

NON SPECIFICITE DE MARQUAGE DANS LE CAS

DE TRITIATION PAR DESHALOGENATION CATALYTIQUE :

CAS DE LA PAPAVERINE.

J. DEVILLERS*, M. WINAND** et B. BETTENS***

*Institut National des Radioéléments et Université Libre de Bruxelles
(Faculté des Sciences Appliquées)

**Institut National des Radioéléments - Fleurus (Belgique)

***Chimie Générale et Radioactivation - Université Libre de Bruxelles
(Faculté des Sciences Appliquées)

Received on October 10, 1975

Summary

The tritium labelling of papaverine by catalytic deshalogenation of monobromopapaverine gives a compound whereof the specific radioactivity is 43 Ci/mM. Our results have shown that only 49 % of this radioactivity came from the substitution of bromine by tritium ; 46 % are located in the methylen group while the remaining 5 % are distributed over the other positions.

Résumé

Le marquage au tritium de la papavérine par déshalogénéation catalytique de la monobromopapavérine conduit à un produit dont la radioactivité spécifique est de 43 Ci/mM. Nos résultats ont montré que seulement 49 % de cette radioactivité résultent de la substitution du brome par le tritium ; 46 % sont localisés dans le groupe méthylène tandis que les 5 % restants sont répartis sur les autres positions.

INTRODUCTION

Il est fréquent d'utiliser la déshalogénéation catalytique pour tritier des composés organiques. La méthode consiste à substituer un ou plusieurs atomes d'halogènes par un ou plusieurs atomes de tritium. Les conditions expérimentales sont souvent comparables à celles des réductions de composés non saturés. On sait que ces deux méthodes ont deux avantages évidents :

- l'obtention de très hautes radioactivités spécifiques ;
- une excellente spécificité de marquage.

Si le premier avantage est toujours réel, nous montrons dans ce travail que le second doit être considéré avec la plus grande prudence.

La littérature mentionne quelques cas de non spécificité de marquage dans le cas de réductions catalytiques de composés oléfiniques. Un cas bien connu est celui de la préparation de l'acide stéarique tritié par hydrogénation catalytique de l'acide élaïdique. La déshydrogénation biochimique de l'acide stéarique obtenu donne alors l'acide oléique dont la radioactivité spécifique est beaucoup plus élevée qu'attendu (1) ; l'analyse de l'acide oléique tritié (1, 2) montre que seulement 15 % du tritium incorporé est au niveau des carbonés 9 et 10. La raison de cette non spécificité de marquage est un glissement de la double liaison le long de la chaîne hydrocarbonée.

Ce phénomène bien connu a été constaté pour la première fois en 1919 par Moore (3). Cet auteur ainsi que Waterman et Van Vlodrop (4) ont été les premiers à constater une migration de doubles liaisons dans le cas du méthyl oléate.

Taylor (5) et Feuge (6) ont proposé un mécanisme susceptible d'expliquer l'apparition d'un glissement de la double liaison d'un butène lors de son exposition à des conditions d'hydrogénation catalytique. Le processus proposé est radicalaire et se produit une fois que les composés sont chimisorbés sur le catalyseur.

Plus récemment, Dutton et Cie (7) ont étudié le glissement de la double liaison observé dans le cas de la deutériation catalytique du méthyl oléate. Les techniques utilisées sont : la spectroscopie dans l'infrarouge, la résonance magnétique nucléaire et la spectrométrie de masse. Comme souvent (1, 2) la position de la double liaison est également déterminée par clivage oxydatif.

Les cas de non spécificité de marquage dus aux glissements de doubles liaisons sont donc bien connus et on s'attend à ce que le phénomène se produise lors de chaque hydrogénation de chaînes hydrocarbonées.

Indépendamment de ces migrations, la littérature mentionne quelques cas où l'on observe 5 à 10 % de tritium fixé non spécifiquement (8, 9, 10).

Dans le cas des déshalogénations catalytiques, la spécificité de marquage a été peu étudiée. On peut citer le cas de la déshalogénéation du 7 α -bromo-cholestérol (11, 12, 13). Suivant les auteurs, les spécificités de marquage obtenues sont respectivement 70, 80 et 93 %. Il semblerait que ces différents résultats soient dus à une non spécificité du précurseur halogéné.

