

CEA 2406 - BENAKIS A.

SYNTHÈSE DU PHENOBARBITAL ^{14}C - 5 (1964)

Sommaire. - Le phénobarbital (Luminal) bien connu comme agent hypnotique, joue également un rôle important dans la médication anti-épileptique.

Pour l'étude du métabolisme de ce médicament dans l'organisme vivant, nous avons synthétisé le phénobarbital marqué en position 2 du cycle pyrimidinique.

Afin de poursuivre la recherche du métabolisme de ce produit, il a été nécessaire de disposer du phénobarbital marqué en position 5 du cycle pyrimidinique.

Cette synthèse, permettant l'introduction du ^{14}C en position 5 du cycle pyrimidinique, comporte sept étapes, au départ de l'acide benzoïque carboxyle ^{14}C , d'une activité spécifique de 25 mc/mM.

Point de fusion du produit final : 172-173°C

Activité spécifique : 11,15 mC/mM.

Rendement total radioactif du produit pur, par rapport à l'acide benzoïque de départ sur 10 mM, de l'ordre de 3 pour cent.

La pureté du produit a été contrôlée par chromatographie sur papier ; elle est de l'ordre de 99 pour cent.

12 p.

CEA 2406 - BENAKIS A.

SYNTHESIS OF PHENOBARBITAL ^{14}C - 5 (1964)

Summary. - Phenobarbital (Luminal), well known as a hypnotic agent, plays also an important role in the medical treatment of epilepsy.

With the object of studying the metabolism of this medicament in the living system, the synthesis of phenobarbital marked in position 2 of the pyrimidinic ring has been effected.

It has been necessary, in order to carry out to research into the metabolism of this product, to have a phenobarbital marked in position 5 of the pyrimidinic ring.

This synthesis, making it possible to introduce C-14 into position 5 of the pyrimidinic ring, consists of seven stages starting from C-14 carboxyl benzoic acid having a specific activity of 25 mc/mM.

The melting point of the final product is 172-173°C and its specific activity is 11,15 mC/mM.

The overall radio-active yield of the pure product, with respect to the original benzoic acid (10 mM) is of the order of 3 per cent.

The purity of the product has been controlled by paper chromatography ; it is of the order of 99 per cent.

12 p.

SYNTHESE DU PHENOBARBITAL ^{14}C - 5

par

Achille BENAKIS

Rapport C.E.A. - R 2406

- Rapport C.E.A. n° 2406 -

DEPARTEMENT DES RADIOELEMENTS
Service de Préparation des Radioéléments
Section des Molécules Marquées

SYNTHESE DU PHENOBARBITAL ^{14}C - 5

par

Achille BENAKIS

Commission Suisse pour la Science Atomique
Université de Genève

Laboratoire du Métabolisme des Médicaments
Ecole de Médecine, Genève, Suisse

Stagiaire à la Section des Molécules Marquées

- Mars 1964 -

SYNTHESE DU PHENOBARBITAL ^{14}C - 5

On utilise actuellement, dans la recherche pharmacologique, un grand nombre de médicaments marqués par des traceurs radioactifs.

Grâce à ce marquage on peut aborder de nombreux problèmes et notamment les transformations que l'agent thérapeutique subit dans l'organisme vivant.

