

SYNTHESES, RESOLUTION OPTIQUE ET RADIOLYSE D'ACIDES AMINES TRITIÉS  
A HAUTE ACTIVITE SPECIFIQUE.

I - D,L-lysine ( $^3\text{H}$ -4,5,6,6) ; L-lysine ( $^3\text{H}$ -4,4,5,5) ; L-leucine  
( $^3\text{H}$ -4,5,5,5) ; acide D- $\alpha$ -amino adipique ( $^3\text{H}$ -4,4,5,5) ; acide  
 $\gamma$ -amino butyrique ( $^3\text{H}$ -2,2,3,3).

Dominique EGO, Jean-Pierre BEAUCOURT<sup>\*</sup>, Louis PICHAT  
Service des Molécules Marquées - CEN-SACLAY -  
91191 GIF SUR YVETTE CEDEX - FRANCE

SUMMARY

2,6-Diamino-4-hexynoic acid 5 was prepared from 1,4-dichloro-2-butyne and diethyl acetamidomalonate. The catalytic reduction of 5 with tritium led to (4,5,6,6- $^3\text{H}$ ) DL-lysine 6' spec. act. 113 Ci/mM. The catalytic reduction with tritium of L-2-amino-6-*t*-butoxycarbonylamino-4-hexynoic acid 7 followed by hydrolysis gave [4,4,5,5- $^3\text{H}$ ] L-lysine 6 spec. act. : 120 Ci/mM.

DL-2-amino-5,5-dichloro-4-methyl-4-pentenoic acid 11 was prepared from 2-methyl-1,1,3-trichloro-1-propene and diethyl acetamidomalonate. The optical isomers were separated by preparative HPLC. The catalytic reduction of the L enantiomer gave [4,5,5,5- $^3\text{H}$ ] L-leucine 13 spec. act. 140 Ci/mM.

Ethoxycarbonylation of ethyl 2-acetylamino-2-ethoxycarbonyl 4-pentynoate : 15 in presence of palladium gave triethyl 4-acetylamino-1-butyne-1,4,4-tricarboxylate 16. Reduction of 16 with tritium followed by hydrolysis gave DL-[4,4,5,5- $^3\text{H}$ ]  $\alpha$ -aminoadipic acid 18' spec. act. 130 Ci/mM. The oxidation of 18' with L-aminoxidase led to D- $\alpha$ -aminoadipic acid 18 with the same specific activity.

Methoxycarbonylation of 3-phthalimido-1-propyne 19 in presence of Pd gave methyl 4-phthalimido-2-butyrate 20 which tritiation followed by hydrolysis led to [2,2,3,3- $^3\text{H}$ ] GABA 22 spec. act. 109 Ci/mM.  $^3\text{H}$  NMR analyses were carried out in each case. Studies on the self radiolysis of these aminoacids during storage are reported.

Key words :  $^3\text{H}$ -NMR - Aminoacids - HPLC separation of enantiomers.

\* To whom all inquiries should be sent.

Les aminoacides tritiés sont couramment utilisés en recherches biologiques et biochimiques. La concentration physiologique des aminoacides dans les organismes vivants étant souvent très faible, des activités spécifiques élevées sont nécessaires, d'où l'emploi d'acides aminés marqués au tritium. Nous décrivons la synthèse de plusieurs aminoacides tritiés obtenus par voie chimique avec une activité spécifique théorique de 120 Ci/mM : DL-lysine [ $^3\text{H}$ -4,5,6,6] L-lysine [ $^3\text{H}$ -4,4,5,5,] L-leucine [ $^3\text{H}$ -4,5,5,5,] acide  $\alpha$ -aminobutyrique [ $^3\text{H}$ -2,2,3,3] et acide  $\gamma$ -aminoadipique [ $^3\text{H}$ -4,4,5,5.] Les atomes de tritium sont introduits par réduction de composés insaturés ou halogénés et les positions de marquage sont déterminées par spectrométrie de masse et RMN du tritium.

### 1/ L-Lysine ( $^3\text{H}$ -4,5,6,6) 6 (schéma 1)

Les synthèses décrites à ce jour dans la littérature permettent d'obtenir une activité spécifique maximum de 60 Ci/mM (1-4). Le précurseur acétylénique 5 que nous avons obtenu permet la fixation théorique de 4 atomes de tritium.

Le dichloro-1,4 butyne-2 2 est condensé sur le dérivé sodé de l'acétamidomalonate d'éthyle 1 pour obtenir l'acétylénique 3. Après réaction sur le phthalimide de potassium et hydrolyse acide, le précurseur 5 est obtenu et purifié par C.L.H.P.

