

Synthèse de l'acide DL-shikimique ^{14}C -1-2^{*1} à partir de l'acrylate de méthyle ^{14}C -2-3

B. CHABANNES[•], L. PICHAT[°], M. HERBERT[°] et H. PACHECO[•]

[°] Service de Molécules Marquées, CEN-Saclay, BP n° 2 Gif-sur-Yvette
(Seine-et-Oise) France

[•] Service de Biochimie, I. N. S. A., Villeurbanne (Rhône) France.

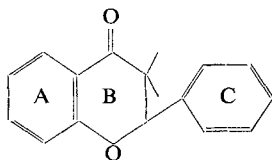
SUMMARY

DL-Shikimic, 1-2- ^{14}C acid has been prepared by a 5 stage synthesis with a total yield of about 11 % from methyl acrylate 2,3- ^{14}C .

RÉSUMÉ

L'acide shikimique ^{14}C -1-2 a été synthétisé en 5 étapes, avec un rendement global de l'ordre de 11 % par rapport à l'acrylate de méthyle ^{14}C -2-3.

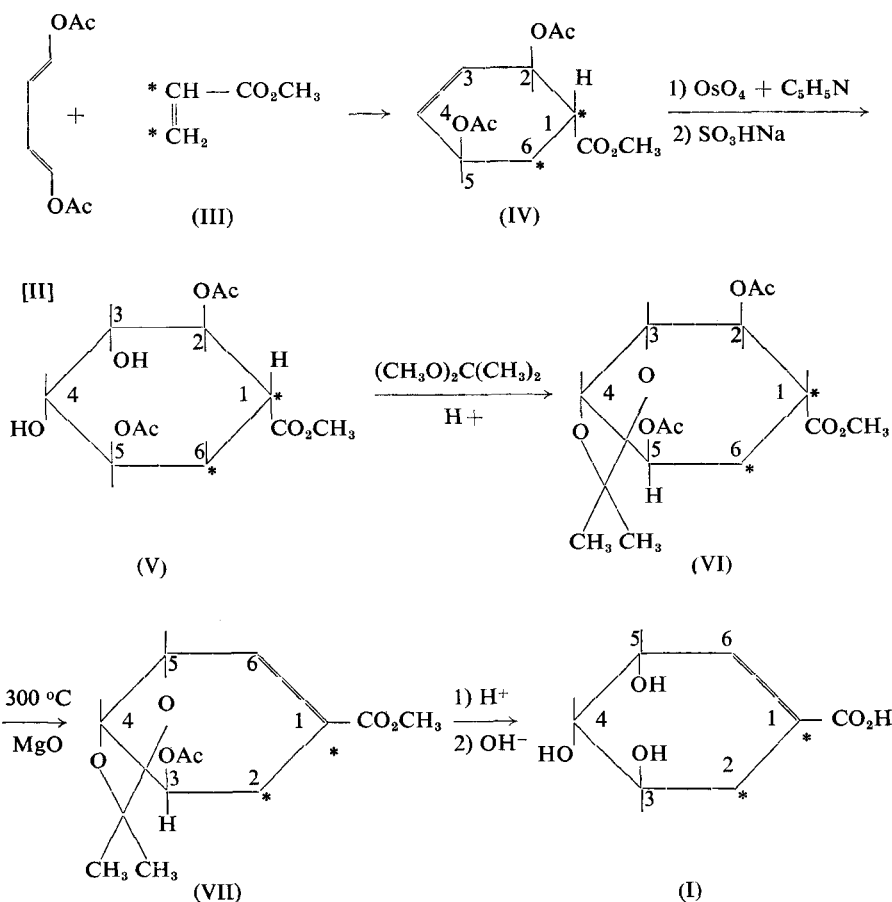
L'acide shikimique (I), très répandu dans le règne végétal, est un précurseur du noyau phényle de différentes molécules, en particulier du noyau C des composés flavoniques; plusieurs unités $\text{C}_6\text{-C}_3$ (phénylalanine — acide cinnamique — acide phénylpyruvique) peuvent aussi être incorporées dans les composés flavoniques mais leur pourcentage d'incorporation est plus faible que celui de l'acide shikimique [1a]. Afin de préciser chez les végétaux, d'une part les étapes qui se situent entre l'acide shikimique et ces unités $\text{C}_6\text{-C}_3$, d'autre part, la filiation des composés flavoniques, nous avons entrepris la synthèse de ce produit marqué au ^{14}C dans le noyau cyclohexénique.



