

PRÉSIDENTE DU CONSEIL
COMMISSARIAT A
L'ÉNERGIE ATOMIQUE

Synthèses de molécules organiques marquées par le carbone-14 et le soufre-35

par

L. PICHAT

Rapport CEA n° **1015**

CENTRE D'ÉTUDES
NUCLÉAIRES DE SACLAY
SERVICE DE DOCUMENTATION
Boite postale n° 2 - Gif-sur-Yvett (S.-et-O.)

PICHAT L.

Rapport CEA n° 1015

Synthèses de molécules organiques marquées par le carbon -14 et le soufre-35.

Sommaire. — Après un bref historique du développement de la Section des Molécules marquées du Commissariat à l'Energie Atomique français, l'auteur donne un résumé des synthèses des composés marqués suivants : benzène ^{14}C -6 ; phényl-p-fluorophényl, thienyl-2 β alamines β ^{14}C , noradrénaline β ^{14}C (arterénoï β ^{14}C) dotriacontane ^{14}C -16-17 acide aminoéthane sulfinique (hypotaurine ^{35}S).

1958

9 pages

PICHAT L.

Report CEA n° 1015

Synthesis of organic substances labelled with ^{14}C and ^{35}S .

Summary. — After a brief history of the development of the „Section des Molécules marquées” of the French Atomic Energy Commission the author gives an outline of the synthesis of the following labelled compounds : benzene ^{14}C -6 ; phenyl, p-fluorophenyl, thienyl-2 β alamines β ^{14}C ; noradrenaline β ^{14}C (arterenol β ^{14}C), dotriacontane ^{14}C -16-17, aminoethane sulfinic acid (hypotaurine ^{35}S).

1958

9 pages

SYNTHESES DE MOLECULES ORGANIQUES MARQUEES

PAR LE CARBONE 14 et le SOUFRE 35 (*)

par L. PICHAT -(**)

I N T R O D U C T I O N

Le laboratoire du Commissariat à l'Energie Atomique Français chargé de la préparation de molécules organiques marquées par les radioéléments a été créé fin 1949 sur l'initiative de M. GUERON. De cette date à fin 1954 l'activité de ce laboratoire a été partagée entre cette production et l'étude de substances organiques scintillantes (monocristaux, plastiques scintillants) pour les mesures de radioactivité. Durant cette période, tout en mettant au point la synthèse de molécules organiques marquées de base (1), l'activité du laboratoire a été consacrée surtout à la préparation de composés organiques marqués spéciaux n'existant pas sur le marché mondial. Ainsi, par exemple ont été préparées : l'acide indolyl-acétique (hétéroauxine) marquée en position α du noyau indole (2), l'isoniazide marqué dans le noyau pyridine (3), l'acide glutamique ^{14}C -3-4, la proline (carboxyl ^{14}C) (4). Depuis le début de 1955 l'activité de la Section des Molécules Marquées a été uniquement consacrée à la préparation de ces dernières. Le tableau I qui donne le nombre des livraisons effectuées au cours des années 1955 à 1957 montre clairement le développement de la production. Alors que le catalogue des molécules marquées ne comportait que 35 produits dans l'édition de mars 1955; l'édition d'avril 1958 mentionne 136 produits. Le Commissariat à l'Energie Atomique satisfait environ 85 % des demandes d'utilisateurs français et a effectué en 1957 : 16 exportations à destination des U.S.A., du Japon, de la Belgique, du Canada, de la Hollande et de la Sarre. La courbe ascendante de la demande et de la production s'est encore accentuée au début de l'année 1958.

(*) D'après des travaux avec la collaboration de : M. Audinot, C. Baret, Ph. Carbonnier, J.P. Guermont, M. Herbert, P. Vercier.

(**) Chef de la Section des Molécules Marquées, C.E.N. Saclay, B.P. n° 2, GIF/YVETTE (Seine et Oise) FRANCE.

Bien qu'il y ait eu en France quelques timides emplois de molécules marquées en chimie analytique ou pour des applications à caractère plus ou moins industriel, les biochimistes sont de loin les utilisateurs les plus nombreux et les emploient surtout pour la recherche fondamentale.

La présente communication donne une description succincte des méthodes originales de synthèse chimique de quelques composés typiques.

