

*Vérification de la pureté radiochimique d'un isomère optique marqué.**

Walter G. VERLY et Charles GERDAY

Laboratoire des Isotopes, Département de Biochimie, Université de Liège.
Adresse actuelle : Département de Biochimie, Université de Montréal, Canada.

SUMMARY

A method for evaluating the radiochemical purity of the labelled isomer of an amino acid is described. It permits to measure the quantity of the enantiomer present as an impurity. The method is applied to the case of tritiated L-phenylalanine.

The inactive racemic form, added as a carrier, is condensed with L-glutamic acid; the diastereoisomers of the resulting dipeptide are resolved chromatographically on Dowex 50 and the radioactivity of each peak is measured.

This process requires only a very little sample and it enables the detection of very minute contaminants.

RÉSUMÉ

Ce travail présente une méthode pour vérifier la pureté radiochimique d'un isomère marqué d'acide aminé, qui permet de mesurer l'importance de la contamination par l'autre variété optique. La méthode est appliquée au cas de la L-phénylalanine tritiée.

Elle consiste à ajouter le racémique inactif, puis à préparer un dipeptide avec de l'acide L-glutamique. Les diastéréoisomères sont préparés chromatographiquement et la radioactivité de chacun des pics est mesurée.

Ce procédé, qui ne nécessite qu'un très petit échantillon, est susceptible de détecter des contaminations extrêmement faibles.

Lorsqu'une substance naturelle contient un carbone asymétrique, généralement, un seul des deux isomères existe naturellement. Par ailleurs, à cause de la stéréospécificité enzymatique, les deux isomères introduits artifi-

* Reçu le 11 janvier 1965.

ciellement dans le métabolisme sont traités différemment. Dans ces cas, il importe, pour les études biologiques faites à l'aide de traceurs radioactifs, de n'utiliser que l'isomère naturel marqué. La vérification de la pureté radiochimique de ce produit, particulièrement en ce qui concerne la possibilité d'une contamination par l'énantiomère, est une opération importante.

La mesure polarimétrique est presque toujours impossible (l'échantillon à analyser est trop petit); elle n'est jamais recommandable avec des produits de très haute activité pour des raisons d'hygiène et elle est souvent très imprécise, les angles de rotation observés étant trop faibles.

Des méthodes enzymatiques ont été proposées [1], mais elles manquent de la netteté souhaitable pour une analyse radiochimique.

La technique que nous avons mise au point pour vérifier la pureté d'une préparation de L-phénylalanine marquée, ne souffre pas des désavantages énumérés ci-dessus. Elle peut être exécutée sur de très petites quantités de produit, tant en poids qu'en radioactivité. Elle est extrêmement sensible pour détecter la moindre trace de contamination par l'autre isomère optique. Elle est adaptable, sans difficulté, aux autres acides aminés.

La méthode consiste à diluer l'échantillon radioactif avec de la DL-phénylalanine ordinaire, puis à préparer un dipeptide avec l'acide L-glutamique. Les diastéréoisomères obtenus sont séparés sur une colonne chromatographique. Le rapport de la radioactivité dans le pic de l'acide D-phénylalanyl-L-glutamique, à l'activité présente dans le pic de l'acide L-phénylalanyl-L-glutamique, permet de calculer aisément le pourcentage de contamination de la préparation par de la D-phénylalanine marquée.

EXPÉRIENCES ET RÉSULTATS

1. — *Synthèse de l'acide (D, L ou DL)-phénylalanyl-L-glutamique.*

a) Le diester éthylique de l'acide L-glutamique est préparé selon la méthode de CHILES et NOYES [2] et FISHER [3].

b) La carbobenzoxy-phénylalanine est obtenue en suivant les indications de BERGMANN et ZERVAS [4]. Elle est ensuite transformée en chlorure de la manière suivante [5] : à 1,1 g de carbobenzoxy-phénylalanine en suspension dans 15 ml d'éther anhydre à 0° C, on ajoute rapidement 1 g de PCl_5 pulvérisé et la suspension est agitée 30 minutes à 0° C. Après filtration sur ouate, la solution est évaporée sous vide à 0° C; le résidu de chlorure de carbobenzoxy-phénylalanine est directement utilisé dans l'opération suivante.

c) *Synthèse de l'ester diéthylique de l'acide carbobenzoxy-phénylalanyl-L-glutamique* [5, 6].

