

## SYNTHESES DE GLYCERIDES MARQUES AU CARBONE 14

J.L. DANAN et L. PICHAT  
 Service des Molécules Marquées - C.E.N./SACLAY - B.P. n° 2  
 91190 GIF-SUR-YVETTE - FRANCE

SYNTHESIS OF  $^{14}\text{C}$  LABELLED GLYCERIDES

## Abstracts

*Starting from 1-2 isopropylidene sn-glycerol, the synthesis of mono and diglycerides labelled with  $^{14}\text{C}$  in the acyl moiety has been achieved.*

*The acyl chloride method was found to be the best one for the esterification step.*

*The various methods, here proposed with palmitic or lauric acid may be generalized for the obtention of other saturated glycerides.*

En vue d'études enzymatiques, nous avons réalisé la synthèse de mono et de diglycérides de configuration absolue naturelle, marqués au carbone 14 sur les positions acyles.

Afin de fixer la configuration absolue, nous avons utilisé l'isopropylidène-1,2 sn-glycérol **1** (schéma 1) comme composé de départ commun aux différentes synthèses.

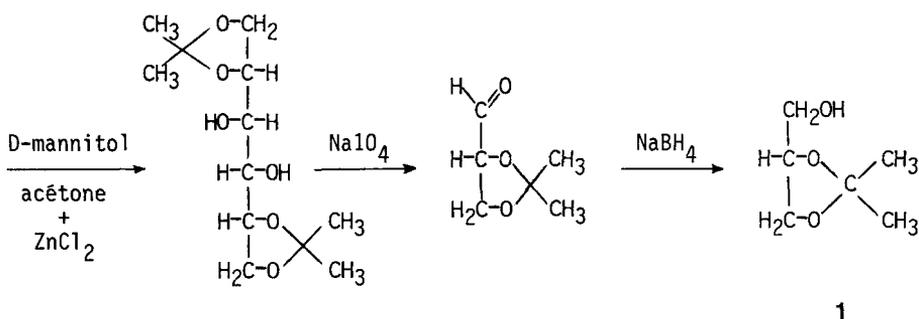


Schéma 1 - Synthèse de l'isopropylidène-1,2 sn-glycérol.

Le diisopropylidène D-mannitol préparé selon (6) est oxydé par le métapériodate de sodium. L'acétone glycéraldéhyde ainsi obtenue est réduite par le borohydrure de sodium pour conduire à l'acétone D-glycérol **1**.

Les estérifications des groupes hydroxyles des dérivés du glycérol ont été réalisées par action du chlorure de l'acide gras désiré. Pour des raisons pratiques (rendement, pureté des produits obtenus) nous avons retenu cette méthode après avoir essayé d'estérifier les groupes hydroxyles par le sel de pyridinium de l'acide gras en présence du chlorure de l'acide triisopropyl benzène sulfonique (TPS) (1) ou de carbonyl di-imidazole (2), méthodes employées dans d'autres domaines.

Les méthodes d'estérifications par un anhydride d'acide ont été à priori rejetées car elles nécessitent un fort excès de dérivé d'acide marqué (plus de 6 équivalents par rapport aux hydroxyles à estérifier).

La synthèse du [palmitoyl ( $^{14}\text{C}$ )-16] -1 sn-glycérol **4**

est réalisée selon (3)(schéma 2) par estérification d'un excès de benzyl-3 isopropylidène-1,2 sn-glycérol **2** préparé par action du dérivé sodé de l'isopropylidène-1,2 sn-glycérol **1** sur le chlorure de benzyle suivie de l'hydrolyse acide du groupe isopropylidène.

