

SYNTHESE DU CHLORO-7 NITRO-4 BENZOOXA-2 DIAZOLE-1,3 UNIFORMEMENT
MARQUE AU CARBONE-14 : CHLORURE DE NBD-¹⁴C (U) "CHLORO - 4
NITRO-7 BENZOFURAZANE ¹⁴C (U)"

Jean-Pierre NOEL, Louis PICHAT
Service des Molécules Marquées - C.E.N.-SACLAY, B.P. N° 2
91190 GIF SUR YVETTE - FRANCE

Received June 4, 1976

SUMMARY

The little compound, a useful reagent in biochemistry, has been synthesized in 14 steps from barium carbonate ¹⁴C via benzene ¹⁴C-0, through aniline ¹⁴C-0, p-aminobenzene sulfamide ¹⁴C-0 and 2,6-dichloro aniline ¹⁴C (U). The oxidation of the latter into 2,6-dichloronitrosobenzene ¹⁴C (U) is best performed with m-chloro peroxobenzonic acid; other reagents reported in the literature give rise to substantial amounts of 2,6-dichloronitrobenzene ¹⁴C-0, sodium azide and the 2,6-dichloronitrosobenzene ¹⁴C (U) give 5-chlorobenzofurazano-¹⁴C (U). Nitration of the latter is conveniently obtained with the complex: trifluoromethane sulfonic acid + nitric acid which gives 5-chloride ¹⁴C (U) with a 90% yield. The overall yield is 14% based on Ba¹⁴CO₃. Specific activity: 100 mCi/mMole - Shelf-life at -20° C, as lyophilized powder kept under vacuum, so far has been good.

Le chlorure de "NBD" : chloro-7 nitro-4 benzooxa-2 diazole-1,3 ou chloro-4 nitro-7 benzofurazane, introduit en analyse biologique en 1962, par Ghosh et Whitehouse (13) réagit avec les amines (14), les acides aminés (14), les groupes SH (15) en fournissant des dérivés très fluorescents. Ce réactif présente divers avantages sur d'autres : il n'est pas fluorescent par lui-même, cette absence de fluorescence évite les interférences lors de la mesure de la fluorescence des dérivés du NBD ; il peut être utilisé en milieu aqueux. Le NBD marqué au tritium a été synthétisé (16) et utilisé pour la détermination des sites actifs du facteur de couplage I (CF₁) d'enzymes catalysant les phosphorylations. Le NBD tritié obtenu avec un rendement radiocatif de 0,26 % par rapport à l'eau tritiée avait une activité spécifique de seulement 8 mCi/mMole ce qui limite les emplois de ce réactif tritié. Nous nous sommes proposés la synthèse du "NBD" chlorure marqué au ¹⁴C d'activité spécifique de l'ordre de 100 mCi/mMole. Le schéma réactionnel adopté est celui de Boulton et

©, 1977 by John Wiley & Sons, Ltd.

al. (10) avec des améliorations à divers stades et les adaptations nécessaires aux faibles quantités manipulées (fig. 1). Il comporte 14 étapes à partir du carbonate de baryum ^{14}C .