Nagatsu, Lewitt et Underfriend (14) ont également étudié un cas de non spécificité lors de la mise au point de leur radioessai de la tyrosine-hydroxylase. Ils observent une non spécificité de marquage de 15 % environ et sont obligés d'apporter une correction à leurs résultats. On comprend aisément ici l'importance des conséquences que peut avoir une non spécificité à laquelle on ne s'attend pas.

Les catalogues commerciaux mentionnent de nombreux composés tritiés préparés par déshalogénéation catalytique et pour beaucoup, on peut se demander dans quelles mesures la spécificité de marquage est susceptible

d'évoluer. Il est étonnant de constater que la quasi totalité de ces produits sont vendus comme étant " spécifiquement " marqués. Le cas de la papavérine (spécificité de seulement 49 %) nous donne pleinement raison quant à la méfiance dont il faut faire preuve vis-à-vis de la spécificité de marquage d'un composé tritié préparé par déshalogénéation catalytique.

Méthodes et dispositifs expérimentaux

Analyse du précurseur

Le précurseur utilisé est la 6,7 diméthoxy-1-[3,4 diméthoxy - 6 bromobenzyl] isoquinoline (bromopapavérine) préparée selon Decker et Girard (15) par action de l'eau de brome sur la 6,7 diméthoxy-1-[3,4 diméthoxybenzyl] isoquinoline (papavérine).

Il est indispensable de tester la pureté chimique du précurseur et de contrôler la spécificité de la bromation. En effet, la présence de papavérine (ou d'autres impuretés) dans le précurseur compromettrait l'obtention d'une radioactivité spécifique maximum. De plus, la spécificité de la bromation doit être effective afin de ne tritier que la position 6 du groupement benzyle de la molécule.

Dans ce but une analyse élémentaire donne, comme pourcentages :

Calculés : C=57.45 H=4.80 N=3.35 Br=19.12

Trouvés : C=57.35 H=4.70 N=3.40 Br=19.08. L'examen du spectre de résonance nucléaire magnétique indique clairement la présence d'un seul brome d'une part, l'occupation de la position 6 d'autre part. Ces résultats sont encore confirmés par chromatographie en couche mince. Parmi les différents systèmes essayés, seuls les solvants d'éluion suivants permettent de séparer avec une excellente résolution la bromopapavérine et la papavérine sur gel de silice.

TABLEAU 1

Systèmes	Solvants	Produits	Rf
1	Cyclohexane - benzène - diéthylamine (75 - 15 - 10)	Papavérine	0.18
		Papavéraldine	0.28
		Br-papavérine	0.30
2	Benzène - tétrahydrofurane - méthanol (75 - 25 - 5)	Papavérine	0.56
		Papavéraldine	0.70
		Br-papavérine	0.71

Les photographies prises sous éclairage ultraviolet des deux couches minces analytiques (fig. 1) montrent d'une part l'excellente résolution papavérine - bromopapavérine et l'absence de papavérine dans le précurseur (soit moins de 1 % par cette technique).

Tritiation, purification et analyse

La déshalogénéation est réalisée dans une rampe en pyrex constituée en grande partie de tubes capillaires (fig. 2). La pompe Toeppler permet de maintenir la pression à une valeur légèrement inférieure à la pression atmosphérique dans l'ampoule de réaction.

Cette réaction se fait au départ de 21 mg (0,05 mM) de précurseur bromé et de tritium gazeux légèrement en excès de façon à maintenir la pression constante jusqu'à réduction complète.

