés - Rf X 100

SOLVANTS	1 a	1 b	1 c	2 a	2 b	2 c	2 d	3 a	3 b	3 d	4 a	4 b	4 d	5 a	5 b	5 c	5 d	6 a	6 b	6 c	6 d
I	66 S	59 S	38 S	80 S	75 S	53 S	91 S	21 S	16 S	36 S	69 S	64 S					56 S				44 S
II								63 S	63 S		80 S	80 S		68 SP	68 SP	53 P		51 S		52 P	
III								19 S	17 S	29 S	87 S	84 S	92 S					70 P	51 S		69 S
IV														35 P	35 P				70 P		
V																43 P*				69 P*	
VI														29 P	29 P	21 P				65 P	
VII																		78 P	78 P		
VIII	32 P	40 P																			

S = CCM sur feuille Silicagel Schleicher-Schüll
P = Chromatographie descendante sur papier Whatman n° 1 - Révélation UV
P* = Chromatographie ascendante sur papier Whatman n° 1 - Révélation UV ou FeCl₃
I : benzène : 90, dioxanne : 25, acide acétique : 4
II : n-butanol : 40, acide acétique : 10, eau : 10 (12)
III : acétate d'éthyle : 95, éthanol : 5 (6)
IV : isopropanol : 80, ammoniac : 5, eau : 15
V : méthanol : 40, n-butanol : 20, benzène : 20, eau : 20
VI : n-butanol : 40, éthanol : 20, eau : 20 (12)
VII : n-propanol : 70, eau : 30 (6)
VIII : propanol : 70, ammoniac : 30

enregistrés sur appareil Varian CH 7 par introduction directe de l'échantillon dans la source. Les analyses élémentaires et les spectres IR et RMN ont été réalisés avec les produits non marqués. Les points de fusion ont été pris au microscope à platine chauffante Reichert.

Acides benzoïques (carboxyle ^{14}C) 1 a, b, c :

- Bromo-1 méthoxy-3 triméthylsilyloxy-4 benzène

On silyle la fonction phénolique libre par un procédé s'inspirant de celui décrit dans (24). A 48,7 g de bromo-1 méthoxy-3 hydroxy-4 benzène (240 mMoies) (bromo-4 guaïacol) (21) en solution dans 21,3 g de pyridine anhydre (270 mMoies) et 50 ml de benzène anhydre, on ajoute à 0° C et sous atmosphère d'azote sec 28,2 g de triméthylchlorosilane (260 mMoies) en solution dans 45 ml de benzène anhydre. Les réactifs sont agités 2 heures à température ambiante. Le produit obtenu est analysé en CPV sur "Silicone OV₁" à 160° C. Le rendement de la silylation est quantitatif. On filtre en boîte à gants, le précipité de chlorure de pyridinium est lavé deux fois avec 20 ml de benzène anhydre. La solution benzénique est évaporée sous vide. Le dérivé silylé est distillé sous vide. On obtient 60 g soit un rendement de 90 %. Liquide incolore $E_{b,7} = 111^\circ \text{C}$ $n_D^{22} = 1,5202$

RMN : (sans solvant), avec TMS comme référence interne δ ppm
 $\delta = 0,17$ 9H (OSi(CH₃)₃), $\delta = 3,57$ 3H (OCH₃) $\delta = 6,56$ 1H $\delta = 6,80$ 2H

- Bromo-1 méthoxy-4 triméthylsilyloxy-3 benzène

En opérant comme ci-dessus, 48,7 g de bromo-1 hydroxy-3 méthoxy-4 benzène (bromo-5 guaïacol) (22) conduisent à 58 g de dérivé silylé soit un rendement de 88 % $E_{b,5} = 111^\circ \text{C}$ $n_D^{22} = 1,5188$

RMN : (sans solvant) δ ppm
 $\delta = 0,16$ 9H (OSi(CH₃)₃), $\delta = 3,54$ 3H (OCH₃), $\delta = 6,45$ 1H, $\delta = 6,81$ 2H

- Bromure de méthoxy-3 triméthylsiloxy-4 phénylmagnésium

On prépare une solution de 27 g de bromo-1 méthoxy-3 triméthylsilyloxy-4 benzène (100 mMoies) et 2,3 g de dibromo-1,2 éthane (12 mMoies) dans 200 ml de THF anhydre. Sous atmosphère d'azote sec, on ajoute 10 ml de cette solution à 2,88 g de magnésium (120 mMoies) et on chauffe à 75° C (bain d'huile). Les réactifs sont agités, quand la réaction est amorcée, la solution restante est ajoutée goutte à goutte (1 h.) et la température de 75° C est maintenue pendant la durée d'addition du bromure et 2 heures après l'addition. La solution obtenue est 0,15 M (dosage de l'iode).