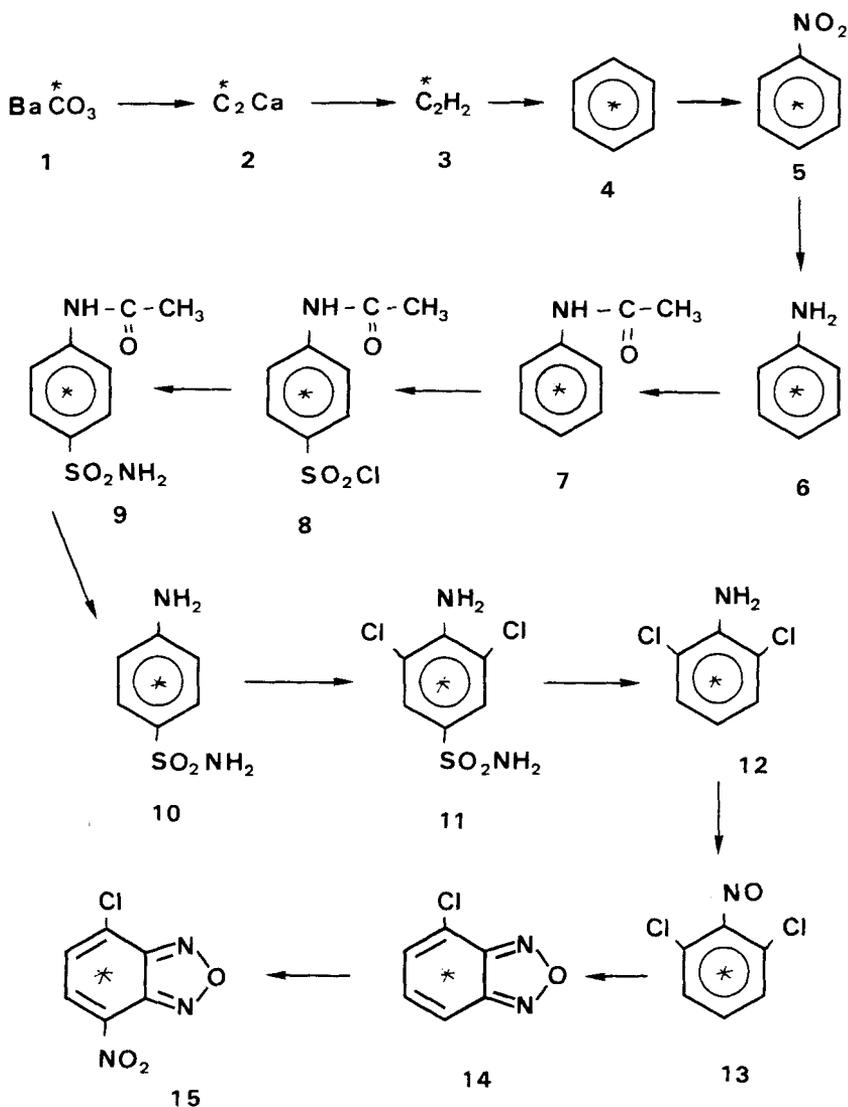


Fig. 1

L'acétylène ^{14}C (U) **3** préparé par hydrolyse du carbure de calcium ^{14}C (U) **2**, résultant de l'action du calcium sur le carbonate de baryum **1** selon (1), est ensuite cyclo-trimérisé à l'aide d'un catalyseur à base de chrome (2). Le benzène ^{14}C (U) **4** est obtenu avec un rendement de l'ordre de 85 % par rapport au carbonate de baryum. Le benzène ^{14}C (U) est nitré

à l'aide du mélange sulfonitrique en nitrobenzène ^{14}C (U) **5**. Ce dernier est réduit en aniline ^{14}C (U) **6** par le mélange fer et acide chlorhydrique (3). Le rendement en aniline par rapport au benzène est de 80 %.

L'acétylation de **6** fournit l'acétanilide ^{14}C -(U-noyau) **7** avec un rendement de 97 % (4). Le produit est purifié par chromatographie sur silice avec un rendement de 89 %. La pureté radiochimique de **7** est supérieure à 99%. Cette purification nous est apparue nécessaire pour obtenir des rendements élevés dans les étapes suivantes.

Le p-acétamido phényl ^{14}C -(U-noyau) sulfochlorure **8** est ensuite obtenu selon (5). Son hydrolyse par l'ammoniaque (6) a donné le p-acétamido phényl ^{14}C -(U-noyau) sulfonamide **9**. La désacétylation de **9** par hydrolyse chlorhydrique (7) a fourni l'amino-4 phényl ^{14}C -(U) sulfonamide **10** avec un rendement de 74 % par rapport à l'acétanilide et une pureté radiochimique de 93 % environ.

Le dichloro 2-6 amino-4 phényl ^{14}C -(U) sulfonamide **11** résulte de l'action de l'acide chlorhydrique en présence d'eau oxygénée à 30 % (8). **11** a été purifié par chromatographie sur colonne de silice et a été obtenu avec une pureté de l'ordre de 95 % et un rendement de 55 % (8).

