

SYNTHÈSE DE MOLECULES AMPHIPHILES MARQUEES
AUX ISOTOPES STABLES ^{13}C et ^{15}N .

O. BOULOUSSA et P. DIZABO

Laboratoire de Spectrochimie Moléculaire
Université Pierre et Marie Curie
4 Place Jussieu, 75230 Paris cédex 05-FRANCE.

SUMMARY

Starting from $\text{Ba}^{13}\text{CO}_3$, K^{13}CN or potassium phthalimide ^{15}N , procedures for the preparation of specifically labelled fatty acids, fatty amides and N acyl amino acids are described. Identification and purity of the prepared compounds are checked by M.S. and NMR ^{13}C .

RESUME

Partant de $\text{Ba}^{13}\text{CO}_3$, K^{13}CN ou de phthalimide, nous décrivons la synthèse et la purification d'acides gras, d'amines grasses et de N acyl amino acides marqués spécifiquement au ^{13}C ainsi que d'amines grasses marquées à l'azote 15. L'identification et la pureté de ces composés ont été effectuées par SM et RMN ^{13}C .

Key words : ^{13}C labelled fatty acids, fatty amines and N acyl amino acids.

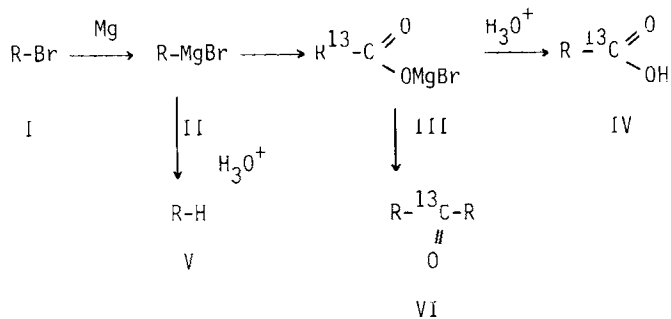
INTRODUCTION

Afin d'étudier par résonance magnétique nucléaire (RMN), le comportement des acides gras, des amines à longue chaîne et de N acyl amino acides dans les bicouches phospholipidiques, nous avons été amenés à préparer ces composés enrichis en position spécifique soit en carbone 13, soit en azote 15. Dans ce mémoire, nous présentons d'abord la préparation des acides ou amines gras, des acides aminés et enfin des N acyl amino acides.

I - Synthèse d'acides gras marqués spécifiquement sur le groupement carboxylique :

Ce type de synthèse est bien connu soit à partir du nitrile (1)

soit par action du dioxyde de carbone sur le dérivé organo magnésien ou lithien (2). Toutefois, l'isolement du produit final IV présente des difficultés dues à la présence des sous-produits, I, V et VI qui même à l'état de traces, perturbent l'étude physico chimique. Il faut remarquer que, malgré



l'utilisation d'un excès d'organo magnésien par rapport à la quantité de CO_2 pour minimiser la formation de cétone VI, il se forme toujours une plus grande quantité de composé VI dans la synthèse de l'acide myristique que dans celle de l'acide stéarique.

La purification de l'acide cherché a pu être réalisée par chromatographie sur colonne de silicagel : l'élution par l'éther de pétrole élimine le bromoalcane I et l'hydrocarbure V, le mélange tétrachlorure de carbone-benzène (80/20 V/V) élimine la cétone symétrique VI, enfin l'acide gras IV est récupéré en éluant avec du diisopropyléther.

L'obtention de l'amino octadécane $^{13}\text{C-1}$ (stéarylamine $^{13}\text{C-1}$) à partir du nitrile $^{13}\text{C}^*$ correspondant par réduction à l'aide de l'hydrure de lithium et d'aluminium ne pose pas de problème particulier. Afin d'isoler l'amine très pure (vérification effectuée par CCM, SM et RMN du ^{13}C) nous avons dû effectuer une chromatographie sur colonne de silicagel sur le produit brut de synthèse, puis une autre purification sur son chlorhydrate.

La préparation de l'amino octadécane ^{15}N a été réalisée selon la méthode de Gabriel (3,4). Sa purification sur colonne de silicagel n'offre aucune difficulté.

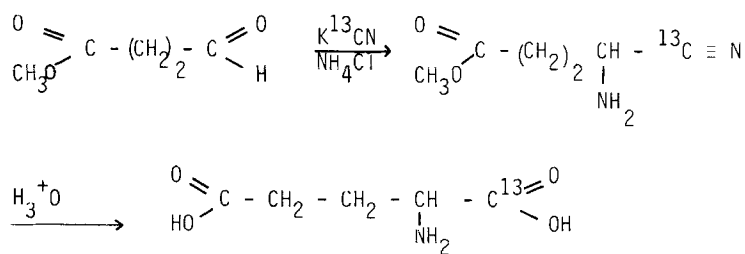
 * Le nitrile a pu être obtenu avec un rendement presque quantitatif en utilisant la méthode décrite par (5).

L'amide ^{13}C -1 stéarique est obtenu par action de l'ammoniac anhydre sur le chlorure d'acide avec un rendement de 85%. A cause de sa faible solubilité dans les solvants organiques seul le spectre de masse a permis de déterminer sa pureté.

