

APPLICATION D'UNE METHODE NON SPECIFIQUE DE TRITIATION DE MOLECULES ORGANIQUES.

O. Buchman, I. Pri-Bar, M. Shimoni et L. Smoskowitz.
Atomic Energy Commission, Nuclear Research Centre-
Negev, P.O.B.9001, Beer-Sheva, Israel.
Received on January 17th 1974.

SUMMARY

A method for labelling organic molecules using gaseous tritium has been applied to the general labelling of some complex structural compounds. Experimental results are given, including the specific activities obtained. The effectiveness of the labelling by platinum black, generated in situ by tritium, has been compared to the poor exchange yields obtained when the catalyst is activated by hydrogen before use. Raising the reaction temperature increases the specific activity of the tritiated compound.

RESUME

Une méthode de marquage de molécules organiques par l'entremise du tritium gazeux a été appliquée à la tritiation non spécifique d'une trentaine de dérivés de structure complexe. Les résultats expérimentaux, comprenant les activités spécifiques obtenues, sont donnés. L'efficacité de la tritiation catalysée par le noir de platine, formé in situ par le tritium, a été comparée aux faibles rendements d'échange obtenus lorsque le catalyseur est activé, au préalable, par l'hydrogène. Une élévation de la température de réaction augmente l'activité spécifique du substrat tritié.

INTRODUCTION

Une des méthodes de tritiation actuellement employées pour le marquage

général de molécules organiques consiste en l'échange isotopique hydrogène-tritium par catalyse du noir de platine activé⁽¹⁻³⁾. Cette méthode permet d'atteindre des activités spécifiques nettement supérieures à celles obtenues par exposition du substrat au tritium gazeux, selon Wilzbach^(4,5a).

Dans la tritiation catalytique hétérogène effectuée en phase liquide, la radioactivité du substrat marqué est fonction de l'activité spécifique du donneur de tritium et de la constante d'équilibre de la réaction d'échange. L'agent de tritiation généralement employé est l'eau tritiée ou l'acide acétique marqué au tritium^(5b).

Un procédé simple de tritiation par échange catalytique a été récemment décrit⁽³⁾. Il combine les facilités de manipulation du tritium gazeux à l'efficacité de l'échange catalytique en solution. L'intérêt de la méthode consiste en la formation in situ d'oxyde de tritium (T_2O) à très haute activité spécifique (58 Ci/mole) et obtention simultanée de sites d'échange actifs à la surface du catalyseur métallique (noir de platine) par action réductrice du tritium gazeux sur l'oxyde de platine (PtO_2). Les quantités limitées de tritium engagées (7 à 25 Ci) lors de l'activation du catalyseur produisent un agent de tritiation dissous dont la radioactivité est de l'ordre de 10 à 50 Ci/ml.

Nous avons appliqué cette méthode de tritiation avec succès à de nombreux composés organiques de structure moléculaire variée et présentant un intérêt biologique ou pharmaceutique.

PARTIE EXPERIMENTALE

La méthode de tritiation a été précédemment décrite⁽³⁾ et a été scrupuleusement suivie. Les tritiations ont été effectuées sur une rampe à vide capillaire classique⁽⁶⁾ couramment utilisée pour les transferts et les manipulations de tritium gazeux. Le solvant choisi, faisant fonction de milieu

d'échange, a été écarté en fin de réaction par cryo-sublimation. C'est pourquoi, la préférence a été donnée, dans la mesure du possible, à un solvant ayant une tension de vapeur élevée. Le produit brut de réaction a été rincé plusieurs fois au méthanol qui a été séparé, chaque fois, par cryo-sublimation. Ainsi, les atomes de tritium "labiles" ont été écartés par leur échange rapide avec les atomes d'hydrogène du solvant.

Il a été nécessaire d'ajouter du charbon actif afin de filtrer aisément le catalyseur. En effet, le noir de platine formé est si finement divisé qu'il n'est pas retenu par un filtre "Millipore" de 100 μ . Dans la majorité des cas, le produit brut de tritiation a été accompagné d'un faible pourcentage d'impuretés radiochimiques, facilement séparables. Les techniques de purification ont été adaptées aux propriétés propres à chaque composé tritié.

La pureté chimique a été déterminée par UV (Perkin-Elmer 402 Ultra-Violet and Visible Spectrophotometer), par IR (Perkin-Elmer 257 Grating Infrared Spectrophotometer), par GLC (F & M 810 Research Chromatograph) et par CCM sur plaques analytiques de Silica Gel F_{254} (0.25 mm).

Le rendement chimique a été déterminé par pesée, par UV ou par GLC. La pureté radiochimique a été contrôlée par radiochromatogramme (Berthold LB 2722 Dünnschicht Scanner 11) des plaques de CCM développées dans les systèmes de solvants adéquats.

Les activités globale et spécifique ont été mesurées par scintillation liquide (Packard 3004 Liquid Scintillation Spectrometer).

Réactifs: oxyde de platine: B.D.H. ($PtO_2 \cdot x H_2O$)
tritium gazeux: C.E.A.

les composés à tritier sont de diverses origines et ont été utilisés tels quels.

