

Pro Element wurden je 13,5 ml Phase eingefüllt, aber pro Verteilungsschritt nur 10 ml (75%) der obern Phase transportiert. Bei einem mittleren Verteilungskoeffizienten des γ -Globulins von 1,51 entspricht dies einer Verteilungszahl von 0,8 (Verhältnis des pro Schritt aus einem Element transportiertes gelöstes zum verbleibenden Material [1]). Nach einigen Probeschritten wurden in den ersten 4 Gläsern 104 ml Phasenpaar, enthaltend 2,75 g γ -Globulin, eingefüllt und mit der automatischen Verteilung über 200 Transfers begonnen. In jedem Verteilungsschritt, der ca. 15 min dauerte, wurde 6 min zur Gleichgewichtseinstellung gemischt und 6 min zentrifugiert.

Das Phasenverhältnis betrug je nach Versuch 1:1 oder 1:2 leichte zu schwerer Phase. Pro Verteilungsschritt wurden $\frac{2}{3}$ bis $\frac{3}{4}$ des Phasenvolumens an mobiler Phase injiziert. Dieses Volumen ist zugleich dasjenige der Fraktionen.

Die Untersuchungen wurden vom SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS unterstützt (Gesuch Nr. 3091), wofür ich seinen Behörden bestens danke. Der Blutspendedienst des Schweiz. Roten Kreuzes stellte humanes γ -Globulin zur Verfügung. Herrn Prof. FEY vom veterinär-bakteriologischen Institut der Universität Bern danke ich für die Überlassung des Colostrum-Serums, die Ausführung der Immunelektrophoresen und die Bestimmungen der Antikörpertiter. Für die treue Mitarbeit bin ich meinen Laboranten K. BAUMANN, U. GSTEIGER, C. WÜTHRICH und A. ZENATY zu Dank verpflichtet.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 3. Mitteilung: P. v. TAVEL & W. BOLLIGER, *Helv. 51*, 278 (1968).
 [2] C. A. WILLIAMS & M. W. CHASE, «Methods in Immunology and Immunochemistry», Vol. 1, (Academic Press, New York 1967).
 [3] R. R. PORTER, *Biochem. J.* 59, 405 (1955).
 [4] P. v. TAVEL, *Helv.* 45, 1576 (1962).
 [5] R. R. PORTER, *Biochem. J.* 53, 320 (1953).
 [6] P. v. TAVEL, *Helv.* 38, 520 (1955).
 [7] J. N. BRÖNSTED, *C. r. Trav. Lab. Carlsberg, Sér. chim.* 22, 99 (1938).
 [8] HOUBEN-WEYL, «Methoden der organischen Chemie», Bd. I/1, 257 (1958).
 [9] L. ORNSTEIN, *Ann. New York Acad. Sci.* 121, 321 (1964); J. DAVIS, *ibid.* 121, 404 (1964).

174. Echange d'oxygène lors de la substitution électrophile des phénols

par H. Dahn et J.-D. Aubort¹⁾

Institut de Chimie organique, Université de Lausanne

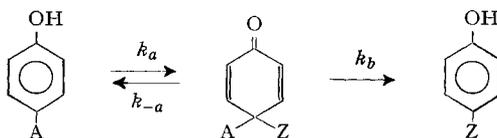
(13 VII 68)

Summary. In the bromodesulfonation of sodium 2,6-dibromophenol-4-sulfonate (I) and similar compounds, the relatively stable quinoloid intermediate II exchanges its carbonyl oxygen with that of $H_2^{18}O$ by an addition-elimination process. The exchange is slower than the formation of the product III; it is roughly comparable to the exchange velocity of quinones of similar structure. By reversibility of the electrophilic addition step, ^{18}O is incorporated into the starting phenol I. In electrophilic substitutions with shorter life-time of the quinoloid intermediate, the oxygen exchange is difficult or impossible to observe.

Le mécanisme généralement adopté pour la substitution électrophile des phénols comporte un produit intermédiaire, de structure quinoloïde [1]. Dans certains cas, lorsque la seconde étape (élimination) est très lente par rapport à la première ($k_a (> k_{-a}) \gg k_b$), l'intermédiaire quinoïde peut être observé directement, par exemple par spectrophotométrie dans l'UV. ou par spectrométrie de RMN. [2] [3].

¹⁾ Extrait de la thèse de J.-D. AUBORT, Lausanne 1968.

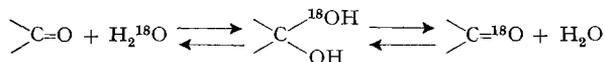
On a constaté que deux facteurs peuvent ralentir l'étape d'élimination (k_b): a) l'encombrement stérique dans le voisinage du groupe $-OH$ du phénol [4]; b) le renforcement de la liaison du groupe partant au noyau: $A = -H < -COO^\ominus < -SO_3^\ominus < -Me$ [5].



Ainsi, lors de la bromodésulfonation du dibromo-3,5-hydroxy-4-benzènesulfonate de Na (I), CANNELL [2] a démontré l'existence d'un intermédiaire quinoloïde II par spectrophotométrie dans l'UV.; sa transformation en produit de réaction III (élimination, k_b) a été suivie par iodométrie.

Par contre, lors de réactions de bromodéprotonation ou de diazocopulation, l'élimination étant rapide, la durée de vie de l'intermédiaire quinoloïde est insuffisante pour permettre son observation directe. Des méthodes indirectes ont été alors utilisées pour démontrer son existence, telles que l'observation d'un effet isotopique cinétique, et l'étude de la catalyse basique [4] [6].