B E N Z E N E $^{14}\text{C}_6$ (5)

L'introduction du ^{14}C dans le noyau benzénique au départ de $^{14}\text{CO}_3\text{Ba}$ est particulièrement délicate. Les méthodes publiées pour la synthèse du benzène ^{14}C ont été passées en revue par Turner et Warne (6). Les mêmes auteurs ont décrit une méthode élégante donnant un rendement global de l'ordre de 75 % par rapport à $^{14}\text{CO}_2$ mis en oeuvre mais ce procédé comporte six étapes successives.

Nous avons donc examiné la possibilité d'utiliser la polymérisation cyclisante de l'acétylène en présence de "triphénylphosphine nickelcarbonyl" : $(\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{PNi}(\text{CO})_2$ comme catalyseur, selon Reppe (7) car, l'acétylène étant facilement préparé avec un rendement presque quantitatif (9) on devait pouvoir disposer d'une synthèse du benzène radioactif en deux étapes seulement à partir de $^{14}\text{CO}_3\text{Ba}$. Notons que ce procédé donne comme sous produit du styrolène uniformément marqué également très intéressant. Bien qu'il soit fait mention (8) sans aucun détail de l'application de la méthode de Reppe à l'échelle d'une molécule, il ne semble pas que l'on ait jusqu'ici tenté d'opérer sur des quantités de l'ordre de 10 millimoles d'acétylène.

Nous avons examiné les conditions pour obtenir un rendement optimum. Parmi les milieux réactionnels essayés : benzène, diméthylformamide, l'acétonitrile a donné les meilleurs résultats. Nous avons vérifié que la trimérisation de l'acétylène ne se produit pas à la pression atmosphérique mais pour une pression d'acétylène supérieure à 2 kg/cm². L'isolement du benzène du milieu réactionnel par l'intermédiaire du "clathrate" selon (6) ne nous a pas donné de résultats reproductibles, d'ailleurs ce procédé ne permet pas d'isoler facilement le styrolène. L'entraînement à la vapeur d'eau ou par un courant d'azote n'ayant pas donné de bons résultats, nous avons été amenés à utiliser comme moyen de séparation la chromatographie de partition en phase vapeur.

Succinctement, la technique à laquelle nous sommes arrivés après de nombreux essais est la suivante. Sur une rampe à vide, on condense 14,3 millimoles d'acétylène dans un tube de verre à parois épaisses (150 mm x 10 mm) renfermant 0,8 ml d'acétonitrile et 30 mg de catalyseur. Le tube scellé, placé dans un

dans lesquelles le radical R désigne les groupements : phényl, p-fluorophényl, thiényl-2.

La carbonatation à l'aide de $^{14}\text{CO}_2$ d'un excès du magnésien approprié, selon la technique habituelle² (1), a conduit avec des rendements de 80 à 90 % aux acides benzoïque, p-fluorobenzoïque, thénicoïque (carboxyles ^{14}C). Dans le cas particulier du magnésien du bromo-2 thiophène, il a été observé que lorsqu'il est préparé dans l'éther, sa carbonatation fournit de l'acide thénicoïque souillé d'une impureté bleue inséparable. Par contre, lorsque le magnésien est préparé dans le tétrahydrofur l'acide obtenu avec un rendement de 90 % est pur. La réduction directe des acides précédents, en solution dans l'éther, par un excès de LiAlH_4 (10) a fourni les alcools correspondants du type benzylique avec des rendements de l'ordre de 90 %. La transformation en chlorures de benzyle correspondants a été effectuée par action du chlorure de thionyle dans l'éther, en présence de pyridine (11). Les rendements ont été de l'ordre de 80-90 %. Dans le cas du chlorométhyl-2 thiophène assez instable, il a été utilisé immédiatement dans la réaction suivante. Nous n'avons pas cherché à isoler à l'état pur les benzylacétamidomalonates d'éthyle obtenus par condensation des chlorures précédents sur un excès de dérivé sodé de l'acétamidomalonate d'éthyle dans le diméthylformamide (D.M.F.) (12). Les produits bruts de réaction ont été hydrolysés par ébullition pendant 8 heures avec de l'acide bromhydrique à 48 % (11). Le mélange formé d'alanines β substituées β ^{14}C et de glycine non radioactive formée par l'hydrolyse de l'excès d'acétamidomalonate d'éthyle a été purifié sur colonnes de résine échangeuse Dowex 50 H^+ . Les rendements globaux basés sur le $^{14}\text{CO}_3\text{Ba}$ de départ ont été respectivement de :