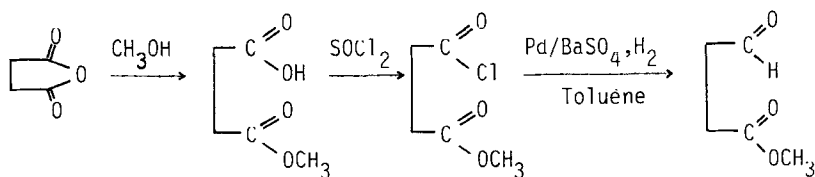
II - Synthèse des acides DL glutamiques ^{13}C -1 et ^{13}C -5

1) Synthèse de l'acide DL glutamique ^{13}C -1

Parmi la grande variété de synthèses de l'acide glutamique, la plus adaptée au marquage isotopique sur le groupement carboxylique est incontestablement celle de Strecker (6,7) :



Le formyl-3 propionate de méthyle a été préparé selon la suite de réactions :



Nous avons constaté au cours de nombreux essais à blanc que le rendement de la synthèse de l'acide glutamique dépendait dans une large mesure de la pureté de l'aldéhyde de départ, c'est pourquoi nous avons apporté une attention particulière à sa purification.

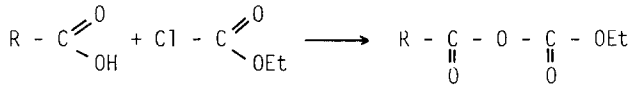
2) Synthèse de l'acide glutamique ^{13}C -5

L'acide DL glutamique ^{13}C -5 est obtenu d'après la méthode préconisée par Pichat et coll. (8) par action de K^{13}CN sur l' α benzamido butyrolactone suivie d'une hydrolyse acide. La réaction conduit d'une part à l'acide glutamique recherché, d'autre part à l'homosérine. La méthode de purification adoptée par (8) nous ayant paru laborieuse, nous avons mis au point une méthode rapide et efficace pour séparer l'acide glutamique marqué de l'homosérine en nous basant sur la différence de leur pHi (pHi Glu = 3,1, pHi homosérine = 6,3).

III - Synthèse de N palmitoyl amino acides

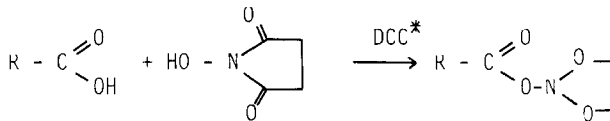
Le couplage d'un acide gras avec un acide aminé peut être réalisé par différentes méthodes, toutes à peu près équivalentes du point de vue du rendement quand il s'agit d'acides aminés hydrophobes (Ala, Gly, Val etc).

La méthode aux anhydrides mixtes (9) consiste à former un anhydride entre l'acide gras à coupler et le chloroformiate d'éthyle suivant la réaction :



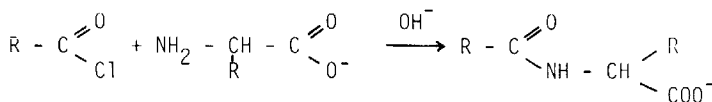
L'acide ainsi activé réagit aisément avec l'acide aminé en milieu basique pour fournir le N acyl amino acide.

Une autre variante de cette méthode (10) fait appel au N hydroxy-succinimide ou N hydroxy phthalimide comme activateur de l'acide gras.



L'acide activé sous cette forme conduit facilement à une liaison peptidique avec un acide aminé en milieu tampon (NaHCO_3).

La deuxième méthode (11) consiste à faire réagir le chlorure de l'acide gras dans un solvant organique (T.H.F. ou dioxanne) sur l'acide aminé en milieu basique à basse température.



* DCC : *Dicyclohexyl carbodiimide*.

Cette dernière méthode est particulièrement adaptée à la synthèse des molécules marquées car le chlorure d'acide qui n'a pas réagi se retrouve après hydrolyse sous forme d'acide gras dans la phase organique et l'acide aminé dans la phase aqueuse. Nous avons ainsi préparé le N palmitoyl alanine ^{13}C -1, le N palmytoyl ^{13}C -1 U ^{13}C alanine, le N palmitoyl glycine ^{13}C -1 ainsi que les N palmitoyl de l'acide glutamique ^{13}C -1 et ^{15}C -5.

PARTIE EXPERIMENTALE

Les spectres de masse sont effectués sur un spectromètre de masse Varian de type CH5 à une énergie de 70eV par introduction directe.

Les spectres de R.M.N. ^{13}C sont enregistrés sur un spectromètre BRUKER WH 90 (F.T.) à 22, 63 MHz.

Les chromatographies sur couche mince (CCM) ont été effectuées sur des plaques de silicagel (type F₂₅₄, Merck). La L alanine ^{13}C -1, la L alanine U ^{13}C et la glycine ^{13}C -1 proviennent du C.E.A. (Saclay, France).

Synthèse des acides gras

Le bromo heptadecane commercial(*) n'étant pas convenable, nous l'avons préparé par décarboxylation de l'acide stéarique (PROLABO pour usages scientifiques) selon une méthode préconisée par (12) avec un rendement de 83% (CCM et SM).

La carbonatation de 8 millimoles de bromure d'heptadecyl magnésium par 5 millimoles de $^{13}\text{CO}_2$ provenant de la décomposition de 1g de Ba $^{13}\text{CO}_3$ (90% ^{13}C) selon la technique décrite par (2) nous a conduit à un résidu qu'on a dissous dans un volume minimum d'éther de pétrole et fixé sur une colonne de silicagel (30 cm x 2 cm) (Kieselgel 100, 0,063 - 0,200 nm. Merck).

L'excès de bromoheptadécane ainsi que l'heptadécane sont élués par 150 ml d'éther de pétrole, la cétone symétrique avec 200 ml du mélange CCl₄-benzène (80/20 V/V), enfin l'acide gras par 300 ml d'isopropyléther. Une CCM de la dernière fraction (CHCl₃/ isopropanol 9/1 V/V) révèle l'existence du seul acide (même Rf qu'un échantillon d'acide non marqué).

* Signalons que le bromoheptadécane commercial ne donne pas facilement un magnésien, même après distillation; nous pensons que celui-ci est obtenu par bromation de l'alcool correspondant et qu'une trace d'alcool suffirait à inhiber la formation du magnésien.