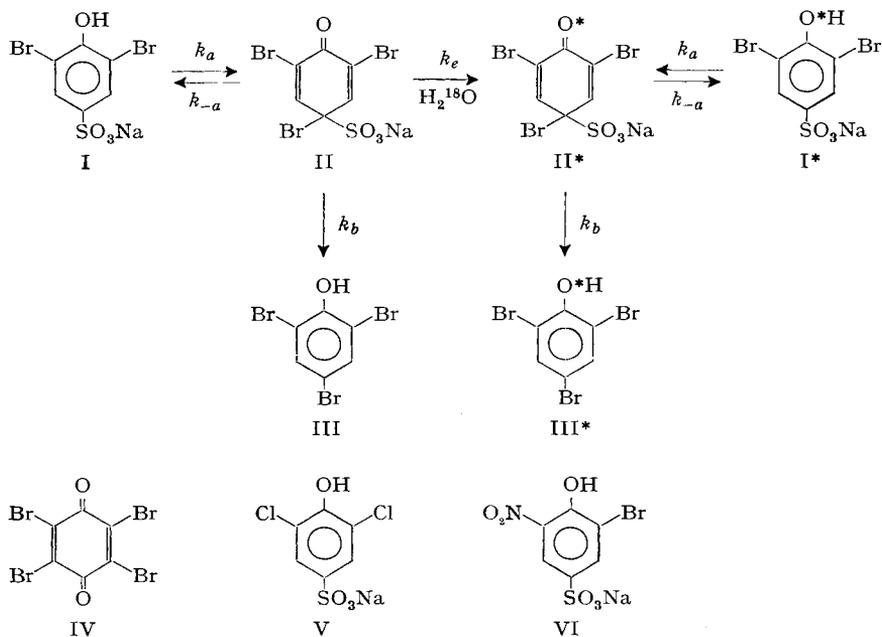
Nous nous sommes proposé d'examiner une nouvelle méthode pour la détection des intermédiaires quinoloïdes en cours de substitution électrophile des phénols. On sait que le groupe carbonyle échange son oxygène avec celui de H_2O , par un mécanisme d'addition-élimination (formation transitoire d'un hydrate), ce dont les phénols sont incapables, dans des conditions douces [7].



Lors de la substitution électrophile d'un phénol dans H_2O , l'intermédiaire quinoloïde, s'il se forme, peut subir un échange d'oxygène de son groupe carbonyle. En utilisant un traceur (oxygène-18 ou -17), l'intermédiaire serait ainsi marqué, formant un produit de réaction également marqué.

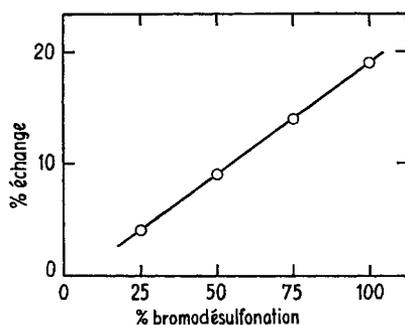
Les cétones α,β -insaturées échangent leur oxygène plus lentement que les cétones saturées, mais nous avons observé dans un travail antérieur [8] que les *p*-benzoquinones (structures analogues aux intermédiaires quinoloïdes) échangent leur oxygène avec celui de $H_2^{18}O$, lorsqu'elles sont substituées par des attracteurs d'électrons. Parallèlement, de tels substituants ralentissent la substitution électrophile, ce qui est favorable à l'observation de l'intermédiaire. Ainsi, la durée de vie de l'intermédiaire II de la bromodésulfonation de I [2] étant comparable au temps d'échange total de la quinone IV [8], nous pouvions prévoir un échange isotopique significatif au cours de cette réaction.

La bromodésulfonation de I a donc été étudiée au moyen du traceur ^{18}O . Les phénols enrichis en ^{18}O étant délicats à préparer, nous avons étudié la réaction de I isotopiquement normal avec Br_2 dans $H_2^{18}O$. Une vérification préliminaire a permis de montrer que I, comme la plupart des phénols [9] [10], n'échange pas son oxygène avec $H_2^{18}O$ dans des conditions douces (voir partie expérimentale). De même, le produit de réaction (tribromo-2,4,6-phénol, III), qui est complètement insoluble dans l'eau,



n'échange pas son oxygène avec $H_2^{18}O$, même dans des conditions plus draconiennes [10]²⁾.

Lors de la réaction de I avec un défaut³⁾ de Br_2 dans $H_2^{18}O$, à 25,0°, en présence d'une faible quantité de HBr, nous avons observé la formation de produit III* enrichi en ^{18}O . L'accumulation de traceur, après bromodésulfonation totale, n'est toutefois que partielle, de l'ordre de 20% de l'enrichissement du milieu réactionnel en ^{18}O . - Nous avons observé, d'autre part, que l'accumulation de traceur s'effectue progressivement au cours de la bromodésulfonation. En isolant le produit bromodésulfonné



Accumulation du traceur en fonction du progrès de la bromodésulfonation de I

²⁾ A première vue, un échange lent de III via une bromodé bromation [2] est possible; cependant, nous avons toujours utilisé un défaut de Br_2 , ce qui exclut cette réaction.

³⁾ En présence d'un excès de Br_2 , la bromodésulfonation est accompagnée de réactions parasites [2].

après achèvement de la réaction à 25, 50, 75 et 100%, nous avons constaté que l'accumulation de traceur (exprimé en % d'échange, voir partie expérimentale) est proportionnelle au progrès de la bromodésulfonation (figure).

Pour préciser le phénomène de l'échange isotopique en cours de bromodésulfonation, nous avons entrepris des essais systématiques avec les substrats I, V et VI, en faisant varier les conditions de réactions (résultats v. tableau).

On constate que l'échange isotopique en cours de réaction est d'autant plus important que le rapport $[\text{Br}_2]/[\text{substrat}]$ est plus grand. Nous interprétons cette observation de la façon suivante:

L'addition de Br_2 sur le substrat I étant réversible $[2]^4$, l'intermédiaire échangé II^* (enrichi en ^{18}O) formera, à la vitesse définie par k_{-a} (étape inverse de l'addition), le substrat I^* , enrichi en ^{18}O . Lorsque l'excès initial de substrat I est nul, l'ensemble de I^* est transformé, une fois la bromodésulfonation terminée, en produit de réaction III^* . Par contre, lorsque l'excès initial de I est important, la fraction de I qui ne participe pas à la réaction va diluer I^* marqué. La bromodésulfonation terminée, le produit de réaction III^* (formé à partir de I^* marqué, dilué) aura donc un marquage d'autant plus faible que l'excès initial de substrat I est plus grand.

Pour étayer notre hypothèse du marquage de I au cours de la bromodésulfonation, nous avons procédé à une vérification. Celle-ci serait simple à effectuer, si le substrat

Echange isotopique en cours de bromodésulfonation

Solvant: H_2^{18}O (1,5–2 at.-% ^{18}O en excès); température $25,0^\circ \pm 0,1^\circ$						
Essai	Substrat	$[\text{substrat}]$ moles $\cdot \text{l}^{-1}$ (de solvant)	$[\text{Br}_2]$	$[\text{HBr}]$	$[\text{Br}^-]^a)$	% échange $^b)$
1	I	0,050	0,040	0,009	0,062	26
2		0,100	0,080	0,000	0,036	27
3		0,100	0,078	0,000	0,078	24
4		0,100	0,080	0,017	0,124	19
5		0,100	0,080	0,017	1,124	25
6		0,100	0,080	0,285	0,392	24
7		0,200	0,080	0,017	0,124	10
8		0,300	0,080	0,017	0,124	9
9	V	0,050	0,040	0,009	0,062	39
10		0,100	0,078	0,000	0,078	36
11		0,100	0,080	0,017	0,124	28
12		0,100	0,080	0,285	0,392	32
13		0,200	0,080	0,017	0,124	17
14		0,300	0,080	0,017	0,124	10
15	VI	0,100	0,078	0,000		4
16		0,100	0,080	0,017		5
17		0,100	0,080	0,285		3
18		0,200	0,080	0,017		0

^{a)} Voir partie expérimentale.