* Reçu le 23 mars 1965.

¹ Si on utilise la numérotation traditionnelle du cycle de l'acide shikimique [5] déduite de celle de l'acide quinique, soit l'acide trihydroxy-3-4-5 cyclohexène 1-6 carboxylique-1 mais si le sens inverse de numérotation est adopté les positions des atomes marqués deviennent -1-6.

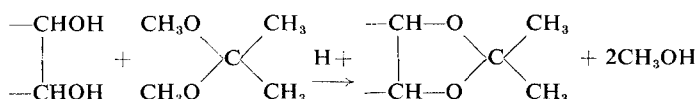
L'acide shikimique uniformément marqué au ^{14}C a été obtenu par voie biochimique enzymatique [1]. Si l'on excepte une méthode de transformation chimique de l'acide quinique en acide shikimique [2] il existe trois synthèses chimiques totales de ce composé [3, 4, 5]. Seules les méthodes [3] et [4] ont été conçues afin de pouvoir introduire le ^{14}C . C'est donc celles-ci que nous avons utilisées. Elles sont basées sur la condensation de Diels-Alder entre le trans-trans diacétoxy-1-4 butadiène-1-3 (II) et l'acrylate de méthyle ^{14}C -2-3. Les carbones 2 et 3 de l'acrylate de méthyle se retrouvent en positions 1 et 2 sur le cycle de l'acide shikimique (I)¹. Nous avons mis au point antérieurement [6] la synthèse de l'acrylate de méthyle ^{14}C -2-3.



La cishydroxylation de la double liaison du diacétoxy 2 β -5 β cyclohexène-3 carboxylate-1 α de méthyle (IV) en position anti par rapport aux groupes

¹ Voir note à la page précédente.

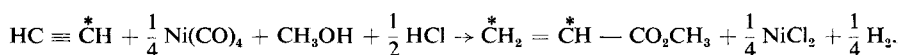
acétoxy a été obtenue par action du tétraoxyde d'osmium en présence de pyridine selon une simplification de la technique de [4]. Les deux hydroxyles en cis de (V) sont protégés par le groupe isopropylidène. Pour ce faire, la technique de SMISSMAN [4] : acétone anhydre en présence d'acide chlorhydrique nous a donné un rendement trop faible (45 % environ). En manipulant l'acétone sur rampe à vide, à l'état gazeux nous avons pu porter à 66 % le rendement en acétonide (VI). Néanmoins, des résultats encore meilleurs ont été obtenus par une technique plus récente [7] : action en milieu acide du diméthoxy-2-2 propane sur les α -cis-diols :



En manipulant HCl anhydre sur une rampe à vide nous avons pu obtenir l'acétonide (VI) avec un rendement de 85-90 %.

L'étape qui nous a donné le plus de difficultés a été celle du passage de (VI) à (VII) : élimination d'acide acétique pour créer la double liaison de l'acide shikimique. Nous avons tenté sans succès la technique employée par SMISSMAN [4] : pyrolyse de l'acétonide (VI) à 285 °C sous 7×10^{-3} mm. La méthode décrite dans [3] : pyrolyse de l'acétonide (VI) à 290 °C sous 760 mm en présence de magnésie nous a fourni avec un rendement de 30 à 50 % l'acétonide du o-acétoxy-3 shikimate de méthyle (VII). Ces résultats sont en accord avec ceux de [3], encore que notre rendement soit beaucoup plus faible. Eux-mêmes [3] n'avaient pas obtenu ceux de SMISSMAN [4].

Le trans-trans diacétoxy-1-4 butadiène 1-3 (II) nécessaire a été préparé selon [7] à partir de cyclooctatétrène. L'acrylate de méthyle ^{14}C -2-3 a été préparé par la méthode de REPPE [10] selon l'équation :



convenablement adaptée pour le travail sur de micro-quantités [6]. Il a été purifié par chromatographie préparative en phase vapeur [16]. L'activité spécifique a été limitée à 10 mCi/mM pour réduire la vitesse de polymérisation sous son propre rayonnement β .

Dans deux essais traceur l'acide shikimique (I) d'activité spécifique 1 mCi/mM a été obtenu avec un rendement radioactif global de 11 % par rapport à l'acrylate de méthyle. Deux autres préparations ont fourni un produit à 9,8 mCi/mM avec un rendement radioactif de 50 % par rapport au cis-diol (V) ¹.

