

CATALYSEURS BIFONCTIONNELS—IV

SYNTHESE ET ACTION CATALYTIQUE DE STEROÏDES
COMPORTANT UNE FONCTION ALCOOL ET UN NOYAU IMIDAZOLE

M. FETIZON* et P. JAUDON†

Laboratoire de Synthèse Organique, Ecole Polytechnique, 91128 Palaiseau Cedex, France

(Received in France 9 November 1976; Received in the UK for publication 28 December 1976)

Résumé—La fixation de deux chaînes carbonées terminées l'une par un hydroxyle, l'autre par un imidazole, sur des diamino- $6\beta,17\beta$ stéroïdes de la série androstane normale et modifiée (D-homo) est décrite. L'action catalytique de ces produits sur l'hydrolyse de l'acétate de *p*-nitrophényle est étudiée. On observe une légère accélération de l'hydrolyse lorsque sont simultanément présents sur le même squelette stéroïde les groupements imidazole et alcool.

Abstract—The binding of two side chains bearing an hydroxyl and imidazole terminal group on $6\beta,17\beta$ -diamino steroids, in the normal and D-homo series, is described. The catalytic effect of these products on the hydrolysis of *p*-nitro-phenyl acetate is studied. A slight acceleration is observed with compounds in which hydroxyl and imidazole groups are attached to the steroid skeleton.

Ce mémoire décrit la synthèse et l'activité des stéroïdes 1 et 2 (Fig. 1), catalyseurs bifonctionnels comportant un noyau imidazole et une fonction alcool, groupements qui participent de manière déterminante à l'action catalytique de l' α -chymotrypsine.^{1,2}

Les raisons du choix du stéroïde 1 possédant un squelette androstane modifié (D-homostéroïde) ont déjà été évoquées dans le mémoire précédent. Le produit 2 ne diffère du produit 1 que par l'orientation des deux chaînes carbonées (portant l'une l'alcool, l'autre l'imidazole) par rapport au stéroïde. L'interaction entre l'imidazole et l'alcool étant plus probable pour le composé 1, on peut s'attendre à une activité catalytique plus grande de ce produit.

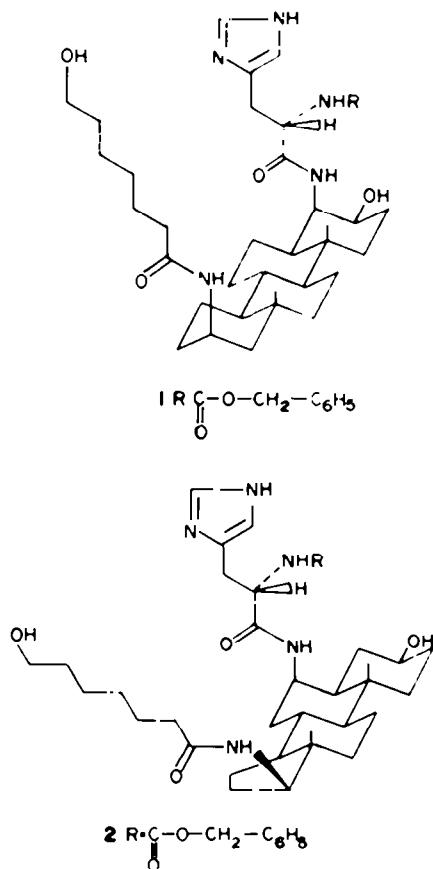
Synthèse des catalyseurs bifonctionnels 1 et 2

La synthèse des composés 1 et 2 fait appel à la même série de réactions sur deux squelettes de départ différents: d'une part l'aminohydroxy- 3β -androstène- 5β 5,³ d'autre part l'aminohydroxy- 3β -D-homoandrostène- 5α 4. L'amine 4 est obtenue avec un rendement de 80% par réduction de la 0-méthyl oxime 3.^{3,4}

Le schéma des réactions utilisées pour synthétiser 1 et 2 est donné Fig. 2. La séquence des réactions choisie implique de commencer à introduire la chaîne en 17β (voir paragraphe suivant). En effet, les amines 17β sont obtenues par réduction des oximes correspondantes, tandis que l'amine- 6β est préparée par réduction du dérivé Δ -5 nitro- 6β provenant lui-même d'une oxydation nitrique de la double liaison. Cette dernière réaction qui ne peut se faire en présence d'une fonction cétone, est

par contre, réalisable sur les amides 6 et 7 après fixation de la première chaîne pour conduire aux produits 8 et 9.

L'achèvement de la synthèse comporte l'hydrogénéation catalytique de 8 et 9 en amines axiales $6\beta^4$ (10 et 11) puis la condensation à l'aide du réactif K de Woodward de la *N*-benzyloxycarbonyle histidine conduisant res-



*Ce travail fait partie de la thèse de Doctorat d'Etat de P. Jaudon (CNRS A.O. 12914).