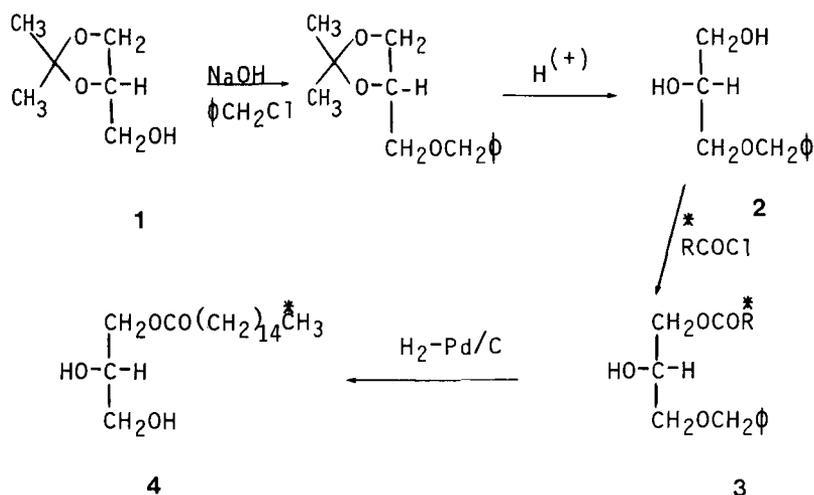


Schéma 2 - Préparation du palmitoyl-1 sn-glycérol **4**

La débenzylation du palmitoyl-1 benzyl-3 sn-glycérol **3** est effectuée par hydrogénéolyse sur charbon palladié.

Le rendement radioactif en palmitoyl-1 sn-glycérol **4** est de 68 % par rapport à l'acide palmitique de départ.

On note la formation d'environ 10 % d'un composé identifié par RMN et SM comme étant le diacyl-1,2 benzyl-3 sn-glycérol.

L'estérification du benzyl-3 sn-glycérol **2** par 2,2 équivalents molaires de chlorure de palmitoyle permet d'obtenir avec un bon rendement le dipalmitoyl-1,2 benzyl-3 sn-glycérol.

Une hydrogénation catalytique sur charbon palladié conduit au dipalmitoyl-1,2 sn-glycérol **8** qui nous a servi de composé de départ pour la synthèse de phospholipides (8).

Le [Palmitoyl  $-(^{14}\text{C})-16$ ]-1 [Lauryl  $-(^{14}\text{C})-1$ ]-2 sn-glycérol **6** a été synthétisé (schéma 3) par action du chlorure de l'acide laurique sur le palmitoyl-1 benzyl-3 sn-glycérol **3**.

La débenzylation de **5** est effectuée par hydrogénolyse sur charbon palladié. Dans ces conditions douces en milieu neutre, aucune migration de l'acide laurique de la position 2 à la position 3 n'est à craindre.

Le rendement radioactif en diglycérade mixte **6** est de 50 % par rapport au dérivé palmitoyl-1 benzyl-3 sn-glycérol **3**

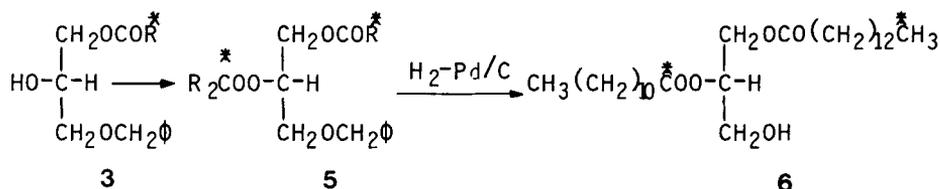


Schéma 3 - Préparation du palmitoyl-1 lauryl-2 sn-glycérol.

La préparation du [Palmitoyl  $-(^{14}\text{C})-1$ ]-3 sn-glycérol **8** isomère optique du palmitoyl-1 sn-glycérol a été effectuée par estérification de l'isopropylidène-1,2 sn-glycérol **1** (schéma 4) suivie de l'hydrolyse du groupe protecteur.

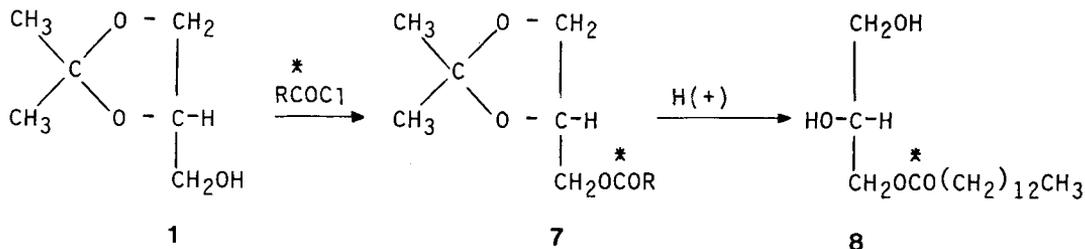


Schéma 4 - Préparation de monopalmitoyl-3 sn-glycérol

L'élimination du groupe isopropylidène a été difficile à réaliser par traitement dans l'éther en présence d'acide chlorhydrique.

