

Synthèse du citrate de (diéthyl-amino-éthoxy-carbonyl) 3 pyridine * (Nicametate) marqué par le ^{14}C

J. LINTERMANS, A. BENAKIS ET J. WILLIAMS

Service des Molécules Marquées (Chef de Service, Dr. L. Pichat)
du CEN-Saclay, B. P. No. 2, Gif/Yvette (91), France

Laboratoire du Métabolisme des Médicaments (Dir. Prof. B. Glasson),
Ecole de Médecine, Genève, Suisse

Reçu le 14 mai 1971

SUMMARY

Starting from sodium acetate ^{14}C -1, the citrate of diethylamino-ethanol nicotinic acid ester was labelled with ^{14}C on the esterified ethanol. The chemical and radiochemical purity of the products obtained at the intermediary steps was checked by GLC. The end product was purified on thin-layer chromatography after identification by autoradiography. The purity of the end product is of 99,8% and its specific activity of 20 mCi/mM.

RÉSUMÉ

Nous décrivons la synthèse marquée au ^{14}C du citrate de (diéthyl-amino-éthoxy-carbonyl) 3 pyridine (Nicametate). Cette synthèse part d'acétate de sodium ^{14}C -1. Elle comporte 6 étapes. Le rendement global en radioactivité est de 8,2%. Le produit ainsi obtenu contient environ 4,5% d'impuretés radioactives. Après purification par chromatographie sur plaque, on obtient un produit d'une pureté de 99,8% et d'une activité spécifique de 20 mCi/mM.

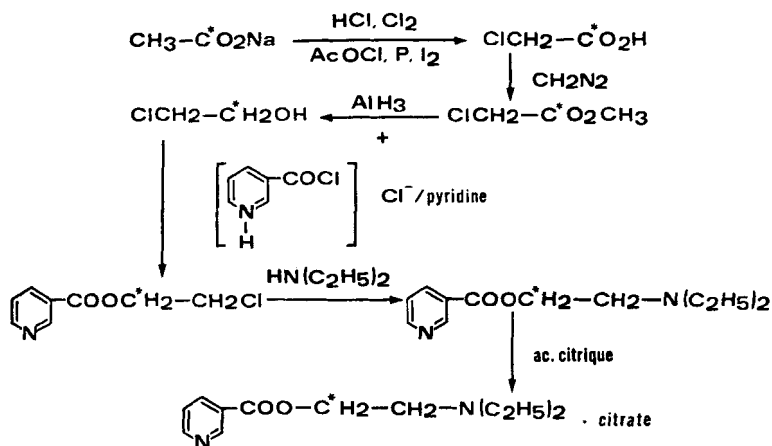
Le citrate de l'ester nicotinique du diéthylaminoéthanol ou Nicametate est un agent thérapeutique de synthèse à action vasodilatatrice, utilisé en médecine générale, ophtalmologie, O. R. L., diabétologie et gériatrie.

* Nicametate (DCI), commercialisé en France sous le nom d'EUCLIDAN, Laboratoires SOLAC, Toulouse, France.

Les principales propriétés de ce produit ont été étudiées et les résultats compilés sous forme de thèse ⁽¹⁾. Les effets pharmacologiques ont été étudiés chez le rat, le cobaye, le lapin et le chien par G. Roux et M. Podesta ⁽²⁾.

En vue de son étude métabolique, ce produit a été marqué par le ¹⁴C sur le groupe éthylique.

Nous avons effectué cette synthèse marquée à partir d'acétate de sodium-carboxyle ¹⁴C en six étapes qu'on peut résumer dans le schéma suivant :



Nous avons synthétisé l'acide chloroacétique-carboxyle ¹⁴C (I) par action de chlore sur l'acétate de sodium ¹⁴C-1 en présence d'acide chlorhydrique, de chlorure d'acétyle, de phosphore rouge et d'iode ^(3, 4).

Le chloroacétate de méthyle-carboxyle ¹⁴C (II) a été obtenu par action de diazométhane sur le produit (I).

Par réduction de l'ester (II) dans l'éther anhydre au moyen d'hydrure d'aluminium formé par action d'aluminohydrure de lithium sur du chlorure d'aluminium ⁽⁵⁾ nous avons obtenu du chloro-2-éthanol ¹⁴C-1 avec un rendement de 70%. Toutefois en opérant la réduction du chloroacétate d'éthyle dans le THF anhydre au moyen d'hydrure d'aluminium formé par action de l'acide sulfurique pur sur l'aluminohydrure de lithium, N.M.Yoon et H.C.Brown ⁽⁶⁾ obtiennent du chloro-2-éthanol avec un rendement de 83%. Bien que le rendement de cette réaction soit meilleur dans le THF, nous n'avons pas utilisé ce solvant pour éviter la difficulté de le sécher après l'hydrolyse aqueuse du milieu réactionnel et en vue de la réaction suivante qui doit être menée en milieu anhydre.

