

SYNTHÈSE DE L'ACIDE NERVONIQUE ^{14}C -24 (ACIDE CIS-TÉTROCOSÈNE-15 OÏQUE ^{14}C -24)

T. MORIYA⁺, M. PABIOT, L. PICHAT^{*}

Service des Molécules Marquées - CEN-SACLAY - BP N° 2
91190 GIF-SUR-YVETTE (FRANCE)

ABSTRACT

Methyl iodide- ^{14}C was condensed with 2-(1-lithio-hept-1-yn-6-yl) 1,3-dioxolane **4** in presence of HMPT and benzene to give 2-(oct-2-yn-8-yl-1- ^{14}C) 1,3-dioxolane **5**.

Catalytic reduction of **5**, followed by acid hydrolysis led to pelargonic aldehyde 9- ^{14}C **7**. Condensation of this aldehyde **7** with an excess of ω -carbomethoxy-tetradecylidene), triphenyl phosphorane **11** produced methyl nervonate 24- ^{14}C **12**. The latter was isolated from its trans isomer by chromatography on a silver nitrate impregnated silicagel column. Finally, nervonic acid 24- ^{14}C **13** was obtained by alkaline hydrolysis (specific activity : 52 mCi/mMole) with an overall yield of 7 % based on methyl iodide- ^{14}C .

L'acide nervonique, qui est un constituant des cêrêbrosides et sphingomyêlines du systême nerveux central, joue un rôle biologique important dans la croissance. Une synthêse de l'acide nervonique (carboxyle- ^{14}C) a été rêalisêe par Carroll (1).

Nous avons synthêtisê cet acide gras marquê en position omêga pour une êtude approfondie de son mêtabolisme (2). La synthêse a été effectuêe selon un schêma réactionnel dêjà dêcrit pour le marquage d'autres acides êthylêniques (3). Le principe consiste en la condensation de l'aldêhyde pêlargonique ^{14}C -9, prêparê à partir d'iodure de mêtyle ^{14}C , avec le rêactif de Wittig **11** dans la dimêthylformamide (DMF).

La condensation de $^{14}\text{CH}_3\text{I}$ avec un excês de (lithio-1-heptyne-1-yl-6)-2 dioxolanne-1,3 a été effectuêe en milieu hexamêthylphosphotriamide (HMPT). La sêparation du produit de condensa-

+ On leave of absence from Japan Atomic Energy Research Institute.

* To whom correspondence should be addressed.

tion 5 de l'excès d'acétylénique 4 par chromatographie liquide préparative s'étant heurtée à des difficultés dues à la forte tension de vapeur du composé 5, a été abandonnée. La synthèse a été poursuivie avec le produit brut. La réduction catalytique par l'oxyde de platine d'Adams, suivie d'une hydrolyse acide a fourni l'aldéhyde pèlargonique ^{14}C -9 : 7 avec un rendement de 64 % par rapport à $^{14}\text{CH}_3\text{I}$.

L'aldéhyde pèlargonique ^{14}C -9 a été condensé avec un excès d'iodure d' ω -carbométhoxytétradécylidène triphénylphosphonium (obtenu selon (3) (4) (5)) dans la DMF.

L'isolement de l'acide nervonique ^{14}C -24 : 13 chimiquement et radiochimiquement pur a nécessité plusieurs chromatographies sur colonne. Une chromatographie sur colonne d'alumine a éliminé l'oxyde de triphénylphosphine ainsi qu'une impureté radioactive non identifiée. Le mélange contenant les isomères CIS et TRANS et des impuretés radioactives, purifié sur colonne de silicagel imprégné de nitrate d'argent, a permis d'isoler 5 fractions :

- (a) : tricosénoate de méthyle- ^{14}C identifié par spectrométrie de masse ;
- (b) : impureté non identifiée ;
- (c) : isomère TRANS identifié par spectromètre de masse ;
- (d) : nervonate de méthyle pratiquement pur ;
- (e) : mélange du nervonate de méthyle et d'une nouvelle impureté non identifiée.