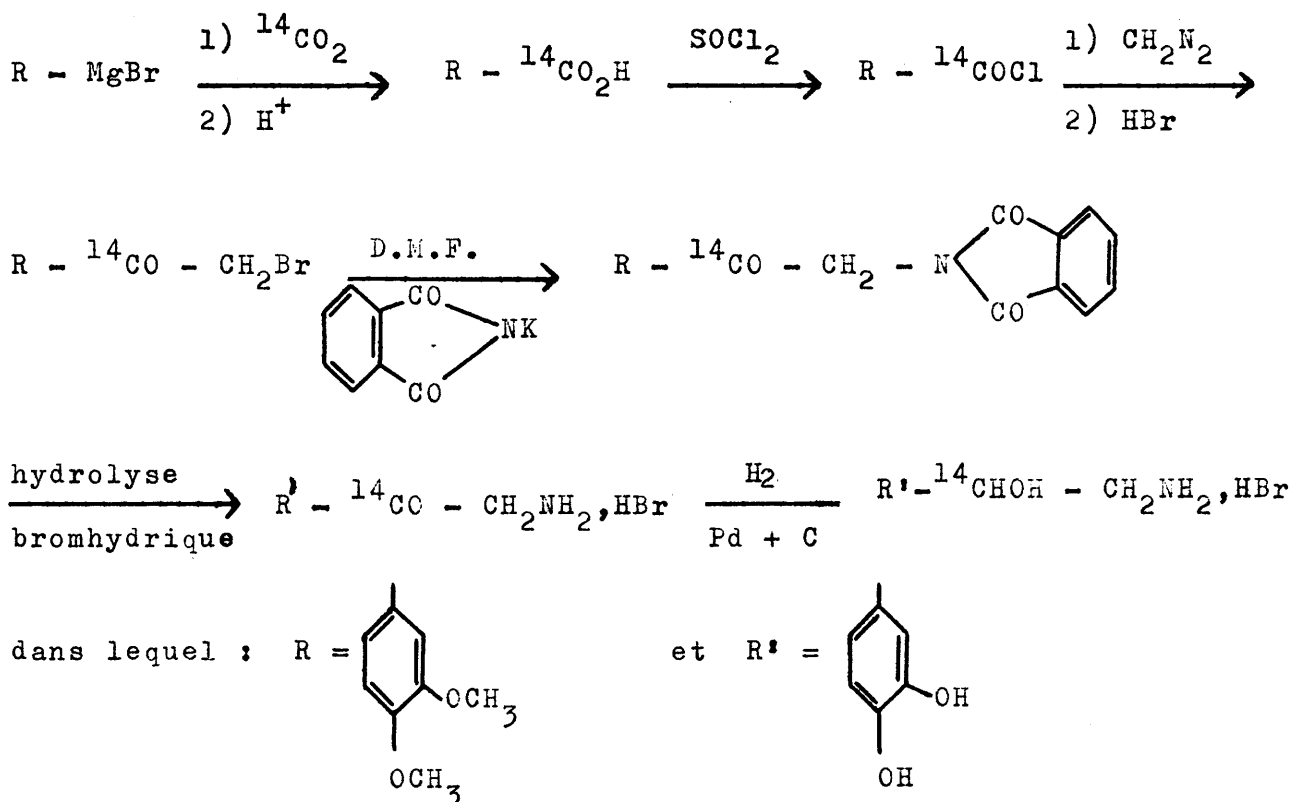
phénylalanine $^{14}\text{C}-3$: 64 %
p-fluorophénylalanine $^{14}\text{C}-3$.	: 39 %
thiényl-2 alanine $^{14}\text{C}-3$: 57 %

L'enregistrement de l'activité le long des chromatogrammes sur papier de ces aminoacides a montré dans chaque cas la présence d'un seul pic radioactif.