^{b)} Valeurs calculées pour I et V, en admettant que la formation de l'intermédiaire (k_a), initialement, est stœchiométrique.

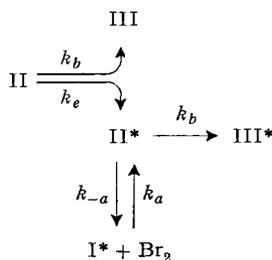
⁴⁾ Nous avons pu confirmer par RMN. l'observation de CANNELL [2]: l'addition de Br^\ominus diminue la concentration de II (voir partie expérimentale).

non entré en réaction pouvait être isolé, et son contenu isotopique, dosé. En réalité, l'isolement, la purification et l'analyse isotopique⁵⁾ des *p*-phénolsulfonates de Na sont très délicats. Nous avons procédé de manière indirecte.

Un premier essai (essai 7 du tableau) a été effectué avec un excès de substrat I de 150%. La bromodésulfonation terminée, le produit de réaction III, formé quantitativement et insoluble dans l'eau, a été filtré et soumis à l'analyse isotopique: on a constaté un échange de 10%. Le filtrat de ce premier essai, contenant l'excès de I non entré en réaction, a été additionné d'une nouvelle quantité de Br₂ (essai 19). Le produit III de cette seconde opération a été également soumis à l'analyse isotopique: on a constaté un échange de 37%.

Si, lors de la première opération, le substrat I non entré en réaction ne s'était pas enrichi en ¹⁸O, l'échange au cours de la seconde (où l'excès de substrat est de 60%) aurait dû être de l'ordre de 15% (estimation sur la base des valeurs du tableau). L'échange de 37% que nous avons observé montre bien que le substrat non entré en réaction au cours de la première réaction a accumulé du traceur⁶⁾.

Estimation des vitesses d'échange. Pour les bromodésulfonations de I et de V, où $k_b < k_{-a} < k_a$ [2] [5], on peut considérer que, au niveau de l'intermédiaire⁷⁾, l'échange isotopique (k_e) et l'élimination (k_b) forment un système de réactions concurrentes respectivement de pseudo-premier ordre et de premier ordre. Voici le schéma pour la réaction de I:



Le produit de l'élimination irréversible (k_b) subie par II est III, fraction isotopiquement normale du produit de réaction. Si la réaction est effectuée avec des quantités équimoléculaires de I et de Br₂, le corps II*, formé de manière irréversible à partir de II (k_e) sera, en fin de réaction, intégralement transformé en III*, fraction marquée du produit de réaction. La réaction réversible entre II* et I* (k_a et k_{-a}) n'y change rien, pour autant que I ne soit pas initialement en excès par rapport à Br₂, et pour autant que l'on mesure l'échange isotopique pour l'ensemble de la bromodésulfonation.

Les constantes k_a et k_{-a} étant très supérieures aux constantes k_e et k_b , le système concurrent est en réalité observable tout au long de la réaction, ainsi que le montre la relation % d'échange/% de bromodésulfonation, relation qui est linéaire, compte tenu des incertitudes de mesures (figure).

⁵⁾ Les 3 atomes de O du groupe -SO₃Na provoquent, en cours d'analyse isotopique, une dilution du traceur par un facteur 4.

⁶⁾ Une preuve analogue a été apportée lors de la mesure de l'accumulation de traceur en fonction de l'avance de la bromodésulfonation (voir partie expérimentale).

⁷⁾ L'équilibre de formation de l'intermédiaire peut être négligé, car $k_a \gg k_{-a}$.

Dans le produit de réaction (III + III*), la fraction isotopiquement normale III sera donc proportionnelle à k_b , alors que la fraction marquée III* sera proportionnelle à k_e . L'analyse isotopique du produit de réaction permet ainsi de déterminer le rapport des constantes k_e et k_b :

$$\frac{k_e}{k_b} = \frac{[\text{III}^*]}{[\text{III}]} = \frac{\% \text{ échange}}{100 - (\% \text{ échange})}$$

Cette relation nous a permis d'évaluer les rapports k_e/k_b pour les bromodésulfonations de I et de V: pour I, $k_e/k_b = 0,23$ (essai 4, tableau), pour V, $k_e/k_b = 0,39$ (essai 11, tableau). Ces valeurs ne sont qu'approximatives, car l'excès initial de substrat, qui devrait être nul pour une détermination correcte, est ici de 25%.

Afin d'évaluer les valeurs de k_e , nous avons mesuré, par spectrophotométrie dans l'UV., les constantes de vitesse d'élimination k_b (voir partie expérimentale). Pour la bromodésulfonation de I, nous avons trouvé $k_b = 5,98 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, valeur proche de celle trouvée par CANNELL [2]⁸⁾, $k_b = 5,49 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$; pour la bromodésulfonation de V, nous avons obtenu $k_b = 5,29 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$. Nous avons constaté que les cinétiques de ces deux réactions sont en excellent accord avec le premier ordre.

Les valeurs de k_b et des rapports k_e/k_b nous ont permis d'évaluer les valeurs de k_e , constantes de vitesse d'échange des intermédiaires quinoïdes; nous les avons comparées aux constantes de vitesse d'échange (de pseudo-premier ordre également) des *p*-benzoquinones tétrahalogénées correspondantes, mesurées précédemment [8]. La constante $k_e = 1,4 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ de l'intermédiaire dibromé II est d'une grandeur comparable à celle de la constante de vitesse d'échange du bromanil: $1,10 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ (mesurée dans le tétrahydrofurane en milieu neutre, à 25,0° [8]). De même, la constante $k_e = 2,1 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ de l'intermédiaire dichloré de la bromodésulfonation de V est de l'ordre de grandeur de la constante de vitesse d'échange du chloranil: $5,95 \cdot 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ (mesurée également dans le tétrahydrofurane en milieu neutre, à 25,0° [8]).

Bien que les constantes de vitesse d'échange des intermédiaires quinoïdes et des quinones aient été mesurées dans des conditions très différentes (solvant et pH), on constate qu'elles sont du même ordre de grandeur. D'autre part, la chloration en position α par rapport au groupe carbonyle conduit à un échange plus rapide que la bromation, ceci tant pour les intermédiaires quinoïdes que pour les quinones.

