

SYNTHESE D'ACIDE BENZISOXAZOLE-1,2 ACETIQUE-3  
(<sup>14</sup>C-α) ET (<sup>14</sup>C-β)

P. THOUREL, J.P. NOEL, J.P. BEAUCOURT\*  
Service des Molécules Marquées  
CEN-SACLAY  
91191 GIF-SUR-YVETTE CEDEX FRANCE

-----  
SUMMARY :

The preparations of 1,2-benzisoxazole-3-acetic acid labelled with <sup>14</sup>C in position α or β of the side chain are described. α-<sup>14</sup>C acid was obtained from 4-hydroxy coumarin [3-<sup>14</sup>C] via Fries rearrangement of phenyl acetate [methyl-<sup>14</sup>C]. β-<sup>14</sup>C acid was synthesized from 4-hydroxy coumarin [2-<sup>14</sup>C] obtained from <sup>14</sup>C-diethyl carbonate. Labelled positions were determined by mass spectrometry and were in agreement with the proposed reaction scheme.

RESUME :

Nous décrivons dans ce travail, deux synthèses de l'acide benzisoxazole-1,2 acétique-3 marqué respectivement au carbone 14 en positions α et β. L'acide <sup>14</sup>C-α est obtenu à partir d'hydroxy-4 coumarine (<sup>14</sup>C-3) synthétisée à partir d'hydroxy-1 acétophénone (<sup>14</sup>C-CH<sub>3</sub>) obtenue par réaction de Fries.

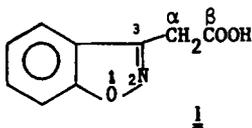
L'acide <sup>14</sup>C-β est synthétisé à partir d'hydroxy-4 coumarine <sup>14</sup>C-2 obtenue à partir de carbonate d'éthyle <sup>14</sup>C. Les positions de marquage ont été contrôlées par spectrométrie de masse et ont confirmé le schéma réactionnel supposé du réarrangement en acide benzisoxazole-1,2 acétique-3.

Key words :

Carbon-14 labelling, 1,2-benzisoxazole-3-acetic acid, Fries rearrangement, diethyl carbonate.

## INTRODUCTION

Les dérivés du benzisoxazole-1,2 ont de nombreuses utilisations industrielles (1). Parmi ces composés, l'acide benzisoxazole-1,2 acétique-3 1 joue un rôle important. Il peut se substituer à l'acide indolylacétique-3 et se comporter en isostère de ce produit comme régulateur hormonal des végétaux (2).

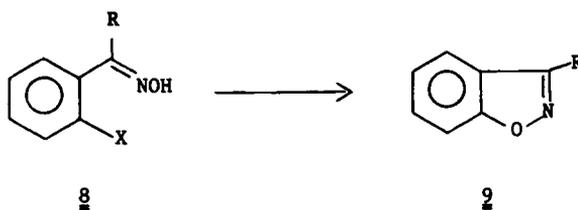


Il sert aussi d'intermédiaire de synthèses à de nombreux dérivés d'activités pharmaceutiques diverses : antispasmodiques (3,4), anticonvulsants (5), antituberculeux (6) ou antiréserpiniques chez les animaux (6). Les études de biodisponibilité et de métabolisme de ces composés nécessitent leur marquage par le carbone 14. Nous nous sommes intéressés à la synthèse de l'acide benzisoxazole-1,2 acétique-3 1 marqué au carbone 14 en position  $\alpha$ - ou  $\beta$ - de la chaîne latérale.

## DISCUSSION

Une synthèse classique des benzisoxazoles 9 consiste à obtenir des syn-oximes substituées en ortho 8 (X = F, Cl, Br, I, NO<sub>2</sub>, OH, OR) et à réaliser en catalyse basique une élimination du groupement X (1,8) selon le Schéma 1.