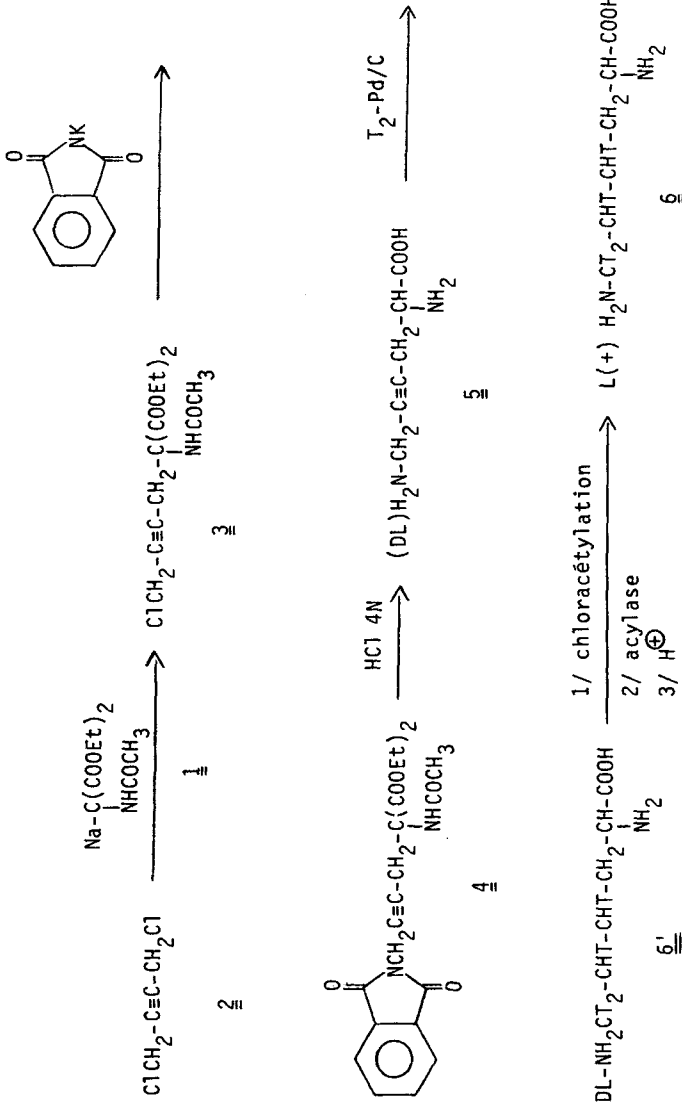
L'amination de l'halogénure 3 a été essayée selon trois procédés : introduction de phthalimide de potassium (5), réaction avec l'hexaméthylène tétramine (6,7) ou traitement par la guanidine (8). Seule la première méthode a conduit à l'amine 5 avec un rendement de 67% après une hydrolyse acide. La protection de la triple liaison par formation d'un complexe avec le dicobalt octacarbonyle (9-11) n'a pas conduit à un rendement supérieur après hydrolyse acide et déprotection par oxydation au nitrate ferrique (12).

La réduction de l'insaturation par le tritium gaz en présence de palladium sur charbon, conduit quantitativement à la D,L-lysine tritiée avec une activité spécifique de 113 Ci/mM. La RMN du tritium indique que la répartition du tritium n'est pas 4,4,5,5 mais 4,5,6,6.

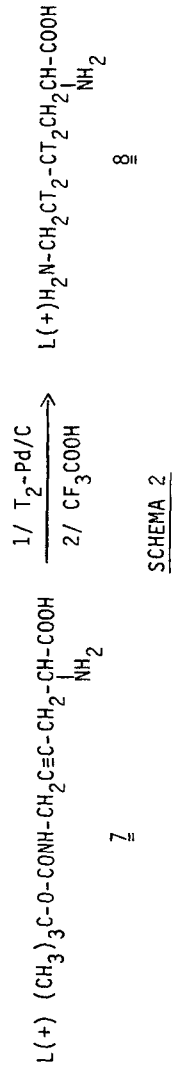
La résolution optique a été obtenue par action de l'acylase de rein de porc sur la D,L-lysine  $^3\text{H}$  N,N'-chloracétylée.

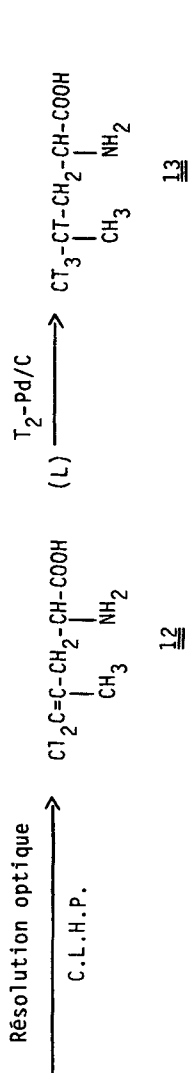
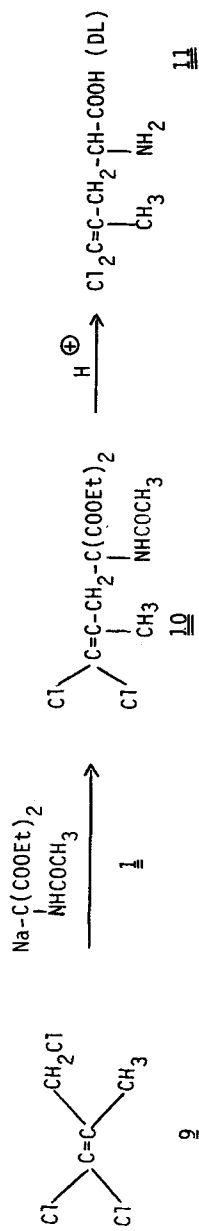
### 2/ L-Lysine ( $^3\text{H}$ -4,4,5,5) 8 (schéma 2).

L'acide L-amino-2 t-butoxycarbonylamino-6 hexyne-4 oïque 7 a été synthétisé selon SASAKI et coll. (13). La réduction de l'insaturation a été réalisée par le tritium gaz en présence de palladium sur charbon à 10% dans le méthanol.

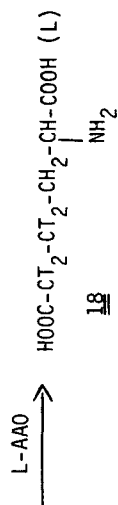
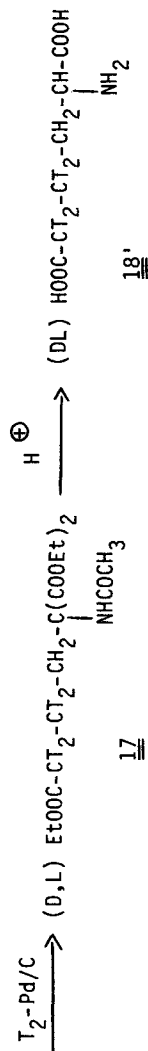
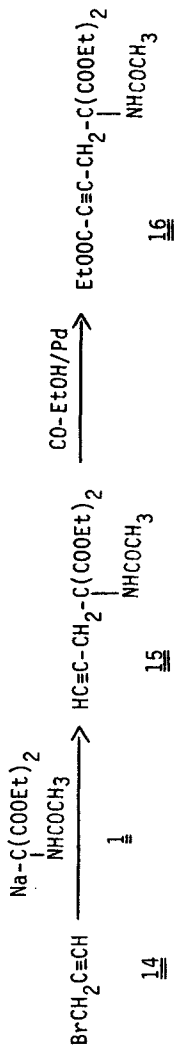


