

PREPARATION DE LA D-METHIONINE ( $^{14}\text{C}$ -3) ET DE LA METHIONINE ( $^{14}\text{C}$ -3).

L.Pichat et J.P.Beaucourt

Service des Molécules Marquées

C.E.N.- SACLAY B.P.n° 2, 91 190 -GIF-SUR-YVETTE, France.

Received on October 19, 1973.

## SUMMARY

Carbonation with  $^{14}\text{CO}_2$  of methylthiomethyl lithium provides with a 83% yield 2-methylthio-acetic acid  $1\text{-}^{14}\text{C}$ , the reduction of which with  $\text{LiAlH}_4$  leads to 2-methylthio-1-ethanol- $1\text{-}^{14}\text{C}$  which is transformed into the corresponding chloride by action of tri-*n*-octyl phosphine and  $\text{CCl}_4$ . This chloride condensed with ethyl sodio acetamidomalonate affords ethyl (2-methyl-thioethyl) acetamido malonate which is saponified into to half-ester, the decarboxylation of which leads to ethyl DL 4-methylthio-2-acetamidobutyrate- $3\text{-}^{14}\text{C}$ .

The latter is resolved by hydrolysis with  $\alpha$ -chymotrypsin which gives rise to *N*-acetyl-L-methionine- $3\text{-}^{14}\text{C}$  which is separated from ethyl 4-methylthio-2-acetamido-D-butyrate- $3\text{-}^{14}\text{C}$ . By hydrochloric hydrolysis are obtained respectively L-methionine- $3\text{-}^{14}\text{C}$  and D-methionine- $3\text{-}^{14}\text{C}$  - specific activity: 54 mCi/mMole in respective overall yields 14 and 11% based on barium carbonate  $^{14}\text{C}$ .

- R E S U M E -

La carbonatation avec  $^{14}\text{CO}_2$  du méthylthiométhyllithium a fourni l'acide méthylthio-2 acétique ( $^{14}\text{C}$ -1) avec un rendement de 83 %, dont la réduction par  $\text{LiAlH}_4$  a conduit au méthylthio-2 éthanol-1 ( $^{14}\text{C}$ -1) qui a été transformé en chlorure correspondant par action de la tri-*n*-octylphosphine et  $\text{CCl}_4$ . Le chlorure condensé sur le sodio acétamidomalonate d'éthyle a fourni le (méthylthio-2 éthyl) acétamidomalonate d'éthyle ( $^{14}\text{C}$ -3) qui a été saponifié en monoester dont la décarboxylation a produit le DL-méthylthio-4 acétamido-2 butyrate d'éthyle ( $^{14}\text{C}$ -3). L'hydrolyse par l' $\alpha$ -chymotrypsine donne la *N*-acétyl-

L-méthionine ( $^{14}\text{C}$ -3) que l'on sépare du méthylthio-4 acétamido-2-D-butyrate d'éthyle ( $^{14}\text{C}$ -3). Par hydrolyse chlorhydrique on aboutit respectivement à la L-méthionine ( $^{14}\text{C}$ -3) et à la D-méthionine ( $^{14}\text{C}$ -3) d'activité spécifique : 54 mCi/mM avec des rendements respectifs globaux de 14 et 11 % par rapport à  $^{14}\text{CO}_3\text{Ba}$ .