¹ Le cyclooctatétrène a été gracieusement fourni par la B. A. S. F. par l'intermédiaire de IMACO. M. Sévellec, Faculté des Sciences de Rennes, a préparé l'acrylate de méthyle ^{14}C -2-3 au cours d'un stage au S. M. M. Nous les en remercions.

TABLEAU I. Chromatographie en couche mince des divers produits de la synthèse de l'acide shikimique ¹⁴C.

Produit	Adsorbant de chromatographie	Solvant de développement	R _f approximatif	Réactif pour révéler les produits
(IV)	« Kieselgel G » activé	<i>n</i> -BuOH : H ₂ O (90 : 10)	0,75	KMnO ₄ dilué
(V)	« Kieselgel G » activé	<i>n</i> -BuOH : H ₂ O (90 : 10)	0,60	I ₀₄ H + benzidine ou KMnO ₄
	« Silica gel Whatman SG41 non activé	CHCl ₃ + 0,5 % EtOH	0,03	Réaction à acide hydroxamique [15]
(VI)	« Silica gel Whatman SG41 non activé	CHCl ₃ + 0,5 % EtOH	0,30	<i>idem</i>
	<i>idem</i>	C ₆ H ₆ + EtOH (98 : 2)	0,40	<i>idem</i>
(VII)	<i>idem</i>	<i>idem</i>	0,50	<i>idem</i>
(I)	<i>idem</i>	<i>n</i> -BuOH : AcOH : eau (50 : 25 : 25)	0,70	Vert de bromocrésol-KMnO ₄
	<i>idem</i>	AcOEt : HCO ₂ H : eau (7 : 2 : 1)	0,75	<i>idem</i>

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Acétylène dicarboxylate de méthyle.

Préparé avec un rendement de 60 à 72 % à partir du sel monopotassique de l'acide selon [9]. E₁₃ = 80 °C; n_D^{23} = 1,4468; littérature n_D^{25} = 1,444-1,4452.

Dichloro-7-8 bicyclo [o-2-4] octadiène-2-4.

Obtenu avec un rendement de 56 à 62 % par action de 140 g (1 M) de chlorure de sulfuryle sur 98 g (0,94 M) de cyclooctatétrène dans 150 ml de chlorure de méthylène à 20-22 °C pendant 2 heures selon [8]. E_{0,1} = 58-62 °C, n_D^{21} = 1,5410 (littérature [8] : n_D^{20} = 1,5417).

Diacétoxy-7-8 bicyclo [o-2-4]-octadiène-2-4.

Préparé avec un rendement de 30 à 47 % par action de l'acétate de potassium anhydre dans l'acide acétique selon [8]. E_{0,1} = 100-110 °C; P. F. = 66 °C.

Trans-trans diacétoxy-1-4 butadiène-1-3.

Le produit précédent 10 g, 50 ml de benzène et 6 g d'acétylène dicarboxylate de méthyle sont chauffés à reflux 6 heures. Après les traitements décrits par [8] on isole 7 g (rendement 40 %) de produit d'addition. P. F. = environ 84 °C. Ce dernier est pyrolysé vers 180-220 °C sous vide de 18 mm. Le diacétoxybutadiène est obtenu avec un rendement de 55-62 %. P. F. = 102-104 °C. Le spectre infrarouge est superposable à celui de la littérature [11] et permet de s'assurer de l'absence de dérivés cis-cis.

Diacétoxy-2 β -5 β -cyclohexène-3 carboxylate 1- α de méthyle Di-¹⁴C-1-6 (IV).

Sur la rampe à vide, on transfère 3,4 mM (3,4 mCi) d'acrylate de méthyle ¹⁴C-2-3 dans un tube de verre Pyrex à parois épaisses ($\varnothing$ = 10 mm, l = 120 mm) contenant 1,032 g (6,07 mM) de trans-trans diacétoxy-1-4 butadiène 1-3 et 3 ml de xylène anhydre. Le tube est scellé sous vide, placé dans une bombe d'acier inoxydable. On chauffe à 140 °C pendant 40 heures. Après évaporation du solvant sous vide, l'huile brune résiduelle (2,24 g) est dissoute dans 3 ml de chloroforme. On purifie par chromatographie sur une colonne d'acide silicique ($\varnothing$ = 20 mm, l = 500 mm, p = 100 g) (Mallinckrodt 100 mesh). Après l'excès de tétracétoxybutadiène apparaît le produit cherché (IV). Il est mis en évidence et sa pureté contrôlée par chromatographie en couche mince (C. C. M.) (voir tableau I). La solution chloroformique est évaporée sous vide dans un appareil à distiller antérieurement décrit [13]. Le rendement de cette opération a varié de 30 à 80 % au cours de 5 essais.