La dichloro 2-6 aniline ^{14}C (U) **12** a résulté de la désulfamidation de **11** à l'aide de l'acide sulfurique à 70 % (8). **12** a été ensuite purifiée par sublimation. Le rendement radioactif et la pureté radioactive du produit sont respectivement de 87 et 90 %.

L'oxydation de **12** en dérivé nitrosé correspondant a été effectuée avantageusement selon (9) à l'aide de l'acide m-chloro perbenzoïque commercial. Après sublimation, le dichloro 2-6 nitrosobenzène ^{14}C (U) **13** obtenu avec un rendement de 85 %, a une pureté radiochimique de 95 %.

L'emploi d'acide m-chloro perbenzoïque comme agent d'oxydation de la dichloro-2-6 aniline en dichloro-2,6 nitrosobenzène évite complètement la formation de dichloro-2,6 nitrobenzène, comme le montre l'analyse par spectrométrie de masse du produit brut de réaction, et l'absence de dichloro-2,6 p-dinitrobenzène dans le NBD final.

Par contre, l'oxydation de la dichloro 2,6 aniline par le mélange d'acide acétique glacial - eau oxygénée 30 % dans les conditions décrites dans (12), nous a conduit à un mélange du dérivé nitroso **13** (pics de masse M^+ à 175 - 77 - 79) attendu souillé de dichloro-2,6 nitrobenzène (pics de masse M^+ à 191 - 93 - 95). Si la synthèse est poursuivie sur ce mélange brut, on obtient à la dernière étape un mélange de chlorure de NBD : 60 % environ et 40 % de dichloro-2-6 p-dinitrobenzène (pics de masse M^+ à 236 - 38 - 40).

Le chloro-4 benzooxa-2 diazole 1-3 ^{14}C (U) **14** obtenu par action de NaN_3 sur **13** dans le DMSO selon (10), a été purifié par lavage à l'eau et obtenu avec une pureté de 98 % et un rendement de 90 %.

Nos premiers essais de nitration de **14** en chloro-7 nitro-4 benzoaxadiazole-1,3 ^{14}C (U) : **15** avec le mélange sulfonitrique ont été assez satisfaisants. Toutefois, nous avons obtenu des résultats plus reproductibles et de manière plus commode, compte tenu des faibles quantités pondérales mises en jeu, grâce à l'utilisation du complexe : acide trifluorométhanesulfonique - acide nitrique décrit par (11).

La pureté radiochimique du NBD (activité spécifique : 109 mCi/mMole) contrôlée par chromatographie sur plaque de silice et par chromatographie liquide haute pression a été trouvée supérieure à 99 %. Le rendement radioactif global basé sur le carbonate de baryum ^{14}C a été de 14 %. Conservé à -20°C en ampoule scellée sous vide, le NBD,Cl a présenté un taux de décomposition inférieur à 1 % au bout de 7 semaines de conservation.

PARTIE EXPERIMENTALE

Abréviations : CPV = chromatographie en phase vapeur
CCM = chromatographie en couche mince
CLHP = chromatographie liquide haute pression

Acétylène ^{14}C -1,2 **3**

On mélange intimement 5897 mg de carbonate de baryum (600 mCi - activité spécifique : 20,2 mCi/mMole) à 14,1 g de calcium (granulométrie 0,5 à 0,8 mm). On répartit ce mélange dans 4 tubes en verre épais (\emptyset : 20 mm, h : 200 mm). On ajoute ensuite 5 mm de calcium sur le mélange. On purge à l'argon pendant deux heures. On chauffe ensuite au bec Mecker jusqu'à ignition de l'ensemble. Le carbure de calcium est ensuite hydrolysé à l'eau dans un ballon muni d'un réfrigérant fixé sur une rampe à vide. L'acétylène est piégé dans deux "by-pass" fixés sur la rampe à vide et refroidis par l'azote liquide puis séché sur P_2O_5 et jaugé.

Le rendement est quantitatif.