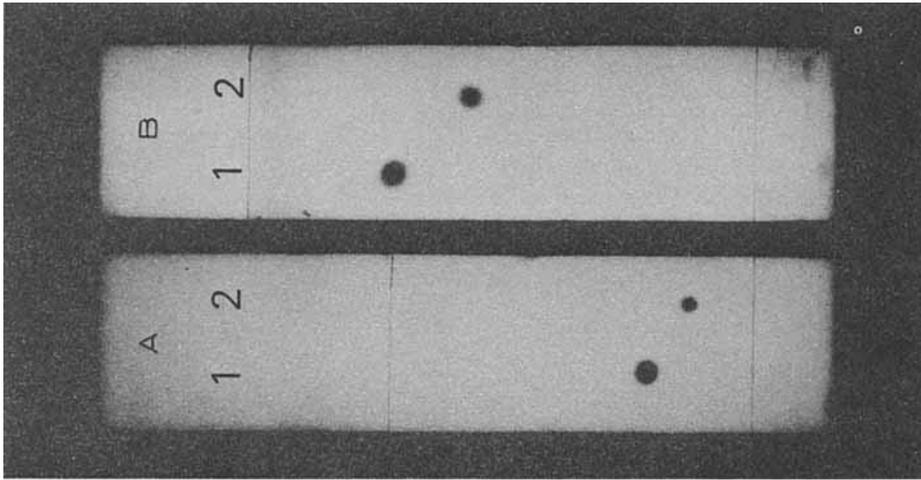


Fig. 1. Chromatographies analytiques du précurseur.
 1 : bromopapavérine 2 : papavérine
 Système 1 : plaque A ; système 2 : plaque B.
 (cf. tableau 1).

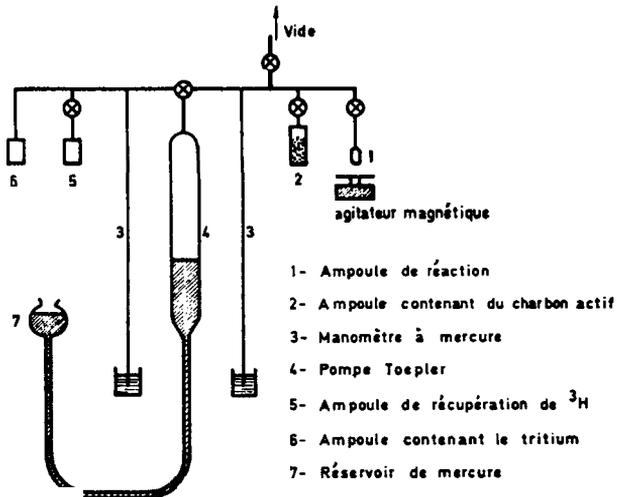


Fig. 2: DISPOSITIF DE TRITIATION

Le palladium (10 %) sur charbon est utilisé comme catalyseur à raison de 20 mg, tandis que la triéthylamine en excès (0,7 mM) permet de capter l'acide bromhydrique formé en cours de réaction. Le solvant utilisé est le dioxanne (2 ml).

Après une durée de 4 heures, la réduction est complète et l'excès de tritium est récupéré sur charbon actif ; on isole alors l'ampoule de réaction de la rampe en scellant le tube capillaire.