- Bromure de méthoxy-4 triméthylsilyloxy-3 phénylmagnésium

On opère comme ci-dessus et obtient une solution 0,11 M (dosage à l'iode).

- Acide hydroxy-4 méthoxy-3 benzoïque (carboxyle ^{14}C) 1 a

Le $^{14}\text{CO}_2$ obtenu par réaction de H_2SO_4 concentré avec $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$ (200 mCi = 3,6 mMoles) sur rampe à vide est condensé à -20°C pendant 45 mn. sur 175 ml de magnésien (26 mMoles). La solution est hydrolysée par H_2SO_4 6N à -20°C . Le THF est évaporé sous vide, l'acide 1 a est extrait à l'éther en continu dans un extracteur liquide liquide. A la solution étherée on ajoute 50 ml d'une solution de NaHCO_3 à 5 %, après 3 h. d'agitation, une extraction à l'éther en continu pendant 15 h. permet d'éliminer de nombreuses impuretés inactives.

La solution est acidifiée par H_2SO_4 6N et l'acide 1 a est extrait à l'éther pendant 6 h. - Activité totale : 150 mCi - Rendement : 75 %.

Le produit obtenu très coloré est purifié sur une colonne de gel "Séphadex G 10" - éluant : acétone : 70, eau : 30. La pureté radiochimique est contrôlée par radiochromatographie sur couche mince (tableau A, solvant I) et sur papier (tableau A, solvant VIII). Le produit inactif obtenu par la même méthode présente un spectre IR et un point de fusion identiques au produit commercial.

- Acide hydroxy-3 méthoxy-4 benzoïque (carboxyle ^{14}C) 1 b

La préparation, les purifications et les contrôles sont identiques à ceux décrits pour 1 a. Activité obtenue : 160 mCi - Rendement : 80 %.

Le produit inactif préparé par ce procédé a un spectre IR et un point de fusion identiques à ceux de l'acide hydroxy-3 méthoxy-4 benzoïque obtenu par oxydation de l'hydroxy-3 méthoxy-4 benzaldéhyde selon PEARL (23).

- Acide dihydroxy-3,4 benzoïque (carboxyle ^{14}C) 1 c

70 mCi = 1,55 mMoles d'acide diméthoxy-3,4 benzoïque (carboxyle ^{14}C), 10 ml d'acide acétique et 10 ml d'acide bromhydrique 48 % sont chauffés pendant 6 h sous azote au bain d'huile à 125°C . L'évolution de la réaction est suivie par CCM (tableau A - solvant I) avec des échantillons témoins.

La solution est évaporée à sec et le produit est laissé 3 h. au dessiccateur en présence de P_2O_5 et KOH.

Benzoates de méthyle ($^{14}\text{COOCH}_3$) 2 a, b, c :

Le procédé est identique pour les trois esters. A 1 mMole d'acide 1 sont ajoutés 6 ml de méthanol anhydre, séché sur tamis moléculaire 3 A, et

HCl gazeux sec (H_2SO_4 concentré sur 100 mg d' NH_4Cl). On chauffe 5 h. à reflux sous atmosphère d'azote sec. L'évolution de la réaction est suivie par CCM (tableau A, solvant I) en présence des substances témoins (acides et esters). Le rendement en ester est déterminé par l'intégration du radiochromatogramme. La solution est évaporée à sec, le résidu repris par 5 ml de CH_3OH anhydre. Une nouvelle évaporation permet d'éliminer les dernières traces d'HCl.

- Hydroxy-4 méthoxy-3 benzoate de méthyle ($^{14}\text{COOCH}_3$) 2 a (17)

Préparé à partir de 50 mCi = 1 mMole de 1 a - Rdt. = 98 %.

