

## Sur une amélioration de la synthèse de l'acétamino-2 fluorène $^{14}\text{C}$ -9

NGUYEN-HOANG-NAM \*<sup>1</sup>, H. HOELLINGER \*, M. HERBERT \*\*,  
NGUYEN-DAT-XUONG \* et L. PICHAT \*\*

\* Institut de Chimie des Substances Naturelles du C.N.R.S., 91 Gif-sur-Yvette;

\*\* Service des Molécules Marquées, C.E.N.-Saclay, B.P. n° 2, 91, Gif-sur-Yvette.

Reçu le 20 novembre 1969.

### SUMMARY

*An improvement of the synthesis of 2-Acetylmino fluorene 9- $^{14}\text{C}$  is related. The labelled compound, purified by silicagel-adsorption column chromatography, is obtained with a radioactive overall yield of 63 % based on  $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$ , specific activity : 27 mCi/mM.*

### RÉSUMÉ

*Une amélioration de la synthèse de l'acétamino-2 fluorène  $^{14}\text{C}$ -9 est décrite. Le produit marqué est purifié par chromatographie sur colonne d'adsorption-silicagel. Le rendement radioactif global est de 63 % par rapport à  $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$ , activité spécifique : 27 mCi/mM.*

L'acétamino-2 fluorène (AAF) est un hépato-cancérogène dont les investigations remontent à plus de deux décennies.

Récemment, A. Lacassagne <sup>(1)</sup> a observé que l'administration prolongée d'AAF entraîne une régression des formations séreuses de la glande sous-maxillaire chez le rat.

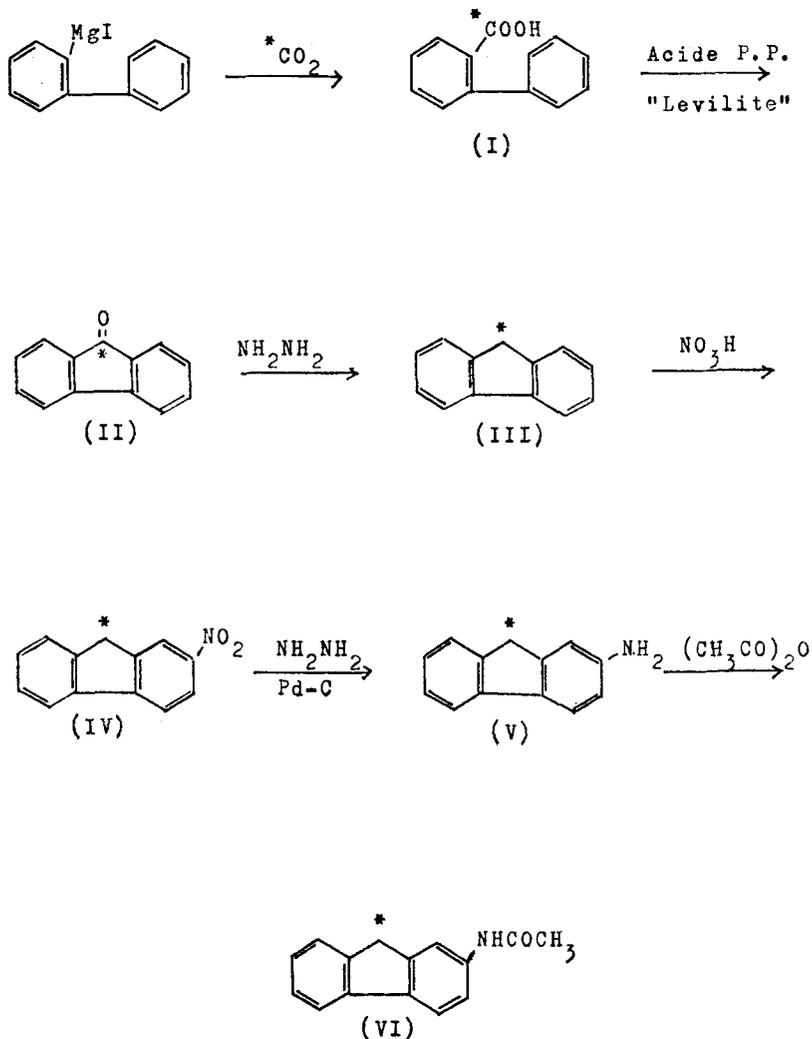
Pour confirmer le parallélisme qui semble exister entre les variations expérimentales de cette atrophie des tubes séreux et celles de la cancérisation, il est nécessaire de disposer d'AAF marqué au  $^{14}\text{C}$ .