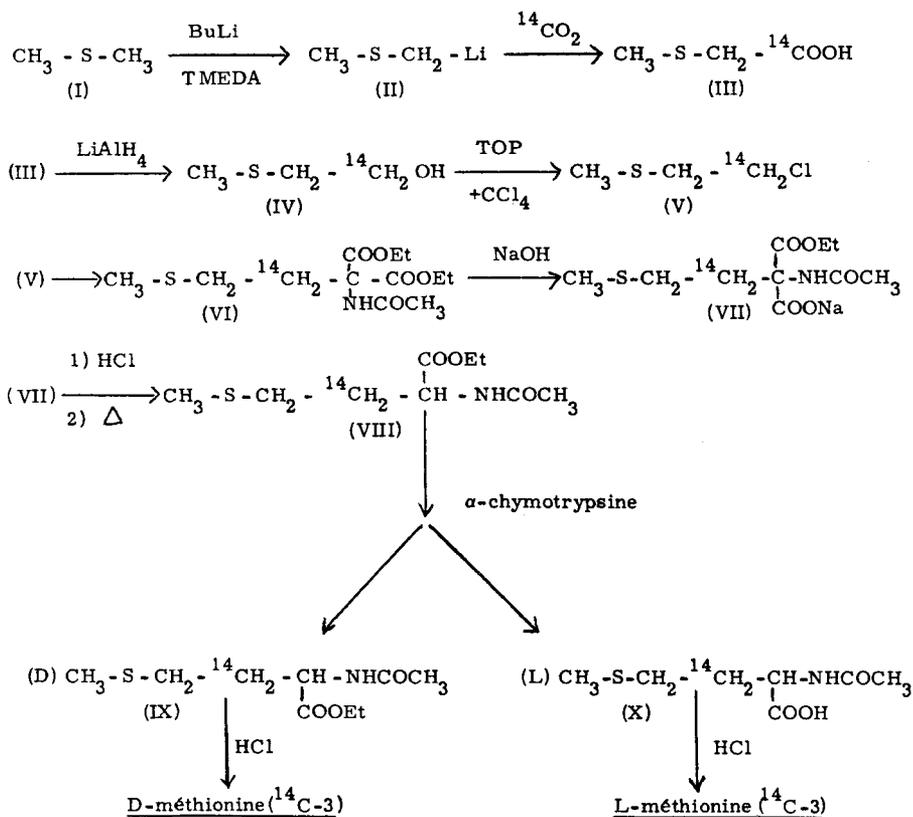
La méthionine joue un rôle important dans les réactions biologiques de méthylation et de sulfuration. Il est donc d'un grand intérêt de posséder de la méthionine marquée par divers isotopes. On trouve dans la littérature différentes synthèses de méthionine  $^{35}\text{S}$  (1, 2, 3, 4, 5), méthionine  $^{14}\text{C}$ - $^{35}\text{S}$  (6), méthionine (méthyl  $^{14}\text{C}$ ) (7, 8, 9), méthionine (carboxyle  $^{14}\text{C}$ ) (10). En outre la chaîne carbonée a été marquée au carbone 14 sur les positions 3-4 (11). La synthèse que nous avons mise au point permet l'obtention dans de bonnes conditions de D-méthionine ( $^{14}\text{C}$ -3) et de L-méthionine ( $^{14}\text{C}$ -3), selon le schéma 1 :

Nous avons préparé l'acide méthylthio-2 acétique (III) par carbonatation avec  $^{14}\text{CO}_2$  entre  $-80^\circ\text{C}$  et  $0^\circ\text{C}$  du méthylthiométhyllithium (II) obtenu par action du complexe de coordination (BuLi - TMEDA) sur le diméthyl sulfure selon D.J. PETERSON (12). La réduction par  $\text{LiAlH}_4$  de l'acide (III) conduit avec un rendement de 83 % au méthylthio-2 éthanol ( $^{14}\text{C}$ -1) (IV).

L'action du chlorure de thionyle sur (IV) nous a bien fourni le chlorure correspondant (V) mais sur les faibles quantités mises en jeu, il n'a pas été possible de séparer (V) des traces de  $\text{SOCl}_2$  qui nuisent au rendement final en méthionine. Nous avons trouvé préférable de préparer (V) par action de la trioctylphosphine et du tétrachlorure de carbone sur (IV), selon une méthode décrite par S. HOOZ et S.S.H. GILANI (13). Il est possible d'obtenir (V) radioactivement pur par un transfert sous vide.