Schéma 1 :

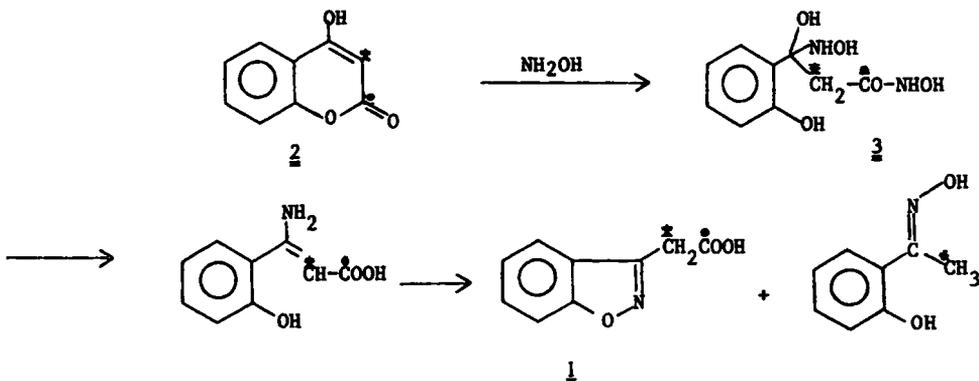


Cependant, lorsque R est un groupement carboxylique, une décomposition du cycle benzisoxazole est possible, ainsi qu'un réarrangement de BECKMANN de l'oxime conduisant à un mélange de benzisoxazoles et de benzoxazoles (1,9).

Un autre type de synthèse d'acide benzisoxazole-1,2 acétique-3 consiste à traiter l'hydroxy-4 coumarine 2 par l'hydroxylamine : un réarrangement de l'oxime formé 3 conduit au cycle benzisoxazole-1,2 1 (10-13).

Le schéma réactionnel supposé du réarrangement est donné ci-dessous (Schéma 2).

Schéma 2 :

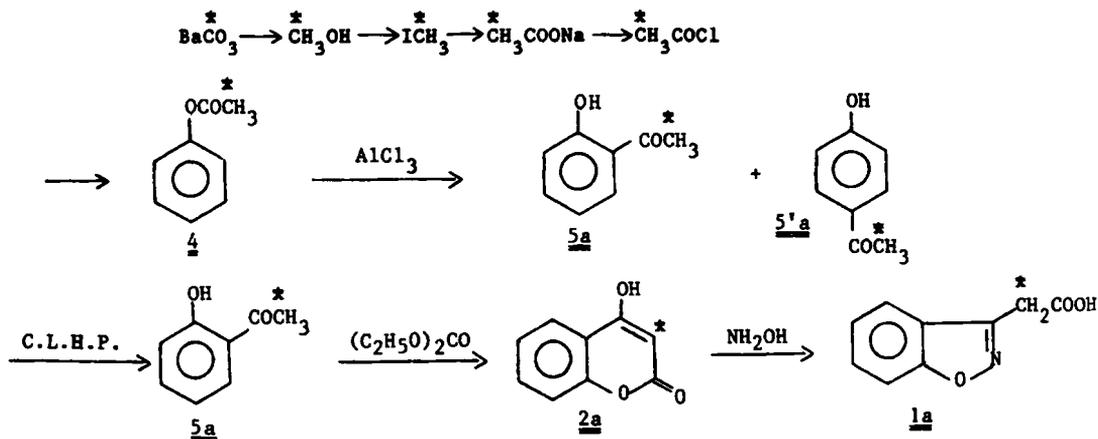


Un marquage sur le C-2 de l'hydroxy-4 coumarine 2 doit conduire à 1 marqué sur le carboxyle, alors que 2 marqué sur C-3 doit conduire à 1 marqué en position α.

Pour obtenir l'acide benzisoxazole-1,2 acétique-3 <sup>14</sup>C-α (1a) ou <sup>14</sup>C-β (1b) et pour vérifier le schéma du réarrangement, nous avons utilisé le mode opératoire décrit dans les Schémas 3 et 4.