<sup>1</sup> Chercheur à l'I.N.S.E.R.M.

La synthèse de l'AAF  $^{14}\text{C}$  à haute activité spécifique et sa purification font l'objet du présent travail\*.

L'AAF  $^{14}\text{C}$ -9 à faible activité spécifique (environ 1 mCi/mM) a déjà été obtenu <sup>(2, 3)</sup>, avec un rendement radioactif de 43 % par rapport à  $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$ . Nous avons suivi le même schéma réactionnel (voir tableau I) adopté par

TABLEAU I.



\* Synthèse entreprise en collaboration avec M. le Professeur A. Lacassagne, Institut du Radium à Paris, et effectuée au Service des Molécules Marquées, C.E.N.-Saclay.

ces auteurs <sup>(2, 3)</sup>, tout en apportant des modifications à chaque stade pour augmenter les rendements et en l'adaptant à l'obtention de l'AAF <sup>14</sup>C-9 à haute activité spécifique (27 mCi/mM). Ces améliorations nous ont permis d'atteindre un rendement radioactif global de 63 % par rapport à Ba<sup>14</sup>CO<sub>3</sub>.

L'AAF <sup>14</sup>C-9 est purifié par chromatographie sur colonne d'adsorption-silicagel.

La pureté chimique de (VI) est contrôlée par spectrophotométrie ultraviolette et sa pureté radiochimique, par chromatographie en couche mince.

#### PARTIE EXPÉRIMENTALE.

##### *Acide diphenyl-2 carboxylique (carboxyle <sup>14</sup>C) (I).*

L'ortho iododiphényle, qui constitue la matière première de départ de la synthèse, est obtenu selon <sup>(4)</sup>.

La distillation sous vide sur une colonne à bande tournante étant inefficace, l'*o*-iododiphényle est purifié par chromatographie sur colonne d'adsorption-silicagel Woelm (éluant : benzène-hexane 6 : 4). Il est analysé par chromatographie en phase vapeur à 225° C sur colonne acier inoxydable remplie de « chromosorb » imprégné à 10 % de « silicone rubber », vaporisation à 265° C, avec un détecteur d'ionisation de flamme (300° C), débit d'azote gaz vecteur : 70 ml/mn.

Le réactif de Grignard est préparé dans l'éther anhydre à une concentration d'environ 0,23 M/litre à partir du magnésium pur en tournures et d'*o*-iododiphényle.

La carbonatation de l'*o*-iododiphénylmagnésium a nécessité une mise au point. Dans les essais préliminaires « à blanc » nous n'avons pas pu reproduire les résultats obtenus par <sup>(5, 6, 3)</sup>, qui ont carbonaté le réactif de Grignard à des températures respectives de -60° C, -10° C et 0° C.

La carbonatation à la température ambiante nous a donné des résultats satisfaisants et reproductibles en acide (I).

30 ml (7 mmole) de la solution magnésienne sont carbonatés sur la rampe à vide, selon la technique habituelle <sup>(7)</sup>, par le gaz carbonique dégagé à partir de 826 mg (4,18 mmole) de Ba<sup>14</sup>CO<sub>3</sub> d'activité totale : 200 mCi (activité spécifique : 47,8 mCi/mM), à environ 23° C pendant 3 h. Après décomposition et purification par extraction à l'éther de la solution alcaline on obtient 690 mg (3,50 mmole) d'acide (I) incolore, d'activité 178 mCi (rendement radioactif : 89 %). Par C.C.M. (voir tableau II) on ne détecte qu'une seule tache radioactive.