S.M. : M^+ = 182 m/e = 151 (M-31 (OCH_3)) (pic de base), 123 (M-59 (COOCH_3))

- Hydroxy-3 méthoxy-4 benzoate de méthyle ($^{14}\text{COOCH}_3$) 2 b

Préparé à partir de 50 mCi : 1 mMole de 1 b - Rdt. = 98 %

S.M. : M^+ = 182 m/e = 167 152 151 (M-31 (OCH_3)) (pic de base), 123 (M-59 (COOCH_3))

- Dihydroxy-3,4 benzoate de méthyle ($^{14}\text{COOCH}_3$) 2 c

Préparé à partir de 70 mCi : 1,5 mMole de 1 c - Rdt. = 98 %

S.M. : M^+ = 168 m/e = 137 (M-31 (OCH_3)) (pic de base), 109 (M-59 (COOCH_3))

- Dibenzyloxy-3,4 benzoate de méthyle ($^{14}\text{COOCH}_3$) 2 d

A l'ester 2 c (70 mCi = 1,5 mMole), on ajoute 455 mg de carbonate de potassium anhydre (3,3 mMoles), 443 mg de chlorure de benzyle (3,5 mMoles) et 8 ml de DMF anhydre (8). Le mélange est chauffé à 100-110° C et agité pendant 3 h. Le solvant I permet de contrôler par CCM l'évolution de la réaction. La solution est évaporée à 1 ou 2 ml et le produit est extrait à l'éther et lavé à l'eau. Nous obtenons environ 69 mCi d'ester 2 d de pureté satisfaisante. Le produit est évaporé à sec et laissé 15 h. au dessiccateur en présence de P_2O_5 et KOH.

Analyse $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_4$	Calc. %	C	75,84	H	5,79
	Tr.		75,50		5,69

P.F. = 58-60° C (éthanol)

S.M. : M^+ = 348 m/e = 257 (M-91 (CH_2O)), 181, 92, 91 (pic de base), 65.

Carbanion méthylsulfinyle (9) :

Les opérations suivantes sont faites en boîte à gants sous atmosphère d'azote sec. Dans un ballon à deux cols surmonté d'une garde à CaCl_2 , on verse 50 ml de DMSO (distillé sur hydrure de calcium et conservé sur tamis moléculaire 4 A. On ajoute 3,6 g d'hydrure de sodium à 50 % en suspension dans l'huile (75 mMoles). Le mélange est chauffé au bain d'huile à 75° C et agité magnétiquement pendant 1 h., jusqu'à ce qu'il n'y ait plus

de dégagement d'hydrogène. La solution obtenue est environ 1,5 M.

β -Cétosulfoxydes (^{14}CO) 3 a, 3 b (10) :

Le procédé est identique pour les deux β -cétosulfoxydes. Dans un ballon tricol de 50 ml, surmonté d'une garde à CaCl_2 et muni d'une ampoule à égalisation de pression, on verse 6 ml de la solution précédente et 6 ml de THF anhydre, le mélange est refroidi à 0°C et agité magnétiquement sous atmosphère d'azote sec. L'ester (1 mMole) en solution dans 4 ml de THF est ajouté goutte à goutte au mélange précédent. L'ampoule est rincée par 2 ml de THF. On continue l'agitation pendant 1 h. à température ambiante. Le mélange réactionnel est versé dans 30 ml d'eau à 0°C . La solution est ajustée à $\text{pH} = 2,5$ par HCl N . Le β -cétosulfoxyde formé est extrait par 400 ml de CHCl_3 et lavé avec 10 ml d'eau seulement.

Dans tous les cas, nous obtenons un produit de très bonne pureté, contrôlée par radiochromatographie sur plaque de silicagel dans les solvants I, II, III (tableau A).

Le rendement du β -cétosulfoxyde est déterminé par mesure de l'intégration des radiochromatogrammes et de l'activité récupérée.

β -Cétosulfoxyde (^{14}CO) 3 d :

A 5 ml de solution de carbanion, 1,5 M et 5 ml de THF anhydre, on ajoute l'ester 2 d (69 mCi = 1,5 mMoles) dans 4 ml de THF. Le β -cétosulfoxyde formé est extrait au chloroforme et lavé à l'eau, sa grande solubilité dans la phase organique permet d'utiliser peu de chloroforme pour l'extraction et de laver à l'eau normalement, le contrôle de la pureté est effectué comme pour 3 a et 3 b.

ω -(Méthylsulfinyl)-hydroxy-4 méthoxy-3 acétophénone (^{14}CO) : 3 a

Préparé à partir de 2 a (50 mCi = 1 mMole)

Activité trouvée : 48,2 mCi Rdt. = 90 %

I.R. : $\nu_{\text{C=O}}$ à 1665 cm^{-1} , $\nu_{\text{S=O}}$ à 1020 cm^{-1} P.F. = $151-152^\circ \text{C}$

(CHCl_3 , éther de pétrole)

Analyse $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_4\text{S}$:	calc. % :	C 52,62	H 5,30	S 14,05
	Tr.	52,94	5,53	13,34

RMN : voir tableau B.

