

Bull. Soc. Chim. Belg., 72, pp. 50-59 7 fig. (1963)

SYNTHÈSE DE LA DL-CARNITINE ET DE LA BÉTAÏNE
CROTONIQUE MARQUÉES AU TRITIUM (*)

W.G. VERLY (**), P.A. FLAMÉE et Ch.J. FALLAIS

Université de Liège, Département de Biochimie, Laboratoire des Isotopes

RÉSUMÉ

De l'acide β -hydroxy- γ -aminobutyrique a été marqué avec du tritium par échange selon la technique de Wilzbach. Le produit tritié a été méthylié et la dl-carnitine obtenue purifiée par chromatographie et électrophorèse. Les rendements chimique et isotopique de cette opération ont été calculés et sont commentés. La dl-carnitine tritiée a été déshydratée en bêtaïne crotonique tritiée; cette dernière a été purifiée par chromatographie. La localisation du tritium dans ces molécules marquées est discutée.

Le but de ce travail est de marquer avec du tritium, en dehors des groupes méthyle, de la dl-carnitine et de la bêtaïne crotonique.

La méthode consiste à exposer de l'acide β -hydroxy- γ -aminobutyrique à de l'hydrogène tritié selon la technique de Wilzbach (1), puis à méthyler cet acide en dl-carnitine. La dl-carnitine est purifiée successivement par chromatographie et électrophorèse continue. Une partie de la dl-carnitine tritiée est déshydratée en bêtaïne crotonique qui est à son tour purifiée par chromatographie.

Au cours de ces opérations, la carnitine et la bêtaïne crotonique sont dosées par le permanganate; leur pureté est surveillée par électrophorèse sur papier et leur radioactivité mesurée par scintillation liquide. Ces méthodes ont permis d'avoir des assurances quant à la pureté radio-chimique des produits de synthèse et aussi d'estimer la valeur de la méthode d'échange de Wilzbach en ce qui concerne le marquage au tritium du précurseur de la carnitine, l'acide β -hydroxy- γ -aminobutyrique.

(*) Ce travail a été subsidié par le contrat de recherche Euratom 001-61 7-RISB.

(**) Associé du Fonds National Belge de la Recherche Scientifique.

(1) K.E. WILZBACH, *J. Am. Chem. Soc.*, 79, 1013, 1957.

DÉTAILS EXPÉRIMENTAUX

Dosage de la carnitine et de la bêtaïne crotonique par le permanganate⁽²⁾ :

La carnitine est d'abord déshydratée en bêtaïne crotonique : une portion aliquote de la solution contenant quelques dixièmes de mg de carnitine est évaporée à sec, on y ajoute 2.5 ml d'acide sulfurique concentré avant de chauffer 3 heures à 130°C. Après refroidissement, on y ajoute 7.5 ml d'eau.

Lorsqu'il s'agit de bêtaïne crotonique, on ajoute l'acide sulfurique et, immédiatement après, l'eau.

Après addition de 2 ml de $KMnO_4$ 0.02 N, on chauffe la solution à 60°C pendant 20 minutes; on ajoute 3 ml d'acide oxalique 0.02 N, puis on titre, à chaud, l'excès d'acide oxalique par la solution de permanganate en se servant d'une microburette. L'oxydation complète de la bêtaïne crotonique en CO_2 , H_2O et glycine-bêtaïne lui enlève 10 électrons de sorte que 1 ml de la solution de permanganate équivaut à 0.294 mg de carnitine ou 0.258 mg de bêtaïne crotonique. Quand les quantités de carnitine ou de bêtaïne dépassant 0.5 mg, les volumes des solutions de $KMnO_4$ et d'acide oxalique ajoutés avant la titration proprement dite, sont portés respectivement à 10 et 15 ml.

Electrophorèse sur papier⁽³⁾ :

Le solvant de pH 4 est une solution aqueuse qui contient 17.5 ml d'acide acétique et 5 ml de pyridine par litre.

L'appareil utilisé est le LKB type 3290 B; les bandes de papier LKB ont 410 × 40 mm. Après équilibration du papier imbibé de solvant sous une tension de 350 volts, environ 0.2 mg de la substance sous la forme de chlorhydrate en solution dans 0.05 ml d'eau est déposé au centre de la bandelette et l'électrophorèse est poursuivie pendant 4 heures sous la même différence de potentiel.

Le développement de l'électrophorétoqramme est fait dans des vapeurs d'iode⁽⁴⁾ pendant environ 12 heures et le contraste est accentué par des vapeurs d'ammoniaque.

Mesures de radioactivité :

a) A 1 ml ou moins de solution aqueuse convenablement diluée, en ajoute 11 ml d'une solution scintillante (10 g. PPO, 250 mg. POPOP et 100 g. naphthalène par litre de dioxane⁽⁵⁾). La mesure de radioactivité se fait dans un appareil Tri-Carb, modèle automatique; le rendement est calculé en se servant d'un étalon de naphthylacétamide tritiée. Dans certains cas, on a été obligé d'utiliser de l'hydroxyde d'hyamine⁽⁶⁾ pour éviter une précipitation; on ajoutait alors 3 ml d'une solution méthanolique 0.2 N d'hydroxyde d'hyamine et 9 ml d'une solution scintillante (11 g. PPO et 270 mg. POPOP par litre de toluène). Toutes les mesures de radioactivité ont été corrigées pour les ramener à la même date.

(⁵) PPO = 2, 5-diphényloxazole

POPOP = 1, 4-bis-2 (5-phényloxazolyl)-benzène

hyamine = di-isobutylcrésoxyéthoxyéthyl-diméthylbenzyl-ammonium.