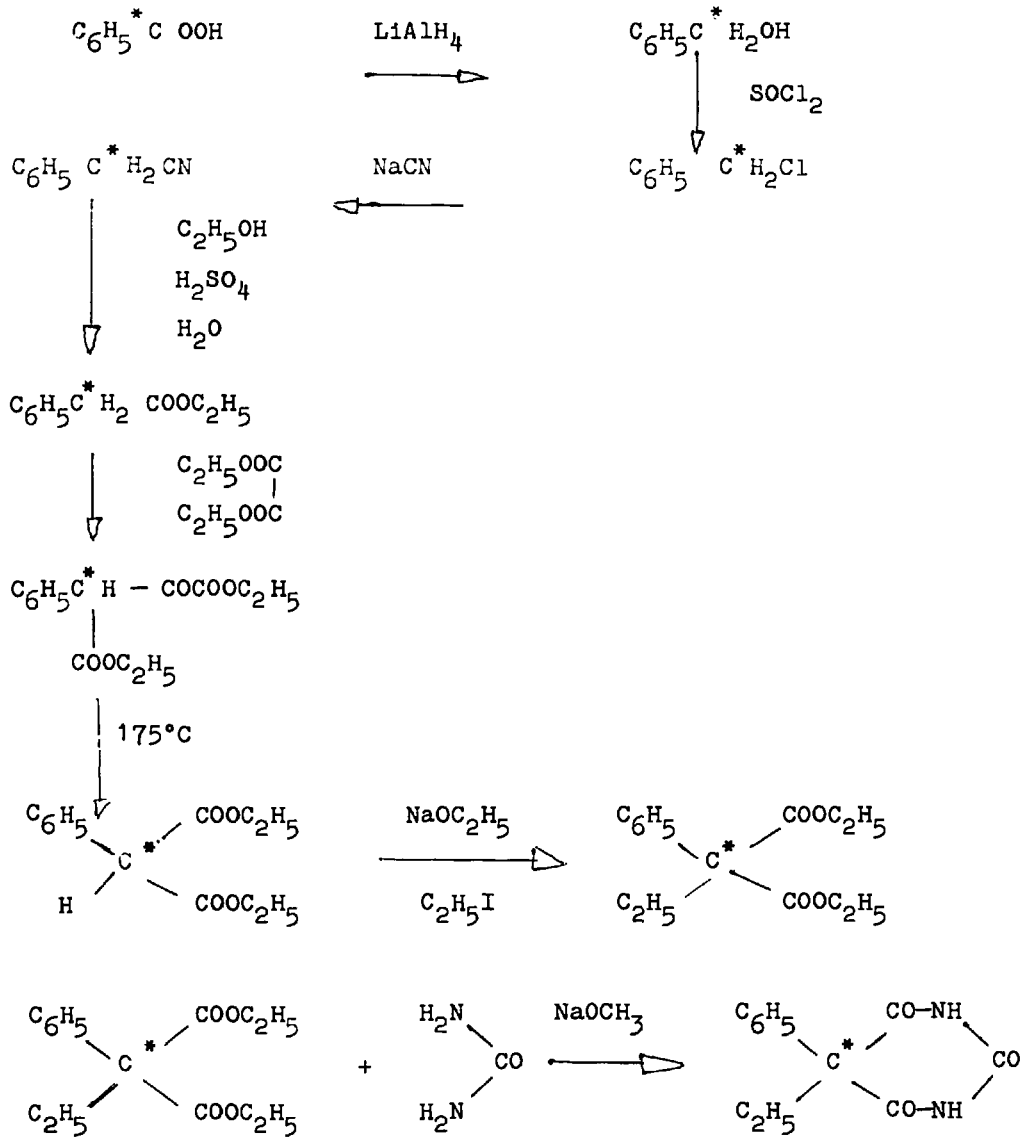
Le phénobarbital, bien connu comme agent hypnotique, joue également un rôle important dans la médication antiépileptique.

Pour l'étude du métabolisme de ce produit, nous avons utilisé le phénobarbital marqué en position 2 du cycle pyrimidinique (1). Pour poursuivre cette recherche il a été nécessaire de disposer du phénobarbital ^{14}C marqué en position 5 du cycle.

La synthèse, permettant l'introduction du C-14 en position 5 dans le cycle pyrimidinique, comporte sept étapes au départ de l'acide benzoïque carboxyle ^{14}C . Les stades de la synthèse sont les suivants :

1. Alcool benzylique ^{14}C -7
2. Chlorure de benzyle ^{14}C -7
3. Cyanure de benzyle ^{14}C -7
4. Phényl acétate ^{14}C -2 d'éthyle
5. Phényl malonate ^{14}C -2 d'éthyle
6. Ethyl phényl malonate ^{14}C -2 d'éthyle
7. Phénobarbital ^{14}C -5

La synthèse s'effectue selon le schéma suivant :



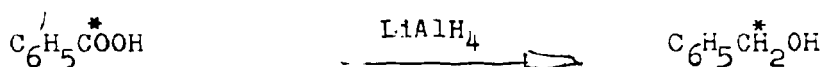
Les rendements de synthèse qui figurent à chaque étape ont été calculés lors des essais de la synthèse non marquée. Etant donné le nombre important des stades nous avons limité, dans la mesure du possible, les transferts en utilisant le montage de la figure n° 3.

L'essentiel des techniques consiste à effectuer les transferts par distillation et les extractions par des extractions en continu.

Les produits des différentes étapes ont été contrôlés par chromatographie en phase gazeuse, et la pureté du produit final par chromatographie sur papier dans plusieurs systèmes.

1. Alcool benzylique $^{14}\text{C-7}$ (2)

Synthèse de l'alcool benzylique $^{14}\text{C-7}$ à partir de l'acide benzoïque carboxyle $^{14}\text{C-7}$ selon le schéma suivant :



Dans un ballon de 100 ml du montage de la figure n° 1, on introduit 0.499 g d'acide benzoïque carboxyle $^{14}\text{C-7}$, d'une activité totale de 102 mCi et d'une activité spécifique de 25 mCi/mM. On ajoute également 0.721 g d'acide benzoïque non marqué, la quantité globale d'acide benzoïque correspondant à 10 mM.