ω -(Méthylsulfinyl)-hydroxy-3 méthoxy-4 acétophénone (^{14}CO) : 3 b

Préparé à partir de 2 b (50 mCi = 1 mMole)

Activité trouvée : 45,4 mCi Rdt. = 89 %

I.R. : $\nu_{C=O}$ à 1660 cm^{-1} , $\nu_{S=O}$ à 1010 cm^{-1}

P.F. = $158 - 161^\circ\text{ C}$ (CHCl_3 , éther de pétrole)

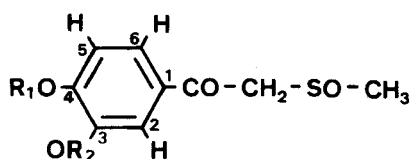
Analyse $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_4\text{S}$: calc. % : C 52,62 H 5,30 S 14,05

Tr. : 52,72 5,38 13,46

RMN : voir tableau .

TABLEAU B

RMN des β -cétosulfoxydes **3a**, **3b** et **3d**



PRODUITS	$\delta\text{ CH}_3$	$\delta\text{ CH}_2$	$\delta\text{ H-5}$	$\delta\text{ H-2,H-6}$	$\delta\text{ R}_1$	$\delta\text{ R}_2$
* 3a	2,71 (s)	4,14 (d) 4,44 (d) J = 14,3	6,92 (d)	7,55 (m)	6,45 (s large)	3,92 (s)
* 3b	2,70 (s)	4,10 (d) 4,44 (d) J = 14,3	6,86 (d)	7,52 (m)	3,95 (s)	5,82 (s)
** 3d	2,68 (s)	4,10 (d) 4,40 (d) J = 14,2	6,92 (d)	$\delta\text{ H-2,H-6 } \emptyset$	$\delta\text{ OCH}_2$ $\text{R}_1\text{ ou R}_2$	$\delta\text{ OCH}_2$ $\text{R}_1\text{ ou R}_2$
				7,45 (m)	5,17 (s)	5,20 (s)

δ exprimé en ppm , J en Hz , solvant CDCl_3 , étalon interne TMS

* T = 65° C , ** T = 25° C

s = singulet , d = doublet , m = multiplet , $\emptyset = \text{C}_6\text{H}_5$

ω -(Méthylsulfinyl)-dibenzoyloxy-3,4 acétophénone (^{14}C) : 3 d

Préparé à partir de 2 d (69 mCi \approx 1,5 mMole), activité trouvée = 68,6 mCi - Rdt. = 93 %.

I.R. $\nu_{\text{C=O}}$ à 1665 cm^{-1} $\nu_{\text{S=O}}$ à 1015 cm^{-1} - P.F. = $122-124^\circ\text{C}$ (CHCl_3 , éther)

Analyse $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{O}_4\text{S}$: calc. % : C 70,03 H 5,62 S 8,13
Tr. : 70,18 5,55 7,64

RMN : voir tableau B

 β -Céto α -hydroxysulfures : 4 a, 4 b, 4 d- Méthyl hemimercaptal de l'hydroxy-4 méthoxy-3 phénylglyoxal : 4 a

Au β -céto sulfoxyde 3 a (48,2 mCi) en solution dans 2 ml de DMSO et 10 ml H_2O , on ajoute 2 ml de HCl concentré. On laisse les réactifs pendant 25 h. à température ambiante. L'évolution de la réaction est suivie en CCM (solvants I, II, III - tableau A). Le β -céto α -hydroxysulfure 4 a est extrait au chloroforme et lavé à l'eau jusqu'à pH neutre. On obtient 46 mCi.

RMN : voir tableau C.

- Méthyl hemimercaptal de l'hydroxy-3 méthoxy-4 phénylglyoxal : 4 b

On opère comme pour 4 a. 45,4 mCi de 3 b conduisent à 39 mCi de 4 b. P.F. = $117-120^\circ\text{C}$ (CHCl_3 - éther de pétrole)

RMN : voir tableau C.