Diacétoxy-2 β -5 β dihydroxy-3 α -4 α cyclohexane carboxylate 1 α de méthyle (V).

Le produit précédent (2,85 mM) en solution dans 5 ml de tétrahydrofurane anhydre dans un tube à centrifuger de 100 ml est refroidi à -50 °C. A cette solution on ajoute une solution préalablement préparée de 1 g de tétroxyde d'osmium dans 40 ml de tétrahydrofurane et 1 g de pyridine anhydre. Le mélange est agité entre -45 et -55 °C pendant 8 heures. La solution initialement jaune clair passe au brun rouge puis il apparaît un précipité. Après 15 heures à -25 °C on centrifuge à 6000 tours/mn. La solution surnageante est pipetée et éliminée. Le résidu de centrifugation est dissout dans 5 ml de pyridine [12]. On ajoute à cette solution rouge foncé, 1,8 g de bisulfite de soude en solution dans 30 ml d'eau distillée et 30 ml de pyridine. On agite pendant 3 heures à la température ambiante. Un produit brun rouge très peu radioactif est décanté. On extrait en continu par le chlorure de méthylène pendant 20 heures. Après lavage à l'eau, séchage (SO₄Na₂) et évaporation on obtient 390 mg d'un produit blanc d'activité 1,40 mCi soit un rendement de 46 % basé sur l'acrylate de méthyle. La pureté est contrôlée par C. C. M. (voir tableau).

Diacétoxy-2 α -5 α Isopropylidènedioxy 3 α -4 α cyclohexane-carboxylate 1 α de méthyle ^{14}C -1-6 (VI)

En boîte à gants dans un ballon de 100 ml on dissout 290 mg (1 mM; 1,2 mCi) du produit précédent dans 20 ml de diméthyl formamide anhydre auquel on ajoute 1,5 ml de diméthoxy-2-2 propane. On l'adapte sur la rampe à vide et évacue sous refroidissement à -80°C . On y transfère par condensation par l'azote liquide HCl anhydre obtenu par l'action de 5 ml de H_2SO_4 concentré sur 400 mg de chlorure de sodium. Le mélange réactionnel ramené à la pression atmosphérique par admission d'azote sec est maintenu à la température ambiante pendant deux heures avec agitation intermittente. Après addition de 4 g de Na_2CO_3 anhydre, filtration, évaporation sous vide, le résidu, dissout dans 3 ml de chloroforme est chromatographié sur une colonne de 90 g de « Florisil » 100 mesh ($\varnothing = 20$ mm, $h = 500$ mm). Solvant d'élution : chloroforme R. P. (stabilisé par 0,5 % d'éthanol). L'absorption U. V. de l'éluat est enregistré automatiquement par un appareil Uvicord. Le deuxième pic élué correspond au produit cherché. Après évaporation on obtient 290 mg d'un produit blanc, activité 1,05 mCi, soit un rendement de 88 %. La pureté est contrôlée par radiochromatographie de la C. C. M. (voir tableau).

Dans des essais inactifs on a vérifié le P. F. = 145°C en accord avec la littérature [3, 4].

Analyse $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}_8$ Calc. % : C 54,54 H 6,71
Tr. : 54,57 6,87

Acétonide du o-acétyl-3-DL-Shikimate de méthyle ^{14}C -1-2 (VII).

103,5 mg (0,31 mM, 0,33 mCi) du produit précédent (VI) et 513 mg de MgO (en poudre très fine et séchée plusieurs jours à 120°C) sont placés dans un sublimateur [13] et intimement mélangés. On fait le vide, puis ramène à la pression atmosphérique avec de l'azote sec. Le doigt du sublimateur étant refroidi à -80°C , le ballon est plongé dans un bain métallique préchauffé à 300°C et l'y maintient pendant 3 minutes. Après refroidissement le contenu du ballon est extrait au chloroforme et la magnésie est filtrée. Le filtrat est recueilli dans le ballon d'un deuxième sublimateur. On y ajoute également la solution chloroformique de rinçage du doigt du premier sublimateur. Après évaporation du chloroforme le résidu organique est fondu à 150°C . Après refroidissement et addition de 506 mg de MgO, le doigt du sublimateur est mis en place. On plonge le ballon dans le bain métallique à 300°C et l'y maintient pendant 3 minutes. On fait au total, sur le même produit les manipulations précédentes, trois fois. La solution chloroformique finale concentrée à 10 cc (CHCl_3 à 0,5 % d'éthanol) est placée sur une colonne ($\varnothing 20$ mm, $h = 500$ mm) d'acide silicique Mallinckrodt 100 mesh. On élue par CHCl_3 et détecte en continu la composition de l'éluat à l'aide d'un appareil Uvicord. Le produit (VII) est élué en tête après percolation de 300 ml de CHCl_3 , dans un volume de 50 ml environ. Un mélange de (VI) et (VII) appa-