##### *Fluorenone <sup>14</sup>C-9 (II).*

La cyclisation de l'acide (I) par l'anhydride phosphorique en milieu benzénique et en présence de « lévillite » selon <sup>(8)</sup> fournit aisément la fluorénone <sup>14</sup>C-9 avec un rendement presque théorique.

TABLEAU II. Chromatographie en couche mince des divers produits de la synthèse de (VI). Révélateur : U.V.

Produit	Absorbant de chromatographie	Solvant de développement	R <sub>f</sub> approximatif
(I)	Plaque silicagel F254 Merck	EtOH : NH <sub>4</sub> OH (90 : 10)	0,60
(II)	Idem	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>	0,65
		EtOH : NH <sub>4</sub> OH (90 : 10)	0,95
(III)	Plaque silicagel F254 Merck	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>	0,95
	Plaque alumine F254 Merck	Heptane	0,70
(IV)	Plaque silicagel F254 Merck	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>	0,50
		C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> : AcEt (50 : 50)	0,92
	Plaque alumine F254 Merck	Heptane	0,24
Dinitro-2,5-fluorène	Plaque silicagel F254 Merck activée à 120° C-24 h.	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>	0,42
Dinitro-2,7-fluorène	Idem	Idem	0,35
(V)	Plaque silicagel F254 Merck	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>	0,20
		C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> : AcEt (50 : 50)	0,76
(VI)	Idem	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> : AcEt (50 : 50)	0,24
		EtOH : NH <sub>4</sub> OH (90 : 10)	0,46
		C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> : AcEt : CH <sub>3</sub> COOH (50 : 50 : 0,5)	0,44

A une solution de 690 mg (3,50 mmole) d'acide (I) dans 20 ml de benzène anhydre on ajoute 2 g d'anhydride phosphorique et 1,5 g de « léviline » (gel de silice en poudre impalpable Prolabo). Le mélange réactionnel est soumis au reflux, avec agitation magnétique, pendant 3 h. Après refroidissement, on décompose le mélange par de l'eau glacée et l'on extrait en continu à l'éther.

L'extrait étheré obtenu au bout d'une nuit d'extraction est concentré à environ 10 ml. On ajoute 20 ml de solution aqueuse de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10 % et l'on agite magnétiquement pendant 15 mn pour neutraliser l'acide (I) n'ayant pas réagi.

Une deuxième extraction à l'éther fournit 595 mg (3,3 mmole) de fluorénone <sup>14</sup>C-9 (II) d'activité 175 mCi (rendement radioactif : 98,7 %). Le produit (II) est mis en évidence et sa pureté contrôlée par C.C.M. (voir tableau II).

#### *Fluorène <sup>14</sup>C-9 (III).*

La cétone (II) est réduite en fluorène <sup>14</sup>C-9 (III) par la méthode de Wolf-Kishner modifiée par Huang-Minlon, sans potasse selon <sup>(5)</sup> car dans les essais préliminaires l'addition de la base n'améliore pas le rendement.

Dans un ballon forme poire de 25 ml contenant 595 mg (3,3 mmole) de (II), on ajoute successivement 7 ml de diéthylène glycol et 1 ml d'hydrate d'hydrazine à 90 %. Le mélange est chauffé au reflux à 280 °C, à l'aide d'un bain métallique, pendant 5 h. On observe, après 30 mn de chauffage, une importante sublimation du carbure (III) qui se condense sur les parois du réfrigérant. Après refroidissement, on ajoute de l'eau et l'on extrait en continu à l'éther. On évapore l'éther et le produit (III) est extrait à nouveau en continu par le benzène pendant 24 h pour éliminer les traces de diéthylène glycol. Après évaporation du solvant on recueille 531 mg (3,2 mmole) de fluorène <sup>14</sup>C-9 (III), 172 mCi (rendement radioactif : 98 %). Il est contrôlé par C.C.M. (voir tableau II).