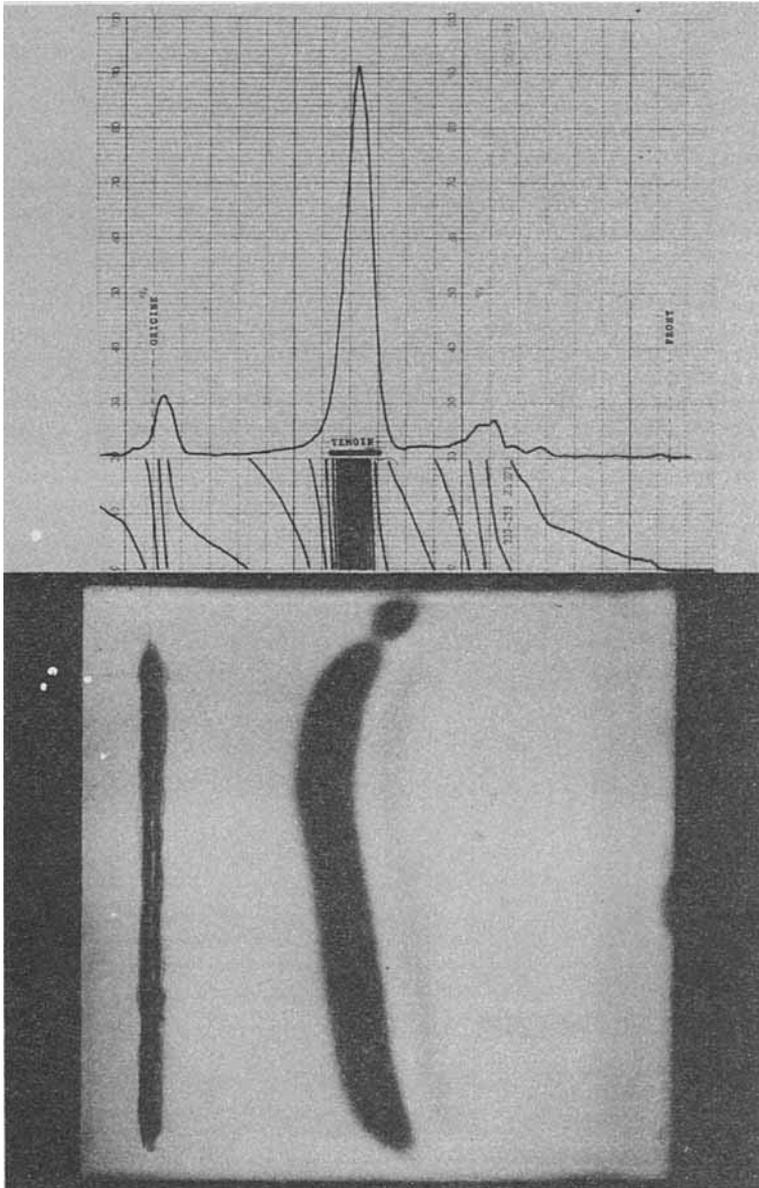


Fig. 3 : plaque préparative et son radiochromatogramme

Après son transfert dans une boîte gantée, l'ampoule est ouverte et on ajoute au milieu réactionnel 20 ml de méthanol ; le tout est alors évaporé à sec, sous vide et à température ordinaire. Cette opération, qui a pour but d'éliminer tout tritium éventuellement labile ou adsorbé sur le catalyseur est répétée trois fois.

Après la première de ces opérations, le catalyseur est éliminé par filtration. A ce même stade, la radioactivité totale est de 2,25 Ci ; après la seconde opération elle est de 2,11 Ci et de 2,05 Ci après la troisième. Ces pertes de respectivement 6 et 3 % sont minimes et indiquent une bonne stabilité de marquage.

La purification est effectuée par chromatographie sur plaque préparative de gel de silice (plaque Merck F 254 G d'épaisseur 2 mm) à l'aide de l'éluant benzène-tétrahydrofurane-méthanol (cf tableau 1). La figure 3 montre d'une part la photographie de la plaque préparative prise sous lumière ultraviolette et d'autre part son enregistrement radiochromatographique. Ce radiochromatogramme permet de calculer par intégration que la radioactivité des impuretés représentent 22 % de la radioactivité totale sur la plaque.

La bande radioactive principale qui est en regard du témoin de papavérine est extraite au méthanol. Des tests chromatographiques analytiques sont effectués sur gel de silice avec les systèmes de solvants : 1 (Cyclohexane-benzène-diéthylamine) et 2 (Benzène-tétrahydrofurane-méthanol) (cf tableau 1). Ces tests permettent de constater (fig. 4a et 4b) d'une part la parfaite similitude des R_f avec la papavérine témoin et d'autre part que la pureté radiochimique est supérieure à 99 %.

Le spectre pris dans l'ultraviolet du produit tritié est rigoureusement identique à celui de la papavérine de référence. On observe quatre maxima dont le principal à 239 nanomètres a été choisi pour doser le produit tritié (fig. 5). Les autres maxima sont situés respectivement aux longueurs d'onde de 280, 314 et 327 nanomètres.