Le substrat VI, qui comporte un groupe nitro, ne forme pas d'intermédiaire décelable par spectrophotométrie UV. ou par spectrométrie de RMN. (voir partie expérimentale); ceci est en accord avec la déstabilisation générale des systèmes quinoïdes par des groupes nitro [5]. Toutefois, un faible échange isotopique en cours de bromodésulfonation ($\leq 5\%$) permet de conclure à la formation d'un intermédiaire, quoiqu'en très faible concentration; la constante k_b doit être de valeur élevée par rapport à k_a et k_{-a} .

Nous avons encore constaté que l'influence de l'acidité du milieu et de la concentration en Br^\ominus sur l'échange isotopique lors des bromodésulfonations de I, V et VI est faible. Cette observation est en accord avec les conclusions de CANNELL [2] pour l'étude cinétique de la réaction de 1.

⁸⁾ Mesurée par iodométrie, les conditions de réaction étant analogues.

Nous avons appliqué la même méthode à l'étude des réactions d'halogénéation de phénols suivantes:

- a) phénol-4-sulfonate de Na + 2 Br₂ → dibromo-3,5-hydroxy-4-benzènesulfonate de Na;
- b) nitro-4-phénol + 2 Br₂ → dibromo-2,6-nitro-4-phénol;
- c) nitro-4-phénol + I₂ → iodo-2-nitro-4-phénol;
- d) chloro-2-nitro-6-phénol + I₂ → chloro-2-iodo-4-nitro-6-phénol;
- e) acide dibromo-3,5-hydroxy-4-benzoïque + I₂ → dibromo-2,6-iodo-4-phénol (iododécarboxylation).

Dans aucun cas nous n'avons observé un échange isotopique significatif. Les intermédiaires quinoïdes, s'il s'en forme, ne doivent donc pas posséder un temps de vie suffisant pour leur permettre d'échanger leur oxygène avec H₂¹⁸O. Les valeurs élevées des constantes k_b par rapport aux constantes k_a , k_{-a} et k_e , ou les valeurs très faibles des rapports k_a/k_{-a} peuvent expliquer ces constatations.

On peut ainsi définir les conditions pour l'observation d'un échange significatif lors de la substitution électrophile d'un phénol:

$$1. k_a > k_{-a} > k_b, \quad 2. k_e \gtrsim k_b.$$

L'enrichissement en ¹⁸O du milieu réactionnel, ainsi que la précision (sensibilité) des analyses isotopiques jouent un rôle important. En admettant que la condition 1 soit remplie (intermédiaire quinoïde formé en grande concentration) et que l'on puisse déceler avec certitude un enrichissement de 0,05 at.-% ¹⁸O dans le produit de réaction, l'utilisation d'un solvant contenant 1 at.-% ¹⁸O permettra l'identification d'un intermédiaire pour lequel $k_e/k_b = 0,05$. Avec un solvant contenant 50 at.-% ¹⁸O, un intermédiaire sera déjà décelé pour $k_e/k_b = 0,001$, soit une élimination 1000 fois plus rapide que l'échange isotopique. Mais si la condition 1 n'est pas remplie (intermédiaire formé en faible concentration), une telle discussion est alors impossible.

Dosage de ¹⁸O. La stabilité exceptionnelle de phénols halogénés ne permet pas l'application de la méthode de DAHN, MOLL & MENASSÉ [11]; une dégradation plus énergique est nécessaire.

Certains réactifs permettent une dégradation de la substance analysée avec transformation de son oxygène en CO₂, dont la teneur en ¹⁸O est dosée par spectrométrie de masse: HgCl₂ [12], le mélange HgCl₂-Hg(CN)₂ [13], le chlorhydrate de guanidine [14] et le mélange HgCl₂-chlorhydrate de guanidine [15] ont été proposés. Ces procédés présentent divers désavantages, notamment la formation parasite de HCl, difficile à éliminer [11], ou les difficultés de purification et de conservation du réactif [15].

Nous avons élaboré un nouveau procédé de dégradation qui consiste à chauffer la substance 3–12 h à 300° avec l'un des deux réactifs suivants, de même efficacité: un mélange dicyandiamide-HgCl₂ ou un mélange mélamine-HgCl₂⁹⁾. Dans le CO₂ formé, à teneur en ¹⁸O identique à celle de la substance analysée, on dose le traceur par spectrométrie de masse¹⁰⁾. Cette méthode présente les avantages suivants:

⁹⁾ Le choix de ces réactifs a été déterminé par la présence, dans leurs structures, du groupe >C=N-, qui paraît être le centre réactif: H₂O est ainsi transformée en CO₂ [14].

¹⁰⁾ Ce procédé d'analyse ne permet évidemment pas le dosage différencié de ¹⁸O dans des substances possédant plusieurs atomes de O de contenus isotopiques différents.

- a) les réactifs de dégradation sont aisés à manipuler et à conserver;
- b) la dégradation de substances organiques très diverses peut être ainsi effectuée (des halogéno- et amino-phénols, des cétones et quinones, des acides carboxyliques et leurs dérivés, ainsi que des composés nitroso ont été dégradés avec succès);
- c) il ne se forme pas de HCl lors de la dégradation, ce qui simplifie considérablement la purification du CO₂.

Partie expérimentale

Les F. sont corrigés. Les mesures spectrométriques ont été réalisées au moyen des appareils suivants: IR.: BECKMAN, modèle IR-5; UV.: BECKMAN, modèle DB-G, couplé à un enregistreur de même marque, modèle «10 inches»; RMN.: VARIAN, modèle A 60-A. Les analyses centésimales ont été effectuées par le Dr K. EDER, au Laboratoire microchimique de l'École de Chimie, Université de Genève. Les dosages finals de ¹⁸O par spectrométrie de masse, ont été réalisés par le Prof. M. THÜRKAUF, à l'Institut de Chimie physique de l'Université de Bâle, et par le PD. Dr P. BAERTSCHLI, à l'Institut Fédéral pour l'Etude des Réacteurs, Würenlingen.

Substrats. – *Dibromo-3,5-hydroxy-4-benzènesulfonate de Na (I)*: le *p*-phénolsulfonate de Na a été bromé par un procédé modifié de ALLAIN-LE CANU [16]. Après recristallisation dans l'eau on a obtenu, avec un rendement de 52%, un produit de poids équivalent 354 (calc. 353,98). – *Sel de S-benzylisothio-uronium* (préparé selon [17]): F. 201–202°.