#### *Nitro-2 fluorène <sup>14</sup>C-9 (IV).*

La nitration de (III) par la méthode de Kuhn <sup>(9)</sup>, à la température de 50° C portée ensuite à 80° C pendant 5 mn, fournit le nitro-2 fluorène <sup>14</sup>C-9 (IV) contenant environ 20 % d'impuretés radioactives. Ce qui nous a amenés à étudier la nitration de (III) en faisant varier la température et le temps de réaction. Il s'est révélé qu'en nitrant (III) à 60° C pendant 1 h on obtient (IV) avec seulement 5 % d'impuretés radiochimiques.

531 mg (3,2 mmole) de (III) sont mis en solution dans 10 ml d'acide acétique cristallisable dans un ballon à fond rond de 25 ml qui est équipé d'une ampoule à brome et d'un agitateur mécanique. On purge l'appareil avec un courant d'azote et porte la solution à 60° C avec un bain d'huile tout en agitant mécaniquement. On ajoute, en une seule fois, 1,1 ml d'acide nitrique ( $d = 1,49$ ) et l'on maintient le mélange réactionnel à 60° C pendant 1 h sous agitation et sous courant d'azote. On laisse refroidir, ajoute de l'eau glacée, extrait en continu avec du benzène et obtient 163,3 mCi.

Une radiochromatographie en couche mince (voir tableau II) enregistre un pic principal de  $R_f = 0,50$  correspondant à celui du nitro-2 fluorène témoin

et 4 autres pics (5 % de la radioactivité du produit brut) parmi lesquels 2 produits sont caractérisés : dinitro-2,5 fluorène ( $R_f = 0,42$ ) et dinitro-2,7 fluorène ( $R_f = 0,35$ ).

#### *Purification de (IV).*

On place le produit brut en solution dans du benzène sur une colonne ( $\varnothing$  ext. = 20 mm, h = 100 cm) contenant environ 150 g de gel de silice d'adsorption Woelm et l'on élue par le benzène. Avec un collecteur automatique, on collecte des fractions de 15 ml environ toutes les 30 mn. On mesure en continu simultanément les variations de la radioactivité et de l'absorption U.V. à 254  $\mu$  de l'éluat. Les fractions correspondantes à chaque pic radioactif sont analysées par C.C.M. (voir tableau II) : la fraction 24-26 correspond à (IV) radiochimiquement pur (137,2 mCi, rendement radioactif : 80 %), la fraction 54-62 correspond au dinitro-2,5 fluorène (0,035 mCi), la fraction 73-114 correspond au dinitro-2,7 fluorène (0,034 mCi) et la fraction 63-72 contient un mélange des 2 dérivés dinitrés (0,155 mCi).

#### *Amino-2 fluorène $^{14}\text{C}$ -9 (V).*

Le dérivé nitré (IV) est réduit aisément en amino-2 fluorène  $^{14}\text{C}$ -9 (V) suivant la technique de Bavin <sup>(10)</sup>.

A une solution de 560 mg (137,2 mCi) de (IV) purifié dans 20 ml d'éthanol, on ajoute 10 mg de palladium sur charbon actif à 10 % de Pd. On porte la température à 60° C et, sous agitation magnétique, on ajoute goutte à goutte 1,5 ml d'hydrate d'hydrazine à 90 %. Cette addition terminée, on ajoute à nouveau 10 mg de charbon palladié. Le mélange réactionnel est chauffé à reflux pendant 5 h. On laisse refroidir, élimine le catalyseur en le filtrant sur du « clarcel », évapore le solvant. On obtient 485 mg (2,67 mmole) d'amine (V), 134,5 mCi (rendement radioactif : 98,2 %). Sa pureté est contrôlée par C.C.M. (voir tableau II).