Cette résistance des éthers isopropylidènes d'esters d'acides gras et du glycérol vis-à-vis de l'hydrolyse acide est connue (4).

Les méthodes de déprotection utilisant l'acide borique dans le triméthyl borane sont limitées à des groupes acyles ayant moins de 12 carbones. L'acide  $\text{CF}_3\text{COOH}$  n'a pas été essayé.

Le rendement en monoglycéride **8** libre n'est que de 45 % par rapport à l'acide palmitique alors que le composé **7** a été isolé avec un rendement de 90 % par rapport à l'acide.

### PARTIE EXPERIMENTALE

#### Généralités

- Spectrométrie de masse (SM) sur appareil Varian.
- Spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) sur appareil JEOL C 60 HL à 60 MHz (référence TMS).
- Chromatographies analytiques et préparatives sur plaques de gel de silice Merck 60 F 254.

#### 1 - D-acétone-glycérol 1

Le diisopropylidène-1,2 5,6-D-mannitol obtenu selon (5) et recristallisé dans l'éther de pétrole, puis oxydé par le métapériodate est réduit par le borohydrure (6) pour donner le D-acétone glycérol **1**.

L'acétone D-glycérol après distillation ( $E_{20} = 83^\circ\text{C}$ ) donne un seul pic en C.P.V. (silicone OV<sub>1</sub> chauffé à  $135^\circ\text{C}$ ).

Les valeurs de l'indice de réfraction et du pouvoir rotatoire spécifique sont conformes à celles données dans la littérature : (6)

$$\eta_D^{22} = 1,4349, \quad \alpha_D^{25} = + 13,9 \text{ (c = 1)}$$

#### - R.M.N. (sans solvant)

$$\delta = 1,25 \text{ ppm (2s-6H-CH}_3\text{)}, \quad \delta = 3,7 \text{ ppm (m-6H-CH et OH)}$$

#### - S.M.

$$m/e \text{ 117, } 62 \% \text{ (M-CH}_3\text{)}^+, \quad m/e \text{ 101, } 28 \% \text{ (M-CH}_2\text{OH)},$$

m/e 59, 30 % (M-CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>)<sup>+</sup>,            m/e 57, 30 %  
 m/e 43, 100 % (CH<sub>3</sub>CO)<sup>+</sup>,            m/e 31, 30 % (CH<sub>2</sub>OH)<sup>+</sup>.

Il est nécessaire d'utiliser ce produit fraîchement préparé et distillé ; le pouvoir rotatoire décroît en effet lentement avec le temps (7).

## 2 - Chlorure de palmitoyle (<sup>14</sup>C)

Sous azote sec, à 2,8g (11 mMoles, 5 mCi) d'acide palmitique dissous dans 5 mL de benzène anhydre, rajouter lentement 2,5 mL de chlorure de thionyle fraîchement distillé (environ 25 mMoles) ou de chlorure d'oxalyle, dissous dans 2 mL de benzène, la température étant maintenue à 0°C par un bain de glace.

Agiter 2 heures à température ambiante puis une heure et demi à reflux.

L'évaporation complète du benzène et de l'excès de chlorure de thionyle (ou d'oxalyle) est effectuée sous 0,8 mm de mercure à l'évaporateur rotatif.

Ce mode opératoire a été utilisé pour toutes les synthèses de chlorure d'acide marqué.

## 3 - [palmitoyl-(<sup>14</sup>C)-16] -1 sn-glycérol (0,5 mCi/mMole) 4

### a) Isopropylidène-1,2 benzyl-3 sn-glycérol

7,2 g (130 mMoles) d'acétone D-glycérol et 5,2 g (130 mMoles) de soude pulvérisée en boîte à gants sont chauffés sous atmosphère d'azote pendant 2 h 30 avec une bonne agitation.

Laisser refroidir le mélange et ajouter ensuite 15 mL de benzène anhydre puis lentement ajouter le chlorure de benzyle (14 mL, 110 mMoles) dissous dans 10 mL de benzène.

Laisser au reflux du benzène 3 h 30.

Après refroidissement, filtrer les sels, laver avec du benzène puis distiller le solvant à pression atmosphérique.

Par distillation sous vide de 0,1 mm, on recueille entre 108 et 110°C une fraction de 17,7 g dont la structure, déterminée par RMN et SM, correspond à l'isopropylidène-1,2 benzyl-3 sn-glycerol.