En faisant agir ⁽⁷⁾ le chlorhydrate du chlorure de nicotyle sur le produit (III) en présence de pyridine, nous avons obtenu l'ester nicotinique du chloro-2-éthanol ¹⁴C-1 (IV) qui, condensé avec la diéthylamine ⁽⁸⁾, a donné l'ester nicotinique de diéthylamino-2-éthanol ¹⁴C-1 (V). Le citrate de (diéthyl-

ammonio-éthoxy-carbonyl) 3 pyridine- ^{14}C a ensuite été obtenu par salification du produit (V) au moyen d'acide citrique ⁽⁸⁾.

Après chaque étape, la pureté chimique et radiochimique du produit obtenu a été déterminée par chromatographie en phase gazeuse couplée à un système de comptage proportionnel de la radioactivité. Nous en avons déduit le rendement du produit pur sans l'isoler.

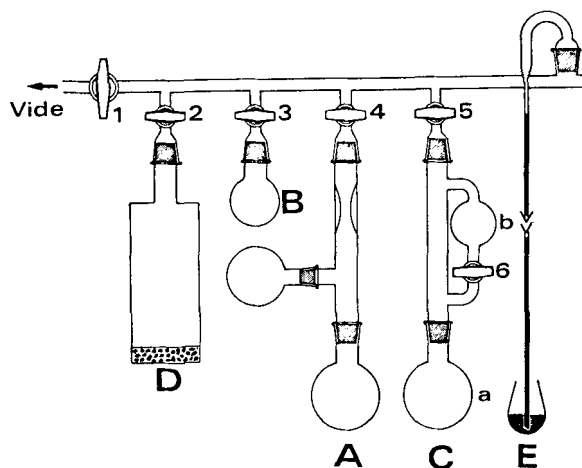
Après de nombreux essais, nous avons mis au point une procédure de purification du citrate de (diéthyl-ammonio-éthoxy-carbonyl) 3 pyridine- ^{14}C par chromatographie préparative sur couche de cellulose.

Après purification, la pureté radiochimique du produit final était de l'ordre de 99,8 % et son activité spécifique de 20 mCi/mM.

PARTIE EXPÉRIMENTALE.

Acide chloroacétique-carboxyle ^{14}C (I).

Une rampe à vide est équipée selon le schéma suivant :



A : ballons de transfert contenant l'acétate de Na (^{14}C -1), 10 mg de P rouge et 6 mg d'iode.

B : ballon contenant du chlorure d'acétyle.

C : générateur d'acide chlorhydrique avec NaCl dans (a) et H_2SO_4 conc. dans (b).

D : cylindre de stockage du chlore sur P_2O_5 .

E : manomètre.

Le ballon A contient 0,246 g (3 mM) d'acétate de sodium ^{14}C -1, parfaitement anhydre, d'une activité totale de 100 mCi, ainsi que 10 mg de phosphore rouge et environ 6 mg d'iode.

Le ballon B contient 0,09 g (0,8 mM) de chlorure d'acétyle fraîchement distillé.

Dans le système C, le ballon *a* est muni d'un système d'agitation magnétique et contient 0,146 g (2,5 mM) de NaCl, le ballon *b* contenant de l'acide sulfurique concentré.

Les produits volatils contenus dans les ballons B et D sont refroidis à $-195\text{ }^{\circ}\text{C}$ puis tous les robinets sont ouverts, sauf 6, et le système entier est mis sous vide (pompe à diffusion de mercure). On note le niveau du manomètre. On ferme les robinets 1, 3, 5 et l'on réchauffe lentement D jusqu'à ce que le manomètre indique une pression de 480 mm, ce qui, à température d'expérience de $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ correspond, dans le volume du système A (200 ml), à une quantité de chlore égale à 5,3 mM. On ferme 4 et on refroidit A et B à $-195\text{ }^{\circ}\text{C}$, puis on ferme 2 et ouvre 1 pour dégazer la rampe, ensuite on referme 1. A étant toujours refroidi à $-195\text{ }^{\circ}\text{C}$, on ouvre 4 et 5 et on laisse couler lentement l'acide sulfurique du ballon *b* dans le ballon *a* en ouvrant le robinet 6.