SCHEMA 1

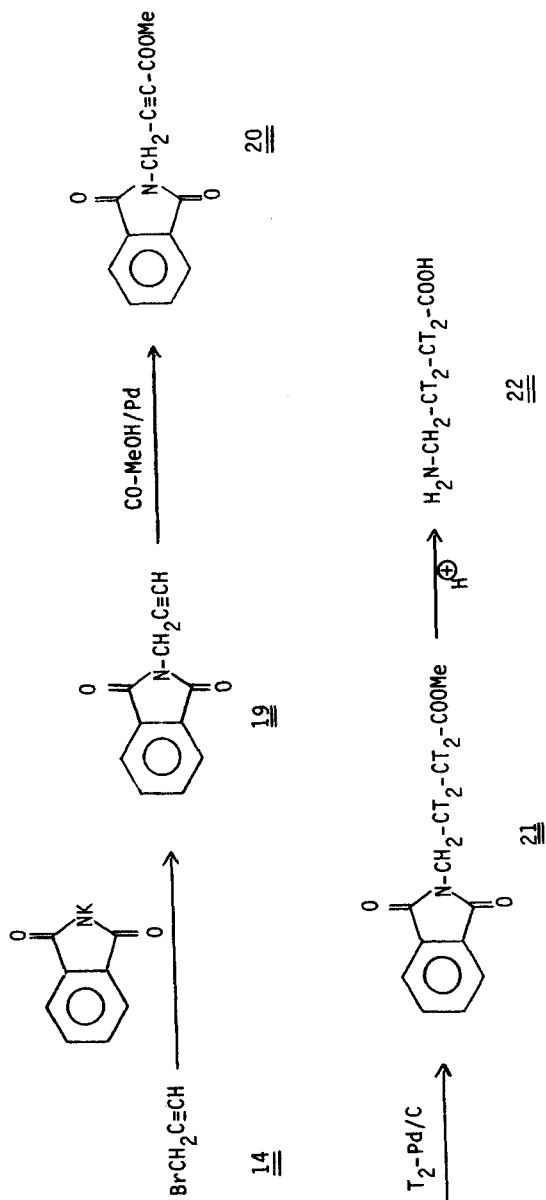




SCHEMA : 3



SCHEMA : 4



SCHEMA : 5

La L-Lysine [ $^3\text{H}$ -4,4,5,5] a été obtenue avec une activité spécifique de 120 Ci/mM. Le tritium est également réparti sur les positions 4 et 5.

### 3/ L-Leucine ( $^3\text{H}$ -4,5,5,5) 13 (schéma 3).

Les synthèses décrites à ce jour dans la littérature ne conduisent pas à une activité spécifique élevée (14-16) à l'exception de l'obtention de la leucine [ $^3\text{H}$ -3,4,5] (17) par deshalogénéation de chloroleucine pour laquelle l'activité spécifique est non reproductible et varie entre 30 et 120 Ci/mM.

Le précurseur 12 que nous avons synthétisé permet la fixation reproductible de quatre atomes de tritium.

Le méthyl-2 trichloro-1,1,3 propène-1 9 est condensé sur le dérivé sodé de l'acétamidomalonate d'éthyle 1 pour conduire au malonate 10 qui par hydrolyse acide fournit, avec un rendement de 90%, l'amino acide racémique 11. La résolution est obtenue par C.L. H.P. en utilisant la phase et les conditions opératoires mises au point par Davankov (18) : support chiral constitué d'une silice modifiée (C-18) sur laquelle est absorbée la L-hydroxy N-cétyl proline, élution par un mélange méthanol-eau contenant de l'acétate de cuivre ( $10^{-4}\text{M}$ ). Le facteur de sélectivité pour la séparation des deux formes L et D est remarquablement élevé : 4,74. L'isomère L : 12 est réduit par le tritium en présence de palladium sur charbon à 10%. La leucine  $^3\text{H}$  obtenue a une activité spécifique de 140 Ci/mM. Le tritium est réparti sur les positions attendues : 75 % de l'activité en position 5 et 25% en position 4. La pureté optique est de 100%.

Plusieurs essais ont été réalisés et ont démontré la reproductibilité de cette synthèse.

### 4/ Acide L- $\alpha$ -amino adipique ( $^3\text{H}$ -4,4,5,5) 18

Une seule synthèse d'acide D,L- $\alpha$ -amino adipique marqué au tritium avec une activité spécifique moyenne (55 Ci/mM) a été décrite, à ce jour, dans la littérature (19). Nous avons obtenu cet aminoacide avec une activité spécifique de 130 Ci/mM par réduction avec le tritium du composé acétylénique 16. Ce dernier est synthétisé par éthoxycarbonylation (20) de 15 dans l'éthanol en présence de palladium. 15 a été obtenu par réaction du dérivé sodé de l'acétamidomalonate d'éthyle 1 et du bromure de propargyle 14. La répartition du tritium, déterminée par RMN- $^3\text{H}$ , est de 52% en position 4 et 48% en position 5.

La résolution optique est obtenue par traitement du racémique D,L-avec la L-Amino Acide Oxydase (L-AAO) qui transforme l'isomère D en  $\alpha$ -cétone acide correspondant. Après purification, l'acide

L- $\alpha$  aminoadipique [ $^3\text{H}$ -4,4,5,5] est obtenu quantitativement avec une pureté optique de 100%.