Nous avons tenté de condenser (V) sur le sodio- ou lithio-acétamidomalonate de triméthylsilyle ou sur le sodio-acétamidomalonate de triméthylsilyle et d'éthyle, dans divers solvants (éther, T.H.F., diméthoxyéthane, D.M.F., H.M.P.T.). Tous ces essais ont été infructueux. Il semble que les dérivés sodés ou lithiés d'esters mono- ou bis-(triméthylsilyle) de l'acide acétamidomalonique ne soient stables qu'à une température trop basse pour permettre la réaction avec (V). Par contre, le (méthylthio-2 éthyl)-acétamido-

## SCHEMA I



Note : Abréviations utilisées :

DMF = diméthylformamide

TMEDA = tétraméthyléthylènediamine

HMPT = hexaméthylphosphorotriamide

TOP = trioctylphosphine

BuLi = butyllithium

TMS = tétraméthylsilane.

malonate d'éthyle (VI) est obtenu sans difficultés par action à chaud de (V) sur le sodioacétamidomalonate d'éthyle dans l'éthanol anhydre.

L'hydrolyse partielle du diester (VI) a été effectuée selon (14) par action d'un excès de soude à la température ambiante.

Après neutralisation exacte et chauffage de (VII) à reflux dans le dioxanne, on obtient par décarboxylation le méthylthio-4 acétamido-2 butyrate d'éthyle (VII).

L'action de l'enzyme protéolytique :  $\alpha$ -chymotrypsine selon (14) conduit à l'ester éthylique de la D-acétyl méthionine (IX) et à la L-acétyl méthionine (X). Le composé (IX) est extrait à l'acétate d'éthyle tandis que (X) reste en solution aqueuse au pH utilisé pour l'hydrolyse enzymatique. Après acidification de la solution aqueuse, on extrait (X) à l'acétate d'éthyle.

L'hydrolyse chlorhydrique de (IX) et de (X), conduit respectivement à la D-méthionine ( $^{14}\text{C}-3$ ) et à la L-méthionine ( $^{14}\text{C}-3$ ), radiochimiquement pures sans autres traitements. Chacun des deux composés est obtenu avec un rendement de 15 % environ par rapport au carbonate de départ.

Après purification par chromatographie préparative papier, les rendements respectifs en D et L-méthionine ( $^{14}\text{C}-3$ ) sont de 11 % et de 14 % par rapport au carbonate de baryum mis en oeuvre. La pureté optique de chacun des énantiomères a été contrôlée par action de la D-amino oxydase et radiochromatographie sur papier du produit réactionnel, selon une technique inspirée de (15).

#### - PARTIE EXPERIMENTALE -

Les chromatographies sur plaques sont effectuées sur plaques de gel de silice (Schleicher - Schull F 1500 - LS-254) dans le système de solvants : benzène - acétate d'éthyle (60, 40).

Pour les spectres R.M.N., on a utilisé l'appareil JEOL C-60HL (TMS en référence interne, déplacements chimiques  $\delta$  exprimés en p.p.m. s = singulet ; d = doublet , t = triplet).

#### Acide méthylthio-2 acétique ( $^{14}\text{C}-1$ ) :

Dans un ballon relié à une rampe à vide, 1,4 ml (10 mM) de T.M.E.D.A. fraîchement distillée et séchée sur tamis moléculaire, sont traités par 3,5 ml (8 mM) de n-butyllithium (solution à 25 % dans l'hexane, Fluka Suisse). L'addition est faite lentement pour éviter tout échauffement

sous refroidissement par un bain d'eau. On ajoute ensuite goutte à goutte 0,54 ml (8 mM) de diméthylsulfure (I) (Fluka, Suisse). Le mélange est agité une nuit à la température ambiante. Le vide est fait dans l'appareillage et 30 ml de T.H.F. anhydre sont transférés sous vide dans le ballon réactionnel. On transfère ensuite le <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> obtenu à partir de 200 mCi (3,7 mM) de carbonate de baryum (<sup>14</sup>C). Le ballon réactionnel est placé dans un bain à -80° C, qu'on laisse revenir progressivement à température ambiante. Après hydrolyse par 20 ml d'eau et extraction en continu à l'éther durant 15 heures, la couche aqueuse est acidifiée par 10 ml de HCl(6 N) et extraite en continu à l'éther pendant 15 heures. On obtient 166 mCi (rendement = 83 %) de l'acide (III) qui donne un seul pic radioactif dans une chromatographie sur plaque (Rf = 0,38).