Benzène ^{14}C (U) **4**

Sur une rampe à vide l'acétylène est absorbé sur 15 g de catalyseur "Perlkatalysator Neu" (Kali Chemie AG Hanovre) préalablement chauffé une nuit à 300°C sous vide de la trompe à diffusion de mercure. L'acétylène adsorbé sur le catalyseur est chauffé une nuit à 50°C . Le benzène formé est ensuite distillé du catalyseur par chauffage à 200°C sous vide dynamique et condensé dans deux by-pass en série refroidis, le premier dans un mélange carbo-glace-acétone, le second dans l'azote liquide. Après 4 heures, on élimine l'acétylène éventuellement piégé dans l'azote liquide, on sèche le benzène sur P_2O_5 et on le jauge.

Une prise d'essai est effectuée pour le contrôle et le comptage du benzène. On trouve 4,53 mMoles et 538 mCi, soit un rendement de 90 %.

Le benzène est contrôlé par CPV, appareil Microteck MT 220 Silicone OV 17 sur "Chromosorb", température : 60° C, temps de rétention : 0,8 mn.
Remarque : Lors de cette préparation, il y a une dilution isotopique due au calcium utilisé qui est partiellement carbonaté. Le rendement radioactif est d'environ 86 %.

Nitrobenzène ^{14}C (U) 5

Le benzène est piégé par transfert sous vide dans un ballon de 100 ml fixé sur une rampe à vide et refroidi par l'azote liquide. Le ballon étant maintenu à 0° C, on purge à l'azote sec et on ajoute en 15 mn à la seringue 0,4 ml du mélange sulfonitrique suivant : HNO_3 : 35,5 %, H_2SO_4 : 52,5 %, H_2O : 12 %. On agite 30 mn à la température ambiante. On reprend avec 3 ml d'eau et 3 ml d'éther, et on neutralise avec une solution saturée de bicarbonate de sodium. On extrait avec trois fois 15 ml d'éther et on sèche sur sulfate de magnésium. On recueille 460 mCi de produit.

Le nitrobenzène est analysé par CPV, colonne OV 17 avec programmation de température de 60 à 150° C à raison de 15° C/mn, temps de rétention : 3,6 mn. Il contient comme impuretés : 4 % de benzène et 3 % de dinitrobenzène.

Rendement radioactif : 86 %.

Aniline ^{14}C (U) 6

On élimine l'éther par évaporation sous vide et on ajoute au nitrobenzène 850 mg de fer en poudre réduit par l'hydrogène (Prolabo) (15 mAtomes) et, goutte à goutte, 8,5 ml de HClN. On agite pendant 2 heures 30 à la température ambiante.

On extrait une première fois la solution aqueuse à l'éther pour éliminer le fer et le chlorure de fer. On reprend avec une solution normale de HCl et on élimine le nitrobenzène ^{14}C et le benzène ^{14}C par extraction à l'éther. Activité : 431 mCi soit un rendement de 80 % par rapport au benzène.

Le produit est contrôlé par CCM sur silice Schleicher et Schüll F 254. Solvant : benzène - acétate d'éthyle (80 - 20), Rf : 0,72 ; et par CPV sur silicone OV 17 à 100° C, temps de rétention : 1,4 mn.

Le produit a une pureté de l'ordre de 97 %.

Acetanilide ^{14}C (U-noyau) 7

Le chlorhydrate d'aniline 431 mCi (3,95 mMoles) est porté à sec dans un ballon de 100 ml, on ajoute 5,6 ml de tétrachlorure de carbone et 1,05 ml d'anhydride acétique fraîchement distillé. Après 25 mn de chauffage à reflux on ajoute à nouveau 1,05 ml d'anhydride acétique. On chauffe à nouveau 20 mn à reflux. Après refroidissement, on porte à sec plusieurs fois en reprenant par du méthanol.

On recueille 417 mCi de produit soit un rendement de 97 %. Le produit est analysé par CCM sur silice Schleicher et Schüll F 254, solvant : benzène-

acétate d'éthyle (50 - 50) , Rf : 0,52.