### - R.M.N. (CDCl<sub>3</sub>)

δ = 1,3 ppm (2s-6H-CH<sub>3</sub>)                    δ = 3,9 ppm (m-5H-CH)  
 δ = 4,5 ppm (s-2H-CH<sub>2</sub>)                    δ = 7,2 ppm (s-5H-Aromatiques)

- S.M.

m/e 222, 2 % ( $M^+$ )	m/e 207, 13 % ( $M-Me$ ) <sup>+</sup>
m/e 164, 25 % ( $M-CO(CH_3)_2$ ) <sup>+</sup>	m/e 101, 43 % ( $M-CH_2OCH_2\phi$ ) <sup>+</sup>
m/e 91, 100 % ( $\phi-CH_2$ ) <sup>+</sup>	m/e 43, 41 % ( $CH_3CO$ ) <sup>+</sup>

b) Benzyl-3 sn-glycérol 2

8 g (36 mMoies) d'isopropylidène benzyl-glycérol dissous dans l'éthanol aqueux sont filtrés sur une colonne Dowex 50wx ( $H^+$ ) (25 cm x 1,2 cm).

Par distillation sous vide de 0,1 mm à 120°C, on isole 4 g de **2** (rendement 62 %) caractérisé par RMN et SM.

- R.M.N. (dans  $D_2O$ )

$\delta = 3,8$ ppm (m-5H-CH)	$\delta = 4,5$ ppm (s-2H- $CH_2$ )
$\delta = 7,3$ ppm (s-5H-Aromatiques)	

- S.M.

m/e 182, 16 % ( $M^+$ )	m/e 107, 40 % ( $\phi CH_2O$ ) <sup>+</sup>
m/e 91, 100 % ( $\phi-CH_2$ ) <sup>+</sup> et ( $M-\phi CH_2$ ) <sup>+</sup>	m/e 31, 35 % ( $CH_2OH$ ) <sup>+</sup>

c) Estérification du benzyl-3 sn-glycérol 2

A l'abri de l'humidité et à température ambiante, 728 mg (4 mMoies) de benzyl-3 sn-glycérol **2** dissous dans 3 mL de benzène anhydre et 4 mMoies (0,4 mL) de pyridine anhydre sont traités lentement par le chlorure de palmitoyle -( $^{14}C$ )-16 (2 mMoies, 1 mCi) dissous dans 2 mL de benzène.

La réaction est arrêtée après 4 jours d'agitation à température ambiante par addition d'un mélange eau/glace. Extraire au benzène et laver la phase organique à l'eau.

Une chromatographie préparative sur plaque de gel de silice (solvant hexane/éther : 3/2) permet de récupérer 590 mg d'un produit (RF = 0,3) dont l'activité représente 703  $\mu Ci$  (70 % de rendement par rapport à l'acide).

La structure de **3** est confirmée par SM et RMN.

- S.M.

m/e 420, 8 % ( $M^+$ )	m/e 329, 4 % ( $M-\phi CH_2$ ) <sup>+</sup>
------------------------	---

m/e 313, 9 % (M- $\phi$ CH <sub>2</sub> O) <sup>+</sup>	m/e 239, 19 % (R-CO) <sup>+</sup>
m/e 181, 47 % (M-RCOOH) <sup>+</sup>	m/e 107, 23 % ( $\phi$ CH <sub>2</sub> O) <sup>+</sup>
m/e 91, 100 % ( $\phi$ CH <sub>2</sub> ) <sup>+</sup>	

- R.M.N. (CDCl<sub>3</sub> + D<sub>2</sub>O)

$\delta$ = 7,3 ppm (s-5H-Aromatiques)	$\delta$ = 4,5 ppm (s-2H-CH <sub>2</sub> benzylique)
$\delta$ = 3,7 ppm (m-3H-CH <sub>2</sub> sn-3 et CH)	$\delta$ = 3 ppm (m-2H-CH <sub>2</sub> sn-1)
$\delta$ = 2,3 ppm (m-2H-CH <sub>2</sub> CO)	$\delta$ = 1,3 ppm (s-26H-CH <sub>2</sub> )
$\delta$ = 0,9 ppm (m-3H-CH <sub>3</sub> )	

d) [Palmitoyl-(<sup>14</sup>C)-16] -1 sn-glycérol (0,5 mCi/mMole) 4

400 mg (435  $\mu$ Ci) de monopalmityl-1 benzyll-3 sn-glycérol **3** dissous dans 5 mL d'éthanol absolu sont mis en présence de charbon palladié à 10 % sous hydrogène pendant 4 h, à température ambiante.

