

## Synthèse de l' amino-5 tétrazole $^{14}\text{C}$

NGUYEN HOANG NAM <sup>°1</sup>, NGUYEN DAT XUONG <sup>°</sup>, M. HERBERT <sup>\*</sup>,  
ET L. PICHAT <sup>\*</sup>.

<sup>°</sup> Institut de Chimie des Substances Naturelles du CNRS — Gif/Yvette (S. et O.)

<sup>\*</sup> Service des Molécules Marquées, CEN Saclay — BP. n<sup>o</sup>2 — Gif/Yvette (S. et O.) France

Manuscrit reçu le 1 décembre 1965

### SUMMARY

*5-Amino tetrazole  $^{14}\text{C}$  is prepared by action of cyanamide  $^{14}\text{C}$  on sodium azide in aqueous acid solution at 70-75°C. After purification by chromatography on an ion exchange resin column Dowex 50-W-12 the radioactive yield is 76% based on  $\text{Ba } ^{14}\text{CO}_3$ . The specific activity is 21.8 mCi/mM. Urea  $^{14}\text{C}$  recovered as a by-product accounts for 11% of the total radioactivity.*

### RESUMÉ

*L'action de la cyanamide  $^{14}\text{C}$  sur l'azohydrate de sodium, en solution aqueuse acide à 70-75°C, fournit l' amino-5 tétrazole  $^{14}\text{C}$ . Après purification sur résine échangeuse Dowex 50-W-12, le rendement radioactif est de 76% par rapport à  $\text{Ba } ^{14}\text{CO}_3$ . L'activité spécifique est de 21,8 mCi/mM. On récupère comme produit secondaire de l'urée  $^{14}\text{C}$  avec un rendement de 11% par rapport à  $\text{Ba } ^{14}\text{CO}_3$ .*

### INTRODUCTION

En vue du dosage de l'histidine dans les protéines <sup>(1)</sup> nous avons eu à préparer <sup>2</sup> de l' amino-5 tétrazole marqué au  $^{14}\text{C}$ , lequel, à notre connaissance, n'a pas encore été décrit.

L' amino-5 tétrazole a été obtenu, pour la première fois, en 1892 par Thiele <sup>(2)</sup> en faisant réagir l'acide nitreux sur l' amino-guanidine. En 1901, Hantzsch et Vagt <sup>(3)</sup> l'ont préparé par action de l'acide azothydrique sur la cyanamide. Trente ans plus tard, Stollé <sup>(4)</sup> a démontré que le même produit pouvait être préparé à partir de la dicyandiamide et de l'acide azothydrique. Enfin, Mihina et Herbst <sup>(5)</sup> ont décrit, en 1950, une méthode très simple de préparation de l' amino-5 tétrazole à partir de la dicyandiamide et de l'azohydrate de sodium en solution aqueuse acide à 65-70°C.

<sup>1</sup> Attaché de recherche à l'I. N. S. E. R. M.

<sup>2</sup> Travail entrepris à la demande de M. NGUYEN VAN THOAI (Laboratoire de Biochimie Générale et Comparée, Collège de France, Paris).



TABLEAU I. Chromatographie descendante sur papier de l' amino-5 tétrazole  $^{14}\text{C}$  et de l'urée  $^{14}\text{C}$ .

Solvants et Papiers	Rf	
	Amino-5 tétrazole Base	Urée
EtOH, $(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{O}$ , $\text{H}_2\text{O}$ , $\text{NH}_4\text{OH}$ 21% 40 : 50 : 10 : 2 — Whatman n° 4	0,39	0,62
<i>n</i> -BuOH, $\text{HCO}_2\text{H}$ , $\text{H}_2\text{O}$ 75 : 10 : 15 — Whatman n° 1	0,57	0,40
$\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$ , $\text{H}_2\text{O}$ 80 : 20 — Whatman n° 1	0,65	0,72

## PARTIE EXPÉRIMENTALE

*Cyanamide de baryum  $^{14}\text{C}$  (I)*

Préparée selon <sup>(6)</sup> en utilisant 565 mg (2,86 mM) de  $\text{Ba } ^{14}\text{CO}_3$  d'activité globale 98,77 mCi.

*Cyanamide  $^{14}\text{C}$  (II)*

La cyanamide de baryum  $^{14}\text{C}$  précédente a été diluée et ramenée à une activité spécifique d'environ 21,0 mCi/mM, 855 mg, 4,83 mM avant sa décomposition en cyanamide  $^{14}\text{C}$  par l'acide sulfurique 6 N. Après centrifugation du  $\text{Ba SO}_4$ , la solution aqueuse de (II) est transférée dans un ballon à fond rond taré de 50 ml et évaporée à sec sous vide à l'évaporateur rotatif. On obtient 211 mg de cristaux incolores (poids théorique : 203 mg).

*Amino-5 tétrazole  $^{14}\text{C}$  (III).*

Le ballon contenant la cyanamide  $^{14}\text{C}$  sert de récipient réactionnel. On y introduit 325 mg (5 mM) d'azohydrate de sodium (Prolabo) et 0,5 ml d'eau distillée. On adapte un réfrigérant et on chauffe la suspension avec un bain d'huile à 50-55°C. Sous agitation magnétique, on ajoute goutte à goutte, par l'intermédiaire d'une seringue et par le haut du réfrigérant, 0,4 ml d'acide chlorhydrique concentré ( $d = 1,19$ ). La durée d'addition est de 10 minutes environ. On rince la seringue avec 0,5 ml d'eau distillée. Après addition de l'acide chlorhydrique, on porte la température du bain d'huile à 70-75°C et le mélange réactionnel est refluxé à cette température et agité magnétiquement pendant 4 heures. La masse semi-solide est laissée à la température ambiante pendant une nuit. On rince le réfrigérant avec de l'eau distillée qui dissout les cristaux formés.