C₁₄H₁₄Br₂N₂O₄S₂ (494,27) Calc. C 34,02 H 2,86 N 5,67% Tr. C 33,90 H 2,71 N 5,61%
Dichloro-3,5-hydroxy-4-benzènesulfonate de Na (V): le dichloro-2,6-phénol a été sulfoné selon ARMSTRONG [18]. Après 2 recristallisations dans l'eau on a obtenu, avec un rendement de 39%, un produit de poids équivalent 265,5 (calc. 265,06). – *Sel de S-benzylisothio-uronium* (préparé selon [17]): F. 171–172°.

C₁₄H₁₄Cl₂N₂O₄S₂ (405,35) Calc. C 41,48 H 3,48 N 6,91% Tr. C 41,19 H 3,40 N 6,94%

Bromo-3-nitro-5-hydroxy-4-benzènesulfonate de Na (VI): le nitro-3-hydroxy-4-benzènesulfonate de Na, préparé selon KING [19], a été bromé par un procédé modifié de SAKELLARIOS [20]. On a obtenu, avec un rendement de 31%, un produit de poids équivalent 319 (calc. 320,07). – *Sel de S-benzylisothio-uronium* (préparé selon [17]): F. 172–174°.

C₁₄H₁₄BrN₃O₆S₂ (460,36) Calc. C 36,52 H 3,07 N 9,13% Tr. C 36,49 H 3,07 N 9,47%

Bromodésulfonations dans H₂¹⁸O. – a) *Au moyen de Br₂ (essais 3, 10 et 15 du tableau)*. Une solution de 0,040 ml (0,78 mmole) de Br₂ dans 7 ml de H₂¹⁸O (1,5–2 at.-% ¹⁸O en excès) et une solution de 1,00 mmole de substrat (I, V ou VI) dans 3 ml de même solvant sont thermostabilisées à 25,0° ± 0,1° pendant une nuit. Les deux solutions sont mélangées et le mélange est maintenu 24 à 48 h à cette même température, jusqu'à réaction négative au papier ioduro-amidoné. Le produit précipité est alors filtré, lavé par 3 fois 5 ml d'eau, séché sous 10 Torr sur CaCl₂ et soumis au dosage du ¹⁸O. On a calculé les % d'échange, définis par la relation

$$\% \text{ d'échange} = \frac{\text{enrichissement en } ^{18}\text{O du produit de réaction}}{\text{enrichissement en } ^{18}\text{O du milieu réactionnel}} \cdot 100^{11)}.$$

Les produits formés ont été identifiés au moyen de leurs F.: *tribromo-2,4,6-phénol* obtenu à partir de I: F. 93° (litt. [21]: F. 95°); *dichloro-2,6-bromo-4-phénol* obtenu à partir de V: F. 65–66° (litt. [22]: F. 66,5°); *dibromo-2,4-nitro-6-phénol* obtenu à partir de VI: F. 111–114° (litt. [20]: F. 117,5°).

b) *Au moyen de KBrO₃-HBr (essais 1–2, 4–9, 11–14 et 16–18 du tableau)*. Une solution de 1–3 mmoles de substrat (I, V ou VI) et de 0,267 mmole (1,60 méq-ox.) de KBrO₃ dans 10–20 ml de H₂¹⁸O (1,5–2 at.-% ¹⁸O en excès) est thermostabilisée à 25,0° ± 0,1° pendant une nuit. On y ajoute, en agitant soigneusement, 0,1–0,5 ml d'acide bromhydrique azéotropique (47,8% de HBr; 8,90 m). Le mélange est maintenu à 25,0° pendant 24 à 28 h, jusqu'à réaction négative au papier ioduro-amidoné. Le phénol est isolé et analysé comme décrit ci-dessus.

Dans l'essai 5, on a ajouté 10 mmoles de NaBr.

¹¹⁾ L'enrichissement en ¹⁸O du milieu réactionnel est constant au cours de la réaction (très large excès de H₂¹⁸O).

Vérification de l'absence d'échange entre I et H₂¹⁸O en milieu acide. Une solution de 1,5 mmole de I dans 4,5 ml de H₂¹⁸O (1,55 at.-% ¹⁸O en excès) et 0,020 ml (0,18 mmole) de HBr 8,90 M a été maintenue 168 h à 25,0° ± 0,1°. Ensuite, 3 ml de cette solution ont été ajoutés à une solution, également thermostabilisée à 25,0° ± 0,1°, de 0,040 ml (0,78 mmole) de Br₂ dans 7 ml de H₂¹⁸O (1,55 at.-% ¹⁸O en excès). Après plus de 24 h de réaction à la même température (réaction négative au papier ioduro-amidonné), le tribromo-2,4,6-phénol a été isolé et analysé comme décrit plus haut: 0,37 at.-% ¹⁸O en excès, correspondant à un échange de 24%. Dans l'essai 3 (tableau), où I a été en contact avec H₂¹⁸O pendant environ 15 h seulement, l'échange était également de 24%; on en conclut que I, maintenu 168 h en solution acide dans H₂¹⁸O, n'a pas subi d'échange d'oxygène avec le solvant.

Accumulation du traceur au cours de la bromodésulfonation de I (figure). Une solution de 4,00 mmoles de I et 1,068 mmole (6,40 méq-ox.) de KBrO₃ dans 40 ml de H₂¹⁸O (1,70 at.-% ¹⁸O en excès) a été thermostabilisée à 25,0° ± 0,1° pendant une nuit. Au temps $t = 0$ on a ajouté, en agitant soigneusement, 0,800 ml (7,12 mmoles) de HBr 8,90 M dans l'eau. Après 48 min à 25,0°, temps correspondant à 25% de bromodésulfonation¹²⁾, on a filtré rapidement le tribromo-2,4,6-phénol précipité et remplacé immédiatement le filtrat dans le thermostat, pour la suite de la réaction. Cette opération a été répétée après 116 min (50% de bromodésulfonation), 231 min (75%) et plus de 24 h (réaction totale). Les précipités ont été traités comme indiqué plus haut: fraction 1 (0–25% de bromodésulfonation) 0,07 at.-% ¹⁸O en excès; fraction 2 (25–50% de bromodésulfonation) 0,23 at.-% ¹⁸O en excès; fraction 3 (50–75% de bromodésulfonation) 0,40 at.-% ¹⁸O en excès; fraction 4 (75–100% de bromodésulfonation) 0,58 at.-% ¹⁸O en excès.