### 1) Synthèse de l'acide benzisoxazole-1,2 acétique-3 (<sup>14</sup>C-α) 1a

Schéma 3 :



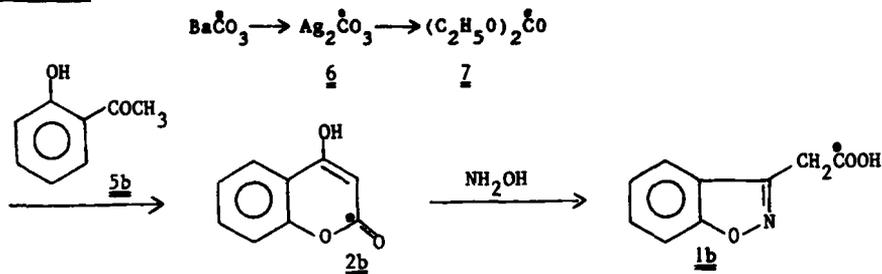
Le chlorure d'acétyle ( $^{14}\text{C}$ -2) obtenu de manière usuelle à partir de carbonate de baryum  $^{14}\text{C}$  à forte activité spécifique (46 mCi/mMole) est mis en réaction avec du phénol pour obtenir avec un rendement de 80% l'acétate de phényle ( $^{14}\text{C}$ -méthyle) 4. Ce dernier, en présence de  $\text{AlCl}_3$  et par chauffage, subit une transposition de Fries donnant le mélange de para- et d'ortho-hydroxy acétophénone ( $^{14}\text{C}$ -2) 5a et 5'a. Les essais de transposition en présence de lumière UV et de carbonate de potassium (14-16) n'ont pas été satisfaisants. Par chauffage, la réaction est relativement lente (4h) et le rendement en dérivé ortho 5a n'est pas favorable (5a : 25% ; 5'a : 75%). Pour poursuivre la réaction, nous avons dû séparer 5a et 5'a par chromatographie liquide préparative (colonne de gel de silice éluée au chloroforme).

Le traitement du dérivé ortho 5a par le carbonate de diéthyle fournit l'hydroxy-4 coumarine ( $^{14}\text{C}$ -3) 2a qui, sous l'action de l'hydroxylamine, conduit au dérivé attendu 1a avec un rendement de 26%. 1a est ensuite purifié par chromatographie liquide sur gel de silice dans le système de solvants cyclohexane : 90, dioxanne : 25, acide acétique : 4.

Nous avons ainsi obtenu 22 mCi (A.S. = 46 mCi/mMole) de 1a contrôlé par CCM, CLHP et spectrométrie de masse. Le spectre de masse permet de vérifier la position de marquage au  $^{14}\text{C}$  en position  $\alpha$ .

2) Synthèse de l'acide benzisoxazole-1,2 acétique-3 ( $^{14}\text{C}$ - $\beta$ ) 1b

Schéma 4 :



Le carbonate de diéthyle 7, obtenu à partir de carbonate de baryum (17) via le carbonate d'argent 6, est utilisé sans purification. Par réaction dans l'éthanol absolu sur l'ortho-hydroxyacétophénone 5b, on obtient l'hydroxy-4 coumarine ( $^{14}\text{C}$ -2) 2b avec un rendement faible de 16%. Ce composé 2b est traité par l'hydroxylamine en solution éthanolique pour fournir 1b avec un rendement de 26% après purification par chromatographie liquide moyenne pression sur gel de silice (cyclohexane : 90, dioxanne : 25, acide acétique : 4).

1b a été contrôlé par CCM, CLHP, spectrométrie UV et spectrométrie de masse. Le spectre de masse a confirmé le marquage au  $^{14}\text{C}$  sur la position  $\beta$ .

PARTIE EXPERIMENTALECarbonate d'argent- $^{14}\text{C}$  6

A 19,98 g (117 mMoles) de nitrate d'argent, dissous à l'abri de la lumière dans 55 ml d'eau distillée, on ajoute 687 mCi de carbonate de baryum (A.S. 30 mCi/mMole ; 22,9 mMoles). La suspension est agitée pendant 17 heures à l'abri de la lumière.

Le précipité est filtré, lavé à l'eau distillée, à l'acétone puis à l'éther anhydre. Le produit 6 (5,9 g ; rendement : 95%) est séché sous vide dynamique pendant 5 heures, puis utilisé pour l'étape suivante sans contrôle ni purification.