On ajoute à cette fraction, 243 mCi (même activité spécifique) d'acétanilide provenant d'une synthèse parallèle et on purifie ce produit par chromatographie sur une colonne (\emptyset : 35 mn, h : 180 mm) de 45 g de silice Merck H 60 en éluant avec le mélange benzène - acétate d'éthyle (50 - 50).

Le rendement de la purification est de 90 % soit 585 mCi d'acétanilide.

p-Acétamido phényl ^{14}C (U-noyau) sulfochlorure 8

L'acétanilide 585 mCi (5,36 mMoles) est porté à sec dans un ballon de 100 ml à deux tubulures munies d'un réfrigérant avec arrivée d'azote et d'une ampoule de coulée contenant 2 ml de chlorhydrique sulfurique fraîchement distillée. On refroidit le ballon dans un bain à 12° C et on fait couler la chlorhydrique sulfurique goutte à goutte en 30 mn. L'acétanilide se dissout. On laisse revenir à température ambiante et on chauffe 2 heures à 60° C.

p-Acétamido phényl ^{14}C (U-noyau) sulfonamide 9

Dans un ballon de 100 ml refroidi à - 10° C, on ajoute 20 ml d'ammoniaque à 21 % et quelques morceaux de glace pilée. On verse en 15 mn le mélange brut réactionnel précédent. On agite ensuite 2 heures à température ambiante; on porte à sec à l'évaporateur rotatif.

p-Amino phényl ^{14}C (U) sulfonamide 10

On ajoute au mélange précédent (sel + produit) 35 ml d'acide chlorhydrique 2,5 N et on chauffe 40 mn à 120° C. Après refroidissement, on porte à sec sous vide, reprend à l'eau, évapore. On répète ces opérations trois fois. On neutralise avec du bicarbonate de sodium et on extrait à l'acétate d'éthyle.

Il reste environ 5 % d'aniline que l'on élimine par évaporation sous vide.

On recueille 432 mCi de produit soit un rendement de 74 % (725 mg, 4 mMoles, activité spécifique de 108 mCi/mMole).

Le produit est analysé sur plaque de silice Schleicher et Schüll F 254 solvant : benzène - acétate d'éthyle (50 - 50), Rf : 0,18.

Remarque : Lors de l'hydrolyse du sulfochlorure, il y a formation d'acide sulfanilique que l'on peut récupérer et purifier par filtration sur Dowex 50 forme H^+ pour éliminer les sels, puis chromatographie sur résine Amberlite XAD₂ en éluant à l'eau.

Dichloro 2-6 p-aminophényl ^{14}C (U) sulfonamide 11

Dans un ballon de 100 ml contenant le p-aminophényl sulfonamide 432mCi (4 mMoles), on ajoute 6,7 ml d'eau et sous agitation 0,8 ml HCl concentré. Après dissolution du produit, on ajoute 5,86 ml d'HCl concentré. On chauffe à 45° C et on ajoute 0,78 ml d'eau oxygénée à 30 %. On chauffe alors 10 mn à 45° C, un précipité apparaît, on poursuit le chauffage 15 mn à 60° C. On

laisse revenir à température ambiante. Le produit est extrait à l'acétate d'éthyle, porté à sec, repris à l'acétone et la solution est filtrée.

On obtient 367 mCi de produit contenant 25 % d'impuretés actives.

Contrôle : CCM Silice Schleicher et Schüll F 254, support plastique : Benzène - acétone (80 - 20), Rf = 0,50.

Purification : Le produit est purifié sur une colonne (\emptyset : 35 mm, h : 180 mm) de 45 g de Silice H 60 Merck, élution : benzène - acétone (90 - 10), après application du produit sur la colonne dans le mélange acétone - benzène (80 - 20).

On obtient 235 mCi de produit contenant 5 % d'impureté active.

Rendement : 55 %.

Dichloro 2-6 aniline ^{14}C (U) 12

Le dichloro 2-6 p-aminophényl ^{14}C (U) sulfonamide 235 mCi (2,15 mMoies) est porté à sec dans un ballon forme poire de 50 ml. On ajoute 4 ml de H_2SO_4 70 % et on chauffe 2 heures à 170° C. Après refroidissement, on ajoute de la glace pilée, on neutralise à la soude 4 N, on extrait la dichloroaniline à l'éther, on lave deux fois avec une solution saturée de bicarbonate de sodium et deux fois à l'eau. On sèche sur sulfate de magnésium anhydre.