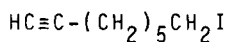
Une deuxième chromatographie de la fraction (e) sur la colonne a permis d'isoler une nouvelle quantité de nervonate de méthyle radiochimiquement pur.

A ce stade de la purification, les contrôles du produit en CPV et en CLHP ont révélé que les puretés radiochimiques et chimiques étaient respectivement de 99 % et de 70 %. Une purification sur un appareil de chromatographie préparative en phase gazeuse antérieurement décrit (6) a été nécessaire. La saponification alcaline de l'ester 12 a conduit à l'acide nervonique ^{14}C -24, dont la purification sur une colonne de silice sous pression a fourni l'acide nervonique ^{14}C -24 de pureté radiochimique et chimique supérieures à 98 %.

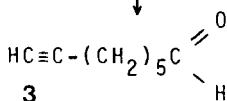
Le rendement global est de 7 % par rapport à $^{14}\text{CH}_3\text{I}$. Activité spécifique 52 mCi/mMole.

$$\text{HC}\equiv\text{C}-(\text{CH}_2)_5\text{CH}_2\text{Cl}$$

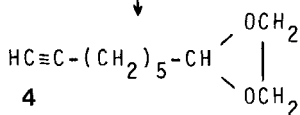
1



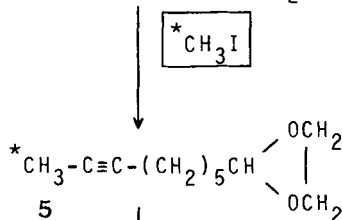
2



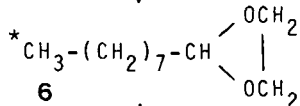
3



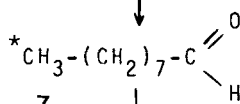
4



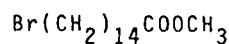
5



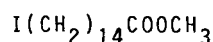
6



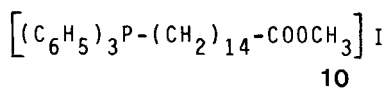
7



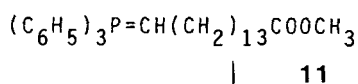
8



Q



10

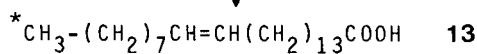


1

Réaction de Wittig



12



13

PARTIE EXPERIMENTALE

Le contrôle de la pureté par chromatographie en phase vapeur (CPV) a été effectué sur appareil Microtek MT 220 et par chromatographie liquide haute pression (CLHP) sur appareil Waters Associates modèle A 6000. Les spectres de masse ont été enregistrés sur appareil Varian CH 7 par introduction directe de l'échantillon dans la source.

(HEPTYNE-1-YL-6)-2-DIOXOLANNE-1,3 4a) Iodo-1 octyne-7

Dans un ballon de 250 ml, on agite à reflux 20 g de chloro 1-octyne (138 mMoles) 1,40 g d'iodure de sodium anhydre (272 mMoles) et 160 ml d'acétone anhydre pendant 24 heures. Le mélange est repris par 200 ml d'eau et 300 ml d'éther. La phase organique est lavée à l'eau, puis séchée sur Na_2SO_4 . On obtient 32 g de produit brut. Après distillation sous vide, l'iodo-1 octyne-7 (26,3 g) est contrôlé en CPV.

Rendement : 80 %

Contrôle CPV : silicone OV-1, 170°C , $\text{PEb}/10^{-2} = 62^\circ \text{C}$.

b) Oxydation de l'iodo-1 octyne-7 par l'oxyde de triméthylamine en octyne-7 al 3 selon (7)

La déshydratation de l'oxyde de triméthylamine (40 g) est effectuée par distillation d'une solution de 250 ml dans la diméthylformamide à 130°C sous pression réduite. Le résidu est séché sous vide à 120°C . Le produit (22 g) est dissous dans 30 ml de chloroforme froid sous atmosphère d'azote, la solution est maintenue à 0°C .

On ajoute lentement une solution chloroformique contenant l'iodo-1 octyne-7 (26,3 g). On chauffe à reflux pendant une heure ; la réaction est suivie en CPV. Le mélange est traité par un même volume de HCl 2N. La solution organique est décantée, lavée au bicarbonate de sodium à 5 %, à l'eau, et séchée sur Na_2SO_4 . Après évaporation du solvant, on récupère 11,9 g d'octyne-7 al.