Le même mode opératoire a été adopté pour la préparation des acides myristique et laurique. Le rendement de la réaction varie entre 70 et 80% d'après plusieurs essais.

Synthèse de l'aminooctadécane 1^{13}C (stéarylamine)

Une solution de 4 millimoles de bromoheptadécane et 2 millimoles de K^{13}CN (90% ^{13}C) dans 50 ml d'éthanol absolu(*) est chauffé à reflux pendant 72 heures; le bromure de potassium formé est éliminé par filtration. Le filtrat est évaporé et le résidu est dissous dans l'éther, la phase étherée est lavée avec une solution de HCl 0,1N. On sèche sur Na_2SO_4 et évapore le solvant sous pression réduite. On continue de sécher le nitrile en dessiccateur pendant une nuit sur P_2O_5 . Le résidu est dissous dans 20 ml d'éther anhydre et on l'ajoute goutte à goutte à une suspension de 8 millimoles de LiAlH_4 dans 20 ml d'éther. Après addition complète de la solution étherée, le mélange est porté à ébullition pendant 4 heures. On le refroidit dans un bain de glace et on décompose l'excès de LiAlH_4 par addition, goutte à goutte, d'une solution saturée de Na_2SO_4 . On ajoute 100 ml d'éther au mélange et on filtre. La phase étherée est isolée par décantation, séchée sur Na_2SO_4 et évaporée à sec. On obtient un résidu solide donnant un test positif à la ninhydrine. Celui-ci est dissous dans CHCl_3 et fixé sur une colonne de silicagel (30 cm x 20 cm) (Kieselgel 60 0,063-0,20 mm Merck).

L'élution au chloroforme nous permet d'éliminer l'excès de bromoheptadécane et éventuellement de l'heptadécane, et le mélange $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH}$ (60/40 V/V) élue la stéarylamine. L'éluat est recueilli jusqu'à test négatif à la ninhydrine. On évapore le solvant sous vide et le résidu jaunâtre est dissous dans 50 ml d'éther dans lequel on fait barboter du gaz HCl anhydre jusqu'à saturation. Le chlorhydrate de stéarylamine précipite, il est isolé, lavé abondamment à l'éther sec et séché sous vide dans un dessiccateur sur KOH . On relibère l'amine en dissolvant son chlorhydrate dans l'eau à 60°C et en neutralisant avec une solution de soude 0,1 M. L'amine est ensuite extraite au chloroforme. Une CCM avec le système de solvants $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ (90/10 V/V) et révélation à l'iode et à la ninhydrine ne fait apparaître qu'une seule tache de même R_f qu'un échantillon témoin (R_{dt} 65% par rapport à K^{13}CN).

Synthèse de l'aminooctadécane ^{15}N (stéarylamine ^{15}N)

A 6 millimoles de bromoheptadécane dissous dans 30 ml de DMF anhydre,

 (*) Bien que la formation du nitrile soit plus rapide dans le DMSO ou le DMF, nous avons préféré utiliser l'éthanol pour des raisons de commodité.

on ajoute 3 millimoles de phtalimide de potassium ^{15}N . Le mélange est porté à 100°C et maintenu à cette température pendant 7 heures. Après refroidissement, on évapore le solvant et le résidu est lavé avec une solution de NaOH 0,1N, puis à l'eau. Il est ensuite séché et mis en suspension dans 30 ml d'éthanol en présence de 1 ml d'hydrazine hydrate à 85%. Le mélange est chauffé à reflux pendant deux heures. On refroidit le mélange, évapore à sec et le résidu est repris avec 30 ml de HCl (6N). On chauffe à ébullition pendant une heure et filtre la solution à chaud. Par refroidissement à 0°C le chlorhydrate de stéarylamine ^{15}N précipite. On l'isole, le lave avec de l'eau glacée. L'amine est libérée comme précédemment et soumise à une chromatographie sur colonne de silicagel (30 cm x 2 cm) éluant : ($\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 70/30 V/V). On collecte des fractions de 5 ml sur un collecteur automatique à raison d'un tube de 5 ml toutes les 15 mn jusqu'à test négatif à la ninhydrine de l'effluent. Le contenu des tubes est soumis à une CCM avec révélation à l'iode et à la ninhydrine. On rassemble le contenu des tubes contenant le produit pur, on évapore à sec, on obtient des cristaux parfaitement blancs dont on a enregistré le spectre RMN ^{13}C et le spectre de masse (Rendement par rapport au phtalimide de potassium : 72%).

Synthèse de l'amide stéarique ^{13}C -1

A une solution de 2 millimoles d'acide stéarique ^{13}C -1 dans 5 ml de benzène anhydre, on ajoute 0,5 ml de SOCl_2 (distillé sur quinoléine) et le mélange est porté à reflux pendant deux heures. On évapore à sec sous pression réduite et on recommence la même opération. On élimine ensuite le benzène et l'excès de SOCl_2 à la pompe vide. Le résidu huileux est dissous dans l'éther anhydre (25 ml) et la solution est soumise à un barbotage de NH_3 anhydre. L'amide et le chlorure d'ammonium précipitent. On élimine l'éther et l'excès de NH_3 sous vide, le résidu est lavé à l'eau pour éliminer NH_4Cl . L'amide est séché en dessiccateur et recristallisé deux fois dans le T.H.F.

La faible solubilité de la molécule dans les solvants organiques ne nous a pas permis d'enregistrer son spectre R.M.N. ^{13}C . Elle a été donc identifiée par SM.