†La faiblesse des rendements obtenus à partir de l'oxime non méthylée (méthode classique) peut être due à la formation de complexes de type $[\text{C}=\text{O}-\text{NO}-\text{AlH}_3]$, généralement peu solubles dans les

solvants utilisés et rendant la réduction difficile

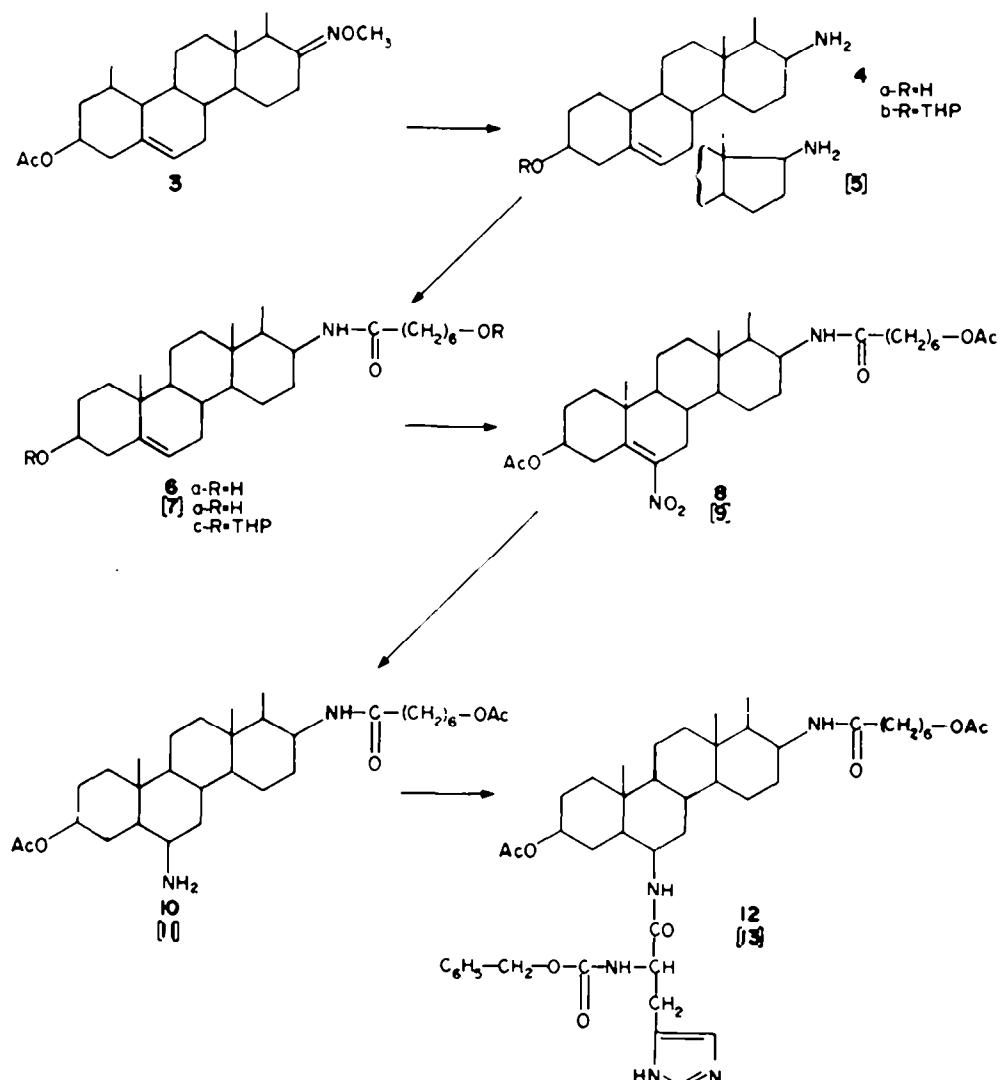


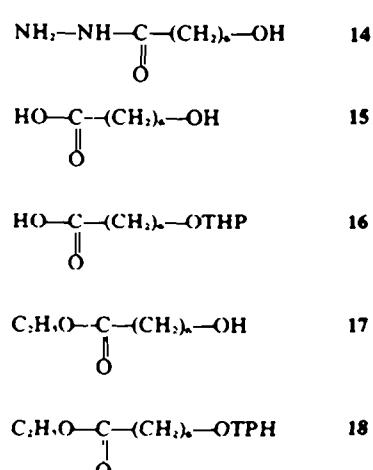
Fig. 2. Les produits [5], [7], [9], [11] et [13] comportant un squelette androstane non modifié, possèdent les mêmes substituants que les D-homoandrostanes correspondants (produits 4, 6, 8, 10 et 12).

pectivement aux dérivés 12 et 13. La dernière étape est la régénération du groupement hydroxyle de la chaîne branchée en 17β . L'utilisation de conditions douces permet de saponifier l'acétate sans toucher au groupement protecteur la fonction amine de l'histidine branchée en 6β .^t

Etude du branchement de la chaîne en 17β . Le branchement de la chaîne en 17β qui, formellement, correspond à la condensation de l'acide hydroxy-7 heptanoïque sur les amino- 17β stéroïdes a été réalisé au moyen de diverses méthodes qui ont été mises au point à propos de la synthèse du produit 7 (série androstane normale). L'application de ces méthodes à la synthèse de l'amide 6 conduit à des résultats différents, dus à la différence de conformation des amines dans les deux séries.