Au chlorure de carbobenzoxy-phénylalanine dissous dans 10 ml d'éther anhydre à 0° C, on ajoute rapidement une solution glacée de 0,6 g d'ester diéthylique de l'acide L-glutamique dans 10 ml d'acétate d'éthyle anhydre, puis 10 ml d'une solution saturée de KHCO_3 . Le mélange est agité 50 minutes à 0° C; après addition de 40 ml d'eau, l'agitation est poursuivie pendant 2

à 3 minutes dans une ampoule à décanter. Après élimination de la couche aqueuse, la phase organique est lavée successivement 2 fois par 3 ml HCl N et 3 ml KHCO_3 à 7 %, puis séchée la nuit sur Na_2SO_4 . Après filtration, elle est évaporée sous vide à température ordinaire. On obtient 0,9 à 1 g du diester éthylique de l'acide carbobenzoxy-phénylalananyl-L-glutamique sous la forme d'un résidu solide ou d'une huile.

d) Obtention du dipeptide libre.

Pour saponifier les fonctions ester [4], le produit est redissous dans 10 ml de dioxane, puis on ajoute 15 ml NaOH N (environ 3 fois la quantité stœchiométrique) et on agite 1,30 heure à température ordinaire. La solution est alors acidifiée par HCl 2N tout en refroidissant à 0° C; l'acide carbobenzoxy-phénylalananyl-L-glutamique est extrait avec de l'acétate d'éthyle, réextrait de cette solution organique par KHCO_3 à 7 %, puis à nouveau repris par l'acétate d'éthyle après acidification. Cette dernière solution organique, après lavages à l'eau, est séchée une nuit sur Na_2SO_4 ; après filtration, elle est évaporée sous vide à température ordinaire. On obtient 700 à 800 mg d'acide carbobenzoxy-phénylalananyl-L-glutamique.

Celui-ci est dissous dans un mélange de 10 ml de méthanol, 3 ml d'eau et 1 ml d'acide acétique glacial. Après addition de 300 mg de noir de palladium [7], la suspension, constamment agitée, est hydrogénée sous une pression de 1 atmosphère pendant 5 heures. Le catalyseur est retenu sur filtre Whatman 1 et le filtrat évaporé sous vide à 40° C. Le résidu est redissous dans l'eau; la solution est refiltrée et réévaporée. On obtient 300 à 400 mg de produit.

L'acide L-phénylalananyl-L-glutamique (forme L en abrégé) est recristallisé dans l'alcool absolu; les formes D et DL dans l'alcool et un peu d'eau.

2. — *Vérification de la pureté des produits.*

a) Des chromatographies descendantes sur papier Whatman n° 1 ont été effectuées en utilisant comme solvant un mélange butanol : acide acétique : eau (4 : 1 : 1); on obtient les Rf suivants :

phénylalanine	0,49
acide glutamique	0,12
dipeptide	0,46

Après hydrolyse du dipeptide dans HCl 6N à ébullition pendant 6 heures, la chromatographie, suivie d'un traitement à la ninhydrine, ne révèle que deux taches correspondant respectivement à la phénylalanine et à l'acide glutamique. Ceci identifie complètement les produits de synthèse.

Par ailleurs, ces différents produits (formes L, D ou DL) n'accusent, après chromatographie, qu'une seule tache à 0,46. Ceci prouve certainement qu'ils ne contiennent pas d'acide glutamique libre, mais ne permet pas d'exclure une contamination par de la phénylalanine dont le Rf est très voisin.

b) Une électrophorèse horizontale sur des bandes de papier Whatman n° 1 a été faite sous une tension de 350 volts. L'électrophorétogramme est développé pendant 15 heures dans un mélange pyridine : acide acétique : eau

(37,5 : 5,0 : 957,5) de pH 5,91 (point isoélectrique de la phénylalanine) et révélé à la ninhydrine. Le dipeptide se déplace de +32 mm, tandis que la phénylalanine reste, bien entendu, sur la ligne de départ. Ce test permet de vérifier que les dipeptides ne sont pas contaminés par de la phénylalanine libre.