- Méthyl hemimercaptal de dibenzoyloxy-3,4 phénylglyoxal : 4 d

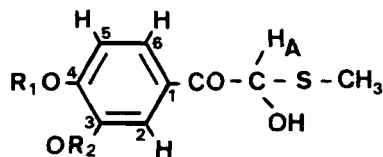
Au β -céto sulfoxyde 3 d (68,6 mCi \approx 1,5 mMole) en solution dans 3,5 ml de DMSO, on ajoute 1,1 ml de HCl concentré. Les réactifs sont laissés 3 h. à température ambiante. L'évolution de la réaction est suivie en CCM (solvant III - tableau A). Le β -céto α -hydroxysulfure 4 d est extrait au chloroforme et lavé à l'eau jusqu'à pH neutre. On obtient 68 mCi.

RMN : voir tableau C.

Acide DL-(hydroxy-4 méthoxy-3 phényl)-2 hydroxy-2 acétique ^{14}C -2 : 5 a (VMA)

Au β -céto α -hydroxysulfure 4 a (23 mCi = 0,46 mMole) on ajoute à 0°C et sous atmosphère d'azote 3 ml d'éthanol et 2 ml de NaOH 10 N. Les réactifs sont agités pendant 30 h. à température ambiante. Le pH de la solution est ensuite ajusté à 1,5 par addition d'HCl 6 N. Plusieurs extractions par le benzène permettent d'éliminer de nombreuses impuretés. L'acide est extrait par l'acétate d'éthyle (13). La phase organique séparée est évaporée à sec sous vide. Le résidu dissous dans 2 ml d'eau est introduit sur une colonne de gel Séphadex G 10" (h. = 90 cm, ϕ = 15 mm). L'acide 5 a est élué par une solution de HCl N/200. L'activité totale mesurée est de 13,8 mCi et l'activité spécifique de 51 mCi/mMole. Le rendement global est de 55 % par rapport à l'acide hydroxy-4

TABLEAU C

RMN des β -cétos α -hydroxy sulfures 4a, 4b et 4d

PRODUITS	SOLVANT	δ CH ₃	δ H _A	δ H _X	δ H-5	δ H-2, H-6	δ R ₁	δ R ₂
4 a	CDCl ₃	2,02 (s)	6,07 (s large)	4,50 (s large)	6,96 (d)	7,66 (m)	6,62 (s)	3,94 (s)
	CDCl ₃ -D ₂ O	2,02 (s)	6,07 (s)	-	6,96 (d)	7,66 (m)	-	3,94 (s)
4 b	CDCl ₃	1,98 (s)	5,99 (d) J=8,2	4,39 (d) J=8,2	6,83 (d)	7,60 (m)	3,95 (s)	5,16 (s)
	CDCl ₃ -D ₂ O	1,98 (s)	5,99 (s)	-	6,83 (d)	7,60 (m)	3,96 (s)	-
4 d						δ H-2, H-6 \emptyset	δ OCH ₂ R ₁ ou R ₂	δ OCH ₂ R ₁ ou R ₂
	CDCl ₃	1,91 (s)	5,91 (d) J=8,2	4,31 (d) J=8,2	6,86 (d)	7,45 (m)	5,12 (s)	5,16 (s)
	CDCl ₃ -D ₂ O	1,91 (s)	5,91 (s)	-	6,86 (d)	7,45 (m)	5,12 (s)	5,16 (s)

 δ exprime en ppm , J en Hz , étalon interne TMS - T = 25° Cs = singulet , d = doublet , m = multiplet , \emptyset = C₆H₅méthoxy-3 benzoïque (carboxyle ¹⁴C).

La pureté radiochimique : > 98 % est contrôlée par radiochromatographie sur papier Whatman n° 1 dans les solvants II, IV, VI où l'on obtient un pic radioactif de même R_f que celui d'un témoin révélé par une solution de chlorure ferrique.

La pureté chimique est déterminée par spectrophotométrie UV dans l'eau : λ max. = 278 nm λ min. = 254 nm.

Le produit inactif obtenu par le même procédé de synthèse présente un spectre IR identique à un échantillon témoin (Aldrich).

P.F. = 131-133° C $\left[\begin{array}{l} \text{Litt. : P.F. = 131-133° C (3) (4)} \\ 133° \text{ C (14) } 134-135° \text{ C (13).} \end{array} \right]$

Acide DL-(hydroxy-3 méthoxy-4 phényl)-2 hydroxy-2 acétique ^{14}C -2 : 5 b (iso-VMA)

Les procédés de préparation et de purification sont identiques à ceux décrits pour l'acide 5 a. 20 mCi de β -céto α -hydroxysulfure 4 b conduisent à 13,9 mCi d'acide 5 b (activité spécifique : 51 mCi/mMole) soit un rendement global de 54 % par rapport à l'acide hydroxy-3 méthoxy-4 benzoïque (carboxyle ^{14}C).