Synthèse de l'acide DL glutamique ^{13}C -1

a) Synthèse du formyl-3 propionate de méthyle

Une solution de chloroformyl-3 propionate de méthyle (30g) dans 200 ml de xylène est placée dans un tricol de 500 ml en présence de 5g de

Pd/BaSO₄ et 1 ml d'une solution de quinoléine S (13). Le tricol est muni d'un réfrigérateur ascendant qu'on relie à un tube plongeant dans 400 ml d'eau. Par la tubulure latérale, on fait arriver un courant de H₂ directement dans la solution. On purge l'appareil sous agitation pendant 30 mn, puis sous agitation et barbotage de H₂, on chauffe le mélange à 120°C : le gaz chlorhydrique formé entraîné par le courant de H₂ est dissous dans l'eau et dosé au fur et à mesure par une solution de soude 4N en présence de phénolphtaleine. On arrête le chauffage une demi-heure après addition de la quantité théorique de soude nécessaire pour neutraliser l'acide chlorhydrique formé au cours de la réaction. On refroidit le mélange, filtre le catalyseur et évapore le xylène sous pression réduite. Le résidu est soumis à une distillation sur colonne à bande tournante sous 20 mm/Hg. On recueille 7 fractions passant entre 79 et 81°C qu'on soumet à une chromatographie préparative en phase vapeur (30% SE 30 Chrom P 45/60). Seules les fractions pures ont été utilisées pour la préparation de l'acide DL glutamique ¹³C-1.

b) Synthèse de l'acide DL glutamique ¹³C-1

A 10 millimoles de formyl-3 propionate de méthyle dissous dans 6 ml de CH₃OH saturé d'ammoniac à -10°C, on ajoute 10 ml d'une solution ammoniacale à 24%, 6 millimoles de NH₄Cl et 6 millimoles de K¹³CN. Le mélange est abandonné pendant 48 heures à la température ambiante, puis soumis à un chauffage à 50°C pendant 2 heures. On évapore les solvants sous vide et dissout le résidu rougeâtre dans 20 ml de HCl 6N. On chauffe à reflux pendant 15 heures. Après traitement au charbon animal et filtration, on évapore à sec. Le résidu est dissous dans le minimum d'eau et fixé sur une colonne Dowex 50 WXH⁺ (25 cm x 2 cm). On lave à l'eau jusqu'à pH neutre et on élue l'acide aminé par NH₄OH (2N). On évapore l'éluat, dissout le résidu dans le minimum d'eau et ajuste le pH à 3,2 par addition de quelques gouttes de HCl concentré. La solution obtenue est ajoutée sous forte agitation à 30 ml d'éthanol. L'acide glutamique est complètement précipité après quelques heures à -20°C. Il est isolé et séché sous vide. Son spectre R.M.N. ¹³C n'indique la présence d'aucune impureté. Rendement compris entre 55 et 65% par rapport à KCN d'après plusieurs essais à blanc.

Synthèse de l'acide DL glutamique ¹³C-5

La phase aqueuse provenant de l'hydrolyse du cyano ¹³C benzamido-butyrate de potassium (8) est évaporée à sec. Le résidu est dissous dans le minimum d'eau et fixé sur une colonne de résine Dowex 50W x H⁺ (30 cm x 2 cm). On lave la colonne à l'eau distillée jusqu'à pH neutre. L'acide glutamique et l'homosérine sont élués par NH₄OH (2N) jusqu'à test négatif à la ninhydrine. On élue l'acide glutamique avec une solution d'acide formique à 5%.

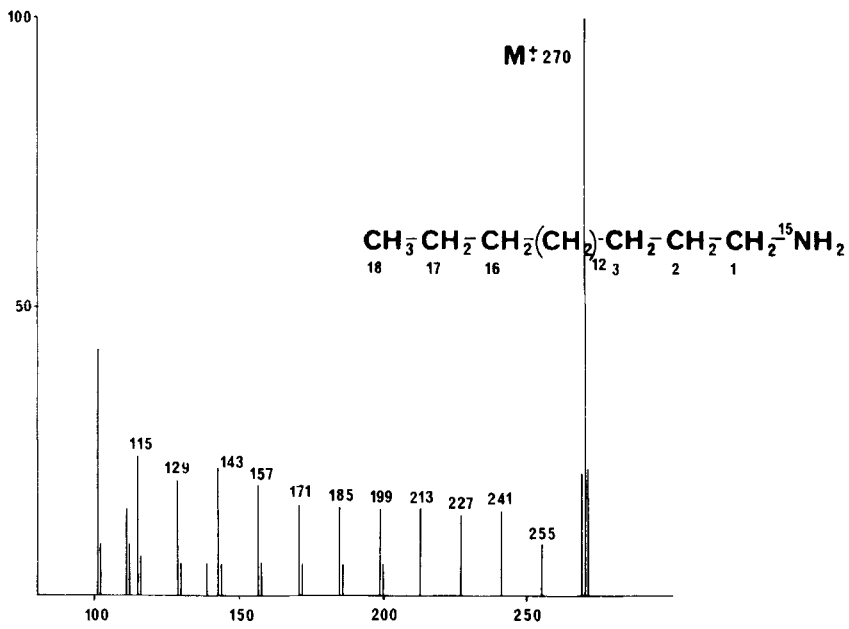
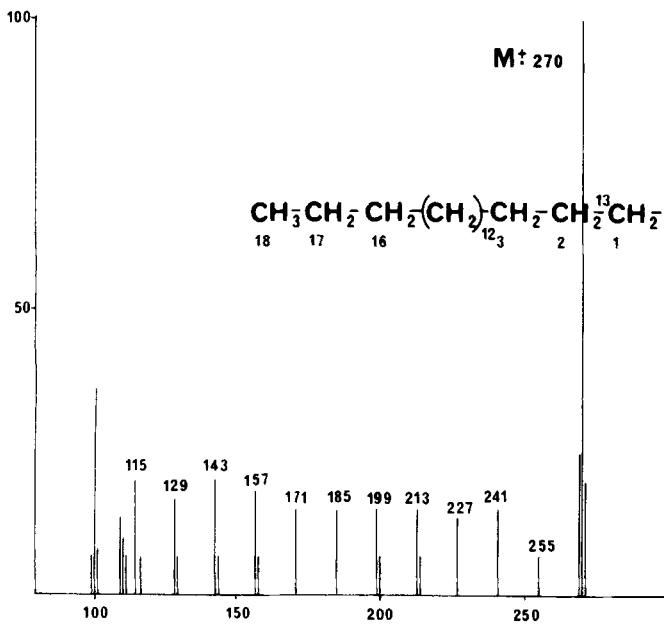
La solution obtenue est concentrée sous vide, traitée au charbon animal. Après filtration on concentre la solution sous vide jusqu'à 2 à 3 ml. On précipite l'acide glutamique par addition de 30 ml d'éthanol. On obtient ainsi 370 mg d'acide DL glutamique à partir de 350 mg de $K^{13}CN$, soit un rendement de 47% par rapport au $K^{13}CN$. Son spectre R.M.N. ^{13}C montre que le produit est pur.