Après 25% de bromodésulfonation, l'enrichissement en ¹⁸O du produit de réaction était donc de 0,07 at.-% ¹⁸O en excès (soit 4% d'échange); après 50% de bromodésulfonation, il était de $(0,07 + 0,23)/2 = 0,15$ at.-% ¹⁸O en excès (soit 9% d'échange); après 75% de bromodésulfonation, il était de $(0,07 + 0,23 + 0,40)/3 = 0,23$ at.-% ¹⁸O en excès (soit 14% d'échange); après 100% de bromodésulfonation, il était de $(0,07 + 0,23 + 0,40 + 0,58)/4 = 0,32$ at.-% ¹⁸O en excès (soit un échange de 19%, valeur identique à celle trouvée dans l'essai 4 du tableau, effectué dans les mêmes conditions).

Mise en évidence du marquage de I pendant la bromodésulfonation (essais 7 et 19). Après filtration du tribromo-2,4,6-phénol précipité, le filtrat de l'essai 7 (tableau), qui contenait encore 1,20 mmole de I n'ayant pas réagi, a été additionné de 0,100 ml (0,89 mmole) de HBr 8,90 M. Après thermostabilisation à 25,0° ± 0,1°, on a ajouté 0,250 ml (0,25 mmole = 1,50 méq-ox.) de solution 1 M de NaBrO₃ dans l'eau. Après 24 h (réaction négative au papier ioduro-amidonné), le tribromo-2,4,6-phénol précipité a été isolé et analysé comme indiqué plus haut.

Réaction 1 (essai 7): enrichissement du milieu = 1,56 at.-% ¹⁸O en excès, enrichissement du produit de réaction = 0,16 at.-% ¹⁸O en excès, soit un échange de 10%.

Réaction 2 (essai 19): enrichissement du milieu = 1,56 at.-% ¹⁸O en excès, enrichissement du produit de réaction = 0,57 at.-% ¹⁸O en excès, soit un échange de 37%.

Mesures des constantes de vitesse d'élimination k_b par spectrophotométrie dans l'U.V., pour les bromodésulfonations de I et V. – On a mesuré la vitesse de disparition de l'absorption intense des intermédiaires quinoïdes: $\lambda_{max} = 278,5$ nm ($\epsilon = 11\,200$) pour l'intermédiaire de I, et $\lambda_{max} = 270$ nm ($\epsilon = 12\,600$) pour l'intermédiaire de V¹³⁾. – Conditions de réaction: température 25,0° ± 0,1°, solvant = H₂O, [substrat ajouté] = $1,30 \cdot 10^{-4}$ M, [Br₂ ajouté] = $1,04 \cdot 10^{-4}$ M, [HClO₄] = $1,43 \cdot 10^{-2}$ M.

La mesure logarithmique des % d'absorption a permis d'obtenir directement une courbe de la concentration de l'intermédiaire en fonction du temps. Les résultats ont été traités par la méthode de GUGGENHEIM [23], et les constantes k_b de premier ordre ont été calculées par la méthode des moindres carrés.

Mise en évidence de la formation des intermédiaires lors de la bromodésulfonation par RMN. – *Conditions de mesure:* Température – 1,5° ± 0,1°, solvant = D₂O, [substrat ajouté]

¹²⁾ Temps déterminés sur la base de $k_b = 6 \cdot 10^{-3}$ min⁻¹, constante de vitesse de bromodésulfonation de I, mesurée par spectrophotométrie dans l'UV.

¹³⁾ Le substrat VI ne forme pas d'intermédiaire détectable.

= 0,35 M, $[\text{Br}_2 \text{ ajouté}] = 0,21 \text{ M}$, $[\text{NaBr ajouté}] = 0,07 \text{ M}$, $[\text{HBr ajouté}] = 0,05 \text{ M}$. Ces concentrations permettaient de prévoir, si la formation des intermédiaires était stœchiométrique: $[\text{intermédiaire}] = 0,21 \text{ M}$ et $[\text{substrat non transformé}] = 0,14 \text{ M}$.

Résultats: Pour le substrat I, le signal des H de l'intermédiaire était de 175 cps inférieur au signal de H_2O , et le signal des H aromatiques de I non transformé était de 178 cps inférieur au signal de H_2O ; l'intégration de ces signaux a permis de préciser que l'intermédiaire se forme avec un rendement de 58% (par rapport à la stœchiométrie de la réaction).

Pour le substrat V, le signal des H de l'intermédiaire était de 160 cps inférieur au signal de H_2O , et le signal des H aromatiques de V non transformé était de 166 cps inférieur au signal de H_2O ; l'intégration a permis de préciser que l'intermédiaire se forme avec un rendement de 70%.

Pour le substrat VI, le signal des H aromatiques était de 203 cps inférieur au signal de H_2O (quadruplet avec $J = 2,5 \text{ cps}$); aucun signal correspondant à la formation d'un intermédiaire n'a été détecté.

Une seconde série de mesures a été effectuée en présence d'une forte concentration en HBr: température $-1,5^\circ \pm 0,1^\circ$, solvant = H_2O , $[\text{substrat ajouté}] = 0,35 \text{ M}$, $[\text{Br}_2 \text{ ajouté}] = 0,18 \text{ M}$, $[\text{NaBr ajouté}] = 0,06 \text{ M}$, $[\text{HBr ajouté}] = 0,76 \text{ M}$. – *Résultats:* pour les substrats I, V et VI, on n'a pas observé la formation d'intermédiaires.

Halogénations diverses de phénols dans H_2^{18}O – Bromation totale du phénolsulfonate-4 de Na.

Une solution de 1,00 mmole de phénolsulfonate-4 de Na et de 0,933 mmole (5,60 méq-ox.) de KBrO_3 dans 10 ml de H_2^{18}O (2,02 at.-% ^{18}O en excès) a été thermostabilisée à $25,0^\circ \pm 0,1^\circ$ pendant une nuit. On y a ajouté, en agitant, 0,400 ml (3,54 mmoles) de HBr 8,90 M. Après 24 h à $25,0^\circ$, le tribromo-2,4,6-phénol précipité a été isolé et analysé comme indiqué plus haut: enrichissement de 0,51 at.-% ^{18}O en excès, correspondant à un échange de 25% pour les 2 étapes de bromodéprotonation et l'étape de bromodésulfonation.

