

SUBSTANCES NATURELLES MARQUEES AU CARBONE ¹⁴; SYNTHÈSE
DE L'ACIDE ANTHRANILIQUE (CARBOXYLE ¹⁴C), PRÉCURSEUR BIO-
GÉNÉTIQUE POTENTIEL DE L'ELLIPTICINE.

Nguyen Van Bac*, Michel Herbert**, Louis Pichat** et
Nguyen Dat-Xuong.

*Institut de Chimie des Substances Naturelles du C.N.R.S.
91190 - Gif s/Yvette.

**Service des Molécules Marquées, C.E.N., Saclay, B.P. N°2,
91190 - Gif s/Yvette.

Received on April 6, 1973

SUMMARY

Anthranilic acid was obtained with a small yield, by carbonation of Lithium acetanilide (from o-bromo acetanilide). Carbonation by ¹⁴CO₂ of the Grignard derivative from o-chlorophenyl bromide gave o-chloro benzoic acid (carboxyl ¹⁴C) which was dehalogenated and aminated into anthranilic acid (carboxyl ¹⁴C) with a radioactive overall yield of 26% based on Ba ¹⁴CO₃; specific activity: 48 mCi/mM.

RESUME

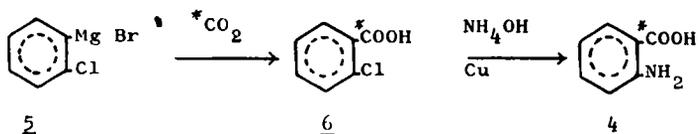
La carbonisation du lithien du bromo-2 acétanilide ne donne qu'un faible rendement en acide anthranilique. La carbonisation du bromure d'o-chlorophénylmagnésium par ¹⁴CO₂ conduit à l'acide o-chlorobenzoïque (carboxyle ¹⁴C) dont l'amination deshalogénante fournit l'acide anthranilique (carboxyle ¹⁴C) avec un rendement radioactif global de 26% par rapport à Ba ¹⁴CO₃ et une activité spécifique de 48 mCi/mM.

Travail effectué au Service des Molécules Marquées, C.E.N. Saclay et dédié au Professeur E. LEDERER en l'honneur de son 65ème Anniversaire.

Plusieurs essais-à-blanc et essais-traceurs ont été effectués au préalable. Nous avons trouvé que cette méthode donne seulement un rendement de 10% en acide anthranilique. Par conséquent, nous l'avons abandonnée.

Nous nous sommes alors adressés au schéma B:

Schéma B



dans lequel on carbonate avec $^{14}\text{CO}_2$ le bromure de o-chlorophénylmagnésium en acide o-chlorobenzoïque (carboxyle ^{14}C). En nous inspirant d'une technique que nous avons utilisée pour la préparation de l'acide p-aminobenzoïque (carboxyle ^{14}C) (7)(8), nous avons procédé à l'amination déshalogénante de 6 en acide anthranilique (carboxyle ^{14}C). Le rendement global de ce dernier a été de 26% rapport à $^{14}\text{CO}_3\text{Ba}$ (activité spécifique: 48 mCi/mM).

PARTIE EXPERIMENTALE

A. - Par carbonatation du lithien de l'o-bromoacétanilide

Sous un courant d'azote, on introduit dans une ampoule à carbonatation équipée d'une agitation magnétique, 460 mg (7,2mM) de n-butyllithium à 20% dans l'hexane. Tout en agitant à -30° , on additionne 856 mg (4mM) de bromo-2 acétanilide 1 en solution dans 30 ml d'éther sec, et on maintient l'agitation durant 20 mn à cette température. Puis, on carbonate la solution précédente selon la technique habituelle (9) en utilisant 394 mg (2 mM) de carbonate de barym ^{14}C , d'activité totale: 20 mCi (activité spécifique: 58,7 mCi/mM) température de carbonatation: -78° , temps: 20 mn. Après hydrolyse par 20 ml de HCl 10 N, extraction en continu par l'éther et évaporation sous vide, on obtient l'acide 2 brut qu'on reprend par une solution de potasse à 10%. On recommence l'extraction à l'éther pendant 5 h, on hydrolyse la solution aqueuse par un chauffage à l'ébullition durant 50 h avec 20 ml d'éthanol. On refroidit, extrait à l'éther et ramène la solution alcaline à pH=3. Une dernière extraction à l'éther conduit finalement

à 2 mCi (Rdt: 10 %) d'acide anthranilique (carboxyle ^{14}C) brut avec une activité spécifique de 58,7 mCi/mM. On obtient à peu près le même rendement lors de deux essais successifs.

B. - Par l'intermédiaire de l'acide o-chlorobenzoïque (carboxyle ^{14}C) .

Bromure d'o-chlorophénylmagnésium: 5 est préparé dans l'éther anhydre à une concentration de 0,55 M/l à partir de 0,72 g (30 milliat.) de magnésium pur en tournures et 4,775 g (25 mM) de chloro-2 bormo-1 benzène fraîchement distillé, contrôlé par chromatographie en phase vapeur.

