

HUGOZ

PREMIER MINISTRE
COMMISSARIAT A
L'ÉNERGIE ATOMIQUE

SYNTHÈSE DE L'ACIDE OROTIQUE

¹⁴C-6

par

L. PICHAT, M. AUDINOT et P. CARBONNIER

COMMISSARIAT
A L'ÉNERGIE ATOMIQUE
BIBLIOTHÈQUE
C. E. N. SACLAY

Rapport CEA n° **1491**

1960

CENTRE D'ÉTUDES
NUCLÉAIRES DE SACLAY
SERVICE DE DOCUMENTATION
Boite postale n° 2 - Gif-sur-Yvette (S.-et O.)

CEA 1491 - PICHAT L., AUDINOT M., CARBONNIER P.

SYNTHÈSE DE L'ACIDE OROTIQUE ^{14}C -6 (1960).

Sommaire - Description de la synthèse de l'acide orotique ^{14}C -6, au départ d'acétate de sodium ^{14}C -1 par l'intermédiaire de l'acétate d'éthyle ^{14}C -1 avec un rendement global radioactif de 47 pour cent. Activité spécifique : 3 mc/mM.

CEA 1491 - PICHAT L., AUDINOT M., CARBONNIER P.

SYNTHESIS OF ^{14}C -6 OROTIC ACID (1960).

Summary. - A description of the synthesis of ^{14}C -6 orotic acid starting from ^{14}C -1 sodium acetate and passing via ^{14}C -1 ethyl acetate ; the overall radioactive yield is 47 per cent. Specific activity : 3 mc/mM.

N° 274. — Synthèse de l'acide orotique ¹⁴C-6,

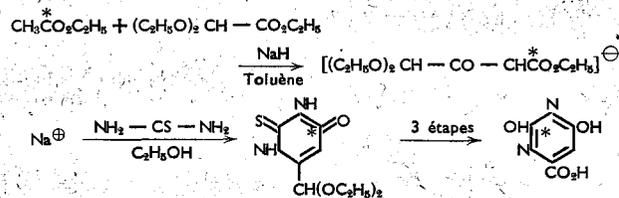
par Louis PICHAT, Marcel AUDINOT et Philippe CARBONNIER.

(Section des Molécules Marquées C. E. N., Saclay, B. P. n° 2 à Gif-sur-Yvette, Seine-et-Oise.)

(Manuscrit reçu le 27.6.59.)

Description de la synthèse de l'acide orotique ¹⁴C — 6, au départ d'acétate de sodium ¹⁴C — 1 par l'intermédiaire de l'acétate d'éthyle ¹⁴C — 1 avec un rendement global radioactif de 47 %. Activité spécifique : 3 mc/mM.

L'acide orotique ou uracil carboxylique-4 présente un intérêt biologique certain. Cet intérêt s'est traduit par des demandes de ce produit marqué au ¹⁴C. L'acide orotique ¹⁴C — 6 a déjà été synthétisé par C. HEIDELBERGER et R. B. HURLBERT (1) selon le procédé général de JOHNSON et SCHROEDER (2) convenablement modifié pour l'utilisation du ¹⁴C. Depuis, ce travail a été également repris par F. KORTE (3). Le schéma réactionnel est le suivant :



L'acétate d'éthyle ¹⁴C — 1 nécessaire pour cette préparation a été préparé par une modification de la méthode de G. A. ROPP (4). Cet auteur préconise le chauffage à reflux au réfrigérant ascendant de phosphate d'éthyle et d'acétate de sodium ¹⁴C — 1. Ce procédé entraîne des pertes considérables d'activité par l'extrémité du réfrigérant. Nous avons conduit l'opération en ballon scellé sous vide, ce qui évite cet inconvénient. Les rendements sont de l'ordre de 90 %. La pureté du produit, vérifiée en chromatographie gazeuse a permis de déceler la présence de deux impuretés (total : 5 % environ) dans certaines préparations dont l'une est de l'alcool éthylique. Sa présence s'explique par l'action de NaOH sur le phosphate d'éthyle, la soude provenant de l'hydrolyse de la solution aqueuse d'acétate de sodium actif. Dans la synthèse de l'acide orotique, l'opération a été également conduite en ampoule scellée

jusqu'au stade thio-2 diéthoxyméthyl-4 uracile ¹⁴C — 6 afin d'éviter les pertes de produits marqués volatils. Le rendement radioactif global calculé sur l'acétate de sodium de départ a été de 47 %.