L'acide benzoïque est dissous dans 15 ml d'éther anhydre. On établit dans le montage un courant d'azote et on ajoute lentement en agitant, goutte à goutte 36,4 ml d'une solution étherée de LiAlH_4 titrant 0.65 mM/ml. L'addition achevée, le mélange est chauffé à reflux pendant 3 h 30 en agitant avec un dispositif magnétique sous atmosphère d'azote.

L'excès de LiAlH_4 est alors détruit par une addition lente de 5 ml H_2O glacée, le ballon étant refroidi dans la glace fondante.

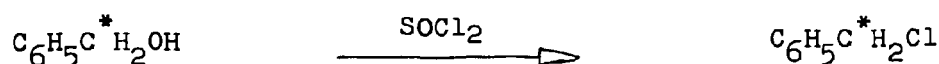
L'hydrolyse est ensuite effectuée par addition goutte à goutte avec agitation de 11 ml d'acide sulfurique 6N. Le pH de la solution est contrôlé et le contenu du ballon transvasé dans un extracteur en continu liquide-liquide de la figure n° 2. On extrait pendant 15 heures. L'extrait étheré est séché sur K_2CO_3 pendant 15 heures et on décante. Le volume étheré est réduit par distillation à l'aide d'une colonne Vigreux au bain-marie. On transvase alors dans le tube T de l'appareil de la figure n° 3. On évapore complètement l'éther à l'évaporateur tournant sous 100 mm Hg à la température ambiante.

Le piège P étant refroidi par la glace carbonique, on dégaze le liquide en faisant un vide de 10^{-3} mm de Hg. Des traces de produit sont condensées dans le piège P. Le dégazage achevé, le robinet R étant fermé, on redistille ces traces dans le tube T refroidi par l'azote liquide, le piège P étant ramené à 30°C environ. On distille alors sous vide statique le produit de T à A le tube T étant chauffé au bain-marie à 50 - 70°C et le tube B refroidi par l'azote liquide.

Le rendement est de l'ordre de 90 pour cent.

2. Chlorure de benzyle $^{14}\text{C-7}$ (3)

Synthèse du chlorure de benzyle $^{14}\text{C-7}$ à partir de l'alcool benzylique $^{14}\text{C-7}$ selon le schéma suivant :

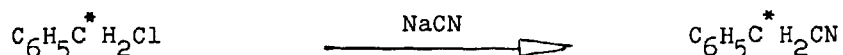


Le tube A de la figure n° 3 contenant l'alcool benzylique $^{14}\text{C-7}$ (0.97 g) est ouvert selon les flèches. On ajoute 10 ml d'éther anhydre et 1.18 g ou 0.71 ml (10 mM) de SOCl_2 (Fluka puriss p.a.) dissous dans 5 ml d'éther anhydre, puis 0.05 ml de pyridine (Fluka puriss p.a.). Il y a début de précipitation et échauffement. Le tube B est muni d'un réfrigérant ascendant équipé d'un tube de garde de CaCl_2 . On chauffe alors à reflux pendant 1 h 30. On ajoute 5 ml d'éther anhydre et on refroidit le tube B par un mélange d'acétone / glace carbonique pour précipiter le chlorhydrate de pyridine formé. Le tube A est centrifugé à 2 000 tours pendant 10 minutes. L'éther est pipeté et transvasé dans le tube T de l'appareil de la figure n° 3. L'éther est évaporé à l'évaporateur rotatif, sous vide partiel de 100 mm de Hg, puis l'excès de SOCl_2 sous 30 mm à 0 °C. Puis le chlorure de benzyle $^{14}\text{C-7}$ est transféré sous vide statique à la partie B de l'appareil de la figure n° 3, selon la procédure indiquée pour l'alcool benzylique.

Le rendement de la synthèse est pratiquement quantitatif.

3. Cyanure de benzyle $^{14}\text{C-7}$

Synthèse du cyanure de benzyle $^{14}\text{C-7}$ à partir du chlorure de benzyle $^{14}\text{C-7}$ selon le schéma suivant :

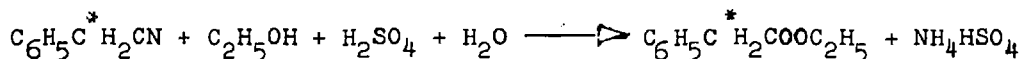


Le ballon B en forme de poire de la figure n° 3 contient 1.13 g de chlorure de benzyle $^{14}\text{C-7}$ provenant de l'opération précédente. On ajoute 1.5 ml d'alcool éthylique absolu, et 0.62 g de NaCN dissous dans 1 ml d' H_2O . Le ballon est muni d'un réfrigérant ascendant et chauffé à 100 °C pendant 4 h 30. Après refroidissement, on transvase le contenu du ballon B dans un extracteur du type de la figure n° 2 et on extrait à l'éther pendant 16 heures. On opère une réduction du volume étheré dans le ballon même de l'extracteur. On transvase dans un ballon de 10 ml en forme de coeur, on rince à l'éther et on évapore à nouveau. Le produit est suffisamment pur pour être utilisé sans autre purification pour l'opération suivante qui s'effectue dans ce même ballon.