La pureté radiochimique > 97 % est contrôlée de la même façon que pour 5 a.

UV (H_2O) λ max. = 278 nm λ min. = 254 nm.

P.F. = 123-125° C [Litt. : P.F. = 123-124° C (5)], IR νCOOH intense à 1740 cm^{-1} .

Analyse $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_5$: calc. % : C 54,55 H 5,09
Tr. : 54,19 5,30

Acide DL-(dibenzoyloxy-3,4 phényl)-2 hydroxy-2 acétique ^{14}C -2 : 5 d

A 34 mCi \approx 0,73 mMole de 4 d on ajoute 5 ml d'éthanol, 4 ml de NaOH 10 N à 0° C. Après 17 h. d'agitation à température ambiante, la solution est extraite à l'éther. La phase aqueuse est ajustée à pH = 1,5-2 par addition d'HCl 6 N. Le produit 5 d impur est extrait à l'éther et lavé à l'eau.

La solution est évaporée à sec et l'acide 5 d est cristallisé deux fois dans le mélange (acétate d'éthyle : 3 ml, cyclohexane : 3 ml). L'acide cristallisé est filtré, lavé au cyclohexane et dissous dans 20 ml d'éthanol.

L'activité totale obtenue est de 26 mCi, la pureté radiochimique de 5 d contrôlée par radiochromatographie sur couche mince de silicagel est > 93 % - S.M. : M^+ = 364, m/e = 348, 318, 273, 227, 181, 92, 91, 65

après purification sur plaque préparative de silicagel Merck (solvant I) :

analyse $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_5$: calc. % : C 72,51 H 5,53
Tr. : 72,74 5,48

Acide DL-(dihydroxy-3,4 phényl)-2 hydroxy-2 acétique ^{14}C -2 : 5 c (DHMA)

A l'acide 5 d (26 mCi) en solution dans 20 ml d'éthanol R.P., on ajoute 60 mg de palladium sur charbon à 10 %. Après hydrogénation pendant 3 h. à température ambiante et sous pression atmosphérique, la solution est filtrée sur "Millipore" et évaporée à sec. L'acide 5 c est cristallisé deux fois dans le mélange (acétate d'éthyle : 3 ml, cyclohexane : 3 ml). La cristallisation est achevée par addition de 10 ml de cyclohexane. Après filtration, l'acide est

solubilisé dans 20 ml d'éthanol à 95°.

L'activité totale est de 21 mCi (activité spécifique : 47 mCi/mMole) soit un rendement de 61 % par rapport à l'acide dihydroxy-3,4 benzoïque (carboxyle ^{14}C).

La pureté radiochimique > 98 % est contrôlée par radiochromatographie sur papier Whatman n° 1 dans les solvants II, V, VI où l'on obtient un seul pic radioactif de même Rf que celui d'un témoin révélé par une solution de chlorure ferrique.

La pureté chimique est déterminée par spectrophotométrie UV dans l'éthanol à 95° : λ max. = 282 nm ; λ min. = 258 nm.

Le produit "blanc" obtenu par le même procédé de synthèse présente des spectres (UV, IR) identiques à ceux du témoin commercial (Aldrich) :

P.F. = 136-138° C	[Litt. : P.F. = 137° C (3) P.F. = 145-146° C (4)]

Analyse $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_5$: calc. % :	C 52,18	H 4,38
Tr. :	52,40	4,40

(Hydroxy-4 méthoxy-3 phényl)-2 éthylène glycol ^{14}C -2 : 6 a (HMPG)

Le sulfure 4 a (23 mCi = 0,46 mMole) dissous dans 5 ml d'éthanol est ajouté lentement à température ambiante au mélange suivant : 40 mg de NaBH_4 + 0,6 ml H_2O + 0,13 ml NaOH 2 N. Les réactifs sont agités magnétiquement pendant 4 h. Un précipité se forme que l'on élimine. La solution est acidifiée à pH = 3 par HCl N/10 pour détruire le complexe formé et l'excès de borohydrure de sodium, puis ajustée à pH = 8 par addition d'une solution de NaHCO_3 à 5 % (le produit est détruit rapidement au-dessous de pH = 5) (15).