Rendement : 87 %

Contrôle CPV : Silicone OV-1, 140°C .

c) (Heptyne-1-yl-6)-2-dioxolanne-1,3) 4

On chauffe à reflux le produit brut précédent pendant 24 heures avec 6,2 g de glycol, 1 g d'acide p-toluène sulfonique et 150 ml de benzène. L'eau produite est éliminée par distillation du benzène dans un décanteur de type Dean Stark. La réaction est contrôlée en CPV. Après refroidissement, la solution est lavée à l'eau, au bicarbonate de sodium à 5 %, à l'eau puis séchée sur Na_2SO_4 .

L'acétal est distillé sous vide dans un appareil à bande tournante. On obtient 8,2 g d'acétal.

Rendement : 51 %

Contrôle CPV : silicone OV-1, 140°C , $\text{PEb}/18 = 121-122^\circ \text{C}$,
 $\eta_{\text{D}}^{21,5} = 1,4559$.

(n-OCTYL(^{14}C -8))-2, DIOXOLANNE-1,3 6a) Condensation de l'(heptyne-1-yl-6)-2 dioxolanne-1,3 avec l'iodure de méthyle- ^{14}C 5

Dans un ballon tricol muni d'un réfrigérant ascendant surmonté d'un robinet et d'une garde à chaux sodée, on introduit en "boîte à gants" balayée par un courant d'azote sec les réactifs suivants : 100 mg de lithium (14,4 mAtome), 5 ml d'hexaméthylphosphotriamide (HMPT) fraîchement distillé, 15 ml de benzène anhydre et 2,6 g de composé acétylénique **4** (15,7 mMoles). L'appareil est maintenu sous atmosphère d'azote sec avec une forte agitation des réactifs. Après 3 jours d'agitation, le lithium a disparu et on obtient une solution jaune brune.

On place le ballon sur une rampe à vide et on transfère 435 mCi (7,5 mMoles) d'iodure de méthyle- ^{14}C obtenu à partir de $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$ (activité spécifique : 58 mCi/mMole). La solution est agitée pendant 2 heures à température ambiante puis 3 heures à 50°C . Après décomposition par l'eau, le produit est décanté, lavé avec HCl N, Na_2CO_3 à 5 %, H_2O , et séché sur Na_2SO_4 . La solution organique (425 mCi) est contrôlée en CPV. On note la présence de 3 impuretés inactives importantes.

Contrôle CPV : Silicone SE-30, 125°C

CCM : Silicagel

1) Benzène : 96, Acétate d'éthyle : 4 ; Rf : 0,42

2) Cyclohexane : 90, Acétate d'éthyle : 10 ; Rf : 0,40

La pureté radiochimique est de 92 %

Rendement : 90 %

Après des essais de purification sur colonne de silicagel dans plusieurs solvants, il apparaît que le rendement est faible et que l'acétal est perdu par évaporation lors des manipulations. Pour ces raisons, on utilise l'acétal brut, contenant comme impureté majeure inactive le (heptyne-1-yl-6)-2-dioxolanne-1,3.

b) Réduction catalytique de 5 en 6

Le produit brut (285 mCi) est hydrogéné en présence d'oxyde de platine d'Adams (42 mg) à température ambiante sous pression atmosphérique dans 15 ml d'éthanol. Après agitation pendant 8 heures, le produit est filtré et la solution alcoolique (285 mCi) est contrôlée en CPV. On note la présence d'une impureté inactive. Le produit, obtenu avec un rendement de 97 %, a une pureté radiochimique, contrôlée par CCM, de 97 %.

Contrôle CPV : Carbowax 20 M, 175° C

CCM : Silicagel, Benzène : 60, Hexane : 40 ; Rf = 0,35

ALDEHYDE PELARGONIQUE ^{14}C -9 7

Après évaporation de l'alcool sous pression réduite, l'acétal est chauffé à reflux sous atmosphère d'azote avec 40 ml d' H_2SO_4 N pendant 5 heures. Après extraction à l'éther et séchage sur Na_2SO_4 , on obtient l'aldéhyde (279 mCi). L'éther est éliminé par distillation. Ce produit est utilisé sans autre purification.