NORADRENALINE β ^{14}C (ARTERENOL β ^{14}C)

La noradrénaline (artérenol) est un important sympathomimétique et des progrès considérables ont été réalisés dans l'étude de son métabolisme grâce à ce produit marqué au ^{14}C (13). Une méthode de synthèse a déjà été décrite (14) en 6 étapes au départ de chlorure d'acétyl $^{14}\text{C}-1$. Le rendement global n'atteint que 6 à 15 % basé sur l'acétate de sodium $^{14}\text{C}-1$. La méthode que nous avons mise au point utilise le gaz carbonique ^{14}C comme matière première, ne comporte que 6 étapes à partir de ce dernier et évite les pertes par oxydation en employant presque jusqu'à la fin de la

préparation des intermédiaires dans lesquels le groupement dihydroxy-3-4 phényl sensible est protégé par méthylation. Le schéma réactionnel est :

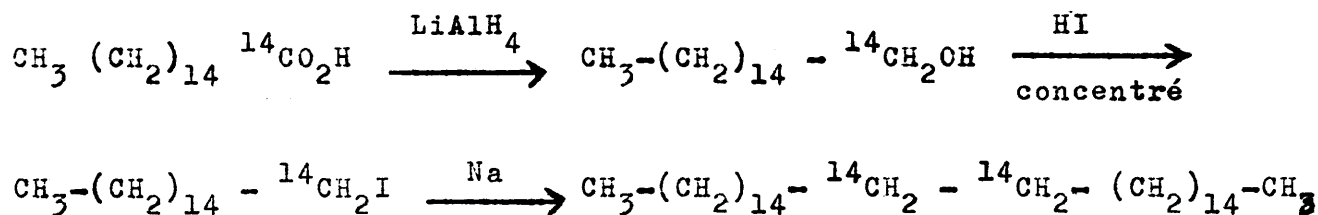


Le magnésien du bromovératrole préparé avec un rendement presque quantitatif en solution dans le tétrahydrofurane bouillant (15) est carbonaté selon la technique habituelle (1). L'acide vé-ratrique carboxyl ^{14}C est obtenu avec un rendement de 90-95 % basé sur $^{14}\text{CO}_2$, après purification par sublimation sous vide poussé. Cette méthode constitue une amélioration très sensible de la prépa-ration de cet acide marqué qui n'avait été obtenu jusqu'ici qu'avec un rendement de 59 % (16) ou avec un rendement de 89 % mais par une méthode beaucoup plus délicate (17). Le chauffage à reflux de l'acide précédent avec du chlorure de thionyle purifié fournit le chlorure de vératroyle ^{14}CO avec un rendement presque quantitatif après sublimation sous vide poussé. L'action d'un excès de diazo-méthane en solution étherée sur le chlorure précédent, suivie de l'action de l'acide bromhydrique à 48 % sur la solution de la dia-zocéatone dans l'acide acétique, conduit avec un rendement de l'ordre de 85 % à la diméthoxy-3-4 α bromoacétophénone β ^{14}C (P.F. = 80-81°C).

La transformation de la cétone bromée précédente en diméthoxy-3-4 α phtalimacétophénone β ^{14}C , par action du phtalimide de potassium dans le diméthylformamide purifié (D.M.F.) constitue l'une des phases critiques de la synthèse. Nous avons cherché, sans succès, à isoler à l'état pur cet intermédiaire. Finalement, sans purification, il a été hydrolysé par chauffage à reflux avec de l'acide bromhydrique concentré en bromhydrate de dihydroxy-3-4 α aminoacétophénone β ^{14}C (noradrénaline). Cette dernière a été hydrogénée en artérenol β ^{14}C , après filtration de l'anhydride phtalique, en solution acétique, à 25°C sous pression atmosphérique en présence de palladium déposé sur charbon actif (14). Après filtration du catalyseur, une microfraction de la solution a été analysée par chromatographie sur papier (Whatman n° 1 traité à l'acide ascorbique (solvant phénol : 85 g HCl N/10 15 ml) en atmosphère de SO_2). L'enregistrement de la radioactivité le long de ce chromatogramme a montré la présence d'impuretés radioactives à côté d'artérenol de $R_F \approx 0,4$. Le produit brut a été purifié (13) sur colonne de résine échangeuse Dowex 50 H^+ et élution par HCl 0,5 N. Les fractions contenant l'artérenol, β ^{14}C sont alors filtrées sur une colonne de résine échangeuse Dowex 1 CH_3CO_2^- pour éliminer les ions Cl^- . Les fractions d'acétate d'artérenol éluées par l'eau distillée sont pures comme le montrent la chromatographie sur papier et le spectre d'absorption ultraviolette identique à celui du produit commercial. Tous nos essais pour obtenir l'acétate d'artérenol β ^{14}C sous forme de poudre cristalline ont échoué. En effet, la lyophilisation des solutions même à basse température provoque la décomposition du produit. Il est vraisemblable que la décomposition résulte, tout au moins partiellement, de la radiolyse interne par suite de la forte activité spécifique. Il est d'ailleurs bien connu que la noradrénaline non marquée est elle-même instable. Néanmoins ces solutions peuvent être concentrées par lyophilisation jusqu'à un volume correspondant à une radioactivité de l'ordre de 50 $\mu\text{C}/\text{ml}$ de solution. Ces solutions, conservées à -20°C sont stables après addition d'acide ascorbique. Le rendement global est de l'ordre de 15 %, activité spécifique 18 $\text{mc}/\text{millimole}$.