Le mélange est évaporé à 2 ml et introduit sur une colonne de gel de "Séphadex G 10" (h. = 70 cm, \varnothing = 15 mm). L'alcool 6 a est élué par l'eau. Une nouvelle purification est effectuée sur une colonne de gel "Séphadex LH 20" (h. = 88 cm, \varnothing = 15 mm) avec élution par le solvant VII.

L'activité totale mesurée est de 16 mCi (activité spécifique : 50 mCi/mMole) soit un rendement global de 64 % par rapport à l'acide hydroxy-4 méthoxy-3 benzoïque (carboxyle ^{14}C).

La pureté radiochimique > 99 % est contrôlée par radiochromatographie sur papier Whatman n° 1 dans les solvants IV et VII et sur plaque de silicagel dans le solvant III où l'on obtient un seul pic radioactif de même Rf que celui d'un témoin révélé par une solution de chlorure ferrique. La pureté chimique est déterminée par spectrophotométrie UV dans l'éthanol : λ max. = 280 nm ; λ min. = 250 nm.

Une synthèse effectuée "à blanc" dans des conditions identiques a permis d'isoler 6 a sous forme de sel de pipérazine IR identique à un échantillon témoin (Aldrich). P.F. = 117-119° C [Litt. = 116-118° C (6)]

Analyse $C_{22}H_{34}N_2O_8$: Calc. % : C 58,13 H 7,54 N 6,17
Tr. : 58,72 7,51 6,02

(Hydroxy-3 méthoxy-4 phényl)-2 éthylène glycol ^{14}C -2 : 6 b (iso-HMPG)

Le procédé de synthèse et les purifications sont identiques à la description faite pour 6 a. 19 mCi de sulfure 4 b conduisent à 14,8 mCi de 6 b (activité spécifique : 48 mCi/mMole) soit un rendement de 60 % par rapport à l'acide hydroxy-3 méthoxy-4 benzoïque (carboxyle ^{14}C).

La pureté radiochimique > 99 % est contrôlée dans les mêmes conditions que pour 6 a.

UV (éthanol) λ max. = 279 nm λ min. = 249 nm.

Une synthèse effectuée "à blanc" dans des conditions identiques a permis d'isoler 6 b sous forme cristallisée. P.F. = 95-96° C

Analyse $C_9H_{12}O_4$: Calc. % : C 58,70 H 6,56
Tr. : 58,84 6,49

(Dibenzoyloxy-3,4 phényl)-2 éthylène glycol ^{14}C -2 : 6 d

Le produit 4 d (34 mCi = 0,73 mMole) en solution dans 6 ml d'éthanol est ajouté lentement à température ambiante au mélange suivant : 80 mg $NaBH_4$ + 1,2 ml H_2O + 0,25 ml $NaOH$ 2 N. La solution est agitée magnétiquement pendant 3 h. et acidifiée à pH = 4-5. Le pH est ajusté à 8 par addition d'une solution de $NaHCO_3$ à 5 %.

Le produit 6 d est extrait à l'éther, lavé à l'eau, purifié sur une colonne de gel "Séphadex LH 20" (h. = 75 cm, ϕ = 15 mm) et élué par le solvant : dichloro-1,2 éthane : 70, méthanol : 30 (16) (V/V débit : 12 ml/h.).

Une cristallisation est effectuée dans le mélange : acétate d'éthyle : 3 ml et cyclohexane : 3 ml.

L'activité est de 26 mCi. P.F. = 73-75° C [Litt. : 77-79° C (6)]

Analyse $C_{22}H_{22}O_4$: Calc. % : C 75,41 H 6,33
Tr. : 75,58 6,56

S.M. : $M^+ = 350$ m/e = 319 ($M-CH_2OH$), 181, 91 ($CH_2\phi$), 65.

(Dihydroxy-3,4 phényl)-2 éthylène glycol ^{14}C -2 : 6 c (DHPG)

Au produit 6 d (26 mCi = 0,56 mMole) en solution dans 15 ml d'éthanol, on ajoute 50 mg de palladium sur charbon à 10 %. Après hydrogénation pendant 2 h. à température ambiante et sous pression atmosphérique, la solution est filtrée sur "Millipore" et évaporée à sec. Le résidu est repris par 2 ml du mélange : dichloro-1,2 éthane : 70 + méthanol : 30 (16) et introduit sur une colonne de gel "Séphadex LH 20" (h. = 51 cm, ϕ = 15 mm). L'alcool 6 c est élué par le mélange ci-dessus, débit : 6 ml/h.