RESULTATS ET DISCUSSION

Les techniques de tritiation impliquent certaines limitations qui

n'existent pas lors de l'échange par le deutérium. Dans ce dernier cas, il est possible d'obtenir un échange pratiquement quantitatif⁽⁷⁾ par mise en oeuvre d'un grand excès d'agent de deutération. Le marquage au tritium, par contre, est limité par la teneur globale en radioactivité du donneur de tritium. L'utilisation d'un agent de tritiation à très forte activité spécifique entraîne, nécessairement, son emploi à faible concentration; ceci, pour des raisons de protection ou d'ordre économique. Il en résulte un déplacement de l'équilibre d'échange qui défavorise la tritiation du substrat.

La procédure de tritiation catalytique que nous avons appliquée est intéressante du fait qu'elle permet d'obtenir des activités spécifiques relativement élevées, alors que la réaction est réalisée à température ambiante. Les résultats, groupés dans le Tableau I, donnent un aperçu de la diversité des composés organiques qui ont été tritiés par la méthode décrite.

L'efficacité de l'activation du catalyseur in situ par le tritium a été vérifiée par une série d'essais comparatifs. Les composés étudiés (Tableau II) ont été tritiés dans des conditions identiques en présence du catalyseur activé de deux manières différentes:

- a) réduction préalable de PtO_2 par l'hydrogène et addition de T_2O préparé séparément;
- b) réduction de PtO_2 in situ par le tritium, dans le ballon réactionnel.

Dans le cas a), après réduction de PtO_2 , une quantité de T_2O correspondant à celle qui se forme par réduction in situ, a été introduite dans le ballon réactionnel.

Il ressort des résultats précédents (Tableau II) que, quand l'échange implique des atomes d'hydrogène liés au noyau benzénique, l'efficacité de T_2O formé à la surface du catalyseur est supérieure à celle de T_2O ajouté au catalyseur activé. Il semble donc que deux facteurs interviennent dans le rendement de la tritiation: a) la formation simultanée de T_2O et de sites

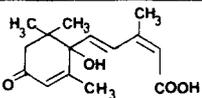
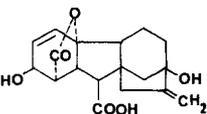
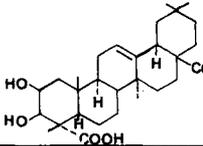
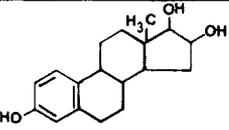
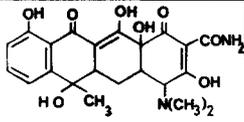
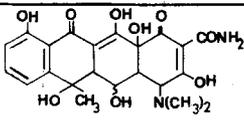
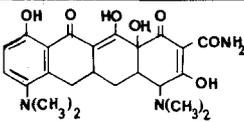
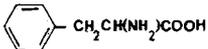
TABLEAU I : Tritiation non Spécifique par Catalyse du Platine Activé <u>in situ</u>						
Composé tritié	Structure	Poids mg	Solvant	Impuretés radioact. %	Activ. Spécif.* mCi/mmole	
Acide Abscisique		50	Méthanol	60	431	
Acide Gibbérellique		69	Méthanol	3	616	
Acide Médicagénique		46	Dioxanne	2	243	
Estriol		31	Dioxanne	3	1.430	
Tétracycline		64	Méthanol	5	121	
Oxytétracycline		50	Eau	48	190	
Minocycline		220	Méthanol	2	326	
L-Phénylalanine		54	Eau	7	435	

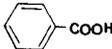
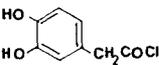
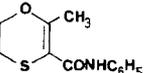
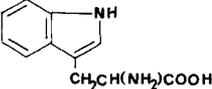
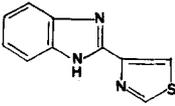
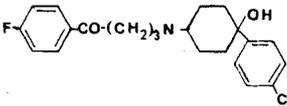
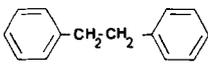
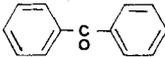
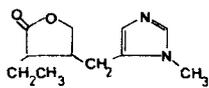
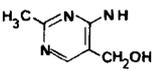
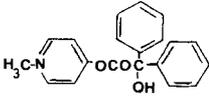
TABLEAU I (suite)					
Composé tritié	Structure	Poids mg	Solvant	Impuretes radioact. l	Activ. Specif. mCi/mmole
Procainamide		150	Eau	33	163
Acide Benzoïque		16	Méthanol	2	68
4-chloroacétyl catéchol		100	Méthanol	1	230
Vitavax		150	Méthanol	2	216
L-Tryptophane		63	Eau	2	213
Thiabendazole		102	DMSO	60	28
Halopéridol		46	Méthanol	10	397
Bibenzyle		22	Méthanol	1	541
Benzophénone		25	Méthanol	3	354