Carbonate de diéthyle  $^{14}\text{C}$  7

A 25 ml de diméthyl formamide distillé sur anhydride phosphorique sont ajoutés, sous atmosphère d'azote, 12 ml (149 mMoles) d'iodure d'éthyle et 4,6 ml (33 mMoles) de triéthylamine distillée sur potasse. Après une demi-heure d'agitation à température ambiante, on ajoute le carbonate d'argent radioactif 6.

L'agitation est maintenue durant 6 heures. Puis on ajoute 16,22 ml de triéthylamine (116 mMoles) et on agite 17 heures. 40 ml de cyclohexane sont alors ajoutés et l'agitation est poursuivie pendant 2 heures. A la solution filtrée sont ajoutés 25 ml d'une solution tampon à pH7 (dihydrogénophosphate de potassium et hydrogénophosphate disodique) et 25 ml d'une solution saturée de chlorure de sodium. Après agitation et filtration, on recueille la phase organique et on extrait la phase aqueuse trois fois avec 70 ml de cyclohexane.

On obtient ainsi 452 mCi de 7 brut (rendement radioactif : 65%).

La distillation du cyclohexane est effectuée avec précaution pour limiter les pertes d'activité. Le résidu est repris par du benzène. On distille à nouveau une partie du solvant puis on transfère à la rampe sous vide le mélange benzène-carbonate d'éthyle pour éliminer un précipité blanc.

On recueille ainsi 402 mCi de 7 en solution benzénique (rendement radioactif : 58,5% par rapport au carbonate de baryum).

Hydroxy-4 coumarine ( $^{14}\text{C}$ -2) 2b

Au carbonate d'éthyle- $^{14}\text{C}$  7 on ajoute 25,75 ml d'une solution d'éthylate de sodium 1,3 M et 1 ml (8,31 mMoles) d'hydroxy-2 acétophénone 5b.

La solution est agitée puis l'éthanol est distillé en maintenant le volume constant par addition de benzène. Une fois l'éthanol éliminé, un précipité orange apparaît. Le mélange réactionnel est maintenu au reflux pendant 15 heures.

Après retour à la température ambiante, l'hydrolyse du mélange est effectuée par 50 ml d'eau distillée. La phase aqueuse est récupérée et acidifiée à pH 4. Le précipité obtenu est filtré, séché puis repris à l'éthanol anhydre pour donner 67,4 mCi de 2b (rendement radioactif : 16%) que l'on contrôle par C.C.M. sur gel de silice (solvant : dichlorométhane : 95, éthanol : 5, Rf. : 0,36).

Pureté radiochimique : 94%.

#### Acide benzisoxazole-1,2 acétique-3 (<sup>14</sup>C-β) 1b

A 528 mg (7,6 mMoles) de chlorhydrate d'hydroxylamine, on ajoute 10 ml d'une solution d'éthylate de sodium 0,74 M (7,4 mMoles) puis l'hydroxy-4 coumarine (<sup>14</sup>C-2) 2b dissoute dans 30 ml d'éthanol anhydre. La solution est chauffée au reflux pendant 9 heures.

L'éthanol est éliminé par distillation à l'évaporateur rotatif puis le résidu est repris par une solution de bicarbonate de sodium à 10%. L'extraction à l'éther permet d'éliminer l'oxime non radioactive formée (10). Le pH est amené entre 3 et 4 par addition d'acide chlorhydrique 2N puis 1b est extrait à l'éther.

Il est ensuite purifié par chromatographie liquide sous moyenne pression (appareil JOBIN YVON) sur colonne de gel de silice Lichroprep Si 60 15-25 μm (60g) (solvant : cyclohexane : 90, dioxanne : 25, acide acétique : 4 - débit : 2,5 ml/min-détection par réfractométrie) 18,6 mCi de 1b pur sont obtenus (rendement : 26% par rapport à 2b).