ACIDE NERVONIQUE ^{14}C -24 13

a) Iodo-15 pentadécanoate de méthyle 9

Dans un ballon de 250 ml surmonté d'un réfrigérant, on introduit 32 g de dérivé bromé **8** (95 mMoles), 21 g d'iodure de sodium anhydre (140 mMoles) et 75 ml de méthyléthylcétone. Après un reflux de 24 heures, la solution est filtrée. Le filtrat est évaporé sous vide. Le résidu est dissous dans 75 ml de benzène. La solution organique est traitée, successivement, avec une solution d'hyposulfite de sodium à 5 %, à l'eau, et séchée sur Na_2SO_4 . Le résidu est concentré à 50 ml.

b) Iodure de ω -carbométhoxytétradécylidène triphénylphosphonium 10

On chauffe la solution précédente à reflux pendant 24 heures avec 30,1 g (115 mmoles) de triphénylphosphine ; le résidu est évaporé à sec sous vide. L'excès de triphénylphosphine est éliminé par addition de 30 ml d'éthanol et précipitation avec 200 ml d'éther. Après deux précipitations, on filtre et on sèche sous vide à 80°C pendant 24 heures. On récupère un produit visqueux : 50,6 g.

Rendement : 82 %

Analyse $\text{C}_{34}\text{H}_{46}\text{O}_2\text{P}$, I : calc. % C = 63,3 H = 7,1
tr. % C = 62,7 H = 7,2

c) ω -Carbométhoxytétradécylidène triphénylphosphorane 11

Dans un ballon tricol, on prépare le méthylate de sodium à partir de 350 mg de sodium (15 mmoles) et 12,5 ml de méthanol anhydre. On évapore à sec sous vide, puis on introduit 20 ml de DMF anhydre à 0°C sous atmosphère d'azote. On ajoute goutte à goutte une solution de 7,1 g d'iodure de ω -carbométhoxytétradécylidène triphénylphosphonium (11 mmoles) dissous dans 20 ml de DMF anhydre. Après agitation magnétique pendant 2 heures, apparaissent une coloration jaune et un précipité d'iodure de sodium.

d) Nervonate de méthyle ^{14}C -24 12

On ajoute goutte à goutte l'aldéhyde pèlargonique ^{14}C -9 dilué dans 10 ml de DMF anhydre au phosphorylène précédent. La solution est évaporée à sec sous vide à 50°C . On traite le résidu avec 100 ml d'eau et on effectue une extraction étherée en continu. La solution étherée est séchée sur Na_2SO_4 . On récupère 255,7 mCi.

Contrôle CCM : Silicagel imprégné de nitrate d'argent (20 %)

Ether de pétrole : 55, benzène : 45

Le contrôle en CCM montre la présence de 5 produits radioactifs dont le nervonate de méthyle (# 44 %).

PURIFICATION DU NERVONATE DE METHYLE ^{14}C -24

Le résidu est évaporé sous vide. Le distillat (38 mCi) contient essentiellement l'aldéhyde pèlargonique ^{14}C -9. Le solide jaune clair est déposé sur une colonne d'alumine neutre Woelm (activité Brockman : 3) ($\varnothing = 15\text{ mm}$, $h = 220\text{ mm}$) avec 200 ml d'hexane. On récupère 163 mCi.

Contrôle CCM : Silicagel imprégné de nitrate d'argent (20 %)

Hexane : 50, Benzène : 50

Le contrôle en CCM montre la présence de 4 produits actifs dont le nervonate de méthyle ^{14}C -24 (62 %).

SEPARATION DU NERVONATE DE METHYLE (CIS) ET DE L'ISOMERE (TRANS)

La chromatographie est effectuée sur une colonne de 100 g de silicagel imprégné à 20 % de AgNO_3 (ϕ = 30 mm, h = 330 mm).
Eluant : Hexane : 50, Benzène : 50.

