

## SYNTHESE ET PURIFICATION DE LA 6-FURFURYLAMINOPURINE-11-H<sup>3</sup> (KINETINE) A HAUTE ACTIVITE SPECIFIQUE.

O. Buchman, D. Milstein et M. Shimoni

Atomic Energy Commission  
Nuclear Research Centre-Negev,  
P.O.B. 9001, Beer-Sheva  
ISRAEL

Received on Augustus 1, 1972.

### SUMMARY

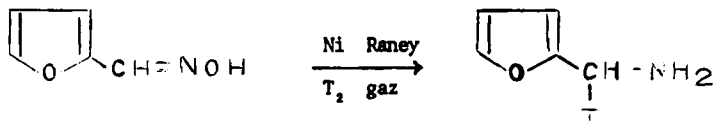
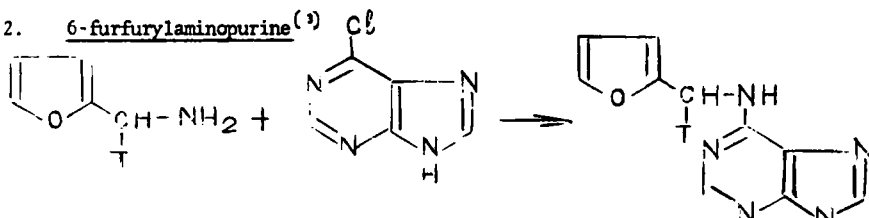
*The microsynthesis and purification of kinetin, labelled with tritium in the methylene group, are described. The specific activity obtained is 2.4 Ci/mmole.*

### RESUME

*La microsynthèse et la purification de la kinétine, marquée au tritium dans le groupe méthylène, sont décrites. L'activité spécifique obtenue est de 2.4 Ci/mmole.*

La kinétine a été isolée de préparations d'acide désoxyribonucléique et identifiée à la 6-furfurylaminopurine<sup>(1)</sup>. Ses propriétés particulières comme facteur de division cellulaire dans diverses parties de plantes, même à des concentrations extrêmement faibles, expliquent l'intérêt porté par les chercheurs à l'étude de l'effet physiologique de ce composé.

Il nous a été demandé de synthétiser la kinétine spécifiquement marquée au tritium sur le méthylène. Nous nous sommes basés sur un schéma de synthèse, à priori, relativement simple et comprenant essentiellement deux étapes:

1. 2-furfurylamine<sup>(2)</sup>2. 6-furfurylaminopurine<sup>(3)</sup>

L'adaptation de chaque étape aux conditions de synthèse spécifiques H aux molécules organiques tritiées nous a amené à mettre en oeuvre une série d'essais inactifs. Ces essais préliminaires ont dû prendre en considération deux faits, de prime abord, contradictoires. D'une part, la synthèse doit être envisagée sur de petites quantités de dérivé tritié, ce qui implique des pertes relativement importantes lorsqu'on purifie la furfurylamine par distillation ou la kinétine par cristallisation. D'autre part, pour obtenir de bons rendements en kinétine<sup>(3)</sup>, il est nécessaire d'observer des conditions expérimentales telles que le rapport des concentrations amine: purine dans la deuxième étape soit de l'ordre de 3:1.

Une telle limitation empêche de réaliser la microsynthèse de la 6-furfurylaminopurine-11-T uniquement avec la 2-furfurylamine radioactive ou, alors, cette synthèse exige d'énormes quantités de tritium.

Un compromis a dû être trouvé de façon que la 2-furfurylamine tritiée, à haute activité spécifique, puisse être diluée par l'amine non marquée dans les proportions voulues telles que la kinétine soit obtenue avec une activité spécifique suffisamment élevée.

Dans un travail précédent<sup>(4)</sup>, il a été montré que la 2-furfurylamine

peut être produite par réduction catalytique des isomères syn ou anti de la 2-furfuraldoxime dans le méthanol, par catalyse du nickel de Raney. Cette réaction donne un rendement de 65% pour une pression en hydrogène inférieure à une atmosphère.

