

METHODES DE SYNTHESE DE L'ACIDE AGARIQUE RACEMIQUE MARQUE AU ^{14}C (ACIDE α -CETYL CITRIQUE (CARBOXYLE-1 ^{14}C) OU ACIDE HYDROXY-2 NONADÉCANETRICARBOXYLIQUE-1,2 (CARBOXYLE ^{14}CO)-3)

J.P. LELLOUCHE, J.P. BEAUCOURT, L. PICHAT^{*}
 SERVICE DES MOLECULES MARQUEES - CEN-SACLAY
 91191 GIF-SUR-YVETTE-CEDEX

SUMMARY

Racemic [3-carboxyl ^{14}C] agaric acid triethyl ester was prepared in low yield by treatment of ethyl 2-ethoxalyl octadecanoate 2 with either ethyl lithioacetate or ethyl bromoacetate, zinc and methyl borate. In another approach, lithio ethynyltrimethylsilane 6 was condensed with 2 to give 7 which, with dicyclohexylborane 8, gave the vinyl borane 9; the latter, by hydrogen peroxide oxidation followed by reaction of diazomethane gave the mixed ester 11 in low yield. [3-carboxyl ^{14}C] Agaric acid, specific activity 57 mCi/mmol, was obtained from 5 or 11 by saponification with lithium hydroxide in 1,2-dimethoxyethane. The best overall yield from ethyl [1 - ^{14}C] stearate was 18%.

L'acide agarique ou acide hydroxy-2 nonadécane-tricarboxylique-1,2,3 ou acide α -cétyle-citrique 1 existe à l'état naturel dans le champignon *Polyporus officinalis* d'où il peut être isolé. Cet acide joue un rôle biologique important dans l'inhibition de plusieurs transporteurs biochimiques. Il inhibe par exemple le transporteur des adénine-nucléotides

^{*} Address any correspondence to this author.

dans les mitochondries de cellules hépatiques de rat (1), le transporteur de l'ion citrate (2) ou l'enzyme glycérophosphate déshydrogénase de cellules cancéreuses (3,4).

Nous avons synthétisé cet acide marqué au carbone 14 sur la fonction carboxyle située en C-3 pour des études sur les mécanismes d'inhibition de l'acide agarique. A ce jour, la littérature (5) rapporte des tentatives de synthèse de l'acide agarique non marqué.

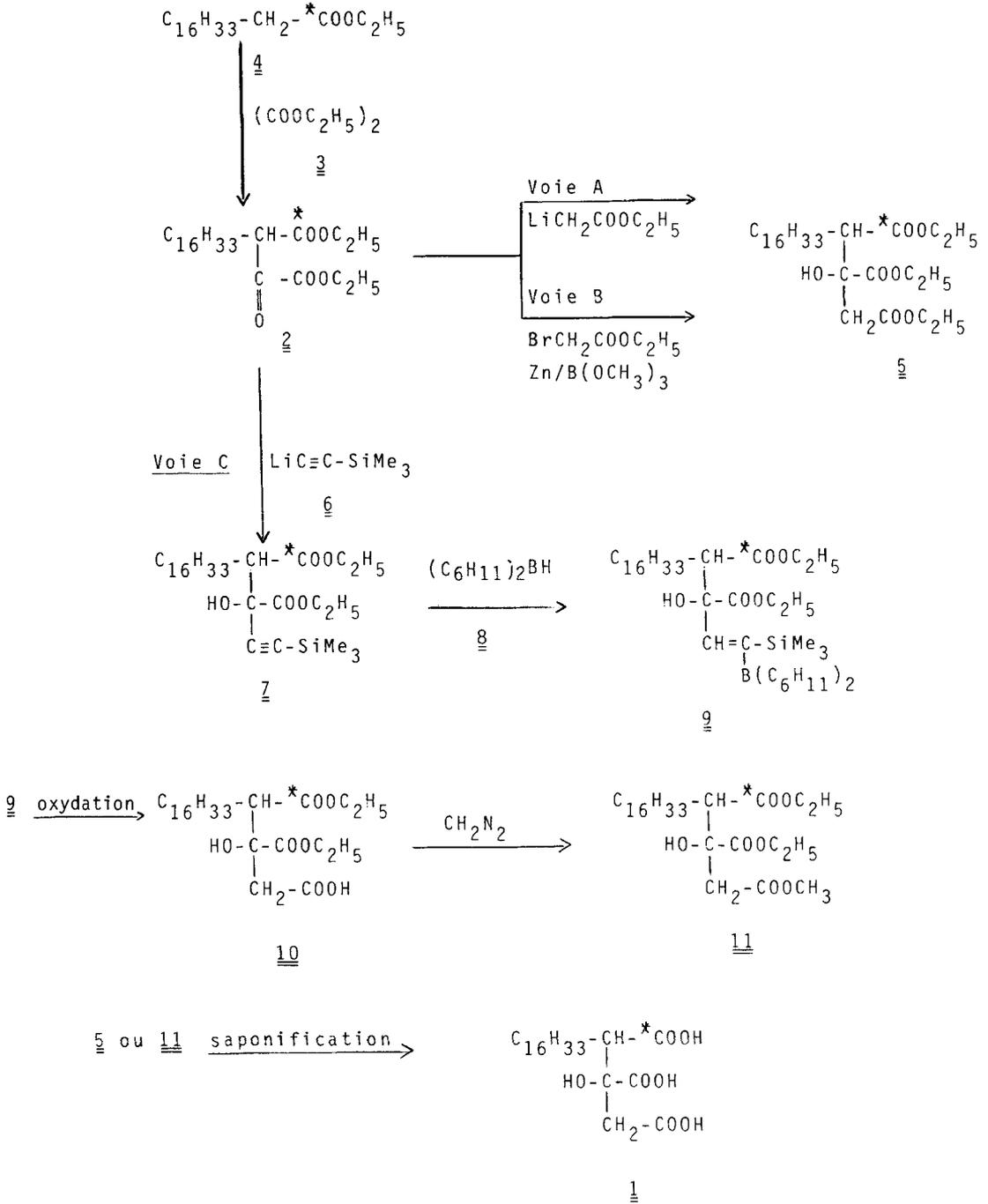
Nous avons utilisé trois voies de synthèses à partir de l'éthoxalyl-2 octadécanoate d'éthyle (^{14}C -1) 2, obtenu par réaction de Claisen entre l'oxalate d'éthyle 3 et l'octadécanoate d'éthyle (^{14}C -1) 4 (6).