Afin d'estimer l'échange au cours des étapes de bromodéprotonation, un essai de bromodésulfonation isolée a été effectué, dans des conditions de réaction identiques. Une solution de 1,00 mmole de I, 0,666 mmole de KBr et 0,267 mmole (1,60 méq-ox.) dans 10 ml de H_2^{18}O (2,02 at.-% ^{18}O en excès) a été thermostabilisée à $25,0^\circ \pm 0,1^\circ$ pendant une nuit. On y a ajouté, en agitant, 0,170 ml (1,52 mmole) de HBr 8,90 M. Après 24 h à $25,0^\circ$, le tribromo-2,4,6-phénol précipité a été isolé et analysé: enrichissement de 0,53 at.-% ^{18}O en excès, correspondant à un échange de 26% pour la bromodésulfonation seule. On en conclut qu'il n'y a pas d'échange d'oxygène au cours de la bromodéprotonation du phénolsulfonate-4 de Na.

Bromodéprotonation du p-nitrophénol. Une solution de 1,00 mmole de p-nitrophénol, 30 mmoles de NaBr et 4,5 mmoles de HBr (0,500 ml HBr 8,90 M) dans 28 ml de H_2^{18}O (1,52 at.-% ^{18}O en excès) a été thermostabilisée à $0^\circ \pm 0,2^\circ$. On y a ajouté, en agitant, une solution de 0,67 mmole (4,00 méq-ox.) de KBrO_3 dans 2 ml du même solvant, préalablement refroidie à 0° . Après 15 min à 0° (réaction négative au papier iodo-amidoné) le précipité a été filtré, lavé au moyen de 3 fois 3 ml de HCl 0,1 N et séché sous 10 Torr sur CaCl_2 : 249 mg (92%) de dibromo-2,6-nitro-4-phénol. Après recristallisation dans le méthanol, 80%: F. 143° (litt. [24]: F. 144°); enrichissement de 0,02 at.-% ^{18}O en excès, correspondant à un échange de 0%. – Spectre de RMN. (dans le tétrahydrofuranne [THF] absolu, référence interne = tétraméthylsilane [TMS]): $\tau = 1,60 \text{ ppm}$ (singulet des H aromatiques).

Iododéprotonation du p-nitrophénol. On a thermostabilisé à $25,0^\circ \pm 0,1^\circ$, pendant une nuit, une solution de 1,00 mmole de p-nitrophénol et 10 mmoles de Na_2HPO_4 dans 10 ml de H_2^{18}O (1,63 at.-% ^{18}O en excès), et une solution de 1,00 mmole de I_2 et 4,00 mmoles de KI dans 10 ml du même solvant. Les deux solutions ont été mélangées, et la réaction a été laissée s'effectuer à $25,0^\circ$ pendant 48 h. Le mélange réactionnel a été traité par 1 ml de HCl 36–38% et extrait par $20 + 10 + 5 \text{ ml}$ de CH_2Cl_2 . Les extraits réunis ont été séchés sur $\text{Na}_2\text{SO}_4 \text{ anh.}$, et le solvant évaporé sous vide. Le résidu huileux a été cristallisé dans 8 ml de CCl_4 : on a obtenu 201 mg (76%) de iodo-2-nitro-4-phénol, F. $79-81^\circ$ (litt. [25]: F. $86-87^\circ$); enrichissement de 0,02 at.-% ^{18}O en excès, correspondant à un échange de 0%. – Spectre de RMN. (dans le THF absolu, référence interne = TMS): $\tau = 1,41 \text{ ppm}$: doublet intégré pour 1 H (pos. 3); $\tau = 1,89 \text{ ppm}$: quadruplet intégré pour 1 H (pos. 5); $\tau = 3,06 \text{ ppm}$: doublet intégré pour 1 H (pos. 6); couplage 3–5: $J = 3 \text{ cps}$, couplage 5–6: $J = 9 \text{ cps}$.

Iododéprotonation du chloro-2-nitro-6-phénol. Les conditions de réaction étaient identiques à celles de l'iododéprotonation du p-nitrophénol. La réaction achevée, le mélange réactionnel a été

traité par 1 ml de HCl 36–38%; le précipité a été filtré, lavé au moyen de 3 fois 3 ml de HCl 0,1N et séché sous 10 Torr sur CaCl₂: 269 mg (90%) de *chloro-2-iodo-4-nitro-6-phénol*, qui ont été recristallisés dans le méthanol à 80% (F. 72–73°); enrichissement de 0,02 at.-% ¹⁸O en excès, correspondant à un échange de 0%.

C₆H₃ClINO₃ (299,47) Calc. C 24,06 H 1,01 N 4,68% Tr. C 24,09 H 1,23 N 4,80%

Spectre de RMN. (dans le THF absolu, référence interne = TMS): τ = 1,68 ppm: doublet intégré pour 1 H (pos. 5); τ = 1,95 ppm: doublet intégré pour 1 H (pos. 3); couplage 3–5: J = 2,5 cps. – Spectre d'absorption IR. (dans KBr): 1328 et 1527 cm⁻¹ (–NO₂); 1244 cm⁻¹ (C–OH); 762 cm⁻¹ (C–Cl); 883, 1449 et 1597 cm⁻¹ (aromatiques).

Iododécarboxylation de l'acide dibromo-3,5-hydroxy-4-benzoïque. Les conditions de réaction étaient identiques à celles de l'iododéprotonation du *p*-nitrophénol. La réaction achevée, le mélange réactionnel a été traité par 1 ml de HCl 36–38%; le précipité a été filtré, lavé au moyen de 3 fois 5 ml d'eau et séché sous 10 Torr sur CaCl₂: 366 mg (97%) de *dibromo-2,6-iodo-4-phénol*. Après recristallisation dans le méthanol à 50%, F. 103–104° (litt. [26]: F. 105°); enrichissement de 0,00 at.-% ¹⁸O en excès, correspondant à un échange de 0%.

Dosage de ¹⁸O. – *Réactif dicyandiamide-HgCl₂*: la dicyandiamide, recristallisée deux fois dans l'eau (F. 211–212°), et HgCl₂ «pour analyse» sont mélangés dans la proportion 1:1,6. Avant usage, le réactif est séché plusieurs heures sous 10 Torr sur P₂O₅.

Réactif mélamine-HgCl₂: la mélamine (FLUKA > 99%) et HgCl₂ «pour analyse» sont mélangés dans la proportion 1:1. Avant usage, le réactif est séché plusieurs heures sous 10 Torr sur P₂O₅.