Le rendement de la synthèse est de l'ordre de 65 pour cent.

4. Phényl acétate $^{14}\text{C-2}$ d'éthyle

Synthèse du phényl acétate $^{14}\text{C-2}$ d'éthyle à partir du cyanure de benzyle $^{14}\text{C-7}$ selon le schéma suivant :

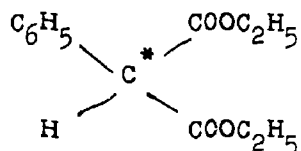
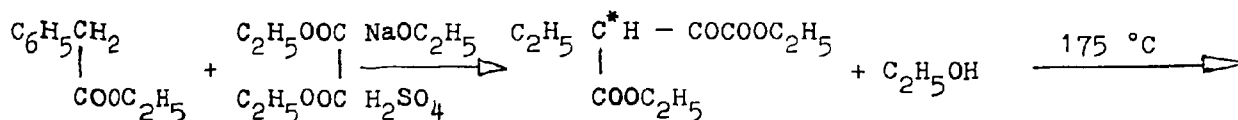


Le ballon de la synthèse précédente contenant 0.7 g de cyanure de benzyle $^{14}\text{C-7}$ est muni d'un réfrigérant ascendant. On ajoute 1.7 ml d'alcool éthylique absolu et 0.85 ml d'acide sulfurique pur.

On maintient à reflux modéré à une température de 135 à 140 °C pendant 9 heures et jusqu'à séparation en deux couches. Après refroidissement on ajoute avec précaution 4 ml d'H₂O. On transvase le tout dans un extracteur en continu du type de la figure n° 2 et on extrait à l'éther pendant 6 heures. La solution étherée est partiellement évaporée et on effectue deux lavages avec 2 x 2 ml d'une solution saturée de carbonate de sodium. On lave encore avec 2 x 2 ml d'eau et on contrôle le pH des eaux de lavage qui doit être neutre. Après lavage, l'éther est séché sur du sulfate de magnésium anhydre pendant 15 heures. L'éther est ensuite transféré dans le tube T de l'appareil de la figure n° 3. On évapore selon la procédure habituelle, évaporateur tournant, dégazage, distillation sous vide statique. Le produit est ainsi transféré dans la partie E de l'appareil de la figure 3 conçue de telle sorte qu'elle puisse être introduite dans une centrifugeuse. Le phényl acétate ¹⁴C-2 d'éthyle ainsi obtenu est un liquide incolore, d'aspect huileux. Le rendement de l'opération est de l'ordre de 60 pour cent.

5. Phényl malonate ¹⁴C-2 d'éthyle

Synthèse du phényl malonate ¹⁴C-2 d'éthyle à partir du phényl acétate ¹⁴C-2 d'éthyle selon le schéma suivant :



Le tube E de l'appareil de la figure n° 3, contenant 0.6 g de phényl acétate ¹⁴C-2 d'éthyle, est muni d'un réfrigérant ascendant. Etant donné que cette réaction se fait dans un milieu parfaitement anhydre, le réfrigérant est muni d'un tube de chlorure de calcium.

On prépare par ailleurs une solution d'éthylate de sodium en introduisant dans un erlenmeyer de 25 ml équipé d'un tube de refroidissement ascendant, lui-même muni d'un tube de chlorure de calcium, 10 ml d'alcool éthylique parfaitement anhydre, spécialement déshydraté sur Mg. On introduit 0.41g de copeaux de sodium et après la formation de l'éthylate, 2.5 ml de diéthyl oxalate neutre et fraîchement distillé. Ces opérations s'effectuent dans un caisson sous atmosphère d'azote.

L'erlenmeyer muni de son tube de refroidissement et du tube de garde de chlorure de calcium est porté pendant 30 minutes à 60 °C. La solution devient au fur

et à mesure jaune. On prélève de cette solution 5 ml et on les ajoute au tube E contenant le phényl acétate $^{14}\text{C}-2$ d'éthyle. Le diéthyl oxalate ainsi ajouté est en excès d'environ 25 pour cent de la quantité molaire nécessaire pour la condensation.¹⁾

Le tube E est porté à 60 °C et on le laisse reposer pendant 48 heures. En effet, cette condensation est relativement lente puisqu'elle se poursuit dans l'éther des lavages du produit de condensation.