#### *Acétamino-2 fluorène $^{14}\text{C}$ -9 (VI).*

485 mg (2,67 mmole) de (V) sont mis en suspension dans 10 ml de benzène dans un ballon de 25 ml surmonté d'un réfrigérant et d'une ampoule à brome. Le mélange est porté à ébullition et l'on ajoute, sous agitation magnétique, 0,27 ml d'anhydride acétique. Puis on maintient l'ébullition pendant 5 mn en agitant, laisse le mélange revenir à la température ambiante, ajoute de l'eau glacée et extrait en continu à l'éther. Après évaporation du solvant, on recueille 590 mg (2,65 mmole) d'acétamino-2 fluorène  $^{14}\text{C}$ -9 (VI), 133,3 mCi (rendement radioactif : 99 % en produit brut).

*Purification de (VI).*

Le produit (VI) est purifié par chromatographie sur colonne d'adsorption-silicagel Woelm, dans les mêmes conditions que celles utilisées pour purifier (IV). L'élution se fait, dans l'ordre, avec :

- 400 ml benzène
- 300 ml benzène-Acétate d'éthyle 7 : 3
- 800 ml benzène-Acétate d'éthyle 5 : 5

La fraction 62-111 correspond à (VI) radiochimiquement pur : 125 mCi, rendement radioactif : 93 %.

Le rendement radioactif global en acétamino-2 fluorène <sup>14</sup>C-9 (VI) est de 63 % par rapport à Ba<sup>14</sup>CO<sub>3</sub>, activité spécifique : 27 mCi/mM, après dilution avec (VI) non radioactif.

*Contrôle de la pureté chimique et radiochimique de (VI).*

La pureté chimique, contrôlée \* par spectrophotométrie U.V. dans le méthanol à 285 mμ, est supérieure à 99 %.

La pureté radiochimique est contrôlée par chromatographie en couche mince dans 3 systèmes de solvants (voir tableau II). On ne détecte aucune impureté radiochimique.

## REMERCIEMENTS.

Un certain nombre d'« essais traceurs » de cette synthèse ont été entrepris par l'un d'entre nous (N. H. N.) lors de son stage en 1960-63 au Radiocarbon Laboratory, University of Illinois, Urbana, Illinois (U. S. A.).

Nous remercions vivement M. le Professeur R. F. Nystrom, Directeur de ce Laboratoire, pour sa bienveillance et ses précieux conseils durant ce stage.

## REFERENCES

1. LACASSAGNE, A. et HURST, L. — *C. R. Acad. Sc.*, **263** : 2059 (1966).
2. RAY, F. E. et GEISER, R. C. — *Cancer Research*, **10** : 616 (1950).
3. HEIDELBERGER, C. et RIEKE, H. S. — *Cancer Research*, **11** : 640 (1951).
4. SHIRLEY, D. A. — *Preparation of Organic Intermediates*, John Willey and Sons, 182 (1951).
5. HARRIS, A. S., WHITE, E. N. et MC NEIL, D. — *J. Chem. Soc.*, 4216 (1955).
6. GUTMANN, H. R. et PETERS, J. H. — *Cancer Research*, **13** : 415 (1953).
7. BARET, C. et PICHAT, L. — *Bull. Soc. Chim.*, 580 (1951).
8. NGUYEN-HOANG-NAM, NGUYEN-DAT-XUONG, HERBERT, M. et PICHAT, L. — *Bull. Soc. Chim.*, 4632 (1967).
9. KUHN, W. E. — *Organic Syntheses*, coll. Vol. 2, John Willey and Sons, 447 (1943).
10. BAVIN, P. M. G. — *Organic Syntheses*, John Willey and Sons, **40**, 5 (1960).

\* Dosage effectué par M<sup>me</sup> Y. Olombel.