Après 1/4 d'heure environ, tout l'acide chlorhydrique s'est dégagé et se trouve piégé en A. On ferme 5 et on ouvre 3 en maintenant toujours à $-195\text{ }^{\circ}\text{C}$ la température de A. Lorsque tout le contenu de B a distillé, on ferme 4 et le système A est scellé à la flamme. On chauffe le mélange réactionnel à $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ durant 16 heures, puis on effectue une distillation en statique en chauffant progressivement jusqu'à $180\text{ }^{\circ}\text{C}$ le ballon où l'acide chloroacétique ^{14}C -1 (I) s'est formé et refroidissant à $-195\text{ }^{\circ}\text{C}$ le ballon collecteur. Le ballon collecteur contenant (I) est réchauffé à $0\text{ }^{\circ}\text{C}$, ouvert et rapidement adapté à un piège refroidi à température de l'azote liquide. Ce système est ensuite mis sous le vide de la pompe à palette, en opérant progressivement. Après 10 minutes, le vide est coupé, le piège enlevé et l'acide chloroacétique ^{14}C -1 est dissous dans 5 ml d'éther sec. Le piège, séparé, est réchauffé à $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ et mis sous le vide de la pompe à palette pendant 1/2 heure. Ensuite, le résidu contenu dans le piège est repris par 5 ml d'éther sec. et cette solution est réunie à la solution étherée précédente de produit (I).

Chloroacétate- ^{14}C -1 de méthyle (II).

Le ballon contenant le produit (I) en solution dans l'éther est muni d'un tube d'addition à deux voies sur lequel on adapte respectivement une ampoule à robinet et un réfrigérant à eau. Par l'intermédiaire de l'ampoule à robinet on ajoute rapidement 15 ml d'une solution étherée de diazométhane titrant 0,18 mM/ml. Après 2 h l'excès de diazométhane est chassé et la solution étherée du produit (II) est concentrée jusqu'à un volume d'environ 5 ml par distillation à travers une colonne de Vigreux de 10 cm. La pureté radiochimique du chloroacétate de méthyle ^{14}C -1 obtenu est déterminée par chromatographie

en phase gazeuse (voir tableau). Le rendement en activité du produit pur est de 56 %, soit 56 mCi par rapport à l'acétate de sodium ^{14}C -1.

Chloro-2 éthanol ^{14}C -1 (III).

Dans un ballon de 100 ml à 3 cols munis d'un thermomètre, d'un réfrigérant à eau, d'une ampoule à robinet et d'un système d'agitation magnétique on introduit 10 ml d'une solution étherée de LiAlH_4 titrant 0,3 mM/ml puis, goutte à goutte, en agitant, 0,4 g d' AlCl_3 en solution dans 5 ml d'éther sec. Après quelques minutes la précipitation est complète. Au mélange inhomogène obtenu on ajoute lentement l'ester (II) en solution dans 5 ml d'éther sec, en maintenant la température à 0 °C, sous une agitation modérée. Après 15 minutes on opère l'hydrolyse au moyen de 1,5 ml d'eau, en maintenant constamment la température aux alentours de 0 °C. On ajoute ensuite du sulfate de sodium anhydre et, après quelque temps, on filtre la couche étherée en lavant le précipité plusieurs fois avec de l'éther sec. Le filtrat est dilué par 5 ml de benzène sec, puis l'éther est entièrement distillé à travers une colonne de Vigreux de 10 cm. On obtient ainsi une solution benzénique de chloro-2-éthanol ^{14}C -1(III) dont la pureté est déterminée par chromatographie en phase gazeuse.

Le rendement en activité du produit pur est de 70 %, soit 39 mCi par rapport à l'ester (II).

Nicotinate de chloro-2-éthanol ^{14}C -1 (IV).

Dans un ballon de 25 ml muni d'un réfrigérant équipé d'une garde à chlorure de calcium on introduit 0,356 g (2 mM) de chlorhydrate du chlorure de nicotinyne, avec le produit (III) en solution dans 5 ml de benzène sec et 0,25 ml de pyridine. On chauffe à reflux pendant 4 h. On ajoute 5 ml d'eau pour dissoudre le chlorhydrate de pyridine et on met l'ensemble des phases liquides dans un extracteur liquide-liquide en continu où la phase aqueuse est extraite au benzène jusqu'à épuisement de l'activité qu'elle contient. L'extrait benzénique est agité avec une solution aqueuse de carbonate de potassium (5 %). Les deux phases liquides sont mises dans un extracteur liquide-liquide en continu où la phase aqueuse est extraite au benzène jusqu'à disparition de l'activité qu'elle contient. L'extrait benzénique est séché sur du sulfate de sodium anhydre puis le solvant est évaporé sous un vide de 16 mm de Hg. La pureté du produit obtenu est déterminée par chromatographie en phase gazeuse. Le rendement en activité du produit pur est de 69 %, soit 27 mCi par rapport au chloro-2-éthanol ^{14}C -1.

Nicotinate de diéthylamino-2-éthanol ^{14}C -1 (V).

