

SYNTHESE DES ISOMERES (E) ET (Z) DE LA PHENYLHYDRAZONE DE L'HEXANAL (noyau ^{14}C - U)*

Do-Cao-Thang, Nguyen-Hoang-Nam**, C. Chopard, J.B. Galey et J.C. Chottard.
Laboratoire de Chimie et Biochimie Pharmacologiques et Toxicologiques.
Unité Associée au CNRS en Développement Concerté avec l'INSERM, UA 400, 45
rue des Saints Pères, 75270 Paris cedex 06, France.

SUMMARY

Synthesis and chromatographic separation of (E) and (Z) isomers of (ring- ^{14}C) hexanal phenylhydrazone 2 : (ring- ^{14}C) phenylhydrazine hydrochloride 1 was synthesized from labelled aniline hydrochloride, and purification was accomplished by reverse phase low pressure liquid chromatography. The crude free base of 1 was condensed with hexanal to give a mixture of (E) and (Z) isomers of 2. The conditions for their separation by reverse phase HPLC were optimized on an analytical column and then used for the preparative work which was the most effective and fastest method. Structure and configuration of (E) and (Z) isomers of (ring- ^{14}C) hexanal phenylhydrazones (SA = 13.3 mCi/mmol) were proven by $^1\text{H-NMR}$ and mass spectroscopy.

Key Words : Carbon-14, Phenylhydrazine, Phenylhydrazone, HPLC.

INTRODUCTION

Certaines phénylhydrazones sont de très bons inhibiteurs des lipoxygénases (1-2). Dans le cadre d'une étude du mécanisme d'inhibition par ces composés nous avons montré que la phénylhydrazone de l'hexanal 2 est un substrat suicide de la lipoxygénase-1 de soja. L'utilisation de cette phénylhydrazone uniformément marquée au ^{14}C sur le noyau aromatique a pour but de mettre en évidence une éventuelle fixation covalente du noyau phényle au site actif de l'enzyme.

RESULTATS ET DISCUSSION

La synthèse de la phénylhydrazone de l'hexanal 2 marquée au ^{14}C n'est pas décrite dans la littérature. Or, pour l'étude sur une éventuelle fixation covalente du noyau phényle de l'hydrazone 2 sur la protéine il est nécessaire de disposer du produit marqué dans le noyau.

* Ce travail fait partie de la thèse de Docteur Ingénieur de JBG, soutenue à l'Université Pierre et Marie Curie, Paris VI, le 18-11-1985.

** To whom requests should be addressed.

Le présent mémoire décrit la synthèse de la phénylhydrazone de l'hexanal (noyau ^{14}C -U) 2 et la séparation de ses deux isomères (E) et (Z) par chromatographie liquide préparative à haute performance (CLPHP) en phase inverse.

Nous avons obtenu la phénylhydrazone 2 non radioactive en faisant réagir la phénylhydrazine 1, fraîchement distillée, avec un équivalent d'hexanal dans le méthanol sous argon, à la température ambiante. Après purification par distillation, l'hydrazone 2 est caractérisée par résonance magnétique nucléaire du proton (RMN- ^1H), par spectroscopie ultraviolette (UV) et par spectrométrie de masse (SM). L'analyse détaillée (250 MHz) du massif du proton H_1 permet d'estimer à environ 70/30 les proportions des deux isomères (E) et (Z) (3) (Fig.1).

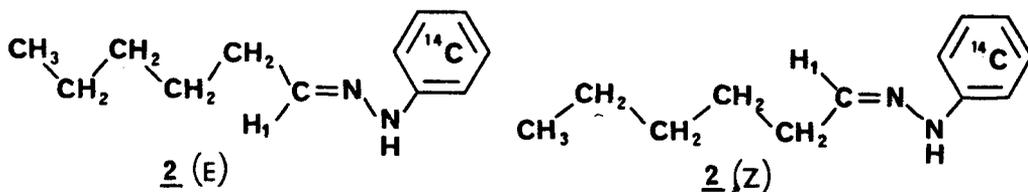


Figure 1 : Isomères (E) et (Z) de la phénylhydrazone de l'hexanal.

La préparation de la phénylhydrazine 1 marquée au ^{14}C ou au ^3H , à partir de l'aniline radioactive, est décrite (4-6), mais aucune méthode de contrôle de sa pureté n'est mentionnée.

Nous avons préparé le chlorhydrate de la phénylhydrazine ^{14}C -U 1 à partir du chlorhydrate de l'aniline ^{14}C -U (activité spécifique = 492 MBq/mmol), selon (4), en réduisant le sel de diazonium par l'anhydride sulfureux. Le contrôle de 1 par chromatographie en couche mince n'étant pas satisfaisant, son analyse a été effectuée par chromatographie liquide à haute performance (CLHP) en phase inverse. La purification de 1 peut être réalisée par chromatographie liquide à basse pression en phase inverse.