Les réactions utilisées nécessitent la synthèse de dérivés de l'acide heptanoïque 14, 15 et 16 (Fig. 3). Ceux-ci sont obtenus à partir de l'ester 17 provenant

lui-même de l'oxydation de la cycloheptanone par l'acide de Caro en présence d'éthanol, suivie d'une restérification du produit brut obtenu.³



^tCe groupement protecteur supprime les possibilités d'interaction avec l'amine libre qui compliquerait l'interprétation des résultats de l'étude cinétique.

Fig. 3.

Les rendements obtenus dans la synthèse des amides **6** et **7** au moyen de trois méthodes différentes (par l'intermédiaire de l'azide, par l'utilisation du réactif K de Woodward et par l'action d'un anhydride de mixte) sont consignés dans le Tableau 1.

La méthode *via* l'azide présente l'avantage d'utiliser l'ester **17** sans passer par l'acide libre plus difficilement isolable. L'hydrazide **14** obtenu à partir de l'ester **17** est transformé en azide par action de l'acide nitreux. Cet azide peut réagir sur les amino-stéroïdes **4** et **5** pour former la liaison peptidique. Les plus faibles rendements obtenus sont dus à la formation parallèle d'urées **19** et **20**. La formation de ces produits peut s'expliquer par le réarrangement de l'azide en isocyanate qui, en réagissant sur l'amine forme l'urée. La faible solubilité de l'aminostéroïde en ralentissant la réaction rend possible la compétition entre les deux réactions. Bien que l'amide soit séparable de l'urée par chromatographie d'autres méthodes ont été envisagées afin d'obtenir les produits **6** et **7** avec un bon rendement.

Parmi tous les réactifs facilitant la formation de la liaison peptidique,⁶ le réactif K de Woodward⁷ formant avec l'acide un ester d'énol réactif, présente l'avantage de ne pas nécessiter le blocage des fonctions alcool. Ce réactif a d'ailleurs été utilisé au cours de la fixation d'acides aminés et de peptides sur un squelette stéroïde.^{8,9} Cette méthode conduit à de mauvais rendements dus à la faible solubilité des produits dans les solvants utilisés.

La dernière méthode employée utilise l'anhydride mixte résultant de l'action du chloroformate d'éthyle sur l'acide **16**. Cette méthode donne de bons résultats bien qu'il soit nécessaire dans ce cas de bloquer les fonctions alcool (sous forme d'éther de tétrahydropyrannyle).

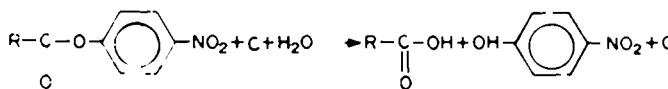
Tableau 1. Branchement de la chaîne carbonée en 17β

Méthode	Rendement en 7b série stéroïde non modifiée	Rendement en 6b série D-homo
Azide	40-80%	0-20%
Réactif de Woodward	37%	20%
Anhydride mixte	80%	75%

Action catalytique des produits **1** et **2**

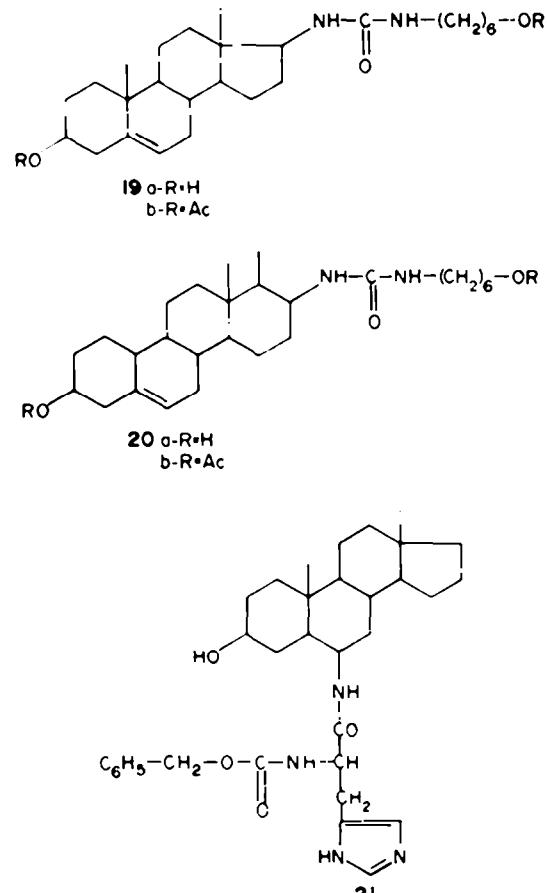
L'action catalytique des composés **1** et **2** a été mesurée sur l'hydrolyse de l'acétate de *p*-nitrophényle, substrat hydrolysé par l' α -chymotrypsine et généralement utilisé dans ce type d'étude. Afin d'essayer de dégager le caractère bifonctionnel de la catalyse par les composés **1** et **2**, leur activité a été comparée à celle du stéroïde **21** ne portant que la chaîne terminée par le noyau imidazole.