Dosage. Un mélange de 20–50 mg (0,1–0,2 mmole) de substance à analyser et de 100–150 mg de réactif est placé dans un tube en pyrex (longueur ca 15 cm, diamètre intérieur 5 mm) scellé à une extrémité et étiré à l'autre en une pointe de 2–3 cm de longueur. Après l'avoir évacué jusqu'à 10⁻⁴ à 10⁻⁵ Torr, le tube rempli est scellé de telle manière que sa longueur finale soit proche de 10 cm. Au moyen d'un four électrique il est chauffé à 300° ± 10° le temps voulu (3–12 h, selon la substance à analyser). Après refroidissement, le tube est ouvert (par rupture de sa partie étirée) dans un appareillage [11] préalablement évacué à 10⁻⁴–10⁻⁵ Torr. Le CO₂ formé est condensé à –180°, pour éliminer l'eau formée en cours de dégradation; le CO₂ est porté à –80°, condensé dans un collecteur refroidi à –180° et évacué à 10⁻⁴–10⁻⁵ Torr (élimination des gaz non condensables). Après répétition de l'opération, l'échantillon de CO₂ est prêt pour la spectrométrie de masse.

Les auteurs remercient sincèrement le FONDS NATIONAL SUISSE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE de l'aide financière accordée pour ce travail.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. LAPWORTH, J. chem. Soc. 79, 1265 (1901); E. S. LEWIS & M. C. R. SYMONS, Quart. Reviews 12, 242 (1958).
- [2] L. G. CANNELL, J. Amer. chem. Soc. 79, 2927 (1957).
- [3] M. CHRISTEN, W. KOCH, W. SIMON & H. ZOLLINGER, Helv. 45, 2077 (1962); W. KOCH & H. ZOLLINGER, Helv. 48, 554 (1965).
- [4] H. ZOLLINGER, «Hydrogen Isotope Effects in Aromatic Substitution Reactions», dans V. GOLD, «Advances in Physical Organic Chemistry», vol. 2, p. 163 ss., Academic Press, London 1964.
- [5] L. G. CANNELL, J. Amer. chem. Soc. 79, 2932 (1957).
- [6] E. GROVENSTEIN JR. & U. V. HENDERSON JR., J. Amer. chem. Soc. 78, 569 (1956); E. GROVENSTEIN JR. & G. A. ROPP, *ibid.* 78, 2560 (1956).
- [7] D. SAMUEL & B. L. SILVER, «Oxygen Isotope Exchange Reactions of Organic Compounds», dans V. GOLD, «Advances in Physical Organic Chemistry», vol. 3, p. 144, Academic Press, London 1965.
- [8] H. DAHN & J.-D. AUBORT, Helv. 51, 1348 (1968).
- [9] V. V. FESENKO & I. P. GRAGEROV, Dokl. Akad. Nauk. S.S.S.R. 101, 695 (1955).
- [10] S. OAE, R. KIRITANI & W. TAGAKI, Bull. chem. Soc. Japan 39, 1961 (1966).
- [11] H. DAHN, H. MOLL & R. MENASSÉ, Helv. 42, 1225 (1959).
- [12] D. RITTENBERG & L. PONTICORVO, Int. J. appl. Radiation Isotopes 7, 208 (1956).

- [13] M. HALMANN & S. PINCHAS, J. chem. Soc. 1958, 3264.
[14] P. D. BOYER, D. J. GRAVES, C. H. SUELTER & M. E. DEMPSEY, Analyt. Chemistry 33, 1906 (1961).
[15] H. DAHN & P. WYSS, travaux non publiés.
[16] M. J. ALLAIN-LE CANU, Bull. Soc. chim. France [2] 47, 881 (1887).
[17] E. CHAMBERS & G. W. WATT, J. org. Chemistry 6, 376 (1941).
[18] H. E. ARMSTRONG, J. chem. Soc. 28, 522 (1875).
[19] R. KING, J. chem. Soc. 179, 2108 (1921).
[20] E. SAKELLARIOS, Ber. deutsch. chem. Ges. 55, 2851 (1922).
[21] R. L. SHRINER, R. C. FUSON & D. Y. CURTIN, «The systematic Identification of Organic Compounds», 5. édit., p. 375, John Wiley, New York 1964.
[22] W. H. HUNTER & F. E. JOYCE, J. Amer. chem. Soc. 39, 2644 (1917).
[23] A. A. FROST & R. G. PEARSON, «Kinetics and Mechanism», 2. édit. p. 49, John Wiley, New York 1953.
[24] A. CONTARDI & B. CIOCCA, Gazz. chim. ital. 63, 883 (1933).
[25] H. H. HODGSON & F. H. MOORE, J. chem. Soc. 127, 2264 (1925).
[26] H. H. HODGSON & J. NIXON, J. chem. Soc. 1930, 1087.

175. Naturstoffe aus Mikroorganismen

2. Mitteilung [1]

Isolierung von L-Monapterin aus *Pseudomonas roseus fluorescens* J. C. MARCHAL 1937 und seine Konstitutionsaufklärung¹⁾

von M. Viscontini und R. Bühler-Moor

Organisch-Chemisches Institut der Universität, Rämistrasse 76, CH-8001 Zürich

(19. VII. 68)

Zusammenfassung. Aus einer Kultur von *Pseudomonas roseus fluorescens* J. C. MARCHAL 1937 in eisenfreier, synthetischer Nährlösung wurde u. a. ein Pterin isoliert, das sich als (+)-6-(L-threo-1',2',3'-Trihydroxypropyl)-pterin erwiesen hat. – Isolierung, Eigenschaften und Konstitutionsaufklärung des Monapterins werden in dieser Arbeit beschrieben.

1937 isolierte J. C. MARCHAL aus einer Trinkwasserquelle bei Nancy (Frankreich) ein neues, chromogenes Bakterium, das er als *Pseudomonas roseus fluorescens* bezeichnet hat. Dieses *Pseudomonas* besitzt die eigentümliche Eigenschaft, in Nährlösung mit oder ohne Eisen zu wachsen, aber nach ganz verschiedenen Stoffwechselzyklen. In synthetischen, eisenfreien Nährlösungen wächst das *Pseudomonas* langsamer und scheidet im Kulturmedium zahlreiche fluoreszierende Substanzen aus, die in eisenhaltigem Kulturmedium nicht oder nur in geringen Konzentrationen zu finden sind.

In der ersten, vorläufigen Mitteilung [1] berichteten wir über die Isolierung von Monapterin, 6-Hydroxymethyl-pterin und zahlreichen Porphyrinen der Coproporphyrin-Reihe aus einer synthetischen, eisenfreien Nährlösung. In der vorliegenden Arbeit beschreiben wir die Isolierung und die Konstitutionsaufklärung des Monapterins, das sich als ein Stereoisomeres des D-Neopterins (I), und zwar als 6-[L-threo-1',2',3'-Trihydroxypropyl]-pterin (II), erwiesen hat.

¹⁾ Auszug aus der Dissertation von R. BÜHLER-MOOR, Universität Zürich 1968.