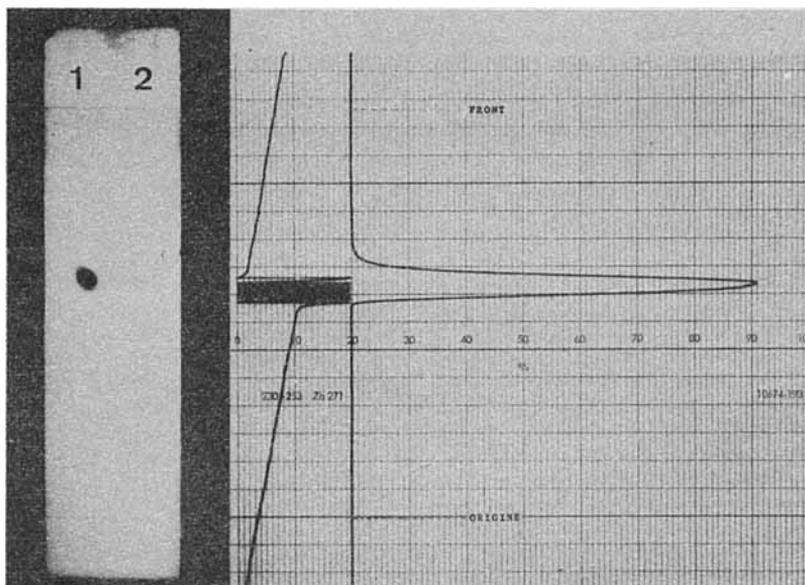


Fig. 4 a. Test analytique de la ^3H -papavérine pure.
 1 : témoin non radioactif.
 2 : produit tritié.
 Système 1 (tableau 1)

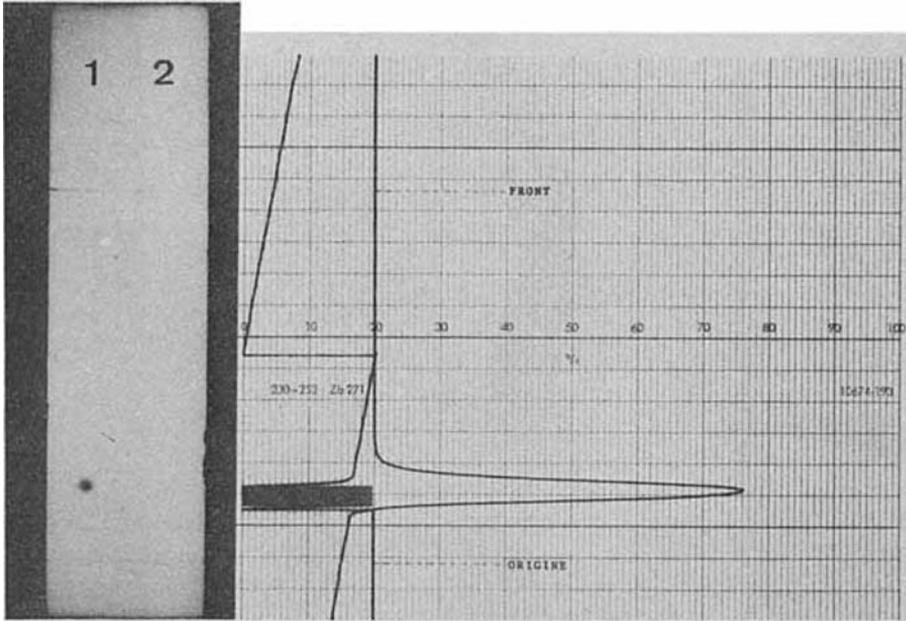


Fig. 4 b. Test analytique de la ^3H -papavérine pure.
1 : témoin non radioactif.
2 : produit tritié
Système 2 (tableau 1)

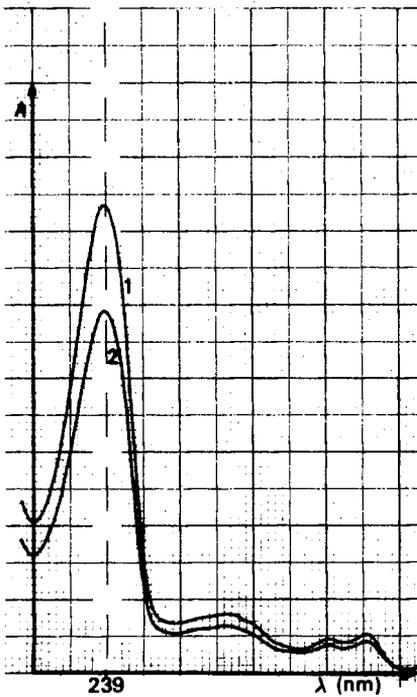


Fig. 5 : Spectre UV de la papavérine
1 : Spectre du produit tritié
2 : Spectre de référence.