Le processus réactionnel peut être schématisé par:



C: catalyseurs **1**, **2** ou **21**

¹⁰Dans le domaine de pH utilisé, les noyaux imidazoles sont partiellement protonés mais on sait que l'activité catalytique de l'imidazole dans le cas de l'hydrolyse d'un ester activé est due à la forme libre de l'imidazole qui joue le rôle de catalyseur nucléophile.¹⁰



Pour chaque catalyseur, l'étude cinétique a été effectuée à différents pH. La vitesse de réaction est déterminée en suivant par spectrophotométrie l'apparition de l'anion paranitrophénate à 400 nm. La concentration en catalyseur demeurant constante au cours de la réaction, il est possible de déterminer la constante de vitesse k_{cat} correspondant à l'éqn (1):

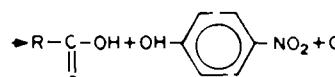
$$v = - \frac{d[\text{PNPA}]}{dt} = \frac{d[\text{PNP}]}{dt} = k_{cat}[\text{PNPA}] \quad (1)$$

[PNPA]: concentration en acétate de paranitrophényle
[PNP]: concentration en paranitrophénate

avec:

$$k_{cat}[\text{PNPA}] = k_{cat}[\text{C}] + k_{cat}[\text{PNPA}] \quad (2)$$

[C] = concentration en imidazole libre variable selon le pH utilisé¹¹. k_{cat} = constante d'hydrolyse déterminée en absence de catalyseur et généralement négligeable dans



nos expériences. k_{cat} = constante d'hydrolyse due au catalyseur.

La constante de vitesse de second ordre (k_{cat}) correspondant à l'éqn (2) permet de caractériser les catalyseurs **1**, **2** et **21** et de comparer leur réactivité.

Tableau 2. Hydrolyse de l'acétate de *p*-nitrophényle catalysée par 1, 2 et 21

Catalyseur	pH	[C] [†] 10 ³ M	k _{obs} 10 ² mn ⁻¹	[C] [‡] 10 ³ M	k _{cat} M ⁻¹ mn ⁻¹
21	8.00	3	1.0	2.72	3.7
		2	0.6	1.81	3.6
		1	0.3	0.90	3.8
	7.50	3	0.8	2.28	3.6
		2	0.5	1.52	3.5
		1	0.3	0.76	3.5
pK _a = 7.00 ± 0.01	7.00	3	0.5	1.50	3.3
		2	0.3	1.00	3.2
	7.50	3	1.8	2.72	6.8
		2	1.2	1.81	6.7
pK _a = 7.00 ± 0.01	7.00	2	1.0	1.52	6.6
		1	0.5	0.76	6.7
		3	1.0	1.50	6.7
	7.50	2	0.6	1.00	6.2
		3	2.3	1.86	12.4
		1	1.1	0.93	11.6
pK _a = 6.90 ± 0.01	7.50	2	1.8	1.61	11.4
		1	0.9	0.80	11.9
		3	2.1	1.68	12.7
	7.00	1	0.6	0.56	10.2
		3	2.1	1.68	12.7
		1	0.6	0.56	10.2

Température: 38°C; force ionique: 0.8; mélange isopropanol-eau (50% v/v).

[†]Concentration totale en catalyseur.

[‡]Concentration en catalyseur libre.

Les résultats obtenus, rassemblés dans le Tableau 2, montrent que l'hydrolyse catalysée de l'acétate de *p*-nitrophényle est accélérée lorsque sont simultanément présents sur la même molécule les deux groupements imidazole et alcool. La plus grande augmentation de vitesse est observée pour le composé 1, dans lequel les chaînes portant les deux groupes catalytiques sont fixées en position diaxiale. Ce résultat, conforme à ce qui était prévu, pourrait être attribué à une interaction entre les deux chaînes plus favorable dans le cas de 1. Toutefois, les accélérations observées en passant de 21 à 2 ou 1 (facteur 2 et 4 respectivement) ne sont pas suffisamment importantes pour qu'on puisse affirmer que le caractère bifonctionnel des composés 1 et 2 joue un rôle essentiel dans le mécanisme de la catalyse par ces produits. Si l'effet observé semble indiquer que l'alcool joue un rôle dans l'augmentation de vitesse de la réaction, on ne peut exclure l'effet d'interactions hydrophobes dues à la présence d'une chaîne carbonée supplémentaire. Ce phénomène a en effet été observé lors de l'étude de modèles voisins.¹¹⁻¹⁴

PARTIE EXPERIMENTALE

Les points de fusion ont été déterminés sur un block Köfler à micro-platine et ne sont pas corrigés. Les spectres IR ont été enregistrés sur des appareils Perkin-Elmer 257 ou 357. Les pouvoirs rotatoires ont été mesurés à 20°C dans le chloroforme à l'aide d'un polarimètre électronique Perkin-Elmer 141. La concentration est exprimée en g/100 cm³. Les spectres RMN ont été enregistrés sur un appareil Jeol-C 60-H. Le produit étant en solution dans CDCl₃, les déplacements chimiques sont exprimés en ppm (référence TMS) et les constantes de couplage en Hz. Les abréviations suivantes ont été utilisées: s, singulet; d, doublet; t, triplet; q, quadruplet; m, multiplet. Les spectres de masse ont été enregistrés, sauf indication contraire, sur un appareil Varian CH-5. Les spectres UV ont été enregistrés sur un appareil Beckman DK 2A. Les microanalyses ont donné des résultats à ± 0.5% de la théorie pour les éléments soulignés.