DOTRIACONTANE ^{14}C -16-17

Pour la préparation de cet hydrocarbure paraffinique à longue chaîne marqué, l'acide palmitique carboxyl ^{14}C nous a semblé une matière première intéressante et nous avons utilisé la suite de réactions :



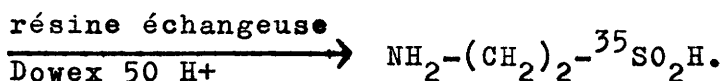
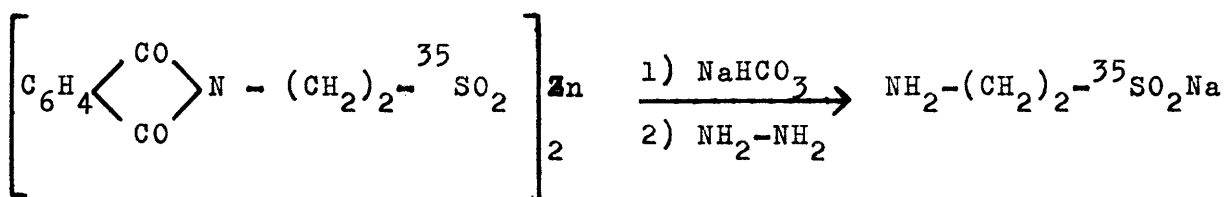
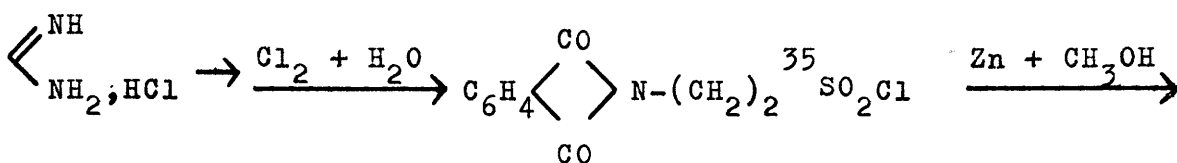
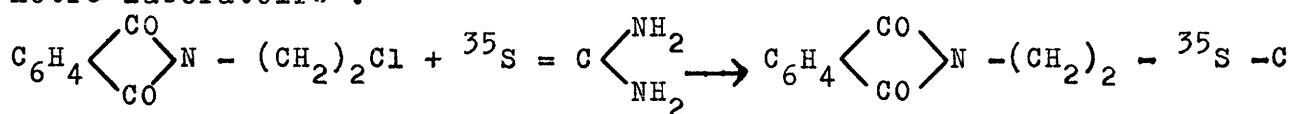
La réduction de l'acide palmitique en alcool cétylique déjà décrite sur des cas analogues (10) s'effectue avec un rendement quantitatif. Il en est de même pour la transformation en iodure de cétyle (18). A partir de ce dernier nous avons étudié diverses méthodes pour accéder au dotriacontane. La duplication de l'iodure de cétyle par le magnésium dans l'éther n'a pas donné un rendement supérieur à 26 %. L'action du zinc (19) a alors été examinée. Ce réactif est activé par une solution aqueuse bouillante de nitrate d'argent; on ajoute alors l'iodure de cétyle et chauffe à reflux. Les rendements ont oscillé entre 20 et 43 %. Le remplacement de l'eau par l'alcool, comme milieu réactionnel bien que favorisant l'homogénéisation du mélange, n'a pas amélioré le rendement. En milieu aqueux, avec ce catalyseur, en opérant en tube scellé avec agitation le rendement atteint 63 %. Cependant la méthode comporte des risques, surtout avec des produits radioactifs, par suite de la formation d'hydrogène. Finalement, nous avons adopté la réaction de Wurtz déjà utilisée dans le cas du bromure de cétyle (20). En agitant une solution étherée d'iodure de cétyle avec un fort excès de sodium pulvérisé et en maintenant la température à environ 34°C, nous avons constaté que le rendement en dotriacontane augmente avec le temps de réaction. Le tableau suivant indique les rendements en fonction de cette variable :

