Synthèse de l'amino-5 tétrazole ¹⁴C

NGUYEN HOANG NAM °1, NGUYEN DAT XUONG °, M. HERBERT *, ET L. PICHAT *.

° Institut de Chimie des Substances Naturelles du CNRS — Gif/Yvette (S. et O.) * Service des Molécules Marquées, CEN Saclay — BP. n°2 — Gif/Yvette (S. et O.) France

Manuscrit reçu le 1 décembre 1965

SUMMARY

5-Amino tetrazole ¹⁴C is prepared by action of cyanamide ¹⁴C 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 Ba ¹⁴CO₃. The specific activity is 21.8 mCi/mM. Urea ¹⁴C recovered as a by-product accounts for 11% of the total radioactivity.

RESUMÉ

L'action de la cyanamide ¹⁴C sur l'azothydrate de sodium, en solution aqueuse acide à 70-75°C, fournit l'amino-5 tétrazole ¹⁴C. Après purification sur résine échangeuse Dowex 50-W-12, le rendement radioactif est de 76% par rapport à Ba ¹⁴CO₃. L'activité spécifique est de 21,8 mCi/mM. On récupère comme produit secondaire de l'urée ¹⁴C avec un rendement de 11% par rapport à Ba ¹⁴CO₃.

INTRODUCTION

En vue du dosage de l'histidine dans les protéines ⁽¹⁾ nous avons eu à préparer ² de l'amino-5 tétrazole marqué au ¹⁴C, lequel, à notre connaissance, n'a pas encore été décrit.

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

¹ Attaché de recherche à l'I. N. S. E. R. M.

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

Nous avons tout d'abord repris cette dernière technique et l'avons adaptée à l'échelle semimicro. Deux essais préliminaires « à blanc » nous ont fourni de l'amino-5 tétrazole anhydre avec un rendement de 78% par rapport à la dicyandiamide (Littérature ⁽⁵⁾: 73% de produit monohydrate).

Comme dans la synthèse radioactive la dicyandiamide ¹⁴C₂ est elle-même obtenue par dimérisation de la cyanamide ¹⁴C ⁽⁶⁾, nous avons essayé de modifier la précédente méthode en remplaçant la dicyandiamide par la cyanamide. Deux essais « à blanc » et un essai « traceur » nous ont permis de constater que l'amino-5 tétrazole peut être obtenu à partir de la cyanamide avec un rendement de 76% par rapport à la cyanamide de baryum alors que le rendement global de la méthode utilisant la dicyandiamide comme intermédiaire n'est que de 61% environ par rapport à la cyanamide de baryum.

Finalement, la synthèse totale de l'amino-5 tétrazole ¹⁴C au départ de Ba ¹⁴CO₃ se schématise ainsi :

$$Ba *CO_{3} \xrightarrow{NH_{3}} Ba N *CN \xrightarrow{H_{2}SO_{4}} H_{2}N - *CN \xrightarrow{Na N_{3}} HCI \xrightarrow{H_{2}N - *C} NH \xrightarrow{N_{4} \longrightarrow 3} N \xrightarrow{H_{2}N - *C} NH \xrightarrow{NH} (III)$$

La purification de l'amino-5 tétrazole ¹⁴C a été faite par chromatographie sur résine échangeuse Dowex 50-W-12. La figure 1 qui enregistre l'activité de l'éluat en fonction de la concentration de l'acide chlorhydrique d'élution met bien en évidence le grand nombre d'impuretés qui se forment. Parmi ces produits secondaires, un seul a été identifié : l'urée ¹⁴C. Dans les essais « à blanc » et « traceur », nous avons essayé de purifier l'amino-5 tétrazole par sublimation. Nous avons trouvé que la sublimation se fait difficilement et que le produit sublimé est impur chimiquement et radiochimiquement.

Le rendement global radioactif en amino-5 tétrazole ¹⁴C a été de 76%, activité spécifique : 21,8 mCi/mM, et celui en urée ¹⁴C : 11%.

La pureté radiochimique des deux produits a été contrôlée par chromatographie sur papier dans les 3 solvants du tableau I ci-dessous.

Dans les solvants indiqués, nous n'avons observé qu'un seul « pic radio-actif » sur le radiochromatogramme, de même Rf que celui d'un échantillon témoin révélé par le réactif d'Ehrlich. De plus, l'amino-5 tétrazole, chromatographié dans le solvant : n-Butanol, acide formique, eau 75 : 10 : 15, donne 2 taches, l'une correspondant à la base libre, l'autre au sel (HCl) dont le Rf varie avec la concentration du produit.

Solvants et Papiers	Rf	
	Amino-5 tétrazole Base	Urée
EtOH, (C ₂ H ₅) ₂ O, H ₂ O, NH ₄ OH 21% 40:50:10:2— Whatman nº 4	0,39	0,62
7-BuOH, HCO ₂ H, H ₂ O 7-5: 10: 15 — Whatman n ^o 1	0,57	0,40
C ₆ H ₅ OH, H ₂ O 80: 20 — Whatman n ^o 1	0,65	0,72

Tableau 1. Chromatographie descendante sur papier de l'amino-5 tétrazole ¹⁴C et de l'urée ¹⁴C.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Cyanamide de baryum ¹⁴C(I)

Préparée selon ⁽⁶⁾ en utilisant 565 mg (2,86 mM) de Ba ¹⁴CO₃ d'activité globale 98,77 mCi.

Cyanamide 14C(II)

La cyanamide de baryum ¹⁴C 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 ¹⁴C par l'acide sulfurique 6 N. Après centrifugation du Ba SO₄, 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 ¹⁴C (III).

Le ballon contenant la cyanamide 14 C sert de récipient réactionnel. On y introduit 325 mg (5 mM) d'azothydrate 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 élue 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 »

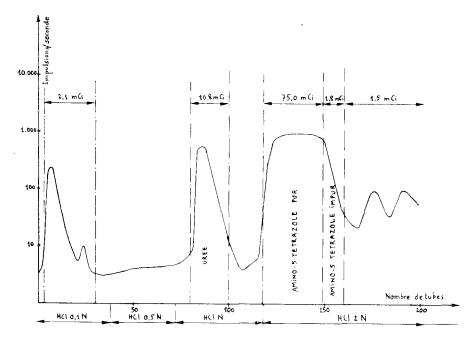


Fig. 1. — Purification de l'amino-5 tétrazole ¹⁴C par chromatographie sur résine échangeuse Dowex 50-W-12 forme H⁺.

Enregistrement logarithmique, automatique de la radioactívité 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 NH₄ 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 ¹⁴C pur par rapport à Ba ¹⁴CO₃ 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 ¹⁴CO₃ = 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.
- ZBARSKY, S. H., et L. FISHER Canad. J. Research, 1949, 27 B, 81;
 HERBERT, M. et PICHAT, L. Bull. Soc. Chim., 1960, 21.