L'activité totale est de 22,3 mCi (activité spécifique : 45 mCi/mMole) soit un rendement de 64 % par rapport à l'acide dihydroxy-3,4 benzoïque (carboxyle ^{14}C).

La pureté radiochimique > 99 % est contrôlée par radiochromatographie sur papier Whatman n° 1 dans les solvants II, V, VI où l'on obtient un seul pic radioactif de même Rf que celui d'un témoin révélé par une solution de chlorure ferrique.

La pureté chimique est déterminée par spectrophotométrie UV dans l'éthanol λ max. = 281 nm ; λ min. = 250 nm.

Le produit inactif obtenu par le même procédé de synthèse présente des spectres (IR, masse) et un point de fusion identiques à un échantillon témoin commercial (Aldrich).

P.F. = 114-116° C [Litt. : P.F. = 128-129° C (6)]

Analyse $C_8H_{10}O_4$:	Calc. % :	C 56,46	H 5,92
	Tr. :	56,55	5,85

R E F E R E N C E S

- 1 Cl. BOHUON, E. COMOY - Problèmes Actuels de Biochimie Appliquée - Editeur : M.L.GIRARD, 2e série - MASSON, Paris 1968, p. 5.
- 2 P. MATHIEU, J.C. CHARVET, G. CHAZOT et P. TROUILLAS
Clin. Chim. Acta, 1972, 41, 5.
- 3 K.N.F. SHAW, A. Mc MILLAN et M.D. ARMSTRONG - J. Org. Chem., 1958, 23, 27.
- 4 E.F. RECONDO et H. RINDERKNECHT - J. Org. Chem., 1960, 25, 2248.
- 5 A. LA MANNA et V. GHISLANDI - Gazz. Chim. Ital., 1959, 89, 1231.
- 6 J.D. BENIGNI et A.J. VERBISCAR - J. Med. Pharm. Chem., 1963, 6, 607.
- 7 G.A. RUSSELL et G.J. MIKOL, J. Am. Chem. Soc., 1966, 88, 5498.
- 8 J.W. DALY, J. BENIGNI, R. MINNIS, Y. KANAOKA et B. WITKOP,
Biochemistry, 1965, 4, 2513.
- 9 E.J. COREY et M. CHAYKOVSKY - J. Amer. Chem. Soc., 1965, 87, 1345.
- 10 H.D. BECKER, G.J. MIKOL et G.A. RUSSELL - J. Amer. Chem. Soc., 1963, 85, 3410.
- 11 E.J. COREY et M. CHAYKOVSKY - J. Amer. Chem. Soc., 1964, 86, 1639.
- 12 J.A. LEVIN - J. Chromatogr., 1972, 67, 129.
- 13 I. GOODMAN, A.P. OLENCZAK, J.W. SCHERRER et R.B. HIATT -
Biochim. Biophys. Acta, 1968, 156, 364.
- 14 J.A.F. GARDNER et H. HIBBERT - J. Amer. Chem. Soc., 1944, 66, 607.
- 15 H. DEKIRMENJIAN et J.W. MAAS - Anal. Biochem., 1970, 35, 113.
- 16 E. ANGGARD, B. SJOQUIST et R. SJOOSTROM - J. Chromatog., 1970, 50, 251.
- 17 I.A. PEARL et J.F. Mc COY - J. Amer. Chem. Soc., 1947, 69, 3071.
- 18 M. PUMMERER, Ber. 1909, 42, 2282 - Ber. 1910, 43, 1401.
- 19 A.A. LIEBMAN, D.H. MALAREK, A.M. DORSKY et H.H. KAEGI -
J. Labelled Compounds, 1971, 7, 449.

- 20 L. PICHAT, in Proceedings of the 2nd U.N. International Conference, Geneva, September 1958. United Nations - Geneva 1958, Vol. 20, Isotopes in Research Paper P 1234, p.32.
- 21 B. RIEGEL, H. WITTCOFF - J. Amer. Chem. Soc., 1946, 68, 1913.
- 22 E.M. HINDMARSH, I. KNIGHT, R. ROBINSON - J. Chem. Soc., 1917, 111, 940.
- 23 I.A. PEARL, in Organic Syntheses - John Wiley, New-York, 1950 - Editeur : A.C. COPE, Vol. 30, p. 101.
- 24 R.G. NEVILLE - J. Org. Chem., 1960, 25, 1063.