Le producteur de molécules marquées doit le plus souvent répartir les produits fabriqués en ampoules d'activité « standart » (1 mc, 0,5 mc, etc.). Cette répartition doit de préférence être faite volumétriquement par pipettage d'une solution stock du produit, afin d'éviter les contaminations considérables qui se produiraient si l'on opérait cette répartition par pesée de la poudre radioactive sèche. Le cas de l'acide orotique posait un problème, ce corps étant insoluble dans tous les solvants volatils. Nous avons pu répartir le produit en le dissolvant dans un excès d'une solution aqueuse de pyridine. L'évaporation sous vide de cette solution suivie d'un chauffage à 100 °C sous vide pendant 8 h, fournit l'acide orotique libre anhydre, le sel de pyridine n'étant pas stable dans ces conditions.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Diéthoxyacétate d'éthyle. — Préparé selon (5).

Acétate d'éthyle ¹⁴C — 1. — 30 cm³ d'une solution d'acétate de sodium ¹⁴C — 1 à 2 mc/cm³, activité spécifique 10 mc/mM soit 60 mc et 6mM sont évaporés à sec sous vide dans un ballon (A) de 50 cm³ placé sur un évaporateur rotatif. L'évaporation achevée le produit est séché par chauffage à 100 °C sous vide de 10⁻³ mmHg (pompe à diffusion de mercure) pendant 8 h. Après refroidissement on introduit rapidement 3 cm³ de phosphate d'éthyle pur, scelle sous vide et chauffe le ballon à 180° — 220 °C pendant 2 h. On refroidit à — 80 °C, ouvre le ballon et l'attache sur l'appareil figure 1. Le robinet R₂ étant ouvert et les pièges B et C refroidis

respectivement à -20°C et -196°C on distille l'acétate d'éthyle sous vide dans le piège C; le piège B a pour but de condenser le phosphate d'éthyle entraîné. Les robinets R_1 et R_2 étant fermés on transfère l'acétate d'éthyle dans le récipient D refroidi par l'azote liquide, le piège C étant chauffé progressivement. Le récipient D renfermant l'acétate d'éthyle est ensuite scellé à froid sous vide.

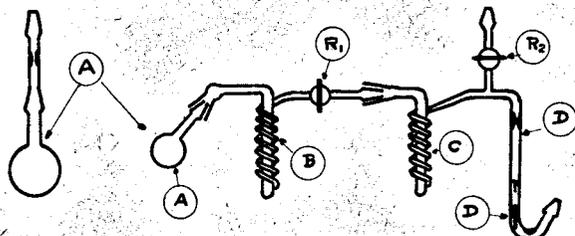


Fig. 1.

- A. Ballon 50 ml avec double rodage RIN n° 1 M.
 B. Piège refroidi à -20°C .
 C. Piège refroidi à -196°C .
 D. Récipient de stockage d'acétate d'éthyle $^{14}\text{C}-1$ avec constrictions et « breakoff-seal » (tube à « queue de cochon »).
 M. Barreau métallique pour ouverture ultérieure du tube D.
 R_1 - R_2 . Robinets à vide.

Dans de nombreux essais « à blanc » le rendement a été déterminé par mesure du volume d'acétate d'éthyle dans une jauge à gaz (Rdt = 90-100 %); et la pureté déterminée par chromatographie gazeuse. Dans certains essais le phosphate d'éthyle a été remplacé par du sulfate sans qu'il y ait amélioration de la qualité du produit obtenu.

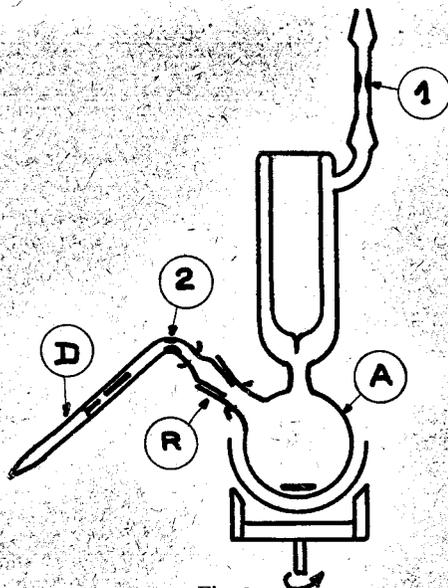


Fig. 2.

Légende

- 1-2. Rétrécissements pour scelllements ultérieurs;
 A. Ballon avec réfrigérant ascendant à glace ou carboglace.
 D. Récipient renfermant l'acétate d'éthyle $^{14}\text{C}-1$.
 R. Rodage R. I. N. n° 1.