#### 5/ Acide $\gamma$ -aminobutyrique ( $^3\text{H}$ -2,2,3,3) 22

La seule synthèse connue à ce jour d'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) marqué au tritium (19) conduit à une activité spécifique de 50 Ci/mM. Le procédé du schéma 5 nous a conduit en quatre étapes au GABA ( $^3\text{H}$ -2,2,3,3) ayant une activité spécifique de 109 Ci/mM.

La réaction de Gabriel appliquée au bromo-3 propyne-1 14 conduit au composé acétylénique 19. Ce dernier, par méthoxycarbonylation en présence de palladium (20) conduit avec un rendement de 57% au carbométhoxy-1 phthalimido-3 propyne-1 20. La réduction de l'insaturation par le tritium gaz en présence de palladium sur charbon suivie d'une hydrolyse acide donne l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique [ $^3\text{H}$ -2,2,3,3] 22. La répartition du tritium est déterminée par RMN- $^3\text{H}$  : 40% en position 2 et 60% en position 3.

#### 6/ Radiolyse au cours du stockage des aminoacides tritiés à très forte activité spécifique.

Le comportement des aminoacides tritiés a été étudié en fonction du temps lors du stockage dans différentes conditions :

- A) solution aqueuse à + 4°C
- B) solution aqueuse à 2% d'éthanol à + 4°C
- C) solution aqueuse à -196°C
- D) solution aqueuse à 2% d'éthanol à -196°C

La conservation est réalisée en solution stérile à une concentration variant de 1 à 2 mCi/ml en flacon type penicilline (+ 4°C) ou en ampoule scellée sous vide (-196°C).

Les résultats sont rassemblés dans le tableau n°1.

L'addition de 2% d'éthanol et la température de stockage ne modifient pas la conservation des aminoacides tritiés. Le facteur le plus important pour la conservation semble être la méthode de purification. Le seul emploi d'une colonne de résine échangeuse d'ions Dowex 50 WX12 ( $\text{H}^+$ ) fournit des composés qui s'autoradiolysent rapidement au stockage.

Pour les aminoacides basiques tritiés avec une très forte activité spécifique (lysine), les meilleurs résultats de conservation sont obtenus avec une double purification : Dowex 50 WX12 ( $\text{H}^+$ ) puis papier Schleicher Schüll n° 2316.

Pour les aminoacides tritiés neutres ou acides, la deuxième

Amino Acide Tritié	Activité Spécifique (Ci/mM)	Mode de Stockage	Mode de Purification	Puretés Radiochimiques après stockage				
				1 mois %	2 mois %	3 mois %	7 mois %	
L-Lysine	120	A	Dowex	99	79	60	-	
	120	A	Dowex + papier	99	99	98	96	
	120	B	Dowex + papier	99	99	99	95	
	120	C	Dowex + papier	99	99	99	98	
	120	D	Dowex + papier	99	99	99	98	
L-Leucine	140	A	Dowex	99	96	94	87	
	140	C	Dowex	-	-	95	92	
	140	C	Dowex + papier	99	96	95	92	
	140	A	Dowex + G10	99	99	97	97	
	140	B	Dowex + G10	99	97	97	97	
	140	C	Dowex + G10	99	99	98	98	
	140	D	Dowex + G10	99	99	98	98	
Acide D- $\alpha$ amino adipique	130	A	Dowex	97	90	85	60	
	130	A	Dowex + G10	99	99	98	90	
	130	C	Dowex + G10	99	98	96	86	
Acide $\gamma$ -aminobutyrique	109	A	Dowex + G10	98	98	98	94	

Tableau N°1 Radiolyse au stockage d'amino acides tritiés à très forte activité spécifique.



purification peut être indifféremment réalisée sur papier Schleicher-Schüll 2316 ou sur Séphadex G10 éluée à l'eau.

Dans ces conditions, la pureté radiochimique reste voisine de 98% après un stockage de 3 mois.

### PARTIE EXPERIMENTALE

1) L-Lysine (<sup>3</sup>H-4,5,6,6) 6 (schéma 1).

1) Acétylamino-1 (chloro-4 butyn-2-yl)-2 propanedioate-1,3 de diéthyle 3

A 35 mM d'éthylate de sodium (805 mg de sodium dans 70 ml d'éthanol), sont ajoutés 35 mM (7,36 g) d'acétamidomalonate d'éthyle 1. Après chauffage à reflux pendant 10 minutes, le mélange est refroidi à 0°C. On ajoute alors 105 mM (12,92 g) de dichloro-1,4 butyne-2 2 et on chauffe 1 heure à reflux. Après refroidissement, addition de 30 ml d'eau, évaporation sous vide de l'éthanol, extraction de la phase aqueuse restante au chloroforme, séchage et évaporation sous vide, le résidu est chromatographié sur colonne de gel de silice Merck (éluant : benzène-éthanol : 97/03). On obtient 4,795 g de 3 (Rdt = 45%).

RMN-<sup>1</sup>H (CCl<sub>4</sub>) : δ = 1,20 ppm (t, CH<sub>2</sub>, 5H) ; 2,05 (s, CH<sub>3</sub>CO, 3H) ; 2,15 (s, CH<sub>2</sub>Cl, 2H) ; 3,10 (s, CH<sub>2</sub>, 2H) ; 4,25 (q, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>, 4H) - SM : m/e (%) = 303 (6) [M]<sup>+</sup> ; 268 (23) [M-Cl]<sup>+</sup> ; 258 (4) [M-COCH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> ; 230 (32) [M-COOC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>]<sup>+</sup> ; 188 (47) [M-COOEt-COCH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> - IR (KBr) : 1300 cm<sup>-1</sup>, ν<sub>C≡C</sub> ; 1670, ν<sub>CONH</sub> ; 1740, ν<sub>CO</sub> ; 2220, ν<sub>C≡C</sub> ; 2850-2940, ν<sub>C<sub>s</sub>-H</sub><sub>p</sub>

2) Acétylamino-1 (phtalimido-4 butyn-2-yl)-2 propanedioate-1,3 de diéthyle 4

8,2 mM (1,54 g) de phtalimide de potassium sont ajoutées à une solution de 8,2 mM (2,48 g) de 3 dans 250 ml de DMF anhydre. Après chauffage 3h à 90°C et refroidissement, le résidu est porté à sec et purifié par chromatographie liquide sur gel de silice (éluant : benzène-acétate d'éthyle : 65/35). On obtient 2,545 g de 4 (Rdt 75%).