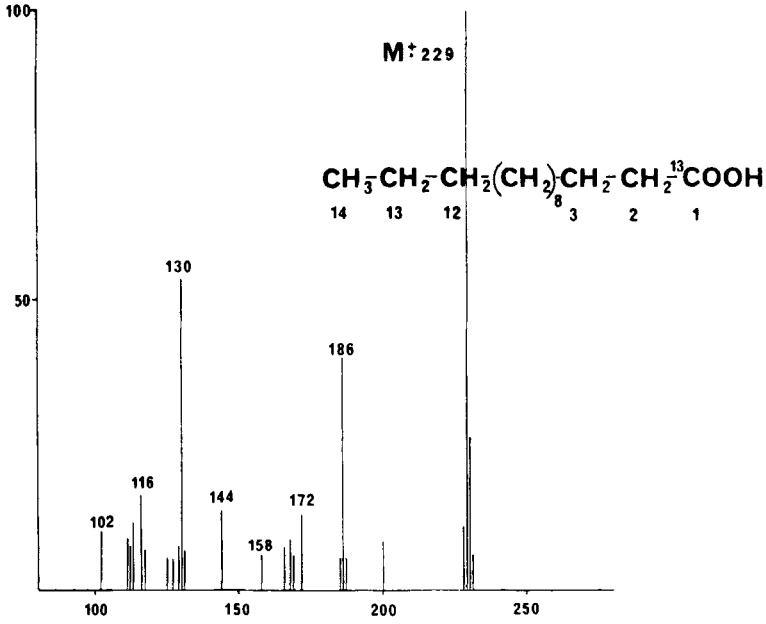
Synthèse des N palmitoyl amino acides

On dissout 2 millimoles de glycine ou d'alanine ^{13}C -1 dans 2 ml de NaOH 2N et 2 ml de THF. On ajoute alternativement goutte à goutte une solution de 3 millimoles de chlorure de palmitoyle dans 3 ml de THF et une solution de NaOH (4N) (sous agitation et en refroidissant le mélange réactionnel dans un bain de glace). Une heure après l'addition des réactifs, on dilue le milieu et on acidifie par addition de HCl 6N. Le précipité est isolé, lavé abondamment à l'eau et séché sous vide. Il est repris par 20 ml d'éther de pétrole à chaud pour dissoudre l'acide palmitique en excès. Le palmitoyl amino acide est isolé par filtration, lavé avec un peu d'éther de pétrole et séché. Les rendements varient entre 70 et 78%. Le même mode opératoire a été utilisé pour préparer le N palmitoyl ^{13}C -1, $U^{13}C$ Ala et les N palmitoyl Glu ^{13}C -1 et ^{13}C -5. Nous avons confirmé la pureté de ces N palmitoyl amino acides par SM et RMN ^{13}C .