Thio-2 diéthoxyméthyl-4 uracile $^{14}\text{C}-6$. — On utilise l'appareil figure 2. Dans le ballon A on place 15 ml de toluène anhydre,

300 mg de NaH (12,5 mM), 1 g de diéthoxyacétate d'éthyle et un barreau aimanté; le réfrigérant rempli de glace étant équipé à son extrémité supérieure d'une garde à Cl_2Ca , on chauffe à $90-100^{\circ}\text{C}$ sous agitation magnétique pendant 1 h. Après refroidissement on raccorde l'appareil à une rampe à vide et rapidement par le rodage on introduit 0,6 g de diéthoxyacétate d'éthyle. On adapte le récipient D de la figure 1 sur le ballon A qui est refroidi par la carboglace et on fait le vide dans l'appareil; on refroidit alors A par l'azote liquide et scelle l'appareil, sous vide au rétrécissement (2); le tube D « queue de cochon » est ouvert au moyen du barreau métallique M et l'acétate d'éthyle distille dans A. On scelle au rétrécissement 1 et maintient le rodage RIN n° 1R par des ressorts. On place de la carboglace + acétone dans le réfrigérant et chauffe à $90-100^{\circ}\text{C}$ pendant 2 h sous agitation magnétique, temps au bout duquel tout NaH a disparu. Après refroidissement, on ouvre l'appareil, place rapidement une petite colonne Vigreux sur le rodage RIN n° 1R et distille le toluène sous vide de trompe à eau en piégeant le distillat dans la carboglace. Dans A on ajoute alors rapidement 700 mg de thiourée et 10 cm^3 d'alcool absolu et chauffe à reflux pendant 3 h, le réfrigérant ascendant étant rempli de glace et muni d'une garde à chlorure de calcium. L'alcool est évaporé sous vide de la même manière que le toluène. Le résidu est repris par 10 cm^3 d'eau distillée et on le transfère quantitativement dans un tube de centrifugeuse dans lequel on précipite le produit par addition d' HCl 6 N jusqu'à pH 4. Poids du produit brut obtenu : 1,42 g (103 % de la théorie). Ce composé donne une seule tache radioactive par chromatographie sur papier Whatman n° 1 solvant : phénol : 80, eau : 20; $R_f = 0,90$.

Acide orotique $^{14}\text{C}-6$. — Dans un Erlenmeyer de 150 cm^3 le produit précédent est mis en suspension dans 10 cm^3 d'eau distillée. 3 ml d'eau oxygénée (110 vol.) sont ajoutés et sous refroidissement par la glace on introduit lentement 3 cm^3 de NaOH 5 N. A ce moment il y a dissolution. La solution est abandonnée à la température ambiante pendant 2 h puis on porte à l'ébullition pendant 5 mn pour décomposer l'excès d'eau oxygénée. Après refroidissement dans la glace on ajoute $1,5\text{ cm}^3$ de H_2SO_4 concentré ce qui provoque la formation d'un précipité blanc. Le mélange réactionnel est porté à l'ébullition pendant 2 mn puis à nouveau refroidi dans la glace. On ajoute alors 1,2 g d'acide chromique suivi de $1,5\text{ cm}^3$ de H_2SO_4 concentré. Le mélange est abandonné à la température ambiante pendant 2 h puis chauffé à 85°C pendant 15 mn. Dans la plupart des essais « à blanc », par refroidissement, il se formait un précipité abondant d'acide orotique. Dans le présent essai ce précipité étant peu abondant on a ajouté à nouveau 0,300 g d'acide chromique et chauffé le mélange à nouveau 15 mn à 85°C . Par refroidissement cette fois on a obtenu un précipité (582 mg) d'acide orotique. Les eaux mères filtrées abandonnées 2 jours au réfrigérateur fournissent un deuxième jet. La chromatographie sur papier du premier précipité (solvants : phénol 80, eau : 20 ou butanol 75, acide acétique : 15, eau : 10) indique la présence d'une impureté en faible proportion. L'activité spécifique mesurée est de : 9,4 mc/mM. Purification : 562 mg du produit précédent et 1,064 g d'acide orotique inactif anhydre sont recristallisés dans 60 cm^3 d'eau. Le deuxième jet est purifié de la même manière. Au total on récupère, 28,6 mc d'acide orotique d'activité spécifique 3 mc/mM (Rdt global = 47 %) ayant un spectre d'absorption ultraviolette identique à celui du produit commercial et ne comportant qu'une seule tache radioactive en chromatographie sur papier (solvants : précipités).

BIBLIOGRAPHIE.

- (1) C. HEIDELBERGER et R. B. HURLBERT, *J. am. chem. Soc.*, 1950, **72**, 4704.
- (2) T. B. JOHNSON et E. F. SCHROEDER, *J. am. chem. Soc.*, 1931, **53**, 1989.
- (3) F. KORTE et W. PAULUS, K. STÖRIK, *Ann. Chem.*, 1958, **619**, 63.
- (4) G. ROPP, *J. am. chem. Soc.*, 1950, **72**, 2299.
- (5) Organic Syntheses 1955, **35**, 59, Chapman et Hall, Londres.

Imprimé avec le périodique *Bulletin de la Société Chimique de France*.
Autorisation S. 7. Dépôt légal: N° 2653 4° trimestre 1959.
Masson et C^{ie}, éditeurs, Paris.