Dans le premier procédé (voie A) le lithioacétate d'éthyle obtenu selon (7) est opposé à 2 dans le THF à -80°C pour donner avec un rendement de 14% l'agaricinate d'éthyle 5 (activité spécifique : 57 mCi/mM). Le rendement n'a pas pu être amélioré par élévation de la température et allongement du temps de réaction ou par addition de HMPT. De plus, la séparation de 5, effectuée par chromatographie liquide sur gel de silice, est difficile.

La deuxième voie de synthèse (voie B) consiste en une réaction de Reformatsky modifiée selon RATHKE et LINDERT (8). L'addition de borate de méthyle au milieu réactionnel neutralise les alkoxydes de zinc basiques formés. Ceci permet d'améliorer les rendements lors de l'utilisation de composés carbonylés susceptibles de s'énoliser ou de s'aldoliser. Dans ces conditions, l'action du bromoacétate d'éthyle sur 2 conduit à l'agaricinate d'éthyle 5 (A.S. = 57 mCi/mM) avec un rendement qui reste faible (17%).

Le principe de la troisième voie de synthèse (voie C) consiste à greffer un groupement éthynyltriméthylsilyle sur 2 puis à le transformer par action d'un dialcoylborane en un vinylborane qui est lui-même oxydé en groupement carboxyméthylène. L'action sur 2 du lithiotriméthylsilyle acétylène 6, préparé selon Hauptmann et Mader (9) conduit à l'éthynylsilane 7 (A.S. = 57 mCi/mM) avec un bon rendement (64%). La monohydroboration par le dicyclohexylborane 8 selon (10) conduit quantitativement au vinylborane 9 selon une réaction stéréo et régiosélective (10,11). L'oxydation de 9 par l'eau oxygénée en présence d'acétate de sodium (12) conduit au monoacide 10 avec un rendement de 35%. Le traitement de 10 par le diazométhane conduit quantitativement à l'agaricinate mixte 11 (A.S. = 57 mCi/mM). Le rendement global est de 22%.

La saponification des esters 5 et 11 pour obtenir l'acide agarique 1 a été étudiée de façon détaillée.



Parmi les nombreuses méthodes de saponification essayées, une seule (13) conduit à 1 avec un rendement acceptable (80%). Ainsi, 5 ou 11 traités par la lithine en excès dans un mélange méthanol-diméthoxyéthane conduisent, après 5 jours de réaction, à 1 qui est purifié par chromatographie liquide sur gel de silice type "H" par le mélange : n-propanol-ammoniaque.