Les chromatographies sur gel de silice dans les solvants chloroforme, méthanol 5 % (RF : 0,3) et chloroforme/benzène : 7/3 indiquent que la réaction est quantitative et que le produit **4** est radiochimiquement pur.

On recueille après filtration sur filtre "Millipore" ("Téflon" 5  $\mu$ ), lavage, et évaporation de l'éthanol 228 mg (422  $\mu$ Ci) de [palmityl-(<sup>14</sup>C)-16] -1 sn-glycérol **4** d'activité spécifique 0,495 mCi/mMole sous forme d'un solide blanc. Le rendement radioactif est de 97 % par rapport au dérivé benzyllé.

Le spectre de masse confirme la structure de **4**

m/e 330, 37 % (M <sup>+</sup> )	m/e 299, 99 % (M-CH <sub>2</sub> OH) <sup>+</sup>
m/e 256 (RCOOH) <sup>+</sup>	m/e 255, 95 % (RCOO) <sup>+</sup> , 239, 100 % (RCO) <sup>+</sup>

Le pic m/e 270, 55 % (CH<sub>2</sub>OCOR + H)<sup>+</sup> permet de confirmer la position de l'acide palmitique sur le C<sub>1</sub> du squelette glycérol.

4 - Diglycérides mixtes : [palmityl-(<sup>14</sup>C)-16] -1 [lauryl-(<sup>14</sup>C)-1] -2 sn-glycérol (1,1 mCi/mMole) 6

A l'abri de l'humidité 242 mg (0,57 mMole, 268  $\mu$ Ci) de palmityl-1 benzyll-3 sn-glycérol **3** dissous dans 1,5 mL de benzène anhydre et 0,2 mL (2 mMoles) de pyridine anhydre sont traités par 0,8 mMole (0,5 mCi) de chlorure d'acide laurique-(<sup>14</sup>C)-1 (A.S. = 0,6 mCi/mMole) dissous dans 1 mL de benzène.

En fin de réaction on recueille par chromatographie préparative sur plaque de gel de silice dans le solvant hexane/éther : 3/2 (RF : 0,7) 225 mg d'un produit blanc donc l'activité est 400  $\mu$ Ci (52 % par rapport à l'activité totale A.S. = 1,07 mCi/mMole).

La S.M. confirme la structure attendue **5**

m/e 602, 1 % ( $M^+$ )	m/e 495, 9 % ( $M-\text{OCH}_2\text{O}^+$ )
m/e 256 (Ac. Palm.) <sup>+</sup>	m/e 183, 18 % $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CO}^+$
m/e 91, 100 % ( $\text{OCH}_2^+$ )	

La débenzylation catalytique est effectuée sur 170 mg (300  $\mu\text{Ci}$ ) de **5** comme décrit précédemment dans l'éthanol absolu en présence de Pd/C.

Le diglycérider **6** est caractérisé par spectrométrie de masse.

m/e 512, 2 %, $M^+$	m/e 495, 22 % ( $M-\text{OH}^+$ )
m/e 494, 60 % ( $M-\text{H}_2\text{O}^+$ )	m/e 313, 68 % ( $M-\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COO}^+$ )
m/e 257 ( $M-\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COO}^+$ ) 100 %	
m/e 36 % ( $M-\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOCH}_2^+$ )	preuve de la position en 1 de l'acide palmitique
m/e 239, 83 % ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}^+$ )	m/e 183, 91 % ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CO}^+$ )

L'absence de pic à  $M-\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOCH}_2$  montre qu'il n'y a pas d'isomérisation de l'acide laurique de la position 2 à 3.

On recueille 140 mg (275  $\mu\text{Ci}$ , A.S. = 1,1 mCi/mMole) de **5**

Le rendement radioactif est supérieur à 95 % par rapport au dérivé benzylé.

La pureté radiochimique est contrôlée par CCM sur plaque de gel de silice dans le solvant chloroforme à 4 % de méthanol (RF : 0,7).