P.F. : 148°C-149°C-RMN-<sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) : δ = 1,2 ppm (t, CH<sub>3</sub>, 6H) ; 2,05 (s, CH<sub>3</sub>CO, 3H) ; 3,25 (s, CH<sub>2</sub>, 2H) ; 4,25 (q, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>, 4H) ; 4,45 (s, CH<sub>2</sub>N, 2H)-RMN-<sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) : δ = 12 ppm (CH<sub>3</sub>) ; 21 (COCH<sub>3</sub>) ; 22 (CH<sub>2</sub>) ; 25,5 (CH<sub>2</sub>) ;

61 ( $\text{COOCH}_2$ ) ; 63 (C) ; 108 (C) ; 121,5 (CH) ; 130 (C) ; 132 (CH) ; 143 (C) ; 165 (C) ; 168 (CO,COO)-S.M : m/e (%) = 414 (25),  $[\text{M}]^+$  ; 341 (100),  $[\text{M-COOC}_2\text{H}_5]^+$  ; 299 (50)  $[\text{M-COOC}_2\text{H}_5\text{-NHCOCH}_3]^+$  ; 160 (79)-I.R (KBr) : 3370  $\text{cm}^{-1}$ ,  $\nu_{\text{N-H}}$  ; 2930-2980,  $\nu_{\text{Csp}^3\text{-H}}$  ; 1750-1735,  $\nu_{\text{CO}}$  : 1230-1210,  $\nu_{\text{COOC}}$ .

### 3) Acide diamino-2,6 hexyn-4-oïque 5

1,45g (3,5 mM) de 4 sont chauffés à reflux pendant 2 heures dans 20 ml de HCl 4N. Après refroidissement, concentration et filtration, 5 est précipité par addition d'acétone. Après filtration et recristallisation dans l' éthanol à 95%, 5 est purifié par C.L.H.P. (Séphasorb - eau/méthanol : 80/20). On recueille 502 mg de 5 (Rdt : 67%).

P.F. : 192-194°C - RMN- $^1\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ) :  $\delta$  = 2,65 ppm (s,  $\text{CH}_2$ , 2H) ; 3,66 (d,  $\text{CH}_2\text{N}$ , H) ; 4,05 (t, CH, 1H)-5.

### 4) D,L-Lysine-( $^3\text{H}$ -4,5,6,6) 6'

8 mg (37 M) de 5 sont solubilisés dans 1,5 ml d'eau et réduits par le tritium gaz en présence de 5 mg de Pd/C à 10%, à pression atmosphérique et à température ambiante. Après 45 minutes d'agitation, filtration du catalyseur et élimination des labiles  $^6\text{H}$  est purifié sur une colonne échangeuse Dowex 50 WX 12 forme  $\text{H}^+$  (100-200 Mesh) avec un gradient d'éluion (HCl 1N à 4N) puis sur papier Schleicher-Schüll N° 2316 (éluant : n-butanol/acide acétique eau : 2/1/1).

CCM (cellulose) : n-butanol, acide acétique, eau : (2/1/1),  $R_f$  = 0,36 ; t-butanol, méthyléthylcétone, ammoniaque, eau (4/3/1-2),  $R_f$  = 0,41 ; pyridine, alcool isoamylique, acide acétique, eau (8/4/1/4),  $R_f$  = 0,16-RMN- $^3\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ) :  $\delta$  = 1,54 ppm (13%,  $^3\text{H}$ -4) ; 1,65 (22%,  $^3\text{H}$ -5) , 3,05 (65%,  $^3\text{H}$ -6).

Activité spécifique (déterminée par A.A.A.A.) : 113 Ci/mM.

### 5) L-Lysine-( $^3\text{H}$ -4,5,6,6) 6

2,6 M (300 mCi) de 6' sont solubilisées dans 2,5 ml d'eau et le pH est ajusté à 12 par addition de NaOH 1N. Après refroidissement à 0°C, 100 l de chlorure de chloracétyle sont ajoutés à la solution qui est ensuite agitée à 0°C pendant 30 minutes. La D,L-lysine N,N'-chloracétylée est purifiée par passage sur une résine Dowex 50 WX 12 ( $\text{H}^+$ ) éluee par gradient de HCl (0 à 2N), puis solubilisée dans 5 ml d'une solution tampon TRIS pH 7,2. On ajoute 5 mg d'acylase de rein de porc et l'agitation est maintenue 18H à 38°C. Après dénaturation de l'enzyme par addition d'éthanol, fil-

tration et évaporation à sec, le résidu est hydrolysé par chauffage à reflux dans 10 ml de HCl 2N pendant 2 heures.

Après purification sur colonne échangeuse Dowex 50 WX 12 ( $H^+$ ) éluée par gradient de HCl (1N à 4N) puis sur papier Schleicher-Schüll n° 2316 (élution : n-butanol/acide acétique/eau : 2/1/1), on obtient 100 mCi de L-lysine ( $^3H$ -4,5,6) radiochimiquement pure (A.S. : 113 Ci/mM).