Les trois voies de synthèse explorées ont donné l'acide agarique (carboxyle ^{14}C)-3 1 avec une activité spécifique de 57 mCi/mM et un rendement global maximum de 18% après purification. D'autres positions de marquage sont facilement accessibles par les schémas réactionnels décrits qui donnent tous un mélange des quatre diastéréoisomères (2R, 3R) ; (2S, 3S) ; (2R, 3S) ; (2S, 3R).

PARTIE EXPERIMENTALE

Les spectres I.R. sont obtenus sur un appareil Beckmann 4250. Les spectres de masse sont enregistrés sur un spectromètre Varian CH7A à 70 eV (introduction directe). Les spectres de RMN du proton et du carbone 13 sont enregistrés sur un spectromètre Varian FT 80 opérant respectivement à 80 MHz et à 20 MHz. Les contrôles de pureté sont obtenus par chromatographie sur couche mince (plaques de gel de silice Merck 60 F 254) et par chromatographie liquide haute pression CLHP sur un appareil Dupont-850.

Ethoxalyl-2 octadécanoate d'éthyle (^{14}C -1) : 2

Sous courant d'azote, on ajoute 5,5 ml (41 mM) d'oxalate d'éthyle anhydre 3 à une solution de 10 mM d'éthanolate de sodium dans 5 ml d'éthanol refroidi à -20°C . On ajoute ensuite 10,2 mM d'octadécanoate d'éthyle (^{14}C -1) 4 (600 mCi, 57 mCi/mM) en solution étherée. Le mélange est agité 2 heures à 50°C . Après évaporations successives de l'éthanol et de 3 en excès, neutralisation à l'acide acétique et extraction à l'éther, on obtient 2 qui est purifié sur colonne de gel de silice "Merck" (cyclohexane-acétate d'éthyle : 95-05).

Rendement : 56%.

Contrôles :

CCM : cyclohexane-acétate d'éthyle : 98-0,2; $R_F = 0,26$

RMN- ^1H : $\delta = 1,25$ ppm (m, 9H) ; $\delta = 1,6$ ppm (m, 30H) ; $\delta = 4,7$ ppm (q, 4H).

RMN- ^{13}C : δ (ppm) = 18,5 ; 19 ; 19,5 ; 28 ; 32 ; 35 ; 38 ; 59 ; 65 ; 67 ; 174 ; 181 ; 195 .

Hydroxy-2 nonadécane-tricarboxylate-1,2 [carboxyle- ^{14}C]-3 d'éthyle 5 (Voie A).

1,1 mM d'acétate d'éthyle anhydre sont ajoutées à -80°C à 1,1 mM de diisopropylamide de lithium en solution dans le THF anhydre. Après 15 mn d'agitation, on ajoute 1 mM de 2 en solution dans le THF. La réaction dure 18h à -80°C . Après hydrolyse (4 ml H_2O + 0,2 ml CH_3COOH) et évaporation sous vide, le résidu est chromatographié sur une colonne de gel de silice type "H". On élue par le mélange : benzène-acétate d'éthyle (98-02) pour obtenir 5 chimiquement et radiochimiquement pur avec une activité spécifique de 57 mCi/mM. Rendement : 14%.

C.C.M. : benzène-acétate d'éthyle : 95 : 05 ; $R_F = 0,31$
 cyclohexane-acétate d'éthyle : 95 : 05 ; $R_F = 0,20$
 hexane-éther : 50 : 50 ; $R_F = 0,51$
 Analyse $\text{C}_{28}\text{H}_{52}\text{O}_7$
 Calc. % C:67,10 ; H:11,10 ; O:21,85
 Tr. % C:67,17 ; H:10,47 ; O:22,37.

RMN- ^1H : $\delta = 0,8$ ppm (t, 12H) ; $\delta = 1,1$ ppm (m, 30H) ; $\delta = 2,9$ ppm (s, 2H) ; $\delta = 3,5$ ppm (t, 1H) ; $\delta = 3,8$ ppm (q, 6H) ; $\delta = 4,25$ ppm (s, 1H).

RMN- ^{13}C : δ (ppm) = 13,25 ; 13,5 ; 14 ; 14,25 ; 23 ; 27 ; 28 ; 30 ; 32, 40 ; 53 ; 60 ; 60,5 ; 62 ; 76 ; 171 ; 172 ; 174.

S.M. : m/e (%) = 502 (0,5%) ; 429 (9,9%) ; 384 (3,19%) ; 314 (9,3%)

Hydroxy-2 nonadécane-tricarboxylate-1,2 [carboxyle ^{14}C]-3 d'éthyle 5 (Voie B).