Le produit (IV) en solution dans 5 ml de diéthylamine est chauffé 24 h à 90 °C dans un ballon de 50 ml scellé sous vide. Après refroidissement le

surnageant est pipeté et le précipité de chlorhydrate de diéthylamine est lavé à l'éther sec. Les phases liquides sont réunies et évaporées sous un vide partiel de 50 mm de Hg. On obtient le produit (V) sous forme d'huile jaune qui est utilisée immédiatement pour l'étape suivante.

Citrate de (diéthyl-amino-éthoxy-carbonyl)3 pyridine ¹⁴C (VI).

Au produit (V) dissous dans 0,1 ml de méthanol, on ajoute 0,2 g d'acide citrique dissous dans 0,3 ml de méthanol. On tiédit et agite le mélange pendant 5 min. Le citrate du (V) est précipité par addition de 5 ml d'acétate d'éthyle. On abandonne la suspension pendant 12 h à -25 °C. On décante le surnageant et lave le précipité plusieurs fois à l'acétate d'éthyle. Le citrate est séché sous vide. On obtient 8,2 mCi de citrate de (diéthyl-ammonio-éthoxy-carbonyl) 3 pyridine-¹⁴C, ce qui représente un rendement de 30% par rapport à l'ester nicotinique du chloro-2-éthanol ¹⁴C-1 (IV).

DONNÉES ANALYTIQUES.

Chromatographie en phase gazeuse :

Sur colonne de 2 m, 3% de silicone OV-1 sur chromosorb G. Détection par ionisation de flamme. Détection de la radioactivité après combustion et mesure par scintillation (Tri-Carb, modèle 3022). Température d'injection : 275 °C.

<i>Produits</i>	<i>t° de la colonne</i>	<i>Temps de rétention (min)</i>
II	90 °C	7.0
III	90 °C	5.0
IV	140 °C	14.2

Chromatographie sur couche	Système	Rf
Support de cellulose	méthanol-éthanol 9/1	0,7

Chromatographie sur papier

Whatman No. 1	isopropanol/HCl (1 N) 6,5/3,5	0,75
Whatman No. 1	KCl (sol. aqueuse 1 N)	0,90

Purification.

La chromatographie sur couche mince du Nicametate ^{14}C selon le système méthanol/éthanol montre 5 impuretés radioactives, comme il est indiqué dans l'autoradiogramme de la figure 1.



FIG. 1.

Le secteur radioactif correspondant au Rf du produit, comparé à la radioactivité des impuretés, indique que ces impuretés représentent 4,7% en radioactivité par rapport au produit. Ces mesures ont été effectuées par scintillation liquide en mettant en suspension le support de chromatoplaques.

Le Nicametate ^{14}C a été purifié par chromatographie sur couche dans les mêmes conditions que celles indiquées précédemment. Le produit a été obtenu après élution des secteurs radioactifs par du méthanol. Le méthanol a été évaporé à sec et une nouvelle chromatographie dans les mêmes conditions montre un seul secteur actif. La comparaison de la radioactivité du secteur actif avec celle du restant de la plaque indique une pureté du produit de l'ordre de 99,8%.



FIG. 2.

L'identité du produit de la figure 2 a été contrôlée par dilution isotopique, après passage par la base et nouvelle cristallisation sous forme de citrate. L'activité spécifique reste constante après deux cristallisations identiques, ce qui confirme le secteur actif de la figure 2 comme étant le Nicametate.

L'activité spécifique du Nicametate après purification est de 20 mCi/mM.

REMERCIEMENTS.

Le travail de synthèse a été réalisé au Service des Molécules Marquées, CEN-Saclay, dirigé par le Dr. L. Pichat. Les auteurs lui expriment ici leurs plus vifs remerciements pour ses judicieux conseils.

BIBLIOGRAPHIE

1. PODESTA, M. — Contribution à l'étude du (diéthyl-ammonio-éthoxy-carbonyl) 3 pyridine, Toulouse, 1960.
2. ROUX, G. et PODESTA, M. — Recherches pharmacologiques sur le citrate de l'ester nicotinique du diéthylaminoéthanol, *Thérapie*, XVI, 265 (1961).
3. CHIN, D. et ADAMS, P. — *Nucl. Sc. Abst.*, **8** : 1057 (1954).
4. LOHEAC, J. — Thèse docteur-ingénieur, Lyon, Juin 1966.
5. NYSTROM, R. — *J. Am. Chem. Soc.*, **81** : 610 (1959).
6. YOON, N. M. et BROWN, H. C. — *J. Am. Chem. Soc.*, **90** : 2915 (1968).
7. CHARONNAT, R. *et al.* — *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 1014 (1948).
8. BSM No. 654 M (1960).