La pureté radioactive de 1b a été contrôlée :

1) par CCM sur gel de silice dans les deux systèmes de solvants suivants :

- benzène : 90, dioxanne : 25, acide acétique : 4.  
(Rf : 0,45)
- benzène : 45, méthanol : 8, acide acétique : 4.  
(Rf : 0,42)

2) par CLHP en phase inverse C-18

Solvant : méthanol : 50, eau : 50, acide heptanesulfonique : 0,5

- Débit : 1,5 ml/min.

Temps de rétention : 6 min 28s.

La pureté chimique est déterminée également par spectrophotométrie U.V. quantitative dans le méthanol .

$\lambda_{\max_1} = 302,5 \text{ nm}$      $\lambda_{\max_2} = 278 \text{ nm}$      $\lambda_{\max_3} = 266,5 \text{ nm}$

$\lambda_{\min_1} = 286,5 \text{ nm}$      $\lambda_{\min_2} = 272 \text{ nm}$      $\lambda_{\min_3} = 238,5 \text{ nm}$

L'ensemble des contrôles montre que 1b a une pureté chimique et radiochimique supérieure à 99%.

L'activité spécifique, déduite du dosage par spectrométrie U.V. et comptage par scintillation liquide est de 28 mCi/mMole (1,04 GBq/mMole).

#### Acétate de phényle (<sup>14</sup>C-2) 4

A 505 mCi d'acétate de sodium (<sup>14</sup>C-2) (46 mCi/mMole, 11 mMoles) en suspension dans 10 ml de benzène anhydre, on ajoute en 10 minutes et à 0°C 1,1 ml (15,2 mMoles) de chlorure de thionyle en solution dans 10 ml de benzène anhydre. On agite ensuite le mélange à température ambiante pendant 1h30. 1,64 g (17,4 mMoles) de phénol en solution dans 10 ml de benzène anhydre sont versés sur le mélange puis la solution est chauffée au reflux pendant 5 heures.

La solution est reprise par 20 ml d'eau. On extrait le produit obtenu 4 quatre fois par 20 ml d'éther. La phase étherée est lavée trois fois par 30 ml de soude normale. La solution est séchée sur sulfate de magnésium.

On recueille 400 mCi de 4 (rendement 80%) avec une pureté radiochimique de 80% contrôlée par CCM sur gel de silice dans le solvant : méthanol : 10, benzène : 90 (Rf : 0,64).

#### Hydroxy-2 acétophénone (<sup>14</sup>C-2) 5a

Dans un ballon contenant 2,3 g (17 mMoles) de trichlorure d'aluminium, on ajoute goutte à goutte 10 ml de sulfure de carbone puis goutte à goutte la solution de 4 (400 mCi ; 8,7 mMoles) dans 20 ml de sulfure de carbone.

Le mélange est porté à reflux pendant 1h 30min, puis agité sous atmosphère d'azote, une nuit à température ambiante. Le sulfure de carbone est alors éliminé par distillation. Le résidu, chauffé à 145°C pendant 4 heures puis refroidi, est hydrolysé par 20 ml de HCl N puis 15 ml d'eau.

La phase aqueuse est extraite au toluène et la gomme restant dans le ballon dissoute dans du méthanol. Les phases organiques sont rassemblées et analysées par CCM sur gel de silice.

Solvant : chloroforme : 100

Rf : hydroxy-4 acétophénone : 0,14

Rf : hydroxy-2 acétophénone : 0,67

35% d'isomère ortho 5a, 60% d'isomère para 5'a et 5% d'impureté sont obtenus.

Le mélange de produits est séparé sur une colonne ( $\phi$  : 40 mm, L : 220 mm) de gel de silice (Lichroprep Si 60, 40-60 m) éluee au chloroforme pour fournir 103 mCi d'hydroxy-2 acétophénone 5a exempte de l'isomère 5'a (pu-

reté radiochimique : 96,6%). Le rendement après purification est de 20,5% par rapport à l'acétate de sodium ( $^{14}\text{C}-2$ ).

#### Hydroxy-4 coumarine ( $^{14}\text{C}-3$ ) 2a

On ajoute à 5a une solution éthanolique de 3,80 ml d'éthylate de sodium 2,2M (8,75 mMoles) contenant 0,425 ml (3,50 mMoles) de carbonate d'éthyle. On distille l'éthanol, tout en maintenant constant le volume par addition de benzène anhydre. Un précipité orange apparaît. La solution est chauffée au reflux pendant 15 heures.