Sous courant d'azote, 1,44 mM de 2 (82 mCi ; 57 mCi/mM) sont agitées dans 1 ml de THF anhydre avec 8,8 mM de borate de méthyle et 2,88 mM de zinc sec (5 à 10 mesh). Après addition de 1,44

mM d' α -bromoacétate d'éthyle, l'agitation est maintenue 60h à température ambiante. Après hydrolyse, extraction à l'éther et évaporation, le résidu est purifié par chromatographie liquide sur colonne de gel de silice type "H" pour donner 13,9 mCi de 5 (A.S. 57 mCi/mM) chimiquement et radiochimiquement pur. Rendement : 17%.

Contrôles :

Ils sont identiques à ceux de 5 obtenus par la voie A.

Hydroxy-2 [éthoxycarbonyl ^{14}C]-3 éthoxycarbonyl-2 méthoxycarbonyl-1 nonadécane 11 (Voie C).

a) (Ethoxycarbonyl ^{14}C)-4 éthoxycarbonyl-3 hydroxy-3 triméthylsilyl-1 eicosyne 7

5,77 mM d'éthynyltriméthylsilane en solution dans 10 ml de THF sont traités à -25°C par 4,6 mM de n-BuLi pendant 15 mn. L'organolithien 6 ainsi formé est traité pendant 4h à -70°C par 3,46 mM de 2 en solution dans le THF (197 mCi à 57 mCi/mM). Après hydrolyse, extraction et séchage, le résidu est purifié par chromatographie liquide sur colonne de gel de silice type "H" (cyclohexane-acétate d'éthyle : 95-05). Rendement : 64%.

CCM : benzène-cyclohexane-acétate d'éthyle : 50:48:02 ; $R_F = 0,28$
 analyse $\text{C}_{29}\text{H}_{54}\text{SiO}_5$
 Calc. % C:70,04 ; H:10,46 ; O:19,50.
 Tr. % C:72,15 ; H:11,28 ; O:16,57.

RMN- ^1H : $\delta = 0,20$ ppm (s, 9H) ; 0,8 ppm (m, 9H) ; 1,1 ppm (m, 30H) ; 3,5 ppm (t, 1H) ; 3,8 ppm (q, 4H).

RMN- ^{13}C : δ (ppm) = 5 ; 19,5 ; 20 ; 20,5 ; 28 ; 33 ; 33,5 ; 34 ; 35 ; 38 ; 59 ; 61 ; 66 ; 68 ; 79 ; 178 ; 179.

b) (Ethoxycarbonyl ^{14}C)-4 éthoxycarbonyl-3 hydroxy-3 triméthylsilyl-1 dicyclohexylboryl-1 eicosène 9.

Une solution de 0,5 mM de 7 dans 10 ml de THF anhydre est traitée à 0°C par 1 mM de dicyclohexylborane. L'agitation est poursuivie pendant 18h à 20°C avec injection à nouveau de 3,5 mM de dicyclohexylborane et agitation supplémentaire de 18h. L'avancement de la réaction est suivi par CCM (hexane-acétate d'éthyle : 85-15) ou par RMN du proton.

La réaction est quantitative et le produit de réaction 9 est utilisé sans purification.

c) Hydroxy-2 [éthoxycarbonyl ^{14}C]-3 éthoxycarbonyl-2 méthoxycarbonyl-1 nonadécane 11.

9 est oxydé 5h à 20°C par 5 ml d'eau oxygénée à 30% et 5 ml d'acétate de sodium (3M). Après addition supplémentaire de 5 ml de CH_3COONa (3M), l'agitation est poursuivie 80h à 20°C. Après addition de métabisulfite de sodium et extraction à l'éther, le résidu 10 est traité sans purification à 0°C par 3 mM de diazométhane en solution étherée. Après évaporation, le résidu est purifié par chromatographie liquide sur gel de silice type "H" (hexane-acétate d'éthyle : 85-15) pour fournir 51 mCi de 11 (AS = 57 mCi/mM) chimiquement et radiochimiquement pur. Rendement : 22%.

CCM : hexane-acétate d'éthyle : 85:15 ; $R_F = 0,33$

analyse $\text{C}_{27}\text{H}_{50}\text{O}_7$:

Calc % C: 67,03 ; H:10,29 ; O:20,44

Tr. % C:66,93 ; H:10,36 ; O:23,01.