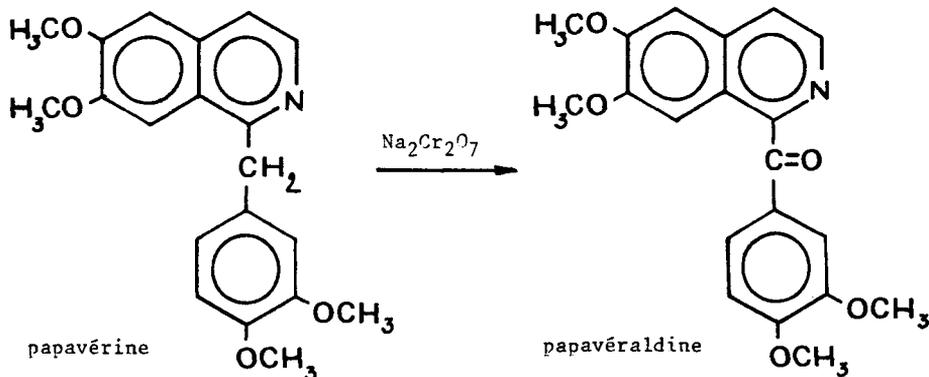
Les dosages ont été effectués sur le maximum d'absorption situé à 239 nanomètres.

Résultats - discussion

La quantité de papavérine obtenue par dosage spectrophotométrique à la longueur d'onde de 239 nm est de 16 mg, ce qui correspond à un rendement chimique de 94 %.

La radioactivité spécifique obtenue par dosage spectrophotométrique et par comptages en scintillation liquide d'une même solution, est de 43 Ci/mM (soit 127 Ci/g).

On sait que la substitution d'un atome de brome par un atome de tritium ne peut fournir qu'une radioactivité spécifique maximum de 29,12 Ci/mM et ce dans le cas de l'utilisation de tritium d'une richesse isotopique de 100 % et en l'absence d'échanges isotopiques en cours de déshalogénéation (hydrogènes labiles provenant de la substance ou de traces d'eau, hydrogène éventuellement adsorbé sur le catalyseur, etc...). La papavérine ayant été reconnue comme chimiquement et radiochimiquement pure, la radioactivité spécifique de 43 Ci/mM ne peut donc s'expliquer que par l'introduction de plus d'un atome de tritium par molécule de papavérine. Or, la résonance magnétique nucléaire et l'analyse élémentaire nous ayant indiscutablement prouvé la présence d'un seul brome par molécule de précurseur, on peut se permettre de déduire que des échanges isotopiques ont eu lieu dans des proportions imprévisibles et ce, parallèlement à la déshalogénéation. Les hydrogènes du groupement méthylène nous semblant les plus aptes à s'échanger, nous avons procédé à l'oxydation de la papavérine tritiée. En effet, l'hypothèse d'un échange au niveau du groupe méthylène peut être facilement vérifiée en comparant les radioactivités spécifiques de la papavérine tritiée et de son produit d'oxydation principal : la papavéraldine (16).



Après l'oxydation, on isole par chromatographie en couche mince (système 2 tableau 1) de la papavéraldine tritiée chimiquement et radiochimiquement pure (fig. 6 a - 6 b) dont l'activité spécifique est de 23 Ci/mM. La radioactivité incorporée par échange au niveau des deux atomes d'hydrogène du groupement méthylène représenterait donc 46,5 % ($23/43 = 0,535$) à condition que lors de l'oxydation, aucun atome de tritium n'ait été enlevé d'autres positions. Ceci est en grande partie confirmé par le fait que les radioactivités spécifiques de la papavérine et de la papavéraldine tritiées ne sont pas sensiblement modifiées dans les conditions d'oxydation, en l'absence toutefois de bichromate de sodium (17).

Cette vérification confirme donc un échange isotopique de 46,5 % au niveau des hydrogènes du groupe méthylène, échange se produisant en cours de déshalogénéation.