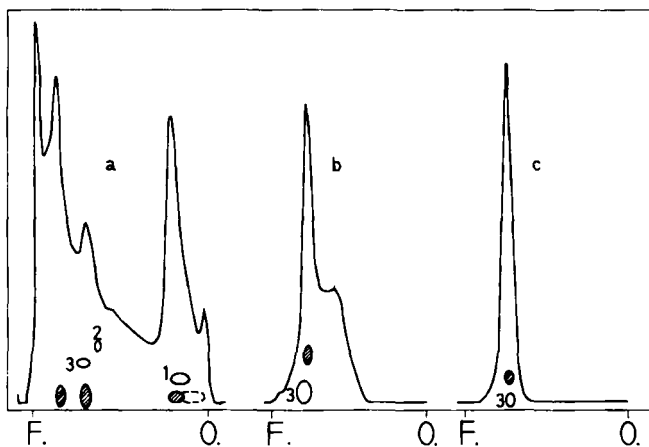
L'obtention de 2-furfurylamine-6-T est accompagnée d'impuretés chimiques et radiochimiques. Il s'avère que la purification de ce stade intermédiaire est liée à de grosses pertes de produit, étant donné les microquantités à distiller. Une tentative de séparation par chromatographie sur couche mince (CCM) préparative n'a pas donné les résultats escomptés d'après la CCM analytique. La purification sur résine cationique a également déçu. La séparation n'est pratiquement réalisable que par chromatographie gazeuse (GLC). Toutefois, un essai préliminaire inactif a mis en évidence que les impuretés présentes ne nuisent pas à la synthèse de la kinétine.

La 2-furfurylamine-6-T a été obtenue avec une activité spécifique de 16 Ci/mmole et la 6-furfurylaminopurine-11-T (kinétine) avec une activité spécifique de 2.4 Ci/mmole. Il y a lieu de noter que la tritiation de la kinétine par marquage général, selon une méthode<sup>(\*)</sup> qui permet d'atteindre des activités spécifiques de 100-500 mCi/mmole, n'a donné, dans ce cas, que 15 mCi/mmole<sup>(\*)</sup>.

Le produit brut de synthèse de la 6-furfurylaminopurine-11-T contient plusieurs impuretés fortement radioactives (Fig. 1a) et leur séparation par CCM préparative semble peu intéressante. Une première purification de la kinétine tritiée, par cristallisation, écarte la plupart des impuretés radioactives et chimiques (Fig. 1b). La purification finale par CCM préparative sur silica gel donne d'excellents résultats (Fig. 1c).

### Partie expérimentale

La pureté chimique a été déterminée par GLC (F & M, Model 810),



**Fig. 1:** Radiogrammes de la kinétine (CCM analytique)

○ : 1) furfurylamine; 2) chloropurine; 3) kinétine

⊙ : produits de synthèse.

a) produit brut de synthèse; b) après cristallisation; c) après purification par CCM préparative.

par UV (Perkin-Elmer 402 Ultra-Violet and Visible Spectrophotometer),  
par IR (Perkin-Elmer 257 Grating Infrared Spectrophotometer) et  
par CCM (Merck) sur plaques de silica gel  $F_{254}$  analytique (0.25 mm) et  
préparative (2 mm).

Le rendement chimique a été contrôlé par pesée, par GLC et par UV.  
La pureté radiochimique a été déterminée par GLC et par CCM (Berthold  
Mümschicht Scanner II).

L'activité spécifique a été déterminée par scintillation liquide  
(Packard Liquid Scintillator Spectrometer).

#### Synthèse de la 2-furfurylamine

Les synthèses de la 2-furfurylamine ont été réalisées sur une rampe à  
vide capillaire classique<sup>(7)</sup> utilisée pour les transferts et les manipulations  
de tritium gazeux.

L'identification et les contrôles de pureté ont été effectués:

- par GLC sur Chromosorb 103 de la firme Johnson-Mainville; 100-120 mesh, colonne de 130 cm x 0.64 cm; gaz porteur hélium: 0.625 ml/sec.; température d'injection: 200°C; temps de rétention: 10'40",
- par CCM analytique dans le système de solvants: n-butanol, acide formique, eau (75:10:15); R<sub>f</sub>: 0.73; révélateur: ninhydrine,
- par spectre IR, identique à un échantillon authentique.

a) essai inactif, selon Buchman et Milstein<sup>(\*)</sup>:

On dissout 128.5 mg (1.125 mmole) de 2-furfuraldoxime<sup>\*</sup> dans 5 ml de méthanol contenant une pointe de spatule de nickel de Raney. Le ballon réactionnel est refroidi dans l'azote liquide et relié à la rampe à vide. Lorsque le vide est établi, on introduit 2.25 mmoles d'hydrogène (390 torr). L'ensemble est réchauffé à température ambiante et maintenu sous agitation vigoureuse jusqu'à cessation de la réduction (20 h.). On sépare par filtration sur préfiltre Millipore et le solvant est écarté par cryosublimation sous vide. La 2-furfurylamine est employée telle quelle dans le stade suivant. Rendement: 65%.

b) essai traceur:

On introduit 54 Ci (0.93 mmole) de tritium + 1.32 mmole d'hydrogène (au total: 390 torr) à la solution méthanolique de 128.5 mg (1.125 mmole) de 2-furfuraldoxime. Lorsque la réduction est achevée (24 h.), le ballon réactionnel est refroidi par l'azote liquide et le mélange résiduel tritium-hydrogène est évacué. Après séparation du solvant, le résidu huileux est rincé, afin de chasser le tritium labile, par 5 ml de méthanol qui sont ensuite évacués par cryosublimation sous vide. On répète l'opération trois fois. Après une nouvelle addition de méthanol, la solution est filtrée et le solvant

---

\* L'on peut indifféremment utiliser l'isomère syn ou anti<sup>(\*)</sup>.