Après retour à la température ambiante, elle est hydrolysée par 40 ml d'eau. La phase aqueuse est acidifiée par HCl 6N jusqu'à pH 4 et le précipité jaune pâle obtenu, recueilli sur fritté, est repris à l'éther puis purifié par chromatographie liquide sous moyenne pression (appareil JOBIN-YVON, 50 g de gel de silice Lichroprep Si 60 15-25  $\mu\text{m}$ . Eluant dichlorométhane : 95, éthanol : 5 - Débit : 2 ml/min).

On recueille finalement 43 mCi de 2a avec une pureté radiochimique de 95% contrôlée par chromatographie sur couche mince de gel de silice (solvant : dichlorométhane : 95, éthanol : 5)

Rendement radioactif : 41%.

#### Acide benzisoxazole-1,2 acétique-3 ( $^{14}\text{C}-\alpha$ ) 1a

La préparation de l'acide benzisoxazole-1,2 acétique-3 ( $^{14}\text{C}-\alpha$ ) 1a à partir de 43 mCi d'hydroxy-4 coumarine ( $^{14}\text{C}-3$ ) 2a est conduite de façon identique à celle du produit ( $^{14}\text{C}-\beta$ ) 1b. On obtient 32% du produit attendu 1a et 63% d'hydroxy-4 coumarine 2a n'ayant pas réagi.

#### Purification de 1a

1) par chromatographie liquide sous moyenne pression (appareil JOBIN-YVON) sur colonne de gel de silice (Lichroprep Si 60 15-25  $\mu\text{m}$  : 60g ; solvant : cyclohexane : 90, dioxanne : 25, acide acétique : 4 ; débit 2,5 ml/min ; détection par réfractométrie).

2) par CLHP préparative sur colonne de SIL "Sup RS" (éluant cyclohexane : 75, dioxanne : 25, acide acétique 1% - détection de radioactivité). On obtient ainsi 11 mCi d'acide 1a.

#### Contrôles de pureté de 1a

La pureté radiochimique est contrôlée par :

1°) CCM sur gel de silice dans les deux systèmes de solvants suivants :

1) benzène : 90, dioxanne : 25, acide acétique : 4

(Rf : 0,45).

2) benzène : 45, méthanol : 8, acide acétique : 4

(Rf : 0,42).

2') par C.L.H.P. en phase inverse C-18 dans le solvant : méthanol : 50, eau : 50, acide heptanesulfonique : 0,5.

(débit 1,5 ml/ min - temps de rétention : 5 min 38s).

- La pureté chimique de la est déterminée par spectrométrie U.V. à 280 nm dans le méthanol.

Le produit la présente dans l'ensemble des contrôles une pureté chimique et radiochimique supérieure à 99%.

L'activité spécifique déduite par dosage en spectrométrie U.V. et comptage par scintillation liquide est de 46 mCi/mMole (1,7 GBq/mMole).

#### Détermination des positions de marquage de la et lb par spectrométrie de masse

##### 1) acide benzisoxazole-1,2 acétique-3 (<sup>14</sup>C-β) lb

Le spectre de masse obtenu par impact électronique présente les pics <sup>m/e</sup> 177-179 (P-1 <sup>12</sup>C et <sup>14</sup>C) <sup>m/e</sup> 159, 161 (P-H<sub>2</sub>O, <sup>12</sup>C et <sup>14</sup>C). Ces pics présentent le doublet isotopique <sup>12</sup>C et <sup>14</sup>C.

Le pic de masse 133 (P-CO<sub>2</sub>) ne présente pas le doublet isotopique <sup>12</sup>C et <sup>14</sup>C et se retrouve sur le spectre du produit témoin non radioactif. On en conclut que l'isotope <sup>14</sup>C est bien porté par le groupement carboxyle. Le rapport isotopique <sup>14</sup>C/<sup>12</sup>C a été mesuré sur le doublet 176, 178 afin de confirmer l'activité spécifique déterminée par spectrophotométrie U.V.