<u>Temps de réaction</u>	<u>Rendement en dotriacontane</u>
20 heures	12 %
90 heures	32 %
8 jours	73 %
10 jours	70 %

Le mélange réactionnel est traité par l'alcool aqueux pour détruire l'excès de sodium et est lavé à l'eau. Le dotriacontane brut obtenu par évaporation de la solution étherée séchée est recristallisé dans l'acétate d'éthyle. Le rendement radioactif en dotriacontane (P.F. = 69-70°C) calculé sur l'acide palmitique carboxyl ¹⁴C a atteint 53 %.

ACIDE AMINOETHANESULFINIQUE (hypotaurine) ³⁵S

Cet important intermédiaire (21) dans le métabolisme du soufre a déjà été préparé par plusieurs méthodes (22) celle de E. Bricas, F. Kieffer et C. Fromageot paraissant la plus satisfaisante. Cette technique utilise la taurine comme matière première et comporte les étapes suivantes : protection de la fonction amine par le groupement benzyloxycarbone, réduction du chlorure d'acide correspondant par le zinc, élimination du groupement protecteur par la sodium dans l'ammoniaque liquide, dessalification par la "Permutite 50". Bien que le rendement de ce procédé soit excellent, il nous a semblé que l'utilisation du groupement phtalyle pour la protection de la fonction amine présenterait certains avantages. Sur ce principe, nous avons mis au point une préparation de l'hypotaurine ³⁵S qui utilise comme matière première la thiourée ³⁵S de préparation courante dans notre laboratoire :



La thiourée ³⁵S (5 mM) condensée sur le phtalimido-2 chloro-1 éthane, en solution alcoolique concentrée, conduit au chlorhydrate de S-phtalimidoéthyl-thiuronium ³⁵S. A noter que, sur des quantités de 5 millimoles de thiourée cette condensation se fait mal en solution alcoolique diluée. L'action du chlore gazeux sur la suspension aqueuse du sel d'isothiuronium a fourni le chlorure de phtalyltaurine ³⁵S qu'il est nécessaire de purifier par sublimation sous vide poussé pour la suite des réactions.

A ce stade le rendement par rapport à la thiourée est de 70-75 %. La réduction du chlorure précédent par le zinc fraîchement activé et le méthanol anhydre donne naissance au sel de zinc de la phtalylhypotaurine. Cette réduction ne donne de résultats satisfaisants qu'avec du méthanol parfaitement anhydre. Il arrive parfois que même dans ces conditions la réaction ne démarre pas; dans ce cas, l'addition d'une trace de carbonate de cuivre facilite la réduction. D'autres agents réducteurs : sulfite de sodium, borohydrures de sodium, de potassium, de lithium ont été essayés et n'ont pas conduit à des résultats aussi satisfaisants que le zinc. Le sel de zinc de la phtalylhypotaurine est transformé en sel de sodium par action d'une solution concentrée de bicarbonate de soude pendant 2 heures. Après séparation, par filtration de l'hydroxyde de zinc, le groupement phtalyle est éliminé par action de l'hydrazine, à la température ambiante pendant 48 heures. Après acidification à pH-3-4 par l'acide chlorhydrique pour précipiter le phtalylhydrazide, la solution filtrée contenant l'hypotaurine ^{35}S est analysée par chromatographie sur papier. Cette dernière montre la présence de taurine ^{35}S comme impureté. Le produit brut est purifié par passage sur une colonne de résine échangeuse "Dowex 50" H^+ . Après élution par HCl N/20 de la taurine ^{35}S et des ions Na^+ ; l'hypotaurine ^{35}S obtenue par évaporation de la solution à froid sous vide à un point de fusion de 170-171°C et n'est pas hygroscopique. L'enregistrement de la radioactivité le long du chromatogramme sur papier (solvant : phénol 80 : eau 20) montre la présence d'un seul "pic" radioactif de $R_F = 0,6$. Le rendement calculé sur la thiourée de départ a atteint 37 % (activité globale : 2 mc; activité spécifique : 1 mc/mM.)