### Purification.

On utilise une colonne ( $\phi = 25$  mm,  $h = 50$  cm) de résine échangeuse d'ions Dowex 50-W-12 (200-400 mesh) forme  $H^+$  ayant préalablement subi les traitements habituels. La solution précédente est placée sur la colonne et l'on élué par percolation d'acide chlorhydrique de concentration croissante. Des fractions de 20 ml environ sont collectées automatiquement toutes les 5 minutes. La radioactivité de l'éluat est enregistrée automatiquement. On obtient la courbe de la figure 1. Les fractions correspondantes à chaque « pic radioactif »

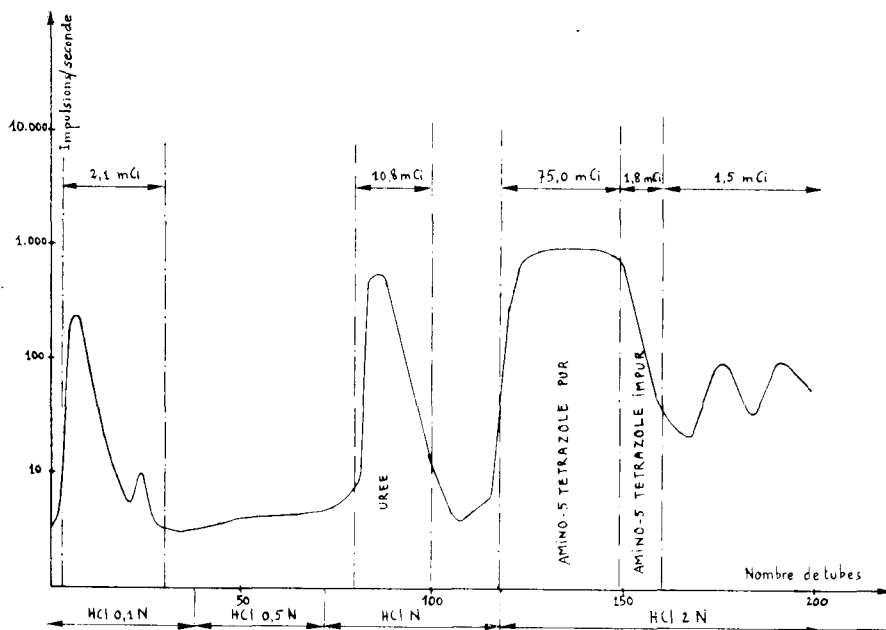


FIG. 1. — Purification de l' amino-5 tétrazole  $^{14}C$  par chromatographie sur résine échangeuse Dowex 50-W-12 forme  $H^+$ .

Enregistrement logarithmique, automatique de la radioactivité de l'éluat.

Elution par HCl de concentration croissante.

sont analysées par radiochromatographie sur papier. Les fractions 118 à 149 correspondent à HCl, amino-5 tétrazole radiochromatographiquement pur. Elles sont rassemblées, évaporées sous vide, reprises par l'eau et évaporées. Cette opération est répétée 2 fois. Le chlorhydrate est transformé en amine libre par filtration sur une colonne ( $\phi = 15$  mm,  $h = 40$  cm) de résine Dowex 50-W-12 forme  $H^+$ . Après lavage à l'eau distillée jusqu'à élimination des ions  $Cl^-$ , l' amino-5 tétrazole est élué par  $NH_4 OH$  N. Après filtration sur un filtre « Millipore Filter » et évaporation à sec sous vide, on obtient 292 mg (3,43 mM)

d'un produit incolore ayant une activité globale de 75 mCi et une activité spécifique de 21,86 mCi/mM.

La pureté a été contrôlée par radiochromatographie sur papier dans trois solvants différents (tableau I). Le rendement global radioactif en amino-5 tétrazole  $^{14}\text{C}$  pur par rapport à Ba  $^{14}\text{CO}_3$  est de 76%. Ce rendement radioactif est en accord avec le rendement chimique obtenu dans l'essai « traceur ».

D'après la figure 1, le bilan total de la radioactivité recueillie s'établit à 91,2 mCi (activité de Ba  $^{14}\text{CO}_3$  = 98,77 mCi).

#### BIBLIOGRAPHIE

1. HORINISHI, H., HACHIMORI, Y., KURIHARA, K. et SHIBATA, K. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1964, **86**, 477.
2. THIELE, J. — *Ann.*, 1892, **270**, 1.
3. HANTZSCH et VAGT, — *Ann.*, 1901, **314**, 339.
4. STOLLE, R. — *Ber.*, 1929, **62**, 1118.
5. MIHINA, J.S., et HERBST, R.M. — *J. Org. Chem.*, 1950, **15**, 1082.
6. ZBARSKY, S.H., et L. FISHER — *Canad. J. Research*, 1949, **27 B**, 81;  
HERBERT, M. et PICHAT, L. — *Bull. Soc. Chim.*, 1960, 21.