### II) L-Lysine ( $^3H$ -4,4,5,5) 8 (schéma 2)

5 mg de 7 (16) solubilisés dans 1 ml de méthanol sont réduits par le tritium gaz à température ambiante et à pression atmosphérique en présence de 5 mg de Pd/C à 10%. Après 45 minutes d'agitation, filtration et évaporation, le mélange est hydrolysé par 5 ml d'acide trifluoroacétique à  $-10^\circ C$  pendant 30 mn. La L-Lysine- $^3H$ -(4,4,5,5) 8 obtenue est purifiée et analysée comme précédemment pour la D,L-lysine [ $^3H$ -4,5,6,6.]

RMN- $^3H$  ( $D_2O$ ) :  $\delta$  = 1,53 ppm (48,5%,  $^3H$ -4) ; 1,65 ppm (48,5%,  $^3H$ -5) ; 3,05 (3%,  $^3H$ -6).

Activité spécifique (déterminée par A.A.A.A.) : 120 Ci/mM.

### III) L-leucine $^3H$ -(4,5,5,5) 13 (schéma 3)

#### 1) Acétylamino-2 dichloro-5,5 éthoxycarbonyl-2 méthyl-4 penten-4-oate d'éthyle 10

A 35 mM d'éthylate de sodium (805 mg de sodium dans 70 ml d'éthanol) sont ajoutés 35 mM (73,6 g) d'acétamidomalonate d'éthyle 1. Après chauffage à reflux pendant 10 minutes et refroidissement à  $0^\circ C$ , on ajoute 105 mM (16,7 g) de méthyl-2 trichloro-1,1,3 propène-1 9 et on chauffe 1 heure à reflux. Après refroidissement, évaporation à sec, reprise par 30 ml d'eau, extraction au chloroforme, séchage et évaporation à sec, le résidu est purifié par chromatographie liquide sur gel de silice (éluant : hexane/acétate d'éthyle : 70/30). (Rdt = 90%).

RMN- $^1H$  ( $CDCl_3$ ) :  $\delta$  = 1,7 ppm (t,  $CH_3$ , 6H) ; 2,25 (s,  $CH_3$ , 3H) ; 2,45 (s,  $CH_3CO$ , 3H) ; 4,70 (q,  $CH_3-CH_2$ , 4H) - RMN- $^{13}C$  ( $CDCl_3$ ) :  $\delta$  = 12,5 ppm ( $CH_3$ ) ; 20 ( $COCH_3$ ) ; 22 ( $CH_3$ ) ; 36,5 ( $CH_2$ ) ; 61,5 ( $COOCH_2$ ) ; 63,5 (C) ; 128 (=C-) ; 171,172 (CO, COO,  $CCl_2$ ) - SM : m/e (%) = 399 (21)  $[M]^+$  ; 304 (7)  $[M-Cl]^+$  ; 294 (9)  $[M-OC_2H_5]^+$  ; 226 (6)  $[M-COOC_2H_5]^+$  ; 123 (17)  $[Cl_2C=C(CH_3)CH_2]^+$  - IR (KBr) :  $\nu$  =  $1740^{-1}$  ;  $\nu_{CO}$  ;  $1635, \nu_{CO}$ .

2) Chlorhydrate de l'acide D,L-amino-2 dichloro-5,5 méthyl-4 penten-4-oïque 11

5 g (14,75 mM) de 10 sont chauffés à reflux dans 20 ml de HCl 4N pendant 2h. Après refroidissement et évaporation le résidu est purifié par chromatographie liquide sur colonne de Séphadex G10 éluee à l'eau puis par C.L.H.P. sur phase Séphasorb (méthanol/eau : 50/50). Le rendement est de 90%.

RMN-<sup>1</sup>H (D<sub>2</sub>O) :  $\delta$  = 2,4 ppm (s, CH<sub>3</sub>, 3H) ; 3,4 (d, CH<sub>2</sub>, 2H) ; 4,65 (t, CH, 1H) - UV (éthanol) :  $\lambda_{\max}$  = 204,5 nm ( $\epsilon$  = 9193) - SM : m/e (%) = 197 (0,6) [M]<sup>+</sup> ; 162 (4) [M-CI]<sup>+</sup> ; 152 (3) [M-COOH]<sup>+</sup> ; 123 (0,9) Cl<sub>2</sub> C = C (CH<sub>3</sub>) CH<sub>2</sub><sup>+</sup> ; 109 (0,6) Cl<sub>2</sub> C = C (CH<sub>3</sub>)<sup>+</sup> ; 74 (100) [C(COOH) NH<sub>2</sub>]<sup>+</sup>.

3) Chlorhydrate de l'acide L-amino-2 dichloro-5,5 méthyl-4 pentèn-4- oïque 12

La résolution de 11 est réalisée par C.L.H.P. préparative sur le support chiral de Davankov (21) au moyen d'une colonne 150 x 4,6 mm éluee par le mélange : méthanol/eau/(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Cu : 15/85/10<sup>-4</sup>M avec un débit de 2 ml/mn. L'isomère L 12 a un temps de rétention de 40 mn (170 mn pour l'isomère D). La sélectivité calculée est de 4,74.

4) L-Leucine (<sup>3</sup>H-4,5,5,5) 13

5 mg de 12 (25,2 M) en solution dans 0,75 ml de méthanol contenant 0,75 ml de NaOH 0,2 N, sont réduits par le tritium gaz à pression atmosphérique et à température ambiante en présence de 5 mg de Pd/C à 10%. Après 45 mn d'agitation, filtration et évaporation, le résidu est purifié par chromatographie liquide sur résine échangeuse d'ions Dowex 50W x 12 forme H<sup>+</sup> (gradient d'élution : HCl 0,5N à 2N) puis sur colonne de Séphadex G10 (élution à l'eau). On obtient ainsi 3 Ci de L-Leucine (<sup>3</sup>H-4,5,5,5) radiochimiquement pure.