3. — Séparation des diastéréoisomères sur une résine échangeuse d'ions.

a) Mesures des pK des acides D et L-phénylalanyl-L-glutamique et de leurs coefficients de partition entre le Dowex-50 et des tampons de différents pH.

Les déterminations des pK ont été effectuées à l'aide d'un appareil d'électrotitration automatique « Radiometer ».

	pK_1	pK_2	pK_3	Point isoélect.
D ou L-phénylalanine	2.58	9.2		
Acide D ou L-glutamique	2.1	4.07	9.47	
Peptide D	2.96	4.5	7.45	3.73
Peptide L	2.65	4.4	8.0	3.5

On peut voir que les pK_1 et pK_3 des diastéréoisomères montrent des différences assez nettes et que, dès lors, on peut espérer obtenir une séparation des produits par chromatographie sur échangeurs d'ions [8, 9].

De plus, en se servant de mesures à la ninhydrine, on a étudié les coefficients de partition des deux diastéréoisomères entre le Dowex-50 et des solutions de même force ionique mais de différents pH. Ces expériences ont été effectuées à une température de 37,5° C en utilisant un tampon citrate 0,1 M. Les résultats se trouvent dans la figure 1. On remarquera que les courbes représentant le comportement des deux formes se croisent à pH 4,5 : pour des valeurs supérieures, la concentration de la forme L dans la solution est relativement plus élevée, tandis que c'est l'inverse aux pH inférieurs.

Des essais de chromatographie sur colonne de Dowex-50 ont ensuite été entrepris entre les pH 3,9 et 5,7; la meilleure résolution a été obtenue entre les pH 4,8 et 4,9.

b) Séparation chromatographique (voir aussi BLACKBURN et TETLEY [10]).

On se sert d'une colonne de Dowex-50 X4 200-400 mesh, de 1 mètre de hauteur et 0,9 cm de diamètre, maintenue à 37,5° C. L'échangeur d'ions est préparé selon la méthode de MOORE et STEIN [11] modifiée par BLACKBURN et TETLEY [10]. La résine, sous la forme sodique, est mise en suspension dans l'eau distillée et versée dans le tube de verre en cinq portions. On fait passer une solution de NaOH 0,2 N contenant du BRIJ 35 (0,125 %). La résine est ensuite équilibrée en faisant passer 200 ml d'un tampon citrate 0,2 M de pH 4,84 constitué comme suit : 42,016 g acide citrique, 400 ml NaOH N, 20 ml

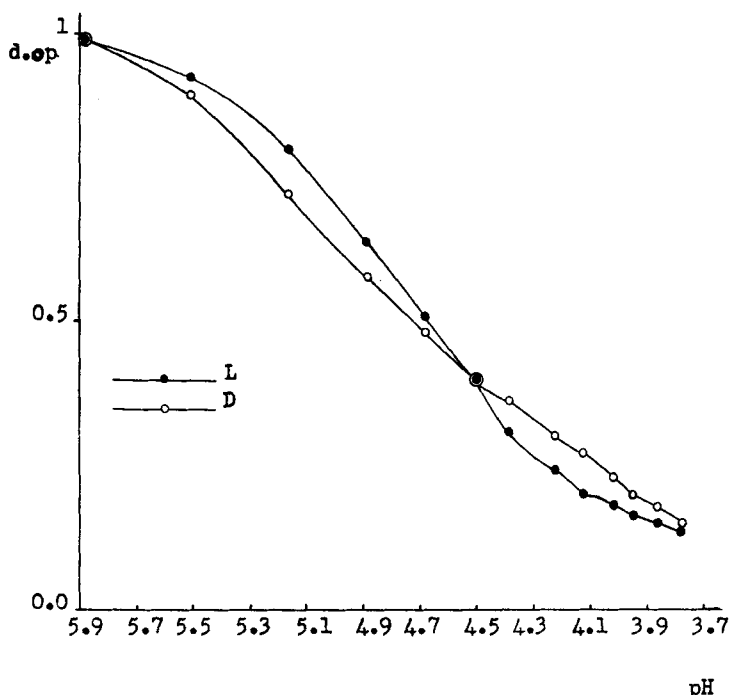


FIG. 1. — Coefficients de partition de l'acide L-phénylalanyl-L-glutamique (points noirs) et de l'acide D-phénylalanyl-L-glutamique (cercles blancs) entre 10 g de Dowex-50 et 10 ml de tampon citrate 0.1 M à différents pH.