On récupère les fractions suivantes :

Fractions 1	: 30,5 mCi	$^*\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{COOCH}_3$
2	: 24,5 mCi	impureté
3	: 4,0 mCi	isomère (TRANS)
4	: 48,5 mCi	nervonate de méthyle pur
5	: 37,0 mCi	mélange : produit + impureté

144,5 mCi

Une nouvelle chromatographie de la fraction 5 permet d'isoler 23 mCi de nervonate de méthyle soit au total 71,5 mCi.

Le contrôle du nervonate a donné les résultats suivants :

CMM : Silicagel imprégné AgNO_3 (20 %)

Hexane : 50, Benzène : 50

Rf = 0,55 98,8 %

Silicagel

mêmes solvants

Rf = 0,51 98,6 %

CPV SE - 30, 230° C 28 % impureté inactive

CLHP Microbondapak C18 30 % impureté inactive

THF/ $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (25/45/35)

Après un contrôle en spectrométrie de masse, l'impureté est identifiée comme étant l'homologue inférieur (tricosénoate de méthyle).

Purification par chromatographie préparative en phase gazeuse dans un appareil antérieurement décrit (6) sur colonne SE - 30, température 230° C, gaz vecteur Helium.

Finalement, on obtient 36 mCi de nervonate de méthyle chimiquement pur à 98 % et radiochimiquement pur à 99 %.

SAPONIFICATION ET PURIFICATION 13

On chauffe à reflux pendant 4 heures sous atmosphère d'azote un mélange contenant le nervonate de méthyle (36 mCi) et 10 ml d'une solution hydroalcoolique de potasse à 20 %. La solution est évaporée à sec. Le résidu est repris avec 100 ml d'eau. La solution est extraite en continu avec de l'éther pour éliminer les impuretés non acides et l'ester qui n'a pas réagi. On acidifie la solution aqueuse avec H_2SO_4 6N. Une nouvelle extraction à l'éther permet d'obtenir l'acide nervonique ^{14}C -24 (31,5 mCi).

Contrôle CCM "Whatman Reversed phase K-18"

Acétone : 90, Eau : 10

Rf = 0,57 pureté radiochimique 96,5%

Silicagel,

Hexane : 80, Ether : 20, Acide acétique : 1

pureté radiochimique 97 %

CLHP Microbondapak C 18

THF/ CH_3CN / H_2O (25/45/35) pureté chimique 99 %

pureté radiochimique 97 %

La purification est réalisée sur une colonne de silice (Merck - Si 60 lobar, type B) sous pression. Elution : hexane : 80, éther : 20 acide acétique 1. On obtient 30 mCi d'acide nervonique ^{14}C -24 dont la pureté radiochimique est de 99 % dans les mêmes conditions que précédemment. L'activité spécifique déterminée par spectrométrie de masse est de 52 mCi/mMole.

Le spectre (masse), les Rf (CCM) et le temps de rétention (CLHP) de l'acide sont identiques à ceux d'un témoin commercial (P. L. Biochemicals, Inc.). Le rendement par rapport à l'iodure de méthyle- ^{14}C est de 7 %.

REFERENCES

- 1 - K.K. CARROLL
Can. J. Chem., 35, 757 (1957)
- 2 - J.L. RABINOWITZ, C. LUTTON et F. CHEVALLIER
Biochem J., 157, 271 (1976)
- 3 - L. PICHAT, J.P. GUERMONT et J.C. LEVRON
Bull. Soc. Chim. France, 1198 (1969)

- 4 - L. PICHAT, J.P. GUERMONT et J.C. LEVRON
"Proceedings of the Second International Conference on the
Preparation and Storage of Labelled Compounds"
Bruxelles - December 1966
Publication Euratom Bruxelles - EUR 3946 d-f-e, 181 (1968)
- 5 - L. PICHAT, J.C. LEVRON et J.P. GUERMONT
Bull. Soc. Chim. France, 1200 (1969)
- 6 - C. BARET
Microchem. J., 11, 455 (1966)
- 7 - V. FRANZEN et S. OTTO
Chem. Ber., 94, 1360 (1961)