RMN : (CCl<sub>4</sub>) δ = 2,14 ppm (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ; δ = 3,04 ppm (s, 2H, CH<sub>2</sub>) ; δ = 11,40 ppm (s, 1H, COOH).

Méthylthio-2 éthanol (<sup>14</sup>C-1) (IV) :

La solution étherée de (III) est portée à sec à l'évaporateur rotatif sans chauffer. On reprend par 50 ml d'éther anhydre et on traite par 800 mg de LiAlH<sub>4</sub> une heure à température ambiante, puis trois heures à reflux. Après destruction de l'excès d'hydrure, on extrait en continu à l'éther durant 96 heures. On obtient 125 mCi de (IV) qui, chromatographié sur plaque présente un seul pic radioactif de Rf = 0,04.

RMN : (CCl<sub>4</sub>) δ = 2,0 ppm (s, 3H, CH<sub>3</sub>) ; δ = 2,20 ppm (s, 1H, OH) ; δ = 2,54 ppm (t, 2H, J = 6 Hz, CH<sub>2</sub>) ; δ = 3,58 ppm (t, 2H, J = 6 Hz, CH<sub>2</sub>).

Méthylthio-2 chloro-1 éthane (<sup>14</sup>C-1) (V) :

La solution étherée de (IV) est séchée sur sulfate de sodium. Après filtration et rinçage à l'éther anhydre, l'éther est distillé doucement au moyen d'une colonne Vigreux, le chauffage étant réalisé par un bain d'huile à 65° C. Quand une grande partie de l'éther a distillé, le mélange réactionnel est transféré dans un ballon forme poire de 25 ml et on distille à nouveau le maximum d'éther dans les mêmes conditions. La distillation est arrêtée quand il ne reste plus qu'environ 2 ml de solution au fond du ballon. Après refroidis-

sement, on ajoute 0,45 ml (4,6 mM) de  $\text{CCl}_4$  anhydre. On refroidit à  $0^\circ\text{C}$  et on ajoute très prudemment et goutte à goutte 2,2 ml (4,6 mM) de trioctylphosphine. On agite une nuit à température ambiante. On ajoute alors 4 ml de D.M.F. et on transfère sous vide secondaire dans un ballon refroidi à l'azote liquide jusqu'à ce que toute l'activité soit transférée.

On obtient ainsi 120 mCi de (V) dont le Rf dans une chromatographie sur plaque est de 0,82. Il reste environ 10 % d'alcool n'ayant pas réagi.

#### Méthylthio-2 éthyl- $\alpha$ -acétamido malonate d'éthyle (VI) :

La solution transférée contenant 120 mCi de (V) est diluée par 10 ml d'éthanol anhydre et ajoutée en 10 minutes à 4,6 mM de sodioacétamidomalonnate d'éthyle, lui-même obtenu par action de 106 mg (4,6 mM) de sodium sur 998 mg (4,6 mM) d'acétamidomalonnate d'éthyle. On agite à l'abri de l'humidité 10 minutes à la température ambiante, puis 15 heures à  $60^\circ\text{C}$ . Après refroidissement, on filtre le NaCl formé sur fritté n° 4 et on le rince à l'éthanol. On obtient 110 mCi de (VI) radiochimiquement pur comme le montre une chromatographie sur plaque (Rf = 0,65).