HCl N, 5 ml BRIJ 35 à 25 %, 1 g de Titriplex, 10 ml alcool benzylique, eau pour faire 1 litre de solution.

On place sur la colonne 2,55 mg d'acide L-phénylalanyl-L-glutamique et 3,21 mg d'acide D-phénylalanyl-L-glutamique; l'élution se fait avec le tampon citrate et on recueille des fractions de 80 gouttes, soit 2,4 ml, au rythme de 5 gouttes par minute. Les dosages se font à la ninhydrine selon la technique de MOORE et STEIN [12]; le spectrophotomètre Coleman junior est utilisé pour les lectures. La figure 2 montre que les diastéréoisomères sont très bien séparés; le premier pic, qui correspond à la forme L, contient 2,52 mg de produit; dans le deuxième, qui correspond à la forme D, on en retrouve 3,34 mg.

4. — *Application de la méthode pour vérifier la pureté d'un échantillon de L-phénylalanine marquée avec du tritium dans les positions 2 et 3, ayant une activité spécifique de 2 curies par millimole.*

Le produit marqué avait été préparé de la manière suivante : réduction de l'acide α -acétaminocinnamoyl-L-glutamique par l'hydrogène tritié, isolement de l'acide acétyl-L-phénylalanyl-L-glutamique par cristallisation fractionnée, hydrolyse du dipeptide acétylé suivie de purification chromatographique de la L-phénylalanine tritiée (WINAND, BRICTEUX et VERLY [13]).

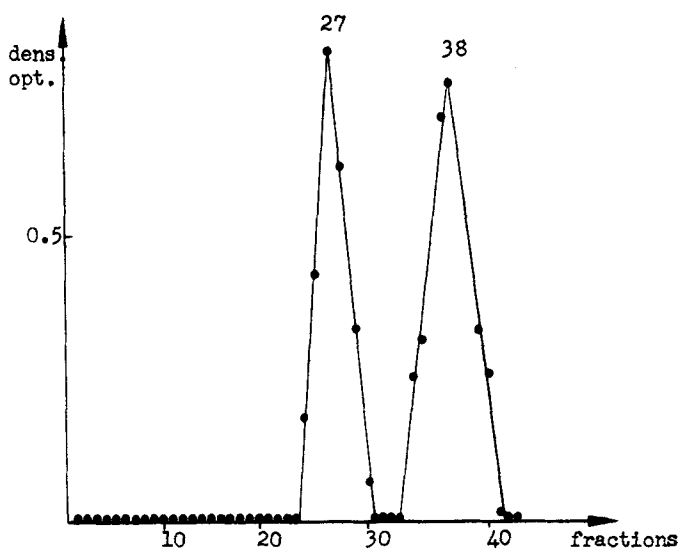


FIG. 2. — Séparation sur Dowex-50 de l'acide L-phénylalanyl-L-glutamique (premier pic) et de l'acide D-phénylalanyl-L-glutamique (deuxième pic).