Hydroxy-7 heptanoate d'éthyle 17

A une solution de 71 ml d'acide sulfurique (d 1.84) dans 24 ml d'eau maintenue en dessous de 15°C, on ajoute petit à petit 50 g de persulfate de potassium, puis 100 ml d'éthanol goutte à goutte en maintenant la température en dessous de 15°C. Puis, en maintenant la température à 15°C on ajoute goutte à goutte pendant une heure 10 g de cycloheptanone dans 30 ml d'éthanol. L'agitation est poursuivie à la même température pendant 2 h. La solution est versée dans un litre d'eau, filtrée, saturée par du sulfate d'ammonium et extraite à l'éther. Après avoir détruit les peroxydes, on évapore le solvant, le produit restant (mélange d'acide et d'ester) est dissous dans 15 ml d'alcool et 1 ml d'acide sulfurique et la solution est portée à reflux pendant 6 h. Après extraction à l'éther on distille sous un vide de 15 mm à une température de 139-142°C. 7.2 g produit. Rdt = 48% Eb₁₁ = 139-142°C; IR (film): 3450 (ν_{OH} lié); 1740 (ν_{C=O} ester); 1250, 1180 (ν_{C=C}); RMN (CCl₄): 1.25 (t, CH₃-CH₂-O); 4.12 (q, O-CH₂-CH₃); 2.3 (t, élargi, CH₂-C=O); 3.6 (t, élargi, CH₂-OH).

Hydrazide 14

1 g d'ester 17 est dissous dans 0.6 ml d'hydrazine hydratée à 98% et porté 6 h à reflux au bain marie. L'hydrazide cristallise après refroidissement, il est alors filtré et recristallisé dans l'acétate d'éthyle. Rdt = 97%; F = 123°C (AcOEt) [litt.¹ = 121-123°C]; IR (CCl₄): 3300, 1740 et 1650.

Ether tétrahydropyrannique de l'hydroxy-7 heptanoate d'éthyle 18

A une solution de 3.2 g d'alcool 17 dans 50 ml d'éther on ajoute 15 ml de dihydropyranne et 100 mg d'acide paratoluène sulfonique. La réaction est terminée au bout de 0.5 h. La solution est lavée, séchée et évaporée. Le produit est utilisé brut dans les manipulations ultérieures. En effet, une distillation sous vide (Eb₁₁ = 120-130°C) libère une partie de l'alcool bloqué. Une chromatographie permet d'isoler l'éther de tétrahydropyrannyle pur mais la saponification de cet échantillon purifié ne permet pas d'obtenir l'acide 16. IR (film): disparition de la bande OH.

Acides heptanoïques 15 et 16

3 g d'ester 17 ou 18 sont chauffés à reflux dans 28 ml d'une solution N de soude méthanolique. Au bout de 2 h la réaction est

complète. La solution est versée dans 50 ml d'eau et extraite deux fois avec 35 ml d'éther. La phase aqueuse recueillie est acidifiée par un mélange d'acide chlorhydrique (2.8 ml) et de pyridine (2 ml), puis saturée par addition de NaCl, et extraite 3 fois à l'aide de 70 ml d'éther. On obtient après évaporation du solvant et distillation azéotropique du benzène 2.37 g d'acide 15 ou 16 pur. IR (film): 3400 (ν_{as} , large bande); 2800-2500 (plusieurs bandes de l'acide); 1710 (ν_{as} , acide); RMN (CCl₄): disparition du groupement éthyle.

Amides 6 et 7

Méthode via l'azide. A une solution refroidie à 0°C de 0.9 g d'hydrazide 14 dans 12 ml d'eau distillée on ajoute 0.9 ml d'acide acétique et 0.44 ml d'HCl concentré, puis goutte à goutte et sous agitation magnétique, une solution de 0.5 g de NaNO₂ dans 3 ml d'eau. L'azide blanc et huileux qui précipite est extrait à l'acétate d'éthyle à 0°C, lavé à l'eau froide, à une solution de bicarbonate de sodium à 5% et enfin à l'eau. La solution est séchée sur sulfate (IR: 2270 cm⁻¹) filtrée et ajoutée à 1 g d'amine (4a ou 5a) dissous dans 40 ml de THF à 0°C. L'agitation est poursuivie 24 h à 0°C puis 2 h à température ambiante. L'extraction est faite au chloroforme, la solution est lavée à l'acide chlorhydrique dilué, au carbonate de sodium en solution puis à l'eau. Après séchage sur sulfate et évaporation du solvant le produit obtenu est acétyle. Une chromatographie sur colonne de silice permet d'obtenir un dérivé pur (éluant AcOEt). Il peut arriver (pour nos expériences une fois sur quatre) sans que l'on puisse en définir nettement la cause, qu'au lieu d'obtenir l'amide cherchée pratiquement pure, on obtienne un mélange (1/1) de ce produit et d'urée.