#### Méthylthio-4 acétamido-2 butyrate d'éthyle (VIII) :

A la solution éthanolique contenant 110 mCi (2 mM) de (VI), on ajoute 1 ml de soude 5 N (5 mM). On agite une heure à température ambiante. Une chromatographie dans les conditions ci-dessus montre un pic actif principal correspondant au sel de sodium de (VII), de Rf = 0,06. Deux impuretés actives représentent environ 20 % de l'activité totale. La solution est neutralisée exactement par HCl(N) et évaporée à sec. Les deux impuretés actives, volatiles, sont éliminées lors de cette évaporation. Il reste (VII), produit cristallisé blanc qui est séché sur potasse et sous vide. On reprend par 50 ml de dioxanne et on chauffe 3 heures à reflux. Après refroidissement, on filtre le précipité de NaCl.

L'activité de la solution est de 80 mCi. La chromatographie dans les conditions ci-dessus montre un pic principal correspondant à (VIII) (Rf = 0,29) et 15 % environ d'impureté active (Rf = 0,3).

Hydrolyse enzymatique du groupe ester :

La solution précédente est portée à sec et le résidu est repris par 50 ml d'une solution 0,1 N de KCl contenant 7 mg de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . On agite vigoureusement et on chauffe au bain d'huile à 37° C. Le pH de la solution est ajusté à pH 7 par addition de soude normale (pH initial = 3). On ajoute alors 30 mg d' $\alpha$ -chymotrypsine (Boehringer Mannheim, R.F.A.) et on maintient le pH à la valeur constante 7,2 par addition de soude 0,1 N dont le débit est réglé par un pH-stat. Au bout d'une heure, la quantité théorique de soude a été ajoutée, soit 6,2 ml (compté tenu des 15 % d'impuretés actives). Après 3 heures, toute addition de soude a cessé. L'extraction par un grand volume d'acétate d'éthyle permet d'obtenir 33 mCi de (IX) (un seul pic actif de  $R_f = 0,06$  dans le système de chromatographie ci-dessus). La solution aqueuse restante est acidifiée par 10 ml de HCl 6 N et extraite par un grand volume d'acétate d'éthyle, ce qui donne 33 mCi de (X) radiochimiquement pur par chromatographie sur plaque de gel de silice ( $R_f = 0,05$  dans benzène - acétate d'éthyle (60 - 40) et  $R_f = 0,81$  dans butanol - acide acétique - eau (50 - 25 - 25). Les deux solutions sont portées à sec.

D-Méthionine (<sup>14</sup>C-3) :

(IX) est repris par 20 ml du mélange HCl - HCOOH (1 - 1) et on chauffe 15 heures à reflux. On obtient 33 mCi de D-méthionine (<sup>14</sup>C-3) contenant moins de 5 % d'impuretés actives. Rendement global : 16 %.

L-Méthionine (<sup>14</sup>C-3) :

L'hydrolyse chlorhydrique effectuée dans des conditions identiques à celles utilisées pour l'isomère D, donne 33 mCi de L-méthionine (<sup>14</sup>C-3) d'une pureté active supérieure à 95 %. Rendement global : 16 %.

Purification et contrôles :

La L-méthionine et la D-méthionine sont purifiées par chromatographies préparatives sur papier Whatman n° 3 (chacune sur deux feuilles 60 cm x 50 cm) dans le système de solvant : butanol, acide formique, eau (75, 15, 10).

L'activité est repérée par autoradiographie et l'élution se fait par l'eau tridistillée contenant 10 % d'acide formique. Le contrôle de pureté est fait à l'aide d'un autoanalyseur d'acides aminés (JEOL) et par chromatographie sur papier Whatman n° 3 dans les systèmes de solvants :

Butanol - Acide formique - Eau (50 - 25 - 25)

t-Butanol - Méthyléthylcétone - Eau - Ammoniaque (40 - 30 - 20 - 10)

t-Butanol - Méthanol - Eau - Pyridine (35 - 40 - 20 - 5).

Ces contrôles montrent une seule impureté active, identifiée à la méthionine sulfoxyde et représentant moins de 2 % de l'activité totale. La L- et la D-méthionine sont conservées à sec, sous azote et à -20° C. En solution aqueuse il se forme rapidement le sulfoxyde.