éaporé. La 2-furfurylamine-6-T n'est pas purifiée et est engagée directement dans le stade suivant.

c) essai radioactif:

Quantités de réactifs mises en oeuvre:

128.5 mg (1.125 mmole) de 2-furfuraldoxime et 120 Ci (2.06 mmoles) de tritium gazeux (370 torr).

On opère de façon identique à l'essai traceur.

Synthèse de la 6-furfurylaminopurine (kinétine)

L'identification et les contrôles de pureté ont été déterminés par spectro UV et par CCM analytique dans les systèmes de solvants:

1. chloroforme, méthanol (85:15),  $R_f$  : 0.66; révélateurs: UV et iode
2. n-butanol, méthyl iso-butyl cétone, acide formique, eau (40:30:15:15),  
 $R_f$ : 0.75; révélateurs: UV et iode.

a) essai inactif, selon Bullock et al.<sup>(3)</sup>:

On ajoute 0.2 ml (2.2 mmoles) de 2-furfurylamine à 100 mg (0.65 mmole) de 6-chloropurine dissous dans 1 ml de méthyl Cellosolve (le rapport amine:purine est de 3.4:1). On porte à ébullition et on maintient le reflux pendant 2 heures. Après refroidissement, la 6-furfurylaminopurine cristallise spontanément. On sépare par filtration, on rince successivement par 2 fois 10 ml de méthyl Cellosolve, par 10 ml d'eau et par 10 ml d'alcool. On obtient 35 mg (0.16 mmole) de 6-furfurylaminopurine. Rendement: 24.6%.

b) essai traceur:

On ajoute 1 ml (11 mmoles) de furfurylamine et 488 mg (3.17 mmoles) de 6-chloropurine dissous dans 5 ml de méthyl Cellosolve à la 2-furfurylamine-6-T obtenue par l'essai traceur. On opère comme décrit dans le cas précédent. On obtient 137 mg (0.64 mmole) de 6-furfurylaminopurine-11-T,

chimiquement et radiochimiquement purs d'activité spécifique: 240 mCi/mmole.

Rendement: 20.2%.

c) essai radioactif:

On ajoute 0.15 ml (1.65 mmole) de 2-furfurylamine et 100 mg (0.65mmole) de 6-chloropurine dissous dans 1 ml de méthyl Cellosolve à la 2-furfurylamine-6-T de l'essai actif. On opère de façon identique à l'essai traceur. On obtient 22 mg (0.10 mmole) de 6-furfurylaminopurine-11-T. Rendement:15.4%.

Après cristallisation, il reste une impureté radiochimique. Une purification supplémentaire par CCM préparative (système de solvants: chloroforme, méthanol 85:15) suivie d'une extraction par HCl 0.1 N permet d'obtenir un produit radioactivement pur d'activité spécifique: 2.4 Ci/mmole.

REFERENCES

- (1) MILLER, C.O., SKOOG, F., OKUMURA, F.S., VON SALTZA, M.H. et STRONG, F.M.- J. Am. Chem. Soc., 78: 1375 (1956).
- (2) PAUL, R.- Bull. Soc. Chim. France, 4: 1121 (1937).  
REEVE, W. et CHRISTIAN, J.- J. Am. Chem. Soc., 78: 860 (1956).
- (3) BULLOCK, M.W., HAND, J.J. et STOKCTAD, E.L.R.- J. Am. Chem. Soc., 78: 3693 (1956).
- (4) BUCHMAN, O. et MILSTEIN, D.- Tetrahedron Letters, (en cours de publication).
- (5) PRI-BAR, I. et BUCHMAN, O.- Chem. Comm., 1631 (1970).
- (6) résultats non publiés.
- (7) AUGUSTINE, R.L.- "Catalytic Hydrogenation", Marcel Dekker, Inc., N.Y.1965.  
WENZEL, M. et SCHULZE, P.E.- "Tritium Markierung", W. De Gruyter & Co., Berlin, 1962.