Le liquide se prend en masse, sous forme d'un solide cristallin blanc-jaune. On lave en ajoutant 10 ml d'éther anhydre et on centrifuge dans le tube même pendant 10 minutes à 3 000 tours. On décante l'éther et on répète l'opération de lavage avec 2 x 5 ml d'éther anhydre. L'éther restant est éliminé en chauffant le tube modérément et on libère l'éthyle phényl oxalacétate à froid avec 2 ml d'une solution à 5 pour cent d'acide sulfurique dans l'eau.

Le contenu du tube est transvasé dans un extracteur en continu, du type de la figure n° 2 et on extrait à l'éther pendant 6 heures. Après avoir distillé une partie de l'éther, on sèche sur sulfate de magnésium pendant 15 heures. On transvase dans le tube T de l'appareil de la figure n° 3. On élimine l'éther à l'évaporateur rotatif sous vide. Par la suite, il est connecté à la rampe à vide par l'intermédiaire d'un piège à serpent. On chauffe alors, à l'aide d'un bain de Wood, progressivement jusqu'à 175 °C et sous vide de 15 mm Hg et jusqu'à cessation de dégagement d'oxyde de carbone. Après 6 heures, la réaction est complète.

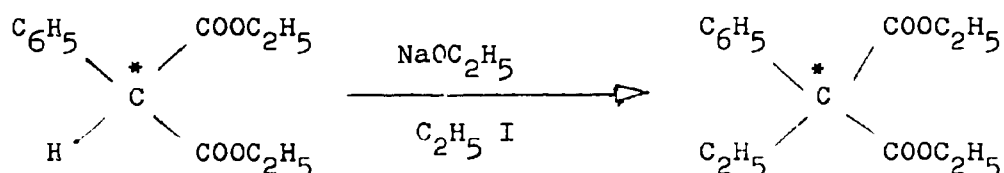
On ferme alors le robinet reliant le piège à la rampe de vide. Le tube T est refroidi à la température de l'azote liquide, le piège étant ramené à 60 °C. Après cette opération, tout en maintenant le tube T à la température de l'azote liquide, on effectue un vide de 10^{-3} mm Hg. On scelle alors l'appareil à l'étranglement f et on distille sous vide statique. Le phényl malonate $^{14}\text{C}-2$ d'éthyle se trouve ainsi transvasé dans le récipient C de la figure n° 3 dans lequel s'effectue la réaction de l'étape suivante.

Le rendement de l'opération est de l'ordre de 65 pour cent.

6. Ethyl phényl malonate $^{14}\text{C}-2$ d'éthyle

Synthèse de l'éthyl phényl malonate $^{14}\text{C}-2$ d'éthyle à partir du phényl malonate $^{14}\text{C}-2$ d'éthyle selon le schéma suivant :

1) Cet excès est important, non seulement pour le rendement de la synthèse, mais également quant aux impuretés présentes dans le produit. En effet, la chromatographie en phase gazeuse sur colonne de silicone à 205° montre la présence de deux impuretés dans le phényl malonate d'éthyle ; l'une des deux impuretés étant le phényl acétate d'éthyle. Celui-ci diminue de moitié dans le phényl malonate d'éthyle quand on passe d'un excès de 10 à 25 pour cent de diéthyl oxalate et d'éthylate de sodium dans la phase de condensation.



Dans l'erlenmeyer C de la figure n° 3 contenant 0.56 g de phényl malonate $^{14}\text{C}-2$ d'éthyle, on introduit un élément pour l'agitation magnétique et on munit l'erlenmeyer d'un réfrigérant ascendant qui comporte un tube de garde de chlorure de calcium.

On prépare par ailleurs une solution d'éthylate de sodium en ajoutant dans 15 ml d'alcool éthylique parfaitement anhydre, spécialement préparé sur magnésium, 0.53 g de copeaux de sodium. Une fois l'éthylate préparé on ajoute 0.1 ml d'acétate d'éthyle préalablement distillé.

Dans l'erlenmeyer contenant le phényl malonate $^{14}\text{C}-2$ d'éthyle on ajoute 0.47 ml d'iodure d'éthyle (Fluka puriss p.a.). Cette quantité est de 20 pour cent en excès par rapport à la quantité molaire nécessaire pour la condensation. Après cette adjonction, on prélève 3 ml de la solution d'éthylate de sodium qu'on ajoute en deux fois dans l'erlenmeyer de réaction. On chauffe alors et on agite à l'aide d'un agitateur magnétique pendant 2 heures à 80 °C.

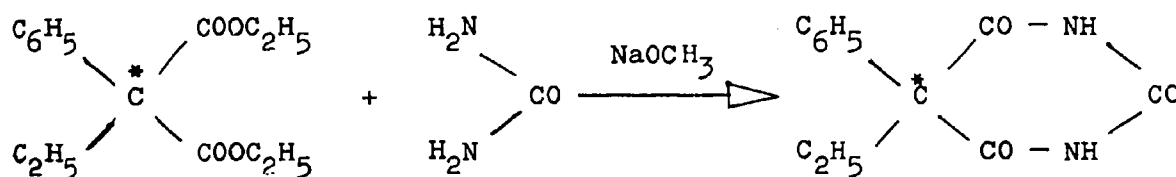
Après refroidissement, l'alcool éthylique en excès est évaporé avec précaution sous vide à l'évaporateur tournant. On ajoute alors 4 ml d'eau et on extrait trois fois par 2 ml de benzène. Le benzène est séché sur sulfate de magnésium pendant 15 heures. Il est transvasé dans²⁾ l'appareil de la figure n° 3, évaporé à l'évaporateur tournant, on dégaze et distille sous vide statique comme d'habitude l'éthyle phényl malonate $^{14}\text{C}-2$ d'éthyle dans le tube D de la figure n° 3.

Le rendement de l'opération est de 85 pour cent.

La chromatographie en phase gazeuse du produit ainsi synthétisé indique la présence de deux impuretés, dont l'une est le phényl acétate d'éthyle. On retrouve ces deux impuretés, par chromatographie en phase gazeuse, dans l'extrait benzénique des produits non condensés avec l'urée. Condensation qui s'effectue dans l'étape suivante.

7. Acide éthyl phényl barbiturique $^{14}\text{C}-5$

Synthèse de l'acide éthyl phényl barbiturique $^{14}\text{C}-5$ à partir de l'éthyle phényl malonate $^{14}\text{C}-2$ d'éthyle et de l'urée selon le schéma suivant :



²⁾ la partie T

Dans le tube D de la figure n° 3 contenant 0.53 g d'éthyl phényl malonate ^{14}C -2 d'éthyle, on ajoute 0.30 g d'urée préalablement séchée pendant 6 heures à 60 °C.

On prépare par ailleurs une solution de méthylate de sodium en introduisant dans un erlenmeyer de 25 ml surmonté d'un tube de refroidissement, 10 ml d'alcool méthylique spécialement déshydraté sur magnésium et 0.1 g de copeaux de sodium. Après refroidissement, on introduit cette solution dans le tube D contenant l'ester et l'urée. L'erlenmeyer est rincé avec 3 ml d'alcool méthylique anhydre. Toutes ces opérations s'effectuent dans le caisson sous atmosphère d'azote.

Le tube D est surmonté d'un tube de garde de chlorure de calcium et fermé à la flamme³⁾. Il est alors placé dans un cylindre de protection fermé en acier inox, et chauffé à 110 °C pendant 12 heures dans une étuve. Cette étuve comporte un dispositif permettant une agitation continue du cylindre.

Après refroidissement, on ouvre le tube selon les flèches de la figure n° 3. On l'adapte à l'évaporateur tournant et l'alcool méthylique est évaporé sous vide. On ajoute alors 8 ml d'eau glacée et on extrait à deux reprises avec 3 et 2 ml de benzène. Cette extraction s'effectue par pipetage.

Dans le but de récupérer l'ester n'ayant pas réagi, nous avons effectué la chromatographie en phase gazeuse de l'extrait benzénique. Cette chromatographie montre que le produit extrait ne correspond pas à l'ester non condensé⁴⁾. D'ailleurs, l'essai de condensation, après purification de l'extrait benzénique, avec l'urée est négatif.

Après extraction, on acidifie par 0.8 ml d'acide acétique glacial, on transfère dans un extracteur en continu et on extrait à l'éther pendant 5 heures. L'éther est éliminé par évaporation. Le résidu est repris par 2.5 ml d'alcool éthylique et le phénobarbital ^{14}C -5 est précipité en ajoutant 9 ml d'eau. On peut filtrer à chaud sur noir animal. Le produit cristallise dans l'armoire frigorifique.

Le rendement de l'opération est de l'ordre de 15 pour cent.

Le point de fusion du produit est de 172 - 173 °C. L'activité spécifique est de 11.15 mCi/mM. Le rendement total radioactif du produit pur par rapport à l'acide benzoïque de départ de 10 mM. est de l'ordre de 3 pour cent⁵⁾.

La pureté radiochimique du produit a été contrôlée par chromatographie sur papier dans plusieurs systèmes chromatographiques et notamment dans les systèmes

3) à l'étranglement f

4) Il est probable que, pendant la condensation, d'autres réactions interviennent

5) Pour récupérer du phénobarbital marqué, nous avons ajouté aux eaux-mères après filtration 32 mg de phénobarbital non marqué. Le produit a été recristallisé et filtré. La chromatographie sur papier indique la présence d'au moins trois impuretés. Le phénobarbital obtenu par cette procédure de récupération ne peut être utilisé sans purification préalable.

butanol-méthanol-eau (45-5-50) et alcool isoamylique-éthylène glycol-ammoniaque (85-5-15). On peut mesurer la radioactivité d'un chromatogramme après élution des secteurs en dehors de celui correspondant au Rf du phénobarbital. Cette radioactivité est de l'ordre de 2 pour cent par rapport à celle du produit déposé au point zéro. Elle ne peut pas être entièrement imputée aux impuretés. En conclusion, le produit a une pureté de 99 pour cent.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BENAKIS A.
Thèse 1344, Faculté des Sciences,
Université de Genève, Genève 1962
- [2] PICHAT L. et CARBONNIER P.
Selon rapport CEA 1148, 2
- [3] PICHAT L. et CARBONNIER P.
Selon rapport CEA 1148, 3

Manuscrit reçu le 3 janvier 1964

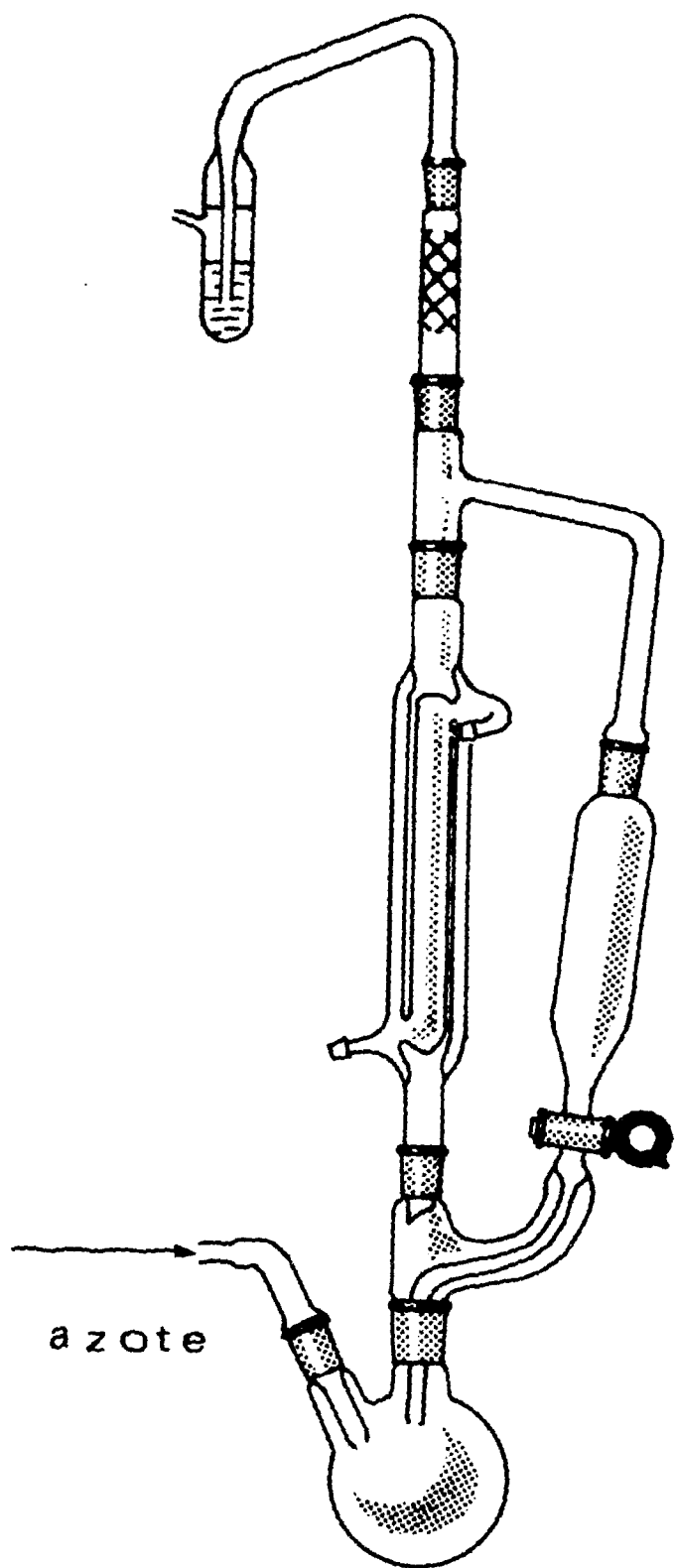


Fig. 1

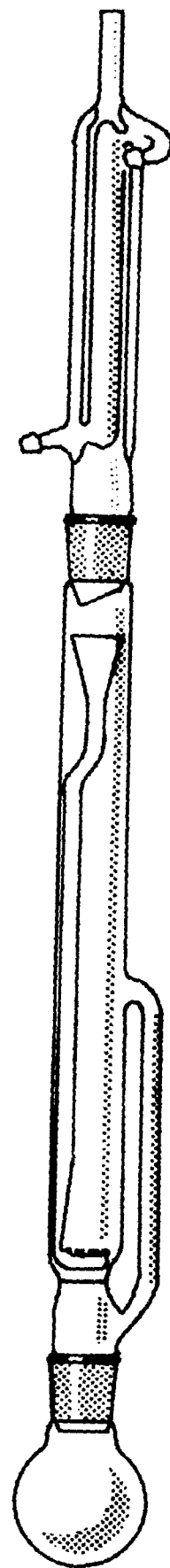


Fig. 2

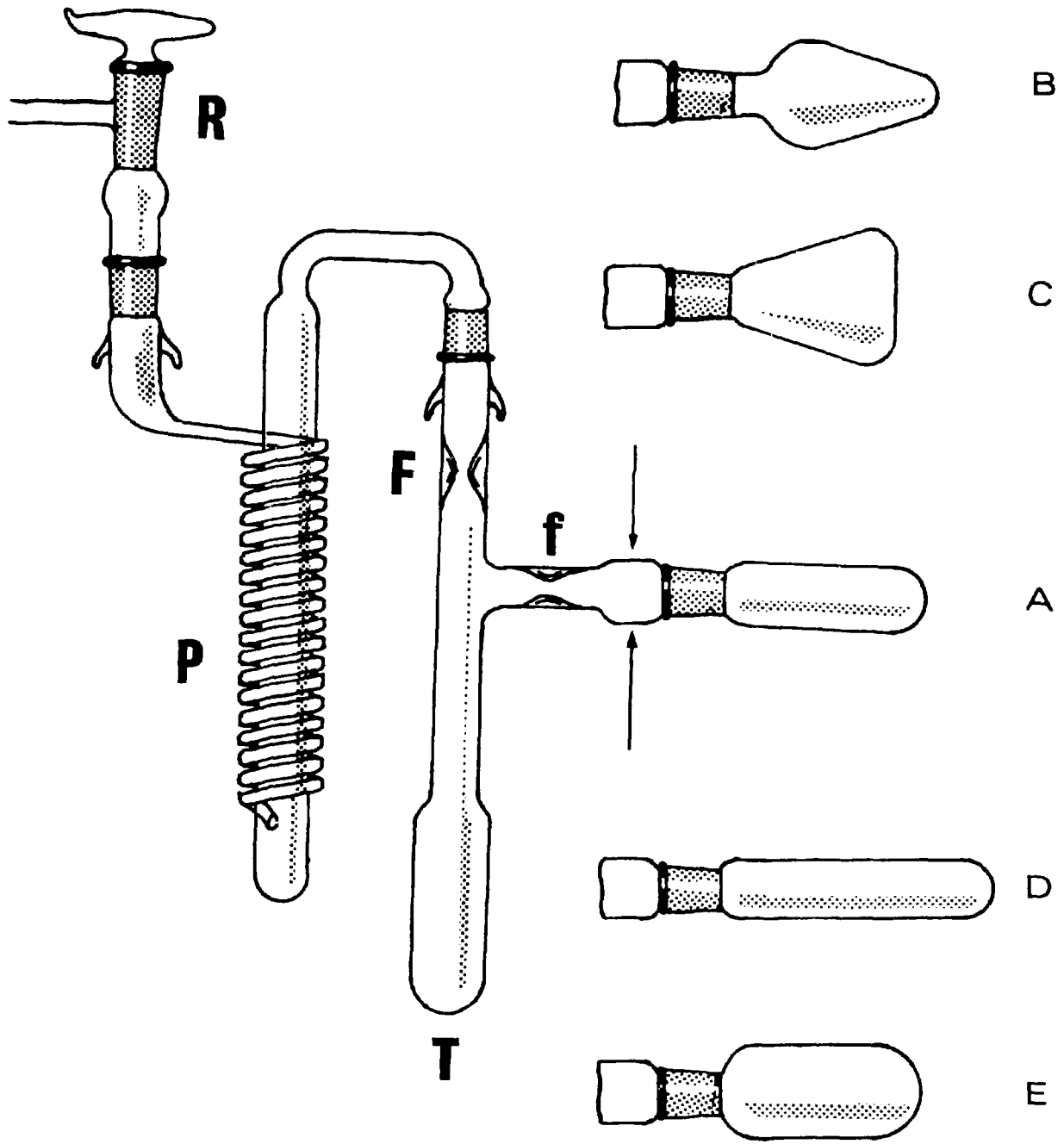


Fig. 3

FIN