Amide 7b. Rdt_{max} = 80%; F = 95-98°C (éther de pétrole); $[\alpha]_D = -74^\circ$ (c = 0.5) C₁₂H₁₄O₂N(C, H, N); IR (CCl₄): 1680 (ν_{as} , amide); RMN: 0.78 (s, CH₃-18); 1.04 (s, CH₃-19); 2.05 (2s, CH₂-CO); 4.00 (t, élargi, J = 7, CH₂-OAc); 4.00 (m, H-17); 4.50 (m, H-3); 5.35 (m, H-6 et NH); SM: 501 (M⁺); 441 (M-CH₃COOH); 254 (M-60-(NH₂-CO(CH₂)₂-OAc)). Urée 19. Lorsqu'il se forme, ce produit est obtenu en mélange avec 50% d'amide 7. Une chromatographie en couche mince sur plaque de silice imprégnée de nitrate d'argent permet de séparer les deux produits (3 éluations AcOEt/hexane 4:1). Rdt_{max} = 40%; F = 100-103°C (MeOH); $[\alpha]_D = -66^\circ$ (c = 0.8) C₁₂H₁₄O₂N(C, H); RMN: 0.70 (s, CH₃-18); 1.03 (s, CH₃-19); 3.20 (m, CH₂-NH). Amide 6b. Rdt_{max} = 20%; F = 72-77°C; $[\alpha]_D = -40^\circ$ (c = 0.8) C₁₂H₁₄O₂N(C, H, N); IR (CCl₄): 1680 (ν_{as} , amide); RMN: 0.82 (s, CH₃-18); 0.87 (d, J = 6, CH₃ en 17a); 1.00 (s, CH₃-19); SM: 529 (M⁺); 469 (M-CH₃COOH); 282 (M-60-(NH₂CO(CH₂)₂-OAc)). Urée 20; Rdt_{max} = 20%; $[\alpha]_D = -35^\circ$ (c = 0.5); C₁₂H₁₄O₂N(C, H, N); RMN: 0.82 (s, CH₃-18); 1.00 (s, CH₃-19); 0.87 (d, J = 7, CH₃ en 17a).

Méthode au réactif de Woodward. A une solution refroidie à 0°C de 1.6 g d'acide 15 dans 125 ml d'acétonitrile sec, on ajoute sous agitation magnétique 1.2 g de réactif K de Woodward et 1 ml de triéthylamine. Après 2 h d'agitation magnétique 1 g d'amine (4a ou 5a) est additionné et la température est maintenue à 0°C pendant 5 h puis à 8°C pendant 48 h. Après évaporation du solvant le produit est repris par du chloroforme (100 ml), lavé à l'eau (5 ml) à l'aide d'une solution normale d'acide chlorhydrique (5 ml), d'une solution saturée de bicarbonate de sodium (5 ml) puis à l'eau (5 ml). Après évaporation du solvant et chromatographie on obtient les amides 7a (Rdt = 37%) ou 6a (Rdt = 20%) pures, identifiées sous forme de diacétate par comparaison aux échantillons obtenus par la méthode A.

Méthode via l'anhydride mixte. A une solution refroidie à 0°C de 2 g d'acide 16 dans 30 ml d'acétone on ajoute 3.5 ml de triéthylamine dans 30 ml d'acétone puis, goutte à goutte 3 ml de chloroformate d'éthyle dissous dans 15 ml d'acétone. Une chromatographie sur plaque de silice montre la formation de l'anhydride mixte ($R_f = 0.9$; éluant éther). On ajoute alors 1.3 g d'amine (4b ou 5b) dissous dans 75 ml d'acétone. La température étant maintenue à 0°C on laisse la manipulation sous agitation magnétique pendant 12 h. On filtre le chlorhydrate de triéthylamine qui a précipité, évapore le filtrat qui, repris par le chloroforme est lavé à l'eau. Après séchage et évaporation du solvant le produit brut obtenu est chromatographié sur colonne de silice.

On obtient les dérivés 7c ou 6c purs qui ne sont pas recristallisés. Amide 7c. Rdt = 80%; $[\alpha]_D = -68^\circ$ (c = 0.5); C₁₂H₁₄O₂N(C, H, N); RMN: 0.72 (s, CH₃-18); 1.04 (s, CH₃-19); 3.20-4.10 (large massif; 7H adjacents à un oxygène); 4.55 et 4.68 (2s élargis, 2H en α de 2O); 5.35 (m, H-6 et NH). Amide 6c. Rdt = 75%; C₁₂H₁₄O₂N(C, H, N); RMN: 0.82 (s, CH₃-18); 0.99 (s, CH₃-19); 0.875 (d, J = 6, CH₃ en 17a).

Régénération des alcools

500 mg de dérivés 7c ou 6c dissous dans 25 ml de méthanol sont chauffés à reflux en présence de 25 mg d'acide paratoluène sulfonique pendant 1 h. Le produit est versé dans l'eau, extrait à l'éther puis lavé au bicarbonate de sodium et à l'eau. Après évaporation du solvant, les produits obtenus sont acétyles. On obtient ainsi les dérivés 7b et 6b qui sont purifiés par cristallisation.