**5** -  $\left[ \text{Palmitoyl}-(^{14}\text{C})-1 \right] -3 \text{ sn-glycérol (0,5 mCi/mMole) } \mathbf{8}$

a) Isopropylidène-1,2 palmitoyl-3 sn-glycérol **7**

En l'absence d'humidité à 4 mMoles d'isopropylidène-1,2 sn-glycérol **1** dissous dans 3 mL de benzène anhydre et 0,4 mL de pyridine anhydre, ajouter lentement 2 mMoles (1 mCi) de chlorure d'acide palmitique ( $^{14}\text{C}$ )-1 dissous dans 2 mL de benzène anhydre.

La réaction est suivie par CCM sur gel de silice dans les solvants (chloroforme, méthanol 0,5 %) et (hexane/éther : 3/2). L'agitation magnétique à température ambiante est maintenue pendant 4 jours.

Au bout de ce temps, **7** étant formé avec un rendement de 90 % (déterminé par l'enregistrement des CCM), arrêter la réaction par un mélange eau/glace, extraire la phase organique, la laver et la sécher.

Une chromatographie sur plaque préparative de gel de silice effectuée avec le solvant (hexane/éther : 3/2) permet de récupérer 630 mg soit 1,7 mMole (850  $\mu$ Ci ; A.S. = 0,5 mCi/mMole) d'une huile qui cristallise spontanément.

- C.C.M. de contrôle sur plaque de gel de silice dans les solvants

hexane/éther : 3/2                      RF = 0,75

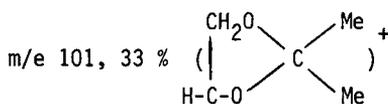
chloroforme, méthanol 0,5 %      RF = 0,8

La structure de **7** est caractérisée par :

- S.M.

m/e 356, 25 %

m/e 355, 100 % (M-15)<sup>+</sup>



m/e 57, 29 %

m/e 43, 42 % (CH<sub>3</sub>CO)<sup>+</sup>

- R.M.N. (CDCl<sub>3</sub>)

$\delta$  = 4,05 ppm (m-3H-CH<sub>2</sub>-1 et CH)       $\delta$  = 2,95 ppm (m-2H-CH<sub>2</sub>-3)

$\delta$  = 2,3 ppm (m-2H-CH<sub>2</sub>CO)               $\delta$  = 1,3 ppm (s-26H-CH<sub>2</sub>)

$\delta$  = 1,25 ppm (6H-CH<sub>3</sub>)                       $\delta$  = 0,9 ppm (m-3H-CH<sub>3</sub>)

b) [Palmitoyl (<sup>14</sup>C-1)] -3 sn-glycérol **8**

1 mMole (0,5 mCi) du composé **7** est dissoute dans 15 mL d'éther.

La solution est refroidie à - 15°C.

10 mL d'acide chlorhydrique concentré (préalablement refroidis à 0°C) sont ajoutés à la solution précédente avec une bonne agitation.

Après 30 minutes à 0°C, 100 mL d'eau sont ajoutés et le mélange est abandonné.

Après 30 minutes, la phase étherée est récupérée, lavée, évaporée et fractionnée par chromatographie préparative sur plaque de gel de silice dans le solvant hexane/éther (3/2).

Le produit **8** de RF : 0,3 (60 % de l'activité) est isolé avec un rendement de 50 % par rapport au dérivé protégé **7** (75mg, 0,25 mCi, A.S. = 0,5 mCi/mMole).

Les spectres de R.M.N. et de masse effectués sur ce composé sont identiques à ceux effectués sur le dérivé palmitoyl-1 sn-glycérol **4**

REFERENCE

- 1 - NEILSON T. et WERSTIUK E.S.  
Can. J. Chem. 49, 493 (1971)
- 2 - STAAB H.A.  
Chem. Ber. 90, 1326 (1957)
- 3 - SOWDEN J.C. et FISHER H.O.L.  
J. Amer. Chem. Soc. 63, 3244 (1941)
- 4 - HARTMAN L.  
G. Chem. Soc. 4134 (1959)
- 5 - BALL E.G. Editor  
Biochemical Preparations 2, 32 (1952)
- 6 - GHANGAS G.S. et FONDY T.P.  
Biochemistry 10, 3204 (1971)
- 7 - BAER E. et FISHER H.O.L.  
J. Amer. Chem. Soc. 67, 2031 (1945)
- 8 - DANAN J. et PICHAT L.  
A paraître