En suivant la méthode de préparation de l'hydrazone 2 non radioactive nous avons obtenu le produit 2 brut radioactif qui, analysé par CLHP en phase inverse, contient deux impuretés radioactives avec des temps de rétention très voisins de ceux des isomères (E) et (Z). Des essais de purification par CLHP en phase inverse pour les éliminer ont été infructueux. Nous avons donc été amenés à modifier les conditions opératoires. La condensation de la phényl-

hydrazine $^{14}\text{C-U } 1$ base non purifiée sur l'hexanal en milieu éthanolique, en présence d'oxyde de baryum et sous atmosphère d'argon, a permis d'accéder aisément à l'hydrazone radioactive 2 . L'analyse du produit brut par CLHP en phase inverse montre qu'on a seulement le mélange des deux isomères (E)(62%) et (Z) (38%), donc en proportions assez proches de la synthèse non radioactive (70/30). Les conditions optimum de séparation de 2 (E) et 2 (Z) par CLHP en phase inverse ont été trouvées sur une colonne analytique, ce qui nous a permis de les adapter à l'échelle préparative pour l'obtention des isomères (E) et (Z) de la phénylhydrazone de l'hexanal (noyau $^{14}\text{C-U } 2$ purs.

Les résultats de leur étude biologique seront publiés séparément.

PARTIE EXPERIMENTALE

Le spectre UV a été obtenu au moyen d'un spectromètre KONTRON UVIKON 810. Les spectres de RMN- ^1H ont été enregistrés sur les appareils VARIAN EM 390 (90MHz) ou BRUKER WM 250 (250MHz). Le SM a été effectué sur un spectromètre RIBER R 1010 équipé d'un calculateur PDP8. La CLHP a été réalisée avec les appareils WATERS : pompes Modèles 590 pour l'analytique, 590 EF pour la préparative ; injecteurs U6K ; détecteurs UV à bande variable 481. Colonnes PRO-LABO : Silice greffée C18 en $5 \mu\text{m}$ S5 ODS 2 (25cm X 4,6 mm) en analytique, S5 ODS 2 Prep 20 (25cm X 20 mm) en préparative.

Chlorhydrate de la phénylhydrazine $^{14}\text{C-U } 1$:

Dans un ballon conique de 5 ml on introduit 6,4 mCi (0,48 mmol, AS = 13,3 mCi/mmol, 1 mCi = 37 MBq) de chlorhydrate d'aniline $^{14}\text{C-U}$ (Service des Molécules Marquées, C.E.N. Saclay) en solution dans 0,5 ml d'eau saturée d'argon et 0,14 ml d'acide chlorhydrique à 13 %. La solution est refroidie à environ -5°C , puis on ajoute, sous courant d'argon et agitation, la solution refroidie de 38mg de nitrite de sodium dans 0,2 ml d'eau. Le mélange est agité pendant 3 minutes et la solution jaune claire de sel de diazonium est pipetée, ajoutée goutte à goutte, en 5 minutes, à 4,7 ml d'une solution aqueuse saturée d'anhydride sulfureux et refroidie à -5°C . Pendant la réduction du sel de diazonium on continue à introduire l'anhydride sulfureux en refroidissant et en agitant. On prolonge l'agitation pendant 15 minutes, laisse le mélange remonter à environ 5°C , puis ajoute 0,23 ml d'acide chlorhydrique concentré. La solution colorée en rouge est décolorée avec du charbon activé et filtrée sous courant d'argon. Le produit est porté à sec puis mis en solution dans du méthanol saturé d'argon. On obtient 5,09 mCi de chlorhydrate de phénylhydrazine $^{14}\text{C-U } 1$

(Rendement = 79,5 %) qui, analysé par CLHP en phase inverse, contient des traces d'aniline. CLHP = solvant : méthanol (30), eau (70), TEA (0,5%^{v/v}); débit : 1ml/min ; chlorhydrate de phenylhydrazine (7,3 min), chlorhydrate d'aniline (9,6 min.).

Ce produit est utilisé pour la réaction suivante.

Purification de 1 :

Pour une autre étude biologique, le produit 1 est purifié par chromatographie liquide à basse pression en phase inverse et sous atmosphère d'argon, avec un appareil Miniprep LC Jobin-Yvon rempli de phase P-20 ODS Whatman ; l'élution est effectuée avec le mélange méthanol (60)-eau (40).

Phénylhydrazone de l'hexanal (noyau ¹⁴C-U) 2 :

A 1,89 mCi (0,142 mmol) de phénylhydrazine ¹⁴C-U base, fraîchement libérée de son chlorhydrate, en solution dans 0,5 ml d'éthanol saturé d'argon dans un ballon conique de 10 ml, on ajoute sous atmosphère d'argon et agitation 66 mg (0,43 mmol) d'oxyde de baryum, puis goutte à goutte la solution de 0,25 mmol d'hexanal dans 1 ml d'éthanol saturé d'argon. On bouche le ballon et agite le mélange à la température ambiante pendant 30 minutes environ. Le mélange jaune clair est filtré sous atmosphère d'argon et l'oxyde de baryum, lavé avec l'éthanol saturé d'argon.