TABLEAU 1 (suite)					
Composé tritié	Structure	Poids mg	Solvant	Impuretés radioact. %	Activ. Spécif. ⁺ mCi/mmole
α -(2,4-dichlorophényl)- α -phényl-5-pyrimidine-méthanol (triarimol)		60	Méthanol	5	92
Indéral		73	Méthanol	5	105
Estradiol monobenzoate		48	Méthanol	20	665
Estradiol dibenzoate		51	Méthanol	20	1.530
Cyproheptadine		100	Méthanol	5	1.320
Sandomigran (malate)		100	AcOH 10%	2	265
Chlorpromazine		111	Méthanol	2	2.030
Perphénazine		140	Méthanol	3	1.140

TABLEAU I (suite)					
Composé tritié	Structure	Poids mg	Solvant	Impuretés radioactif. †	Activ. Spécif. mCi/mmole ⁺
Pilocarpine		130	Méthanol	8	75
2-méthyl-4-amino-5-hydroxyméthylpyrimidine		70	Méthanol	5	33
N-Méthyl-4-pipéridyl-benzilate		52	Dioxanne	28	6.300

+ Activité spécifique déterminée sur produit purifié.

Conditions expérimentales: Oxyde de platine: 20 - 80 mg; tritium gazeux: 7 - 25 Ci (0.12-0.42 mmole)
 solvant: 0.3 - 2 ml; température: 25°C; temps de réaction: 16 - 18 h.

TABLEAU II

Efficacité de l'Echange en Fonction du Mode d'Activation

Composé tritié	Activité Spécifique mCi/mmole	
	Platine activé par H ₂	Platine activé par T ₂
Acide Benzoïque	2	68
Benzophénone	8	354
Bibenzyle	9	541

Conditions expérimentales: Composé: 16 - 25 mg (0.12 mmole);
 tritium gazeux: 7 Ci (0.12 mmole); oxyde de platine: 60 mg;
 température: 25°C; solvant: 0.3 ml méthanol; temps de réaction: 18 h.

actifs sur le platine; b) le nombre de sites actifs ayant adsorbé l'oxyde de tritium. Lors de l'échange in situ, la fraction de sites actifs adsorbant l'oxyde de tritium est plus importante que dans la méthode par pré-activation du catalyseur; ces centres réactifs sont alors partiellement occupés par les molécules d'eau formées.

Lorsque l'échange est catalysé par le platine activé par H_2 , il est généralement nécessaire d'élever la température du milieu réactionnel à 100-120°C afin d'obtenir une tritiation suffisante^(*), ce qui exclut la possibilité de traiter des composés sensibles à la chaleur. Dans les réactions que nous avons effectuées, l'échange isotopique est satisfaisant à température ambiante (Tableau I). Toutefois, nous avons vérifié que l'activité spécifique d'un substrat tritié, thermiquement stable, peut être améliorée par une élévation de température (Tableau III).

Nous avons aussi mis en évidence qu'il est possible d'augmenter l'activité spécifique d'un composé donné par diminution du poids du substrat à tritier ou par augmentation de la concentration en oxyde de tritium dans le milieu d'échange.

TABLEAU III

Effet de la Température sur l'Activité Spécifique

<u>Composé tritié</u>	<u>mg</u>	<u>Solvant</u>	<u>Impur. radioact.%</u>		<u>Act. Spécif. mCi/mmole</u>	
			<u>25°C</u>	<u>60°C</u>	<u>25°C</u>	<u>60°C</u>
Estriol	31	Dioxanne	3	13	1.430	2.820
Indéral	75	Méthanol	5	10	105	320
Perphénazine	140	Méthanol	3	10	1.140	10.800

Conditions expérimentales: oxyde de platine: 80 mg; solvant: 2 ml;
tritium gazeux: 25 Ci; temps de réaction: 18 h.

CONCLUSIONS

Cette procédure de tritiation non spécifique offre une alternative intéressante lorsque le marquage par synthèse est d'accès difficile.

REMERCIEMENTS

Nous remercions vivement Mlle A. Cohen pour son assistance technique.

R E F E R E N C E S

1. GARNETT, J.L., *Nucleonics*, 20: 86 (1962).
2. LEITCH, L.C., *Can. J. Chem.*, 32: 813 (1954).
3. PRI-BAR, I. and BUCHMAN, O., *Chem. Commun.*, 1631 (1970).
4. WILZBACH, K.E., 79: 1013 (1957).
- 5 a) EVANS, E.A., dans "Tritium and its Compounds", Butterworths publ., London, 1966, pp. 110-119.
- b) EVANS, E.A., dans "Tritium and its Compounds", Butterworths publ., London, 1966, pp. 123, 128.
6. WENZEL, M. and SCHULZE, P.E., dans "Tritium-Markierung", Walter de Gruyter & C° edit., Berlin, 1962, p. 19.
7. GARNETT, J.L. and SOLLICH-BAUMGARTNER, W.A., *J. Phys. Chem.*, 69: 1850 (1965).
8. GARNETT, J.L. and SOLLICH, W.A., *J. Catalysis*, 2: 350 (1964).