Acide o-chlorobenzoïque (carboxyle ^{14}C) 6: 3,4 mM de la précédente solution magnésienne sont carbonatées sur rampe à vide selon la technique habituelle (9), par le gaz carbonique dégagé à partir de 409,76 mg (2,08 mM) de carbonate de baryum ^{14}C , d'activité totale : 100 mCi (activité spécifique : 48 mCi/mM), température de carbonatation: -20° , temps: 4 x 20 mn. Après hydrolyse par 20ml de H_2SO_4 à -20° , l'acide brut est extrait en continu par l'éther. Ensuite, sa solution alcaline est purifiée par extraction à l'éther en continu. Après acidification de la solution alcaline, l'extraction par l'éther donne l'acide 6 avec un rendement radioactif: 77 % et un rendement chimique de 77 % (248 mg; 1,59 mM).

Par chromatographie sur couche mince de silicagel (solvant=benzène-éthanol 80:20, révélateur: UV), l'acide 6 a un Rf: 0,37 identique à celui du produit commercial et deux impuretés radioactives non identifiées.

Acide anthranilique (carboxyle ^{14}C) 4 : On porte à la température de $120^\circ/125^\circ$ pendant 5 h dans un autoclave tournant, un mélange de 249 mg (1,59 mM) d'o-chlorobenzoïque, activité totale 77 mCi, activité spécifique: 48 mCi/mM, 4 ml d'ammoniaque concentrée 30 % et 50 mg de Cu réduit fraîchement préparé (10). Après refroidissement, on élimine l'excès de Cu par filtration sur "Millipore", précipite le restant de Cu par passage d'un courant de H_2S pendant 30 mn, essore le sulfure de Cu formé; puis on fait le vide pour éliminer l'excès d'ammoniaque. On acidifie la solution aqueuse jusqu'à pH=4,4 par 29,4 ml H_2SO_4 6 N, tout en agitant magnétiquement. Après extraction à l'éther en continu pendant 3 h, on recueille 153 mg (1,12 mM) d'acide anthranilique (carboxyle ^{14}C), activité totale: 54 mCi, soit un rendement radioactif de 70 %.

La chromatographie sur couche mince de silicagel Merck F 254 (solvant= benzène-éthanol 80:20, révélateur UV) montre la présence de 3 pics radioactifs dont le plus important (92% d'activité totale) de Rf:0,61 correspond à la tache du produit témoin.

Essais de purification:

1°) Plusieurs essais de sublimation n'ont pas permis d'éliminer les impuretés.

2°) Nous avons essayé de purifier l'acide par chromatographie sur plaque préparative de silicagel Merck F 254 (20 cm x 20 cm). Après migration du solvant (benzène-éthanol 80:20) la plaque est séchée à l'air libre pendant 3 h. On localise le produit par autoradiographie. La zone intéressante de la plaque est grattée, éluee par 400 ml d'éther, filtrée sur "Millipore" et évaporée jusqu'à sec. On obtient à partir de 8 mCi d'acide 6 brut, 5 mCi d'un produit radiochi-

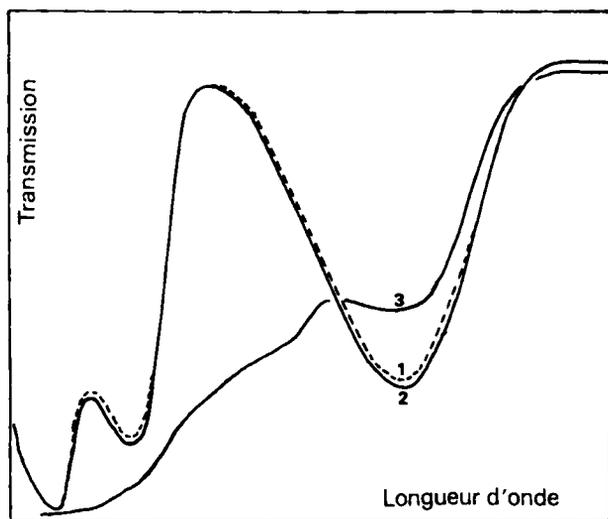


Fig.1 Spectre UV de l'acide anthranilique (carboxyle ^{14}C).

1. Témoin
2. Produit de synthèse
3. Produit + impureté du support

miquement pur. Cependant, la plaque préparative ainsi utilisée contient une notable quantité d'impuretés non radioactives (révélables par spectre en UV, Fig. 1) que l'on élimine par chromatographie sur une petite colonne de silicagel.

On place le produit (5 mCi) en solution dans 5 ml d'éthanol sur une colonne thermostatée par une circulation d'eau (ϕ int. = 17 mm, h = 50 cm), contenant 20 g de silicagel d'adsorption Woelm (activité 1) lavé pendant une nuit par l'hexane.

Avec un mélange d'hexane-éthanol (70:30) comme éluant, on recueille des fractions de 5 ml toutes les 10 mn sur un collecteur de fraction avec enregistrement automatique des produits absorbant dans l'ultraviolet à 335 m μ (Fig. 2).