On recueille ainsi 0,975 mCi de produit 2 qui, analysé par CLHP en phase inverse (Figure 2), ne contient pas d'impuretés ayant des temps de rétention voisins de ceux des deux isomères (E) et (Z). Le pourcentage d'isomères obtenu dans la synthèse radioactive est de 62 % de (E) et 38 % de (Z). Il est assez proche de celui trouvé (70/30) lors de la synthèse non radioactive de 2 opérée sur des quantités plus importantes.

La séparation isomérique effectuée par CLPHP en phase inverse (Figure 3) permet de recueillir 0,171 mCi d'isomères (E) et 0,135 mCi de (Z) purs.

Phénylhydrazone de l'hexanal non radioactive 2 :

.Eb_{0,5} : 160-161° C

.UV (EtOH) : λ_{max} 273 nm (ε₁₇₀₀₀)

.RMN ¹H (CDCl₃) δ (ppm/TMS) : 0,9-1,0 (m, 3H) ; 1,3-1,7 (m, 6H) ; 2,1-2,3 (m, 2H) ; 6,5-6,8 (m, 1H) ; 6,9-7,3 (m, 6H).

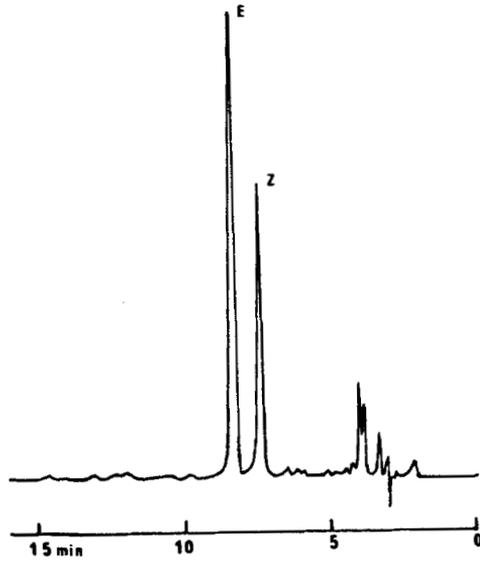


Figure 2 : Analyse par CLHP en phase inverse du mélange 2 (E) et 2 (Z) :
MeOH (80) - H₂O (20) - TEA (0,5‰), 1 ml/min, UV = 273 nm.

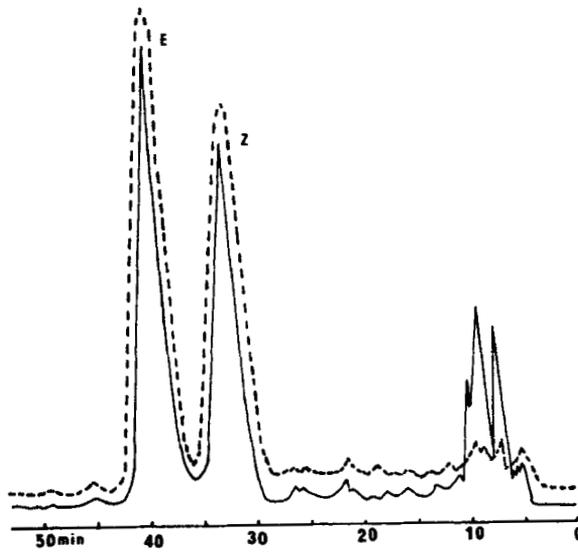


Figure 3 : Séparation par CLPHP en phase inverse de 2 (E) et 2 (Z) : MeOH (70) -
H₂O (30) - TEA (0,5‰), 10 ml/min, UV = 273 nm (—) ; radiochromato-
gramme par comptage (-----).

.L'analyse à 250 MHz du massif du proton H₁ (6,5-6,8 ppm) permet de distinguer la configuration des deux isomères (E) (6,8, t, J = 8Hz) (70 %) et (Z) (6,5, t, J = 5 Hz) (30 %) (Figure 1).

.SM m/e : 190 (M), 161, 133, 93, 77.

REMERCIEMENTS

Nous remercions vivement la Direction du Service des Molécules Marquées du C.E.N. à Saclay : Messieurs A. Vanhove, Chef de Service et J.P. Beaucourt, Responsable scientifique, d'avoir bien voulu nous accueillir (DCT,NHN) et de nous faire bénéficier de toutes les installations du Service.

REFERENCES

- 1 D.P. Wallach et V.R. Brown, *Biochem. Biophys. Acta*, 1981, 663, 361-372.
- 2 J. Baumann et G. Wurm, *Agents and Actions*, 1982, 12, 3-9.
- 3 G.J. Karabatsos et R.A. Taller, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1963, 85, 3624-3629 ; *Tetrahedron*, 1968, 24, 3923-3937.
- 4 T.F. Burger, *J. Labelled Compounds*, 1968, 4, 262-275.
- 5 A. Unverricht, G. Simon et H.R. Schütte, *Z. Chem.*, 1976, 16, 442.
- 6 G.P. Gardini et G. Palla, *J. Labelled Compounds and Radiopharm.*, 1977, 13, 339-347.