CCM (cellulose) : pyridine, alcool isoamylique, acide acétique, eau (8/4/1/4), R<sub>f</sub> = 0,55 ; isopropanol, ammoniacque, eau (8/0,5/1,5), R<sub>f</sub> = 0,76 ; n-butanol, acide acétique, eau (9/1/1), R<sub>f</sub> = 0,59 - RMN-<sup>3</sup>H (D<sub>2</sub>O) :  $\delta$  = 0,9 ppm (75%, <sup>3</sup>H-5,5') ; 1,6 (25%, <sup>3</sup>H-4) - Activité spécifique (déterminée par AAAA) = 140 Ci/mM.

IV - Acide L- $\alpha$ -aminoadipique (<sup>3</sup>H-4,4,5,5) 18 (schéma 4)

1/ Acétylamino-2 éthoxycarbonyl-2 pentyn-4-oate d'éthyle 15

Le malonate 15 est obtenu par réaction entre l'acétamido

malonate d'éthyle 1 et le bromure de propargyle 14 selon le mode opératoire utilisé pour la synthèse de 10. Le rendement de la réaction est de 83% après purification par chromatographie liquide sur gel de silice (éluant : Hexane/Acétate d'éthyle : 30/70).

RMN-<sup>1</sup>H (CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) : δ = 1,20 ppm (t, CH<sub>2</sub>, 6H) ; 1,95 (s, CH<sub>3</sub>, 3H) ; 3,15 (m, CH<sub>2</sub> + C ≡ CH, 3H) ; 4,20 (q, CH<sub>2</sub>, 4H) ; 7,0 (NH, 1H).

## 2/ Acétylamino-4 butyne-1 tricarboxylate-1,4,4 de triéthyle 16

1 mM (255 mg) de 15 est solubilisée dans 10 ml de méthanol contenant 0,056 mM (10 mg) de PdCl<sub>2</sub>, 2 mM (2,69 mg) de CuCl<sub>2</sub> et 2 mM (164 mg) d'acétate de sodium. Un barbotage lent de CO est maintenu pendant la durée de la réaction (2h). Après évaporation du méthanol, reprise à l'eau extraction au chloroforme et séchage de la phase organique, le mélange est purifié par chromatographie liquide sur gel de silice (éluant : hexane/Acétate d'éthyle : 70/30). Le rendement est de 55%.

RMN-<sup>1</sup>H (CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) : δ = 1,17 ppm (t, CH<sub>3</sub>, 3H) ; 1,20 (t, CH<sub>3</sub>, 6H) ; 1,95 (s, CH<sub>3</sub>CO, 3H) ; 3,35 (s, CH<sub>2</sub>, 2H) ; 4,15 (q, CH<sub>2</sub>, 2H) ; 4,20 (q, CH<sub>2</sub>, 4H).

## 3/ Acide DL α-amino adipique (<sup>3</sup>H-4,4,5,5) 18'

1,2 mM (4 mg) de 16 sont réduites par le tritium gaz à température ambiante et pression atmosphérique dans 1,3 ml d'acétate d'éthyle en présence de 4 mg de Pd/C à 10%. On agite pendant 45 mn. Après filtration, évaporation à sec, on recueille 1,56 Ci de 17 qui sont hydrolysés par 25 ml d'HCl 2N à reflux (4 heures). Le résidu est purifié par chromatographie échangeuse d'ions sur une colonne Dowex 50W x 12 (H<sup>+</sup>) éluee par un gradient de HCl (0 à 2N) puis sur une colonne de Séphadex G10 (élution à l'eau).

On recueille 1 Ci de 18' radiochimiquement pur.

CCM (cellulose) : n-butanol/acide acétique/eau (2/1/1), R<sub>f</sub> = 0,53 ; n-propanol/ammoniac (7/3), R<sub>f</sub> = 0,06 ; t-butanol/méthyléthylcétone/ammoniac/eau (4/3/1/2), R<sub>f</sub> = 0,29-RMN-<sup>3</sup>H (D<sub>2</sub>O) : δ = 1,6 ppm (52%, <sup>3</sup>H-4) ; 2,2 (48%, <sup>3</sup>H-5).

Activité spécifique (déterminée par AAAA) : 130 Ci/mM.

## 4) Acide D-α-amino adipique (<sup>3</sup>H-4,4,5,5) 18

2,6 μM de 18' sont solubilisées dans 5 ml d'une solution tampon TRIS 0,2M pH 7,4. On ajoute 5 mg de L-Amino Acide Oxydase et on agite le mélange réactionnel 30h à 38°C. Après addition d'éthanol,

filtration et évaporation à sec, 18 est purifié dans les mêmes conditions que 18' pour fournir l'acide D- $\alpha$ -amino adipique radiochimiquement pur (AS = 130 Ci/mM ; pureté optique : 100%).

V) Acide  $\gamma$ -aminobutyrique ( $^3\text{H-2,2,3,3}$ ) 22 (schéma 5)

1) Phtalimido-3 propyne-1 19

50 mM (9,55 g) de phtalimide de potassium sont ajoutées à 50 mM (5,95 g) de bromo-3 propyne-1 en solution dans 50 ml de diméthylformamide anhydre. Après chauffage à 90°C sous atmosphère d'azote pendant 5h, on précipite 19 par addition d'eau. Après filtration et lavage à l'eau, 19 est purifié par chromatographie liquide sur gel de silice (éluant : hexane/Acétate d'éthyle : 7/3). On recueille 7,4 g de 19 pur (Rdt = 81%).

RMN- $^1\text{H}$  (DMSO) :  $\delta$  = 3,45 ppm (t, CH, 1H) ; 4,55 (d, CH<sub>3</sub>, 2H) ; 8,0 (s, Ar., 4H)- SM : m/e (%) = 185 (44) [M]<sup>+</sup> ; 39 (4) [CH<sub>2</sub>-C  $\equiv$  CH]<sup>+</sup> ; IR (KBr) : 3290 cm<sup>-1</sup>,  $\nu_{\text{Csp-H}}$ .