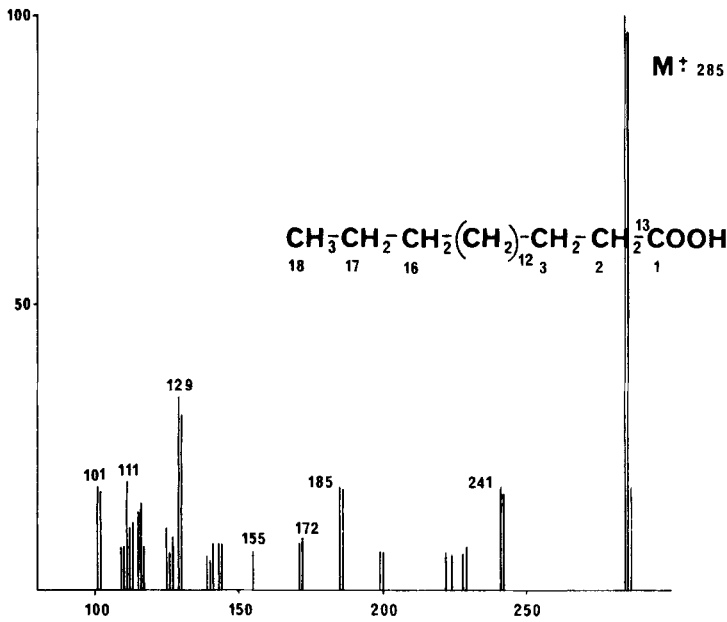
REFERENCES

- 1 - J.C. VEDERAS, W. GRAF, L. DAVID and C. TAMM, *Helv. Chem. Acta*, 58: 1886 (1975)
- 2 - NGUYEN DINH NGUYEN, *Ark. Kemi.*, 28: 289 (1968)
- 3 - GABRIEL, *Ber.*, 20: 2227 (1887)
- 4 - M.S. GIBSON and R.W. BRADSHAW, *Angew. Chem. Intern. Ed. Engl.*, 7: 919 (1968)
- 5 - F.L. COOK, W.B. CHAUNCEY and L.C. LIOTTA, *J. Org. Chem.*, 23: 3416 (1974)
- 6 - A. STREKER, *Ann. Chem.*, 75: 27 (1850)
- 7 - L. PICHAT, P.N. LIEM and J.P. GUERMONT, *J. Labelled Compounds*, 4: 251 (1968)
- 8 - L. PICHAT, J. MIZON and M. HERBERT, 1787 (1963)
- 9 - M. FIESER, L.F. FIESER, E. TOROMANOF, Y. HIRATA, H. HEYMANN, M. TEFFT and S. BHATTACHARYA, *J. Am. Chem. Soc.*, 78: 2825 (1956)
- 10 - A.V. PRABHUDESAI and C.V. VISWANATHAN, *Chemistry and Physics of lipids*, 22 : 71 (1978)
- 11 - A. KOEBNER, *J. Chem. Soc.*, 564 (1941)
- 12 - N.J. BUNCE, *J. Org. Chem.*, 37 : 664 (1972)
- 13 - C.F.H. ALLEN and J. VANALLAN, *Organic Syntheses Coll. Volume III*, p.626 (Method N, Note 4).

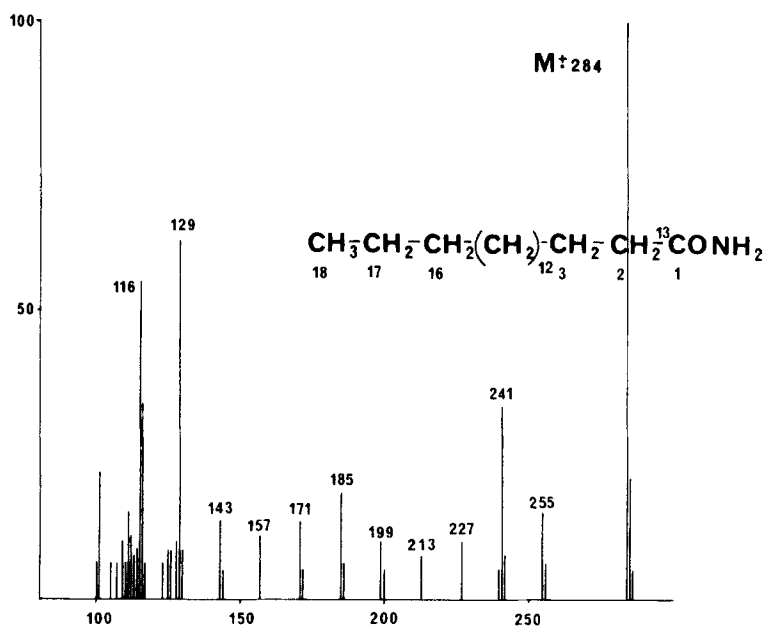
Spectre de masse à 70eV de la stéarylamine ^{15}N Spectre de masse à 70eV de la stéarylamine $^{13}\text{C-1}$



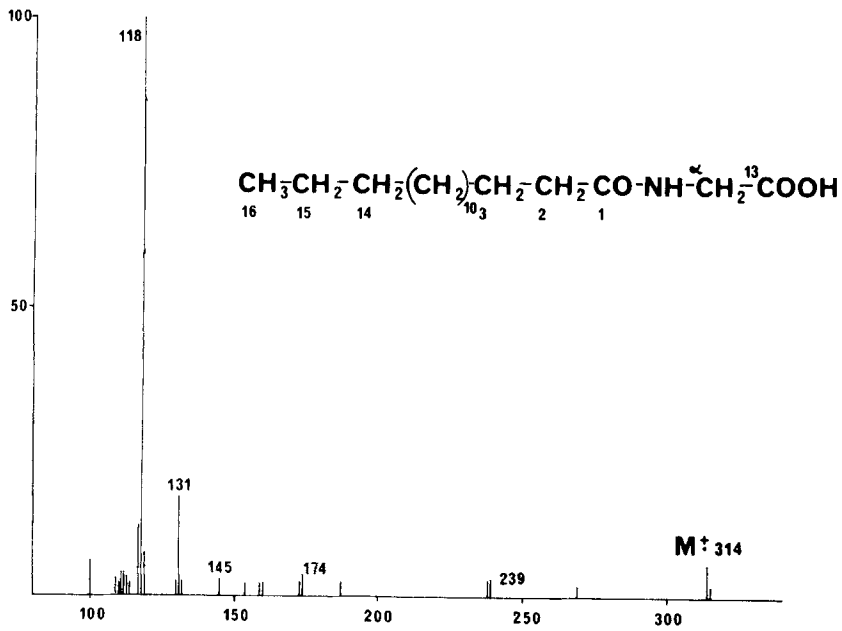
Spectre de masse à 70eV de l'acide stéarique ^{13}C -1 (90%)