Le produit est porté à sec et sublimé à la température ambiante sous vide dynamique maximum.

On obtient 205 mCi de produit contenant 10 % d'impureté active soit un rendement de 87 %.

Contrôle : CMM Silice Merck 60 F 254, support platique : cyclohexane (100), Rf : 0,058.

Dichloro 2-6 Nitrobenzène ^{14}C (U) 13

Dans un ballon forme poire de 50 ml contenant la dichloro 2-6 aniline ^{14}C (U) 205 mCi (1,88 mMoies) on ajoute 4 ml de chloroforme puis en 20 mn et goutte à goutte 655 mg (3,8 mMoies) d'acide m-chloro perbenzoïque (préalablement dosé) (Aldrich - USA) dissous dans 6 ml de chloroforme. Après deux heures à la température ambiante l'acide m-chlorobenzoïque précipite. On agite pendant 15 heures.

Une partie de l'acide m-chlorobenzoïque est éliminée par filtration. La solution chloroformique est lavée successivement par une solution 0,1 N de thiosulfate de sodium, puis une solution saturée de bicarbonate de sodium puis à l'eau. On sèche sur sulfate de sodium anhydre et au filtre.

Le produit est purifié par sublimation sous vide dynamique :

- a) A température ambiante pour éliminer la dichloroaniline n'ayant pas réagi et plusieurs impuretés ;
- b) A 75° C pour recueillir le dichloronitrosobenzène (le produit sublimé sur le doigt à - 78° C est vert).

Activité 173 mCi soit un rendement de 85 %.

Contrôles : CCM cyclohexane-acétone (70 - 30) silice Merck 60 F 254, support plastique, Rf : 0,78.

Chloro-4 benzooxa-2 diazole-1,3 ^{14}C (U) 14

Dans un ballon forme poire de 50 ml contenant la dichloronitrosoaniline 173 mCi (1,58 mMoles) on ajoute 3,3 ml de DMSO anhydre. On chauffe à 80° C pour dissoudre le produit et on ajoute 153 mg (2,35 mMoles) d'azide de sodium (NaN_3). On chauffe progressivement jusqu'à 100° C. A 85° C, il y a un départ très rapide d'azote. On maintient la température à 100° C pendant 15 mn et 1 mn à 120° C. On précipite le produit par addition de glace pilée et on laisse une nuit au réfrigérateur.

On recueille le produit par filtration de la solution et on lave abondamment à l'eau glacée.

Activité 157 mCi soit un rendement de 90 %.

Contrôle : CCM Silice Merck 60 F 254 support verre, Chlorure de méthylène-éther-hexane (10 - 10 - 80), Rf : 0,62
Cyclohexane - éther (90 - 10), Rf : 0,50.

Nitro-4 chloro-7 benzooxa-2 diazole-1,3 ^{14}C (U) (NBD-Cl) 15

Dans un ballon de 100 ml contenant 91 mg (1,07 mMoles) de nitrate de sodium, on ajoute en boîte à gants sous atmosphère d'azote, 1,64 ml d'acide trifluorométhane sulfonique. On agite pendant 45 mn à température ambiante et on ajoute le chloro-4 benzooxa-2 diazole-1,3 ^{14}C (U), 115 mCi (1,05 mMoles) en solution dans 17 ml de chlorure de méthylène. On agite 1 heure à la température ambiante.

On précipite le produit par addition de glace puis on l'extrait au chlorure de méthylène que l'on sèche sur sulfate de magnésium.

Activité 110 mCi, rendement : 96 %.

Contrôle : CCM Silice Merck 60 F 254 support verre, chlorure de méthylène-hexane-éther (10 - 80 - 10), Rf : 0,16.

Il reste 3 % de chloro-4 benzooxa-2 diazole-1,3, Rf : 0,62.