Dérivés nitrés 8 et 9

4.5 ml d'Acide nitrique fumant (d 1.49) sont ajoutés (en 5 min) à une solution de 1.2 g de Δ₅ stéroïde (6b ou 7b) dans 45 ml d'acide acétique à température ambiante. Au bout de 50 min, le produit est versé dans l'eau, filtré, dissous dans le chloroforme et lavé jusqu'à neutralité. Après chromatographie sur plaque de silice fluorescente (deux éluations AcOEt/hexane: 1/2) on obtient les dérivés nitrés purs et on récupère parfois un peu de produit de départ. Dérivé 9. R_f = 0.33 (éluant AcOEt/hexane: 1/1); Rdt_{max} = 62% (à partir de 1.2 g de produit de départ); $[\alpha]_D = -75^\circ$ (c = 1) C₁₂H₁₄O₂N₂(C, H, N); RMN: 0.72 (s, CH₃-18); 1.15 (s, CH₃-19); 5.50 (d élargi, J = 10, NH). Dérivé 8. R_f = 0.5 (éluant AcOEt/hexane: 1/1); $[\alpha]_D = -45^\circ$ (c = 1) C₁₂H₁₄O₂N₂(H, H, N); Rdt_{max} = 30% (à partir de 500 mg de produit de départ; on récupère 200 mg de produit de départ qui n'ont pas réagi; R_f = 0.6); RMN: 0.83 (s, CH₃-18); 1.13 (s, CH₃-19); 0.90 (d, J = 6, CH₃ en 17a); 5.55 (d élargi, J = 12, NH).

Amines 10 et 11. 440 mg de dérivé nitré (8 ou 9) sont dissous dans 10 ml d'acide acétique et hydrogénés sous une pression de 50 kg/cm² en présence de catalyseur Adams (PtO₂) pendant 20 h. Après filtration et évaporation du solvant on obtient l'amine qui est utilisée sans purification.

Amides 12 et 13. A une solution à 0°C de 480 mg de N-CBZ histidine dans 30 ml d'acétonitrile on ajoute 400 mg de réactif K de Woodward et 0.3 ml de triéthylamine. Après 2 h 400 mg d'amine sont additionnées et l'agitation poursuivie à 0°C pendant 48 h. Après évaporation du solvant le produit est dissous dans le chloroforme et lavé successivement par l'eau, le bicarbonate de sodium en solution à 10% puis par l'eau. Après purification sur colonne de silice on obtient le produit cherché pur. Produit 13: le produit brut est chromatographié sur une colonne de 40 mg de silice (inférieur à 0.08 mm) éluté successivement par des mélanges de 200 ml d'AcOEt + 4 ml de MeOH et 300 ml d'AcOEt + 15 ml de MeOH. Les fractions recueillies sont de 50 ml, les fractions 6 à 15 contiennent le produit cherché pur: 216 mg. Le produit cristallise difficilement du méthanol (56 mg sont obtenus à partir de 500 mg, après trois cristallisations successives). Rdt = 35%; F = 96-98°C (3 crist. MeOH); $[\alpha]_D = -25^\circ$ (c = 0.8) C₁₂H₁₄O₂N(C, H, N); RMN: 0.675 (s, CH₃-18); 0.83 (s, CH₃-19); 2.05 (s, 2CH₂-COO); 3.00 (m, CH₃ en α imidazole); 4.00 (t élargi, J = 6, CH₂-OAc); 3.5 à 4.2 (2m, H-6 et H-7); 4.5 (m, H-3); 5.1 (s, -O-CH₂-Ph); 5.5 (d élargi, J = 9, NH); 6.75 et 7.52 (2s, 2H-imidazole); 7.35 (s, 5H aromatiques). Produit 12: le produit brut est chromatographié sur colonne de 40 g de silice (0.05-0.2 mm), éluté par des fractions de 100 ml d'AcOEt auxquelles on ajoute successivement 1, 2, 5 puis 20 ml de méthanol. Les fractions recueillies sont de 20 ml, les fractions 14 à 20 contiennent 140 mg du produit attendu. $[\alpha]_D = -19^\circ$ (c = 0.7); C₁₂H₁₄O₂N(C, H, N); RMN: 0.81 (s, CH₃-18); 0.94 (s, CH₃-19); 0.96 (d, J = 6, CH₃ en 17a).

Produits 1 et 2. 16 mg de produit 12 ou 13 sont laissés à température ambiante pendant une 10 h dans 1 ml de soude méthanolique 0.5 N. On ajoute alors 0.8 ml d'eau distillée puis on neutralise (pH = 7) le mélange à l'aide d'une solution N d'HCl (environ 0.5 ml). Le plus souvent un produit blanc chute (si le produit ne chute pas il suffit d'évaporer un peu de méthanol), on ajoute encore 1 ml d'eau et laisse le mélange 12 h à 8°C. Le produit

recueilli est filtré, lavé abondamment à l'eau distillé, à l'éther, puis à l'eau distillée. Les tentatives de recristallisation ont été vaines, mais le produit obtenu est pur (RMN, analyse). $C_{20}H_{14}O_4N_2(C, H, N)$ et $C_{42}H_{34}O_4N_2(C, H, N)$.