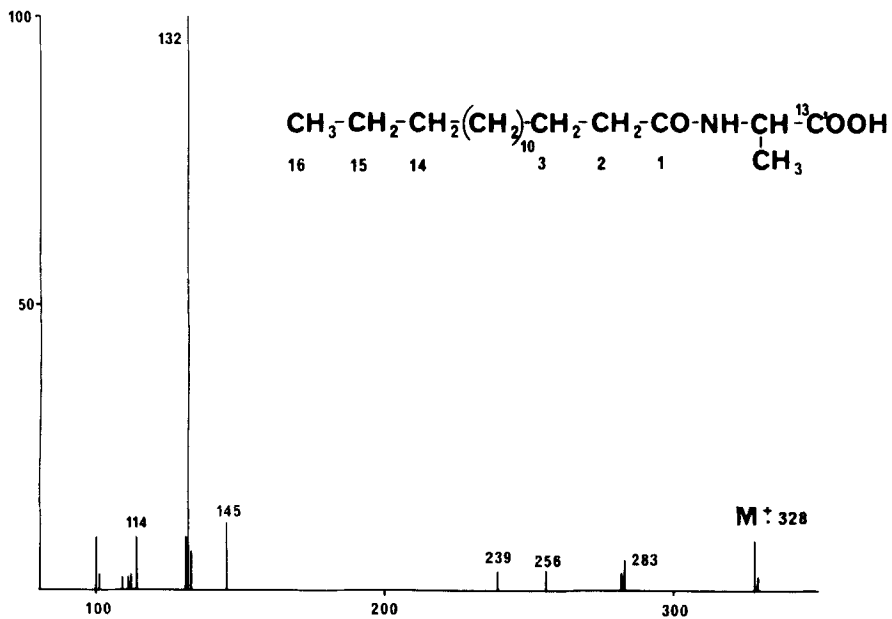
Spectre de masse à 70eV de l'acide stéarique ^{13}C -1 (45%)



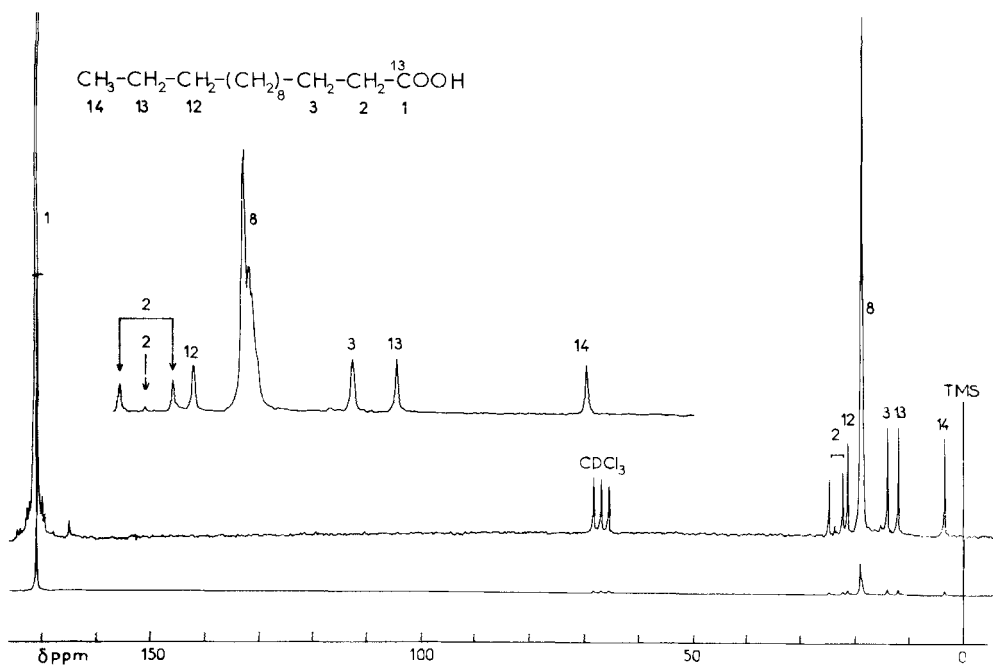
Spectre de masse à 70eV de l'amide stéarique ¹³C-1 (90%)



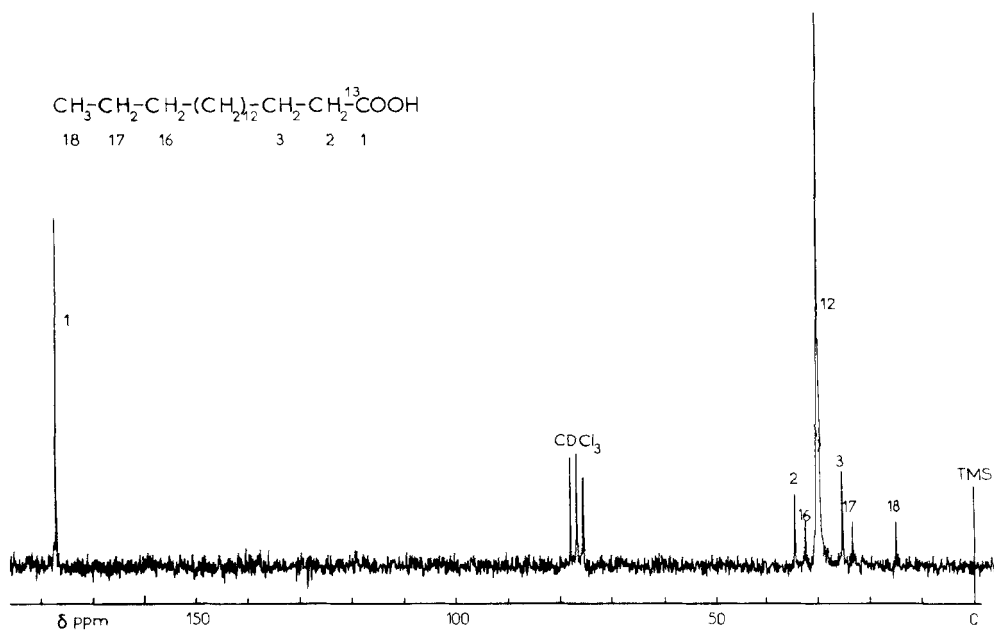
Spectre de masse à 70eV du N palmitoyl glycine $^{13}\text{C-1}$