On a ainsi obtenu 27 mCi de L-méthionine ( $^{14}\text{C}$ -3) (Rdt. global : 14 %) et 22 mCi de D-méthionine ( $^{14}\text{C}$ -3) (Rdt. global : 11 %). L'activité spécifique est de 54 mCi/mM (déterminée par dosage sur l'analyseur automatique d'acides aminés).

#### Contrôle de la pureté optique :

##### 1) L-méthionine ( $^{14}\text{C}$ -3) :

100  $\mu\text{Ci}$  de L-méthionine ( $^{14}\text{C}$ -3) sont ajoutés à 1 ml de tampon de pyrophosphate de sodium 0,1 M à pH 8,1. Sous atmosphère d'oxygène, on ajoute 5 mg de D-aminoxydase (N.B.C., Cleveland - U.S.A.). Pendant 6 heures, on agite vigoureusement à température ambiante, sous atmosphère d'oxygène. Après acidification de la solution, les chromatographies sur papier Whatman n° 1 dans les solvants utilisés pour le contrôle de la pureté radiochimique, montrent un pic actif de méthionine et un pic actif de sulfoxyde (2 % environ). Aucune trace d'isomère D n'a été décelée par cette méthode qui permet de déceler 1 % d'impureté.

Un essai témoin effectué dans les mêmes conditions sur la D-méthionine a permis de contrôler l'activité du lot de D-aminoxydase qui a donné une transformation complète.

##### 2) D-méthionine ( $^{14}\text{C}$ -3) :

On opère de même en traitant 100  $\mu\text{Ci}$  de D-méthionine ( $^{14}\text{C}$ -3) par

la L-aminooxydase (N.B.C.) dans un tampon "tris" 0,1 M à pH 7,2. Le degré de pureté optique est supérieur à 99 %. L'activité du lot de L-aminooxydase utilisé est également contrôlée par action sur de la L-méthionine.

- BIBLIOGRAPHIE -

- (1) L. PICHAT, G. MADEGARD, M. HERBERT  
Bull. Soc. Chim. France, 1961, 2420.
- (2) H. NAITO, M. KANDATSU  
Nippon Nogeï Kagaku Kaishi 1967, 41, 406.
- (3) K. HEISE, E. MITTAG  
Kerenergie 1965, 8, 181.
- (4) H. TARVER, C.L.A. SCHMIDT  
J. Biol. Chem. 1939, 130, 67.
- (5) G.W. KILMER, V. du VIGNEAUD  
J. Biol. Chem. 1944, 154, 247.
- (6) K. SAMUCHOCKA, J. KOWALCZYK  
Radiochem. Radioanal. Letters 1970, 4, 131.
- (7) R.A. RONZIO, W.B. ROWE, A. MEISTER  
Biochem. 1969, 8, 1066.
- (8) P.T. ADAMS, M. KIRK, A. KLEERUP, B.M. TOLBERT  
U.C. R.L. 1956, 22, 3351.
- (9) D.B. MELVILLE, J.R. RACHELE, E.B. KELLER  
J. Biol. Chem. 1947, 169, 419.
- (10) J.P. GUERMONT, D. SHAREFKIN, L. PICHAT  
Rapport C.E.A. n° R 2989 (1966).
- (11) F. SCHLENK, R.L. SMITH  
J. Biol. Chem. 204, 27 (1953).
- (12) D.J. PETERSON  
J. Org. Chem. 1967, 32, 1717.

- (13) J. HOOZ, S.S.H. GILANI  
Can. J. Chem. 1968, 46, 86.
- (14) A. BERGER, M. SMOLARSKY, N. KURN, H.R. BOSSHARD  
J. Org. Chem. 1973, 38, 457.
- (15) A. MEISTER, L. LEVINTOW, R.B. KINGSLEY, J.P. GREENSTEIN  
J. Biol. Chem. 1951, 192, 535.