Ces échanges isotopiques particulièrement importants ont été confirmés lors d'expériences ultérieures (18) au cours desquelles la papavérine a été soumise

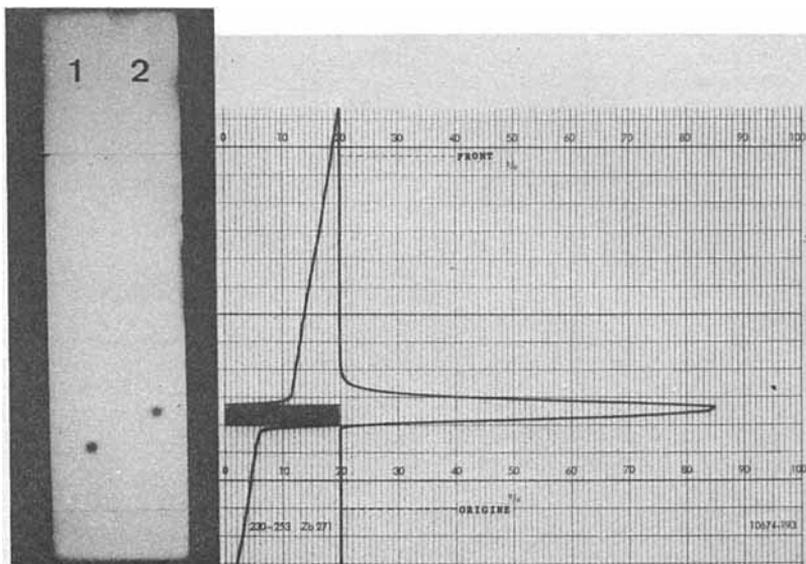


Fig. 6 a. Test analytique de la ^3H -papavéraldine.
 1 : référence de papavérine.
 2 : ^3H -papavéraldine.
 Système 1 (tableau 1)

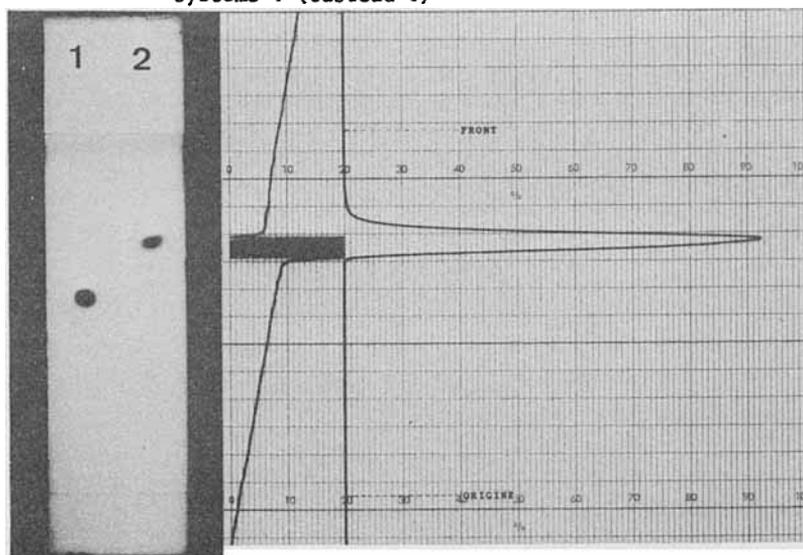


Fig. 6 b. Test analytique de la ^3H -papavéraldine.
 1 : référence de papavérine.
 2 : ^3H -papavéraldine.
 Système 2 (tableau 1)

aux mêmes conditions que celles de la déshalogénération : solvant : dioxanne, triéthylamine, tritium gazeux, catalyseur : Pd/C, temps d'échange : 4 heures à différentes températures. Les résultats montrent que le taux d'incorporation en tritium est tel qu'on peut atteindre des radioactivités spécifiques de 48 Ci/mM, dont plus de 95 % sont au niveau du groupe >CH_2 . Ceci représente donc la valeur remarquable de 78,3 % du maximum théorique possible pour deux atomes de tritium (58,25 Ci).