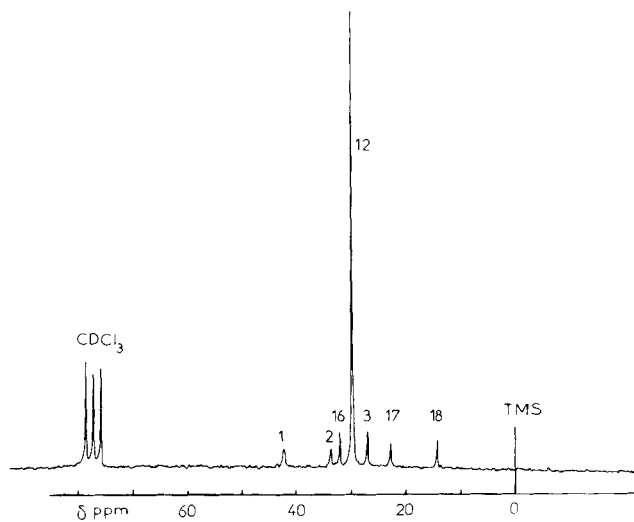
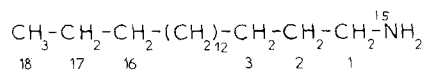
Spectre de masse à 70eV du N palmitoyl alanine $^{13}\text{C-1}$



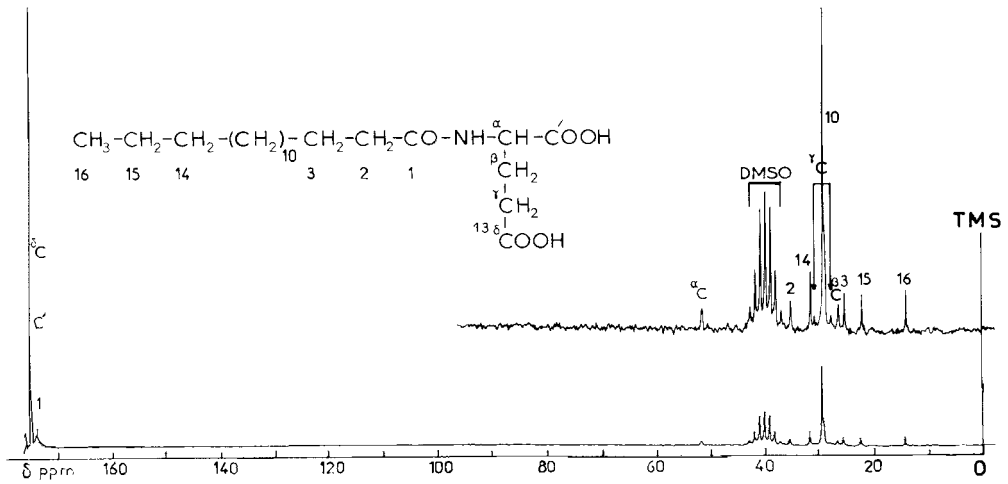
Spectre RMN¹³C de l'acide stéarique ¹³C-1 (90%) dans CDCl₃



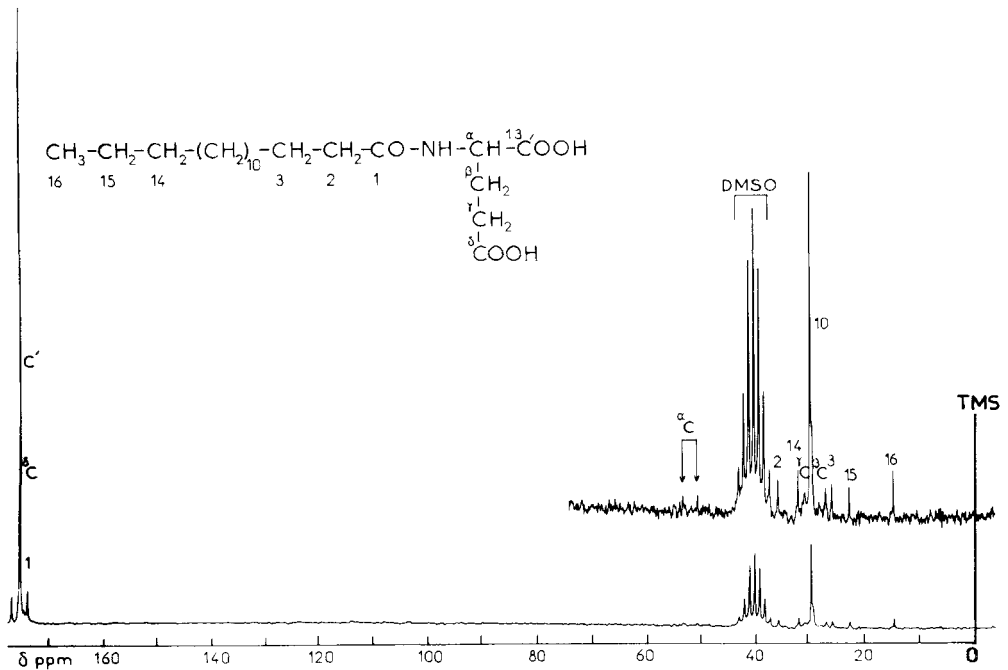
Spectre RMN¹³C de l'acide stéarique ¹³C-1 (10%) dans CDCl₃



Spectre RMN¹³C de la stéarylamine ¹⁵N (96,8%) dans CDCl₃



Spectre RMN¹³C du N palmitoyl acide glutamique ¹³C (90%) dans DMSO (d₆)



Spectre RMN¹³C du N palmitoyl acide glutamique $\delta^{13}\text{C}$ (90%) dans DMSO (d₆)