Purification : Le produit est purifié par chromatographie sur une colonne (\emptyset : 35 mm, h : 200 mm) de 50 g de silice Merck H 60, solvant d'élution : chlorure de méthylène - éther - hexane (10 - 10 - 80) puis après élution du chloro-4 benzooxa-2 diazole-1,3, élution par le mélange : chlorure de méthylène - éther - hexane (15 - 15 - 70).

Les produits sont chargés sur la colonne dissous dans le minimum du mélange éther - chlorure de méthylène auquel on ajoute un volume égal d'hexane.

On recueille 99 mCi de produit, soit un rendement de purification de 90 %.

Contrôles du produit :

- 1) CCM : Les contrôles ont été effectués sur silice Merck 60 F 254
 a) chlorure de méthylène - éther - hexane : 15-15-70 ; Rf : 0,42
 b) cyclohexane - acétone : 70-30 ; Rf : 0,38.

2) CLHP : Appareil Waters Associates modèle 660, colonne Microporasil, élution : n-heptane - chlorure de méthylène de 20 à 60 puis concentration constante chlorure de méthylène n-heptane (60 - 40), temps de rétention : 21 mn.
 Le produit a une pureté radiochimique supérieure à 99 %.

Spectre U.V. :

Le spectre UV du produit ^{14}C est identique à celui d'un échantillon commercial inactif. Il présente 2 maxima d'absorption :

$$\lambda_1 \text{ max : } 346 \text{ m}\mu \quad ; \quad \lambda_2 \text{ max : } 259 \text{ m}\mu \quad ; \quad \epsilon : 9600$$

Activité spécifique :

Déterminée à partir du spectre UV : 109,4 mCi/mMole
 Déduite d'une pesée : 102 mCi/mMole

Conservation :

La presque totalité du produit est conservée sous forme de poudre lyophilisée, en ampoule scellée sous vide, à -20°C . Au bout de 7 semaines de conservation le NBD,Cl ^{14}C , réanalysé montre un taux de décomposition inférieur à 1 %.

Une fraction mineure est conservée en solution dans l'acétone (1 mCi/ml) à -20°C en ampoules scellées sous vide. Dans ces conditions le taux de radiolyse a été de 3 % en 7 semaines.

REFERENCES

- 1 a Cox J.D., Warne R.J. - J. Chem. Soc., 1893 (1951)
- 1 b Pichat L., Clément J. - Bull. Soc. Chim., 329 (1959)
- 2 Haider K. - J. of Labelled Compounds 2 : 174 (1966)
- 3 Vogel, Practical Organic Chemistry (3rd Edition), 564, Longmans London (1962)
- 4 Murray A., Williams D.L. - Org. Synth. with Isotopes, Part I, 599, Interscience publishers inc., New-York (1958)
- 5 Smiles S. et Stewart J. - Org. Synth. 1 : 8 (1932)
- 6 Houben Weyl - Methoden der Organischen Chemie 9 : 606, Georg Thierne Verlag Stuttgart (1955)
- 7 Vogel - Practical Organic Chemistry (3rd Edition), 1006, Longmans London (1962)
- 8 Seinel K. - Org. Synth. 3 : 262 (1955)
- 9 Di Nunno L., Florio S., Todesco P.E. - J. Chem. Soc. (c), 1433 (1970)

- 10 Boulton A.J., Ghosh P.B. et Katritzky A.R. - J. Chem. Soc. (b), 1004 (1966)
- 11 Coon C.L., Blucker W.G. et Hill M.E. - J. Org. Chem. 38 : 4243 (1973)
- 12 Holmes R.R. et Bayer R.P. - J. Am. Chem. Soc. 82 : 3454 (1960)
T. Letters 25 : 2887 (1966)
- 13 Ghosh P.B., Whitehouse M.W. - Biochem. J. 108 : 155 (1968)
- 14 Whitehouse M.W., Ghosh P.B. - Biochem. Pharm. 17 : 158 (1968)
- 15 Birkett D.J., Price N.C., Radda G.K., Salmon A.G. - FEBS Letters
6 : 346 (1970)
- 16 Deters D.W., Racker E., Nelson N., Nelson H. - J. Biol. Chem.
250 : 1041 (1975)