raît ensuite. Les diverses fractions sont analysées par C. C. M. (voir tableau). On obtient 34,7 mg (0,110 mCi) d'un produit huileux ayant un spectre d'absorption en accord avec celui de la littérature [4] et radiochromatographiquement pur. Le rendement radioactif de ce stade a varié de 32 à 43 %. Une forte proportion d'activité reste adsorbée sur la magnésie. Il a été trouvé nécessaire d'ajouter à chaque fois de la magnésie fraîche pour que la désacétylation de (VI) en (VII) se poursuive.

Acide DL-Shikimique ^{14}C -1-2 (I).

34,7 mg du produit précédent (VII) (0,128 mM, 110 μCi) sont dissous dans un mélange de 1 ml d'eau et 4 ml d'acide acétique. La solution est laissée à la température ambiante pendant 3 jours. Après évaporation sous vide le résidu est dissous dans une solution de 28 mg de KOH dans le mélange eau, méthanol (1 : 4, vol. vol.). On laisse à la température ambiante pendant trois jours. Après évaporation sous vide le résidu est repris par 2 ml d'eau distillée et la solution est filtrée sur une colonne de résine échangeuse d'ions Dowex 50 W 12 forme H^+ ($\varnothing$ 10 mm, h = 200 mm).

On obtient 22,4 mg de produit cristallisé (0,125 mCi). Les spectres d'absorption U. V. et I. R. (KBr) sont comparables à ceux fournis par un échantillon authentique. La pureté radiochromatographique est contrôlée par C. C. M. Le rendement de cette étape a varié de 90 à 100 %.

BIBLIOGRAPHIE

- 1a. BOGORAD, L. — The biogenesis of flavonoids in : *Annual Review of Plant Physiology*, 1417-448 (1958).
1. SRINIVASAN. — *J. Biol. Chem.*, **220** : 477 (1955).
2. FISCHER, M. O. L., et DANGSCHAT, G. — *Biochim. Biophysica Acta*, **4** : 199 (1950).
3. MC CRINDLE et coll. — *J. of Chem. Soc.*, p. 1560 (1960).
4. SMISSMAN, E. E. SUH, J. T., OXMAN, H. et DANIELS, R. — *J. Am. Chem. Soc.*, **84** : 1040 (1960).
5. GREWE, R. et HINRICHS, I. — *Chem. Ber.*, **97** : 443 (1964).
6. PICHAT, L., BARET, C. et HERBERT, M. — *Radioisotope Conference*, **1** : 245 (1954), Academic Press, New-York.
7. CHLADEK, S. et SMRT, J. — *Collection of Czechoslovak Chemical Communication*, **28** : 1301-1308 (1963).
8. REPPE, W. et coll. — *Ann. Chem.*, **560** : 1 (1948).
9. HUNTRESS, E. H., LESLIE, T. E. et BORNSTEIN, J. — *Organic Syntheses*, **32** : (1952).
10. REPPE, W. — *Ann. Chem.*, **582** : 1 (1953).
11. INHOFFEN, H., HEIMANN, J., TROISEN H., MUXFELDT et KRÄMER, H. — *Chem. Ber.*, **90** : 187 (1957).
12. BARAN, J. S. — *J. Org. Chem.*, **25** : 257 (1960).
13. PICHAT, L., BARET, C. et AUDINOT, H. — *Bull. Soc. Chim.*, 151 (1956).
14. PICHAT, L., BARET, C. et AUDINOT, H. — *Bull. Soc. Chim.*, 88 (1954).
15. RANDERATH, K. — Traduction anglaise de D. D. Libman, Academic Press, Londres, p. 203 (1963).
16. PICHAT, L., BARET, C., GUERMONT, J. P. et AUDINOT, M. dans *Radioisotopes in the Physical Sciences and Industry International Atomic Energy Agency*. Vienne, 145 (1962).