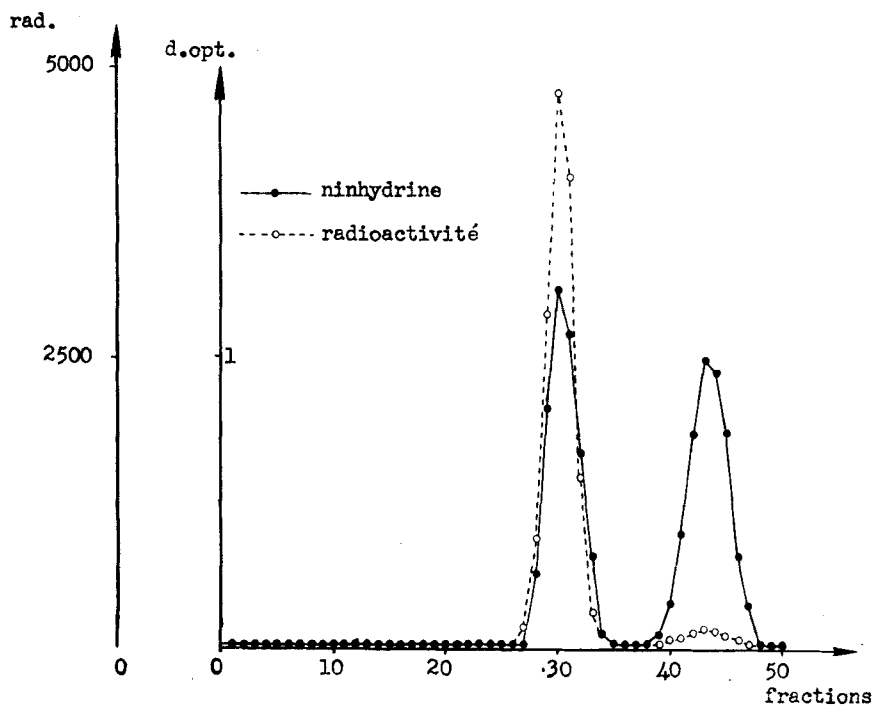


FIG. 3. — Vérification de la pureté radiochimique d'une préparation de L-phénylalanine tritiée. Séparation chromatographique après couplage avec l'acide L-glutamique. Dosages à la ninhydrine (points noirs) et mesures de radioactivité (cercles blancs).

On prend un échantillon de 100 microcuries, c'est-à-dire environ 8 microgrammes du produit, et on y ajoute 405,5 mg de DL-phénylalanine non radioactive. Le mélange est dissous dans l'eau et la solution évaporée à sec sous vide. On réalise la synthèse de l'acide DL-phénylalaninyl-L-glutamique suivant le procédé décrit ci-dessus.

6.84 mg du mélange de diastéréoisomères sont déposés sur la colonne de Dowex-50 et chromatographiés dans les conditions établies précédemment. Les mesures à la ninhydrine révèlent deux pics séparés d'égales surfaces (fig. 3). Les mesures de radioactivité, faites dans un appareil à scintillation liquide après une préparation adéquate des échantillons, montrent que 4,01 % de la radioactivité se trouvent dans le deuxième pic ($1,12 \times 10^5$ d/min. pour $2,69 \times 10^6$ dans le premier pic) et étaient par conséquent sous la forme de l'isomère D dans la L-phénylalanine analysée.

Ce travail a été exécuté dans le cadre du contrat Euratom 038-62-10 RISB.

BIBLIOGRAPHIE

1. MEISTER, A., LEVINTOW, L., KINGSLEY, R. B. et GREENSTEIN, J. — *J. Biol. Chem.*, **192** : 535 (1951).
2. CHILES, H. M. et NOYES, W. A. — *J. Am. Chem. Soc.*, **44** : 1802 (1922).
3. FISHER, E. — *Ber.*, **34** : 453 (1901).
4. BERGMANN, M. et ZERVAS, L. — *Ber.*, **65** : 1192 (1932).
5. VEJDELECK, Z. J. — *C. A.*, **46** : 6103f (1952).
6. DU VIGNEAUD, V. et MILLER, G. L. — *Biochem. prep.*, **2** : 74, Ed. J. Wiley and Sons. New York (1953).
7. VOGEL, A. I. — *Practical organic chemistry*. 997. Ed. Longmans, Green and Co. Ltd. New York (1951).
8. DAVIES, C. W. — *Biochem. J.*, **45** : 38 (1949).
9. DOWMONT, Y. P. et FRUTON, J. S. — *J. Biol. Chem.*, **197** : 271 (1952).
10. BLACKBURN, S. et TETLEY, P. — *Biochem. Bioph. Acta*, **20** : 423 (1956).
11. MOORE, S. et STEIN, W. H. — *J. Biol. Chem.*, **211** : 893 (1954).
12. MOORE, S. et STEIN, W. H. — *J. Biol. Chem.*, **211** : 907 (1954).
13. WINAND, M., BRICTEUX, S. et VERLY, W. G. — Sous presse.