Par contre, la papavéraldine soumise aux mêmes conditions donne lieu à un rendement d'échange isotopique beaucoup plus faible puisque les radioactivités spécifiques obtenues sont de l'ordre de 0,5 Ci/mM. La même expérience réalisée au départ de papavérine en présence de charbon actif exempt de palladium donne lieu à un échange isotopique encore plus faible (0,3 Ci/mM) que dans le cas précédent, ce qui permet dès lors d'affirmer que l'échange au niveau du CH_2 est un phénomène purement catalytique : ces hydrogènes de ce groupement ne devenant donc échangeables en solution que par l'intervention de conditions catalytiques semblables à celles de la déshalogénéation.

Conclusion

Bien que la réduction catalytique soit assurément la méthode apparaissant comme étant la plus intéressante tant au point de vue de la simplicité expérimentale que des caractéristiques radioactives obtenues (radioactivités spécifiques les plus élevées et spécificité de marquage) il faut cependant vérifier la spécificité de marquage qui, comme le montre ce travail, peut être franchement médiocre.

L'exemple de tritiation mentionné ci-avant faisait l'objet d'une production et était destiné à des utilisations biochimiques. Une radioactivité spécifique élevée ainsi qu'une bonne spécificité de marquage étaient particulièrement nécessaires. L'utilisation de tritium d'une richesse isotopique maximum nous a directement donné la preuve d'une non spécificité de marquage très importante grâce à la radioactivité spécifique anormalement élevée obtenue. Si les exigences concernant cette radioactivité spécifique avaient été moins grandes, une telle production aurait pu - comme c'est parfois le cas - être effectuée à l'aide d'hydrogène tritié HT (utilisation du tritium de récupération, pratique bien connue des producteurs ...). Dans ce cas une radioactivité spécifique de quelques curies/mM n'aurait pas nécessairement éveillé notre attention et n'aurait donc pas donné lieu à un contrôle de la spécificité souhaitée ...

REFERENCES

- (1) Glascock R.F. and Reinius C.R. *Biochem J.* 62, 529 (1956)
- (2) Evans E.A. (book) "Tritium and its Compounds" London Butterworth (1966)
- (3) Moore C.W. *J. Soc. Chem. Ind.* 38, 320 T (1919)
- (4) Waterman H.I. and Van Vlodrop C. *Acta Chem. Scand.* 13, 1032 (1959)
- (5) Taylor T.I. chap. 5 in *catalysis*, Vol. 5 Reinhold Publishing Corp. (1957)
- (6) Feuge R.O. *Catalysis* vol 3, 432 (1955)
- (7) Dutton H.J., Scholfield C.R., Selke E. and Rohwedder W.K. *J. of catalysis* 10, 316-27 (1968)
- (8) Tenny K.S., Gupta S.C., Nystrom R.F. and Kummerov F.A. *J. Amer Oil Chemist Soc.* 40, 172 (1963)
- (9) Borcic S., Strelkov T. and Sunko D.E. *Croat Chem. Acta* 34, 243 (1962)
- (10) Sgentas D.S. and Kummerov F.A. *Biochem.* 3, 406 (1964)
- (11) Clayton R.B. and Edwards A.M. - *J. Biol. Chem.* 238, 1966 (1963)
- (12) Gut M. and Uskokovic M. *J. Org. Chem.* 25, 792 (1960)
- (13) Bergstram S., Linstredt S. Samuelson B., Carey E., Gregorian G.A., *J. Amer. Chem. Soc.* 80, 2337 (1958)

- (14) Nagatsu, Lewitt M. and Underfriend S. *Analytic Biochem.* 9, 122 (1964)
- (15) Decker et Girard. *Ber. Deutsch. Chem. Gesellsch.* 37, 3812
- (16) Pschorr *Ber. Dtsch Chem. Ges.* 37 (1936)
- (17) Bettens B., Devillers J. et Winand M.
"Marquage au tritium de la papavérine par échange Wilzbach.
Problèmes inhérents à la détermination de la répartition du tritium"
à paraître (1976).
- (18) Bettens B., Devillers J. et Winand M.
"Comparaison entre échanges Wilzbach et échanges catalytiques
hétérogènes en solution" à paraître (1976).