RMN- ^1H : $\delta = 0,8$ ppm (m, 9H) ; 1,2 ppm (m, 30H) ; 2,9 ppm (s, 2H) ; 3,5 ppm (t, 1H) ; 3,7 ppm (s, 3H) ; 4,1 ppm (q, 4H).

RMN- ^{13}C : δ (ppm) = 19,5 ; 20 ; 20,5 ; 28 ; 32 ; 33 ; 35 ; 38 ; 45 ; 57 ; 58 ; 66 ; 67 ; 82 ; 178 ; 179 ; 180.

S.M. m/e (%) = 486 (1,6%) ; 413 (62,7%) ; 382 (63,2%) ; 368 (67%) ; 312 (27,2%) ; 176 (12,3%).

Acide hydroxy-2 nonadécane-tricarboxylique-1,2 (carboxyle- ^{14}C)-3.
1.

0,035 mM (2 mCi ; 57 mCi/mM) de 5 ou 11 sont agités 5 jours à 20°C dans 50 ml du mélange méthanol-diméthoxyéthane (1-1) en présence de 80 mM de LiOH. Après acidification, extraction à l'éther et évaporation, le résidu est purifié par chromatographie liquide sur colonne de gel de silice type "H" (n-propanol-ammoniaque : 70:-30) pour fournir 1,6 mCi (57 mCi/mM) de 1 chimiquement et radiochimiquement pur. Rendement : 80%.

CCM : 1) silice Merck 60 F 254.

n-propanol-ammoniaque : 70:30 ; $R_F = 0,20$

2) silice phase inverse KC 18 Whatman

eau-méthanol : 35:65 ; $R_F = 0,45$

3) cellulose Merck F 254

t-butanol-méthyléthylcétone-ammoniaque-eau : 40:40:15:05 ;
 $R_F = 0,5$.

S.M. : m/e (%) = 398 (13,8%) ; 380 (19,2%) ; 370 (13,5%) ; 362 (13,7%).

CLHP

Colonne mm x mm	phase mobile	temps de rétention
Dupont Zorbax TMS 4,6 x 25	méthanol (1% H ₃ PO ₄) ⁷⁵ eau (1% H ₃ PO ₄) ²⁵	7 mn
Dupont Zorbax THS 4,6 x 25	méthanol	2 mn
Dupont Zorbax CN 4,6 x 25	méthanol (1% H ₃ PO ₄)	2 mn
Dupont Zorbax C8 4,6 x 25	méthanol (1% H ₃ PO ₄)	2 mn
Dupont Zorbax C8 4,6 x 25	méthanol 85 eau 15	7 mn

Remerciements

Nous remercions Monsieur le Professeur VIGNAIS et Monsieur le Docteur LAUQUIN (CEN.G-Biochimie) pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail entrepris à leur demande.

BIBLIOGRAPHIE

- 1) - E. CHAVEZ, M. KLAPP.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1975, 67, 272
- 2) - E. CHAVEZ, R. CHAVEZ et N. CARRASCO.
Life Sciences, 1978, 23, 1423.
- 3) - E.I. CIACCIO, G.E. BOXER, T.M. DEVLIN et R.T. FORD.
Cancer Res., 1967, 27, 1070.
- 4) - L. BIRKOFER, A. RITTER.
Angew. Chem.-Int. Edit., 1965, 4, 417.
- 5) - D.W.S. EVANS.
J. Chem. Soc, 1959, 1313
E. GRAF, K.C. LIU.
Arch. Pharm. 1967, 300, 348.
E. GRAF, K.C. LIU.
Arch. Pharm. 1973, 306, 366.
E. GRAF, K.C. LU.
Chem. Abst., 967, 67, 43391d.

- 6) - D.E. FLOYD, S.E. MILLER.
"Organic Syntheses" Collect. Vol. IV.
New York, 1963, 141.
- 7) - R.A. ELLISON, P.K. BHATNAGAR.
Synthesis, 1974, 719.
- 8) - M.W. RATHKE, A. LINDERT.
J. Org. Chem., 1970, 35, 3966.
- 9) - H. HAUPTMANN, M. MADER.
Synthesis, 1978, 307.
- 10) - G. ZWEIFEL, G.M. CLARK, N.L. POLSTOW.
J. Amer. Chem. Soc. 1971, 93, 3395.
- 11) - R.B. MILLER, T. REICHENBACH.
Tetrahedron Letters, 1974, 543.
- 12) - E. NEIGISHI, H.C. BROWN.
Synthesis, 1972, 196.
- 13) - J.P. LELLOUCHE.
Thèse Docteur Ingénieur - 29 Oct.-1981-LYON.