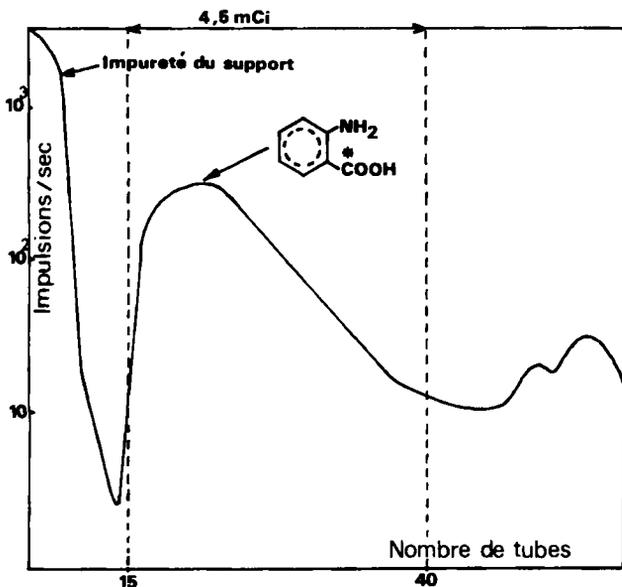


Fig. 1 Purification de l'acide anthranilique (carboxyle ¹⁴C) par chromatographie sur colonne de silicagel: courbe d'enregistrement de la radioactivité.

La fraction 15-40 contient 4, 53 mCi (12, 87 mg=94 mM) de 4 chimiquement et radiochimiquement pur.

3°) Mais la purification la plus commode est celle réalisée avec une colonne (ϕ ext.=25 mm, h= 100 cm) contenant 150 g de silicagel d'adsorption Woelm. La colonne est équilibrée avec le mélange de chloroforme-éthanol-ammoniaque 50:45:5. Avec un collecteur de fraction, on recueille des fractions de 17 ml environ toutes les 30 mn. On détecte simultanément la radioactivité de l'éluat et les produits absorbant dans l'ultraviolet à 334 m μ (détecteur Uvicord L.K.B.). Les fractions correspondantes à chaque pic radioactif sont analysées par chromatographie sur couche mince de silicagel. On obtient 26, 2 mCi de 4 (73, 9 mg = 0, 54 mM), soit un rendement global de 26 %.

Contrôle de la pureté chimique et radiochimique de 4 .

1°) La pureté chimique, contrôlée par spectrométrie UV dans l'éthanol à 335 m μ , est supérieure à 99% (Fig.2).

2°) La pureté radiochimique est contrôlée par radiochromatographie sur couche mince de silicagel Merck F 254, révélateur :UV

Solvants: -C ₆ H ₆ -EtOH	80:20	Rf :0, 64
-CHCl ₃ -EtOH-NH ₄ OH	50:45:5	:0, 16

BIBLIOGRAPHIE

- (1) - M.-M.Janot et R.Goutarel, C.R.Acad.Sci., 218 : 852 (1944).
 - R.Goutarel, M.-M.Janot et V.Prelog, *Experientia*, 4 : 24 (1948).
 - M.-M.Janot, R.Goutarel, P.Karrer et P.Enslin, *Helv.Chim.Acta*, 33 : 150 (1950).
 - L.Marion "The Alkaloids" II : 369 (1952).Edit.Acad.Press, New-York.
 - P.Potier, J.Le Men, C.Kan Fan et M.-M.Janot, *Ann.Pharm.Fr.*, 23 : 691 (1965). P.Potier et J.Le Men, *Bull.Soc.chim.Fr.p.* 456 (1959).
- (2) M.-M.Janot et P.Potier, Travaux non publiés.
- (3) K.Bowden et L.Marion, *Canad.J.Chem.*, 29 : 1037 (1951).
- (4) - G.H.Svoboda, G.A.Poore et M.L.Montfort, *J.Pharm.Sci.*, 57 : 1720(1968).
 - J. Le Men, M.Hayat, G.Mathé, J.C.Guillon, E.Chenu, M.Humblot et Y. Masson, *Europ.Clin.and Biol.Res.*, 15 : 534 (1970).

- (5) - S. Goodwin, A. F. Smith et E. C. Horning, *J. Amer. Chem. Soc.*, 81 : 1959 (1903).
 - A. Buzas, M. Osowiecki et O. Schindler, *C. R. Acad. Sci.*, 247: 1390(1958).
 - W. Jordan et P. J. Scheuer, *Tetrahedron*, 21 : 3731 (1965).
 - J. Poisson et C. Miet, *Ann. Pharm. Fr.*, 25 : 523(1967).
- (6) A. Murray et A. R. Ronzio, "Organic Syntheses with Isotopes", 11 : 316 (1958). Edit. Interscience, Londres.
- (7) M. Herbert, L. Pichat et C. Fabignon, *J. Labell. Cpds*, 4 : 256 (1968).
- (8) V. Markova, L. N. Zenkova et M. N. Shchukina, *Zh. Obshch. Khim.*, 25 : 1383 (1955); *C. A.*, 50 : 4845 g (1956).
- (9) C. Baret et L. Pichat, *Bull. Soc. Chim. Fr.*, p. 580 (1951).
- (10) R. Q. Brewster et T. Groening "Organic Syntheses" 2 : 446 (1943).