(²) E. STRACK et I. LORENZ, *Z. Physiol. Chem.*, **298**, 27, 1954.

(³) J.M. GHUYSEN, communication personnelle.

(⁴) G. BRANTE, *Nature*, **163**, 651, 1949.

b) Les électrophorétogrammes sont passés dans un appareil construit par le Dr. P.A. Osinski⁽³⁾ (4). Il s'agit de deux compteurs ouverts remplis d'argon, pourvus chacun d'une fente colimatrice de 8 mm, entre lesquels passe la bande de papier. La radioactivité est inscrite d'une manière continue sur un papier enregistreur.

Échange selon Wiltzsch et élimination des tritiums labiles

300 mg d'acide β -hydroxy- γ -amino-butyrrique (2.52 millimoles) sont exposés en couche mince à 21 curies de tritium sous la forme d'hydrogène moléculaire pendant 15 jours à température ordinaire et sous une pression de 250 mm Hg. Après évacuation de l'hydrogène tritié, l'activité totale est de 1600 mC.

Dans le but d'éliminer les tritiums labiles, le résidu est dissous dans 25 ml d'eau puis celle-ci est évaporée. Après trois traitements identiques, la radioactivité totale est de 140 mC. Le produit est dissous dans 10 ml d'eau (**).

Méthylation de l'acide β -hydroxy- γ -amino-butyrrique en dl-carnitine (5).

L'opération se fait dans l'appareil représenté par la figure 1.

La solution de l'acide β -hydroxy- γ -amino-butrique est placée dans le fond du tube renflé A et évaporée à sec sous pression réduite (le distillat est gardé

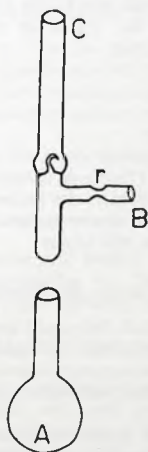


Fig. 1 — appareil à méthylation. Voir détails dans le texte.

(*) Nous remercions le Dr. Osinski qui a fait ces enregistrements pour nous.

(**) Ces opérations ont été faites au Centre Nucléaire Belge à Mol par M. Winand que nous remercions vivement.

(3) P.A. OSINSKI, *Intern. J. Applied Rad. Isot.*, 7, 306, 1960.

(5) H.E. CARTER et P.K. BHATTACHARYYA, *J. Am. Chem. Soc.*, 75, 2503, 1953.

dans une ampoule scellée comme déchet radioactif). Le tube A est alors soudé au reste de l'appareil. Par le bras latéral B, on introduit 1.7 ml de KOH 7 N puis 21 ml d'une solution méthanolique contenant 1.2 ml d'iode de méthyle. L'extrémité A est gelée dans la carboglace; on fait le vide avec une pompe mécanique avant de sceller le bras latéral au niveau du rétrécissement *r*. Lorsque l'appareil est revenu à la température ambiante, on le met pendant 48 heures dans une étuve à 75°C. Le liquide devient jaune brun alors qu'au cours d'essais préliminaires faits avec de l'acide β -hydroxy- γ -amino-butérique non irradié, la solution restait incolore.

Pour évacuer les solvants, on place un pièce de fer dans le tube au-dessus du capillaire scellé (break seal). L'extrémité supérieure C de l'appareil est soudée à l'entrée d'un piège en verre pyrex que l'on plonge dans la carboglace tandis que la sortie est reliée à une pompe mécanique. Le bulbe A est plongé dans la carboglace avant de briser le capillaire scellé au moyen de la pièce de fer manœuvrée de l'extérieur avec un aimant; A est sorti de la carboglace et la distillation se fait lentement; quand elle est terminée, on scelle les deux extrémités du piège que l'on garde comme déchet radioactif. L'appareil est alors coupé en dessous du bras latéral.

Le résidu est dissous dans 17 ml d'eau et la solution est extraite 3 fois avec 17 ml de phénol saturé d'eau. Les extraits phénoliques réunis sont lavés 2 fois avec 17 ml d'eau avant d'être versés dans 150 ml d'éther diéthylique. On recueille la phase aqueuse qui se sépare et on y joint 3 lavages avec 17 ml d'eau. Les phases aqueuses réunies sont lavées avec 150 ml d'éther.

De manière à éliminer les traces de phénol et l'acide β -hydroxy- γ -amino-butérique qui n'a pas réagi ou qui est incomplètement méthylé, la solution aqueuse est passée à travers une colonne de 35 ml d'Amberlite CG-45 sous la forme basique; la résine est ensuite lavée avec 150 ml d'eau. L'effluent est acidifié avec 5 ml de HCl N avant d'être évaporé à sec; le résidu contient le chlorure de carnitine tritiée.

Ce résidu a une activité totale de 16 mC et un dosage par le permanganate donne un équivalent de 170 mg de carnitine (1.16 millimole). L'électrophorogramme révélé à l'iode montre des taches à — 58, — 80 et — 114 mm alors que le témoin carnitine ne donne qu'une seule tache à — 57 mm. Le produit est donc chimiquement très pur.

Purification de la dl-carnitine tritiée par chromatographie (7).

La colonne de Dowex-50 (100-200 mesh) sous la forme acide a une hauteur de 240 mm et un diamètre de 24 mm. Le chlorure de carnitine, en solution dans 5 ml d'eau, est déposé au sommet et l'éluion est immédiatement commencée avec HCl N. Le débit est de 0.5 ml par minute et on recueille des fractions de 22 ml.

Dans chaque fraction, on prélève une portion aliquote pour le dosage au permanganate et une autre pour la mesure de radioactivité. La figure 2 montre le résultat de ces mesures. Le permanganate révèle 2 pics principaux (maxima dans