Produits et appareils utilisés dans études cinétiques

L'acétate de paranitrophényle commercial est recristallisé dans un mélange éthanol-eau, $F = 77.5-78^\circ C$. Les catalyseurs 1, 2 et 21 utilisés au cours des différentes cinétiques proviennent tous du même lot de synthèse et sont de pureté identique. L'isopropanol a été distillé sur sulfate de magnésium ($E_b = 82^\circ C$). Les pH sont maintenus constants au moyen de tampons HEPES (acide N-2-hydroxy-éthylpipérazine-N'-2 éthane sulfonique). Des solutions 0.1 M de cet acide auxquelles on ajoute les quantités adéquates de soude 0.5 M permettent de préparer les tampons pH = 7, pH = 7.5 et pH = 8. La force ionique est maintenue constante ($\mu = 0.8$) par addition de chlorure de potassium 4 M. Les faibles volumes de solution sont prélevés à l'aide de micropipettes de Pedersen. Le spectrophotomètre est un Cary-118 (Varian) muni d'un dispositif de thermostatisation (température $38 \pm 1^\circ C$). Le contrôle du pH est effectué avant et après chaque réaction au moyen d'un pH-mètre (Orion 601-A) muni d'une électrode combinée (Orion semi-micro 91-02). La précision sur les mesures effectuées à $38^\circ C$ est d'environ 0.02 unité de pH.

Mesure des constantes de dissociation des acides et des phénols

Les constantes de dissociation ont été déterminées par dosages potentiométrique dans les conditions de l'expérience.

Le stéroïde est dosé à $38^\circ C$ sous forme de chlorhydrate (addition d'HCl) à une concentration de $5 \times 10^{-3} M$. Dans un mélange isopropanol-eau (50% v/v) la force ionique étant ajustée à $\mu = 0.8$ par addition de chlorure de potassium. La titration est effectuée par addition de soude $5 \times 10^{-3} M$.

Les pK_a sont déterminés en différents points de la courbe par la relation:

$$pK_a = pH - \log \frac{[C]}{[CH^+]}.$$

C: concentration en imidazole libre

CH^+ : concentration de la forme protonée de l'imidazole.

Ce sont des pK_a apparents déterminés dans les conditions de l'expérience, ils ne seront donc pas corrigés.

Mesure des vitesses

Les vitesses des réactions ont été déterminées en dosant par spectrophotométrie visible le *p*-nitrophenate libéré. A 400 nm les réactifs et produits n'absorbent pas, on peut donc à cette longueur d'onde enregistrer la variation de la concentration en ion phénate en fonction du temps. Les cinétiques sont directement effectuées dans la cuve de spectrophotométrie.

Pour un mode opératoire type dans la cuve thermostatée du spectrophotomètre, nous laissons incuber un mélange de 200 μl d'une solution de chlorure de potassium 4 M, 300 μl d'une solution tampon 0.1 M, 250 μl d'isopropanol et 200 μl de la solution de stéroïde $10^{-3} M$ dans l'isopropanol. Après environ 5 min d'incubation 50 μl de la solution de substrat $10^{-3} M$ dans l'isopropanol sont ajoutés et l'apparition de paranitrophénate enregistrée. La cuve témoin contient tous les produits à la même concentration que dans la cuve de mesure, sauf l'ester.

Détermination des constantes de vitesses

Après intégration l'éqn (1) peut être mise sous la forme

$$\ln \frac{D_\infty - D_t}{D_\infty} = k_{cat} t,$$

puisque les densités optiques D_∞ et D_t sont proportionnelles aux concentrations en phénate à l'instant t et au temps ∞ . La pente k_{cat} de la droite $\ln(D_\infty - D_t)$ en fonction du temps est calculée par la méthode des moindres carrés. L'erreur sur k_{cat} est généralement faible (indice de corrélation supérieur à 0.9998 pendant 70 à 80% de la réaction suivant la rapidité de la réaction et la quantité de catalyseur). La reproductibilité est de 5%.

Remerciements—Les auteurs remercient Madame Laloi-Diard pour ses conseils dans la partie cinétique.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹T. C. Bruice et S. J. Benkovic, *Bio-organic Mechanisms*. Benjamin, New York (1966).
- ²D. M. Blow, *Accounts Chem. Res.* **9**, 145 (1976).
- ³G. R. Pettit, R. L. Smith, A. K. Das Gupta et J. I. Ocolowitz, *Can. J. Chem.* **45**, 501 (1967).
- ⁴G. Defaye et M. Fétizon, *Bull. Soc. Chim. Fr.* 1632 (1969).
- ⁵R. Robinson et L. H. Smith, *J. Chem. Soc.* 1847 (1937).
- ⁶Y. S. Klausner et M. Bodansky, *Synthesis* 453 (1972).
- ⁷R. B. Woodward et R. A. Olofson, *J. Am. chem. soc.* **83**, 1007 (1961).
- ⁸G. R. Pettit, R. L. Smith et H. Klinger, *J. Biol. Chem.* **10**, 145 (1967).
- ⁹Nguyen-Dang Tâm, *Bull. Soc. Chim. Fr.* 3805 (1967).
- ¹⁰M. L. Bender et B. W. Turnquest, *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 1652 (1957).
- ¹¹S. Shinkai et T. Kunitake, *Bull. Chem. Soc. Japan* **44**, 3086 (1971).
- ¹²C. A. Blyth et J. R. Knowles, *J. Am. chem. soc.* **93**, 3017 (1971).
- ¹³D. Oakenfull, *J. Chem. soc. Perkin II* 1006 (1973).
- ¹⁴J. P. Guthrie et Y. Ueda, *J. Chem. soc. Chem. Comm* 991 (1974).