2) Phtalimido-4 butyn-2-oate de méthyle 20

A une suspension de 0,056 mM (10 mg) de PdCl<sub>2</sub>, 2 mM (2,7 mg) de CuCl<sub>2</sub> et 2 mM (164 mg) d'acétate de sodium dans 10 ml de méthanol, on ajoute 1 mM (185 mg) de 19 et on réalise un barbotage lent de CO pendant 40 mn.

Après évaporation du méthanol, reprise à l'eau, extraction au chloroforme et séchage de la phase organique, le mélange réactionnel est purifié par chromatographie liquide sur gel de silice (éluant : hexane-Acétate d'éthyle : 7/3). On recueille 140 mg de 20 chimiquement pur (Rdt = 57%).

RMN- $^1\text{H}$  (CD<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) :  $\delta$  = 3,60 ppm (s, CH<sub>3</sub>, 3H) ; 4,55 ppm (s, CH<sub>2</sub>, 2H) ; 8,0 (s, Ar., 4H)- SM : m/e (%) = 243 (1) [M]<sup>+</sup> ; 212 (20) [M-OCH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> ; 184 (56) [M-COOCH<sub>3</sub>]<sup>+</sup> ; 160 (13) [M-(C  $\equiv$  C-COOCH<sub>3</sub>)]<sup>+</sup>.

3) Acide  $\gamma$ -amino butyrique ( $^3\text{H-2,2,3,3}$ ) 22

20 mM (5 mg) de 20 sont réduites à température ambiante et pression atmosphérique dans 1,5 ml d'acétate d'éthyle en présence de 5 mg de Pd/C à 10%. Après 30 minutes d'agitation, filtration du catalyseur et évaporation du solvant, le mélange réactionnel est hydrolysé par 6 ml de HBr 48% pendant 3 heures à reflux.

Après évaporation, le résidu est purifié par chromatographie sur colonne échangeuse d'ions Dowex 50W X12 (H<sup>+</sup>) avec élu-

tion progressive de HCl (0,5 N à 3N), puis sur colonne de Séphadex G10 éluée à l'eau. On recueille 3 Ci de 22 radiochimiquement pur.

CCM (cellulose) : n-butanol-acide acétique-eau (2/1/1),  $R_F = 0,66$  ; alcool isoamylique/pyridine/acide acétique/eau (4/8/1/4) ,  $R_F = 0,36$  ; isopropanol/ammoniaque/eau (8/0,5/1,5),  $R_F = 0,17$  - RMN- $^3\text{H}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ) :  $\delta = 2,25$  à  $2,40$  ppm (39%,  $^3\text{H-2}$ ) ;  $1,90$  à  $2,05$  (61%,  $^3\text{H-3}$ ).

Activité spécifique (déterminée par AAAA) : 109 Ci/mM.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1) M. FRIDKIN, M. SOKOLOVSKY, E. KATCHALSKI  
J. Polym. Sci. Part. D<sub>2</sub> 123 (1964).
- 2) S. THYAGARAJAN, I. MEZO, I. TEPLAN, J. MARTON.  
Acta Chem. Acad. Scient. Hung. 73 (1), 23 (1972).
- 3) M. HAVRANEK, I. MEZO.  
Acta chem. Acad. Scient. Hung. 77 (2), 341 (1973).
- 4) M. AUDINOT, L. PICHAT - CEN-SACLAY - Résultats non publiés.
- 5) M. S. GIBSON, R. N. BRADSHAW.  
Angew. Chem. 7 (12), 919 (1968).
- 6) A. WOHL.  
Ber. 19, 1840 (1886).
- 7) M. DELEPINE, A. JAFFEUX.  
Bull. Soc. Chim. Fr. 31 (4), 108 (1922).
- 8) P. HEBRARD, M. OLOMUCKI.  
Bull. Soc. Chim. Fr. 5, 1938 (1970).
- 9) H. GREENFIELD, H.N. STERNBERG, R.A. FRIEDEL, J.M. WOTIZ, R. MARKBY, I. WENDER.  
J. Am. Chem. Soc. 78, 120 (1955).
- 10) D. SEYFERTH, M.O. NESTLE, A.T. WEHMAN.  
J. Am. Chem. Soc. 97, 7417 (1975).
- 11) C. DESCOINS, D. SAMAIN.  
Tetrahedron Letters 10, 745 (1976).
- 12) K.M. NICHOLAS, R. PETIT.  
Tetrahedron Letters 37, 3475 (1971).
- 13) A.N. SASAKI, E. BRICAS.  
Tetrahedron Letters, 21, 4263 (1980).
- 14) M. WENZEL, P.E. SCHULTZE.  
J. Anal. Chem. 201, 349 (1964).
- 15) Y. SATO, T. TAKAHASHI, T. HESHI.  
Radioisotopes 10, 488 (1961).

- 16) V. du VIGNEAUD, C.H. SCHNEIDER, J.E. STOUFFER, V.V.S. MURTI, J.P. AROSKAR, G. WINESTOCK.  
J. Am. Chem. Soc. 84, 409 (1962).
- 17) M. AUDINOT, L. PICHAT - CEN-SACLAY - Résultats non publiés.
- 18) V.A. DAVANKOV, A.S. BOCHKOV, A.A. KURGANOV, P. ROUMELIOTS, K.K. UNGER  
Chromatographia 13 (11), 677 (1980).
- 19) L. BIRKOFER, K. HEMPEL.  
Chem. Ber. 96, 1373 (1963).
- 20) J. TSUJI, M. TAKAHASHI, T. TAKAHASHI.  
Tetrahedron Letters 21, 849 (1980).