##### 2) acide benzisoxazole-1,2 acétique-3 (<sup>14</sup>C-α) la

Le spectre de masse obtenu par impact électronique présente les pics <sup>m/e</sup> 177-179 (pics moléculaires <sup>12</sup>C et <sup>14</sup>C), <sup>m/e</sup> 159-161 (P-H<sub>2</sub>O, <sup>12</sup>C et <sup>14</sup>C), <sup>m/e</sup> 133-135 (P-CO<sub>2</sub>, <sup>12</sup>C et <sup>14</sup>C).

Les pics présentent le doublet isotopique <sup>12</sup>C et <sup>14</sup>C. Les pics <sup>m/e</sup> 118-119-120 correspondent à la perte de la chaîne latérale et sont identiques dans les spectres des produits radioactif et froid. On en conclut que l'isotope <sup>14</sup>C est bien situé sur le méthylène en α. Le rapport isotopique <sup>14</sup>C/<sup>12</sup>C a été mesuré sur le pic moléculaire afin de confirmer l'activité spécifique déterminée par spectrométrie U.V.

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1) K.H. WUNSCH, A.J. BOULTON  
Adv. Heterocyclic Chem. 9, 277 (1967).
- 2) M. GINNELLA, F. GUALTIERI, C. MELCHIORRE  
Phytochemistry, 10, 539 (1971).

- 3) NARUTO, SHUNSUKE, KODAKAWA, TOSHIKI, KAWASHIMA,  
KATZUYOSHI Eur. Pat. Appl. EP 94.833. (Dainippon  
Pharmaceutical Co., Ltd)
- 4) NISHIMURA, HARUKI, NARUTO, SHUNSUKE, MIZUTA, HIROYUKI,  
KODAKAWA, TOSHIKI, KAWASHIMA, KATZUYOSHI  
Eur. Pat. Appl. EP 73.645. (Dainippon Pharmaceutical Co,  
Ltd)
- 5) MASUDA. Y., KARASAWA.T, SHIRAISHI. Y., HORI.M., YOSHIDA.  
K., SHIMIZU. M.  
Arzneim. Forsch./Drug. Res. 30 (1), 477 (1980).
- 6) THAKAR.K.A., DUMIR.A.B, BHAWAL.B.M.  
Curr. Sci. 49 (23), 889 (1980).
- 7) HITOSHI UNO, MIKIO KOROKAWA, HARUKI NISHIMURA  
Chem. Pharm. Bull, 24 (4), 644 (1976).
- 8) "Five and Six Membered Compounds with Nitrogen and Oxy-  
gen" in Chemistry of Heterocyclic Compounds  
Ed. A. WEISSBERGER, Interscience, N.Y. 1962.
- 9) MAGNUS P. D.  
Aromatic and Heteroatomic Chemistry,  
The Chemical Society, LONDON, 1975, Vol. 3
- 10) MUSTAPHA.A, HSIHMAT.O.H, ZAYED.S.M.A.D., NAWAR.A.A.  
Tetrahedron 19, 1831 (1963).
- 11) CASINI. G., GUALTIERI, F., STEIN.M.L.  
J. Heterocyclic. Chem. 2, 385 (1965).
- 12) CASINI G., GUALTIERI. F., STEIN.M.L.  
J. Heterocyclic. Chem. 6, 279 (1969).
- 13) GIANELLA.M., GUALTIERI.F., MELCHIORRE.C.  
Phytochemistry, 10 (3), 539 (1970).
- 14) GARCIA.H., PRIMO.J., MIRANDA.M.A.  
Synthesis, 901, (1985).
- 15) BELLUS, D.  
Adv. Photochem. 8, 109, (1971).
- 16) KAUPP, G.  
Angew. Chem. Int. Ed. Eng. 19, 243, (1980).
- 17) Eisenhauer. H.R., PEPPER.J.M., JACQUES.L.B., SPINKS  
J.W.J.  
Can. J. Chem. 30, 245, (1952).