T A B L E A U I

Années	Nombre de livraisons de molécules marquées effectuées par la Section des Molécules Marquées du C.E.A.
1955	27
1956	79
1957	111
1958 (janvier - 15 mars)	52

B I B L I O G R A P H I E

- 1 - C. BARET, L. PICHAT, Bull. Soc. Chim. France 18, 580-3 (1951).
L. PICHAT, C. BARET, Rapport C.E.A. n° 99 (1951).
- 2 - L. PICHAT, M. AUDINOT, J. MONNET, Bull. Soc. Chim. France 21,
85-8 (1954).
- 3 - L. PICHAT, C. BARET, M. AUDINOT, Bull. Soc. Chim. France 21,
88-92 (1954).
- 4 - L. PICHAT, C. BARET, M. AUDINOT, M. HERBERT, J. LAMBIN,
Radioisotope Conference 1954, p. 245-257, Butterworths, Londres
(1954).
- 5 - L. PICHAT, C. BARET, Tetrahedron 1, 269 (1957).
- 6 - H.S. TURNER, R.J. WARNE, J. Chem. Soc. 789 (1953).
- 7 - W. REPPE, W.J. SCHWECKENDICK, Ann. Chem. 560, 104 (1949).
- 8 - F. WEYGGAND citant W. REPPE dans Methoden der Organischen Chemi
(Houben-Weyl) t. IV partie 2, p. 552 G. Thieme Verlag Stuttgart
(1955).
- 9 - J.D. Cox, R.J. WARNE, J. Chem. Soc. 1893 (1951).
- 10 - R.F. NYSTROM, W.G. BROWN, J. Am. Chem. Soc. 69, 2548 (1947).
- 11 - J.C. REID, A.E.C.U. 216 (UCRL - 320) (1949).
- 12 - J. SHAPIRA, R. SHAPIRA, K. DITTMER, J. Ame. Chem. Soc. 75, 3655
(1953)
- 13 - D.T. MASUOKA, H.F. SCHOTT, R.I. AKAWIE, W.G. CLARK, Proc. Soc.
Exp. Biology and Medicine 93, 5-7 (1956).
- 14 - D.R. HOWTON, J.F. MEAD, W.G. CLARK, J. Am. Chem. Soc. 77, 2896
(1955)
- 15 - E. MATARASSO, TCHIROUKHINE, Thèse Faculté Sciences Paris p. 9 (1957)
- 16 - V. SHRINIVASAN, F. TURBA, Biochemische Zeitschrift 327, 362-67
(1956).
- 17 - J.C. REID cité dans Isotopic Carbon p. 83, John Wiley and Sons
New-York (1949)

- 18 - GUYER, BIELER, Hardm ier, Helv. Chim. Acta 20, 1466 (1937)
- 19 - J. NOSIK, Chem. Listy 47, 1236 (1953).
- 20 - SCHUBACH-GOES, Ber. 55, 2900 (1922).
- 21 - F. CHATAGNER, B. BERGERET, C.R. Acad. Sci. 232, 448 (1951)
- 22 - E. BRICAS, F. KIEFFER, C. FROMAGEOT, Biochimica Biophys.
Acta 18, 358 (1955).
J. AWAPARA, J. Biol. Chem. 203, 183 (1955).
L. ELDJARN, J. Biol. Chem. 223, 353 (1956).
D. CAVALLINI, C. de MARCO, B. MONDOVI, Giorn. Biochim. 2,
338, (1953).
E.E. KUPSTAS, D.J. HENNESSY, J. Am. Chem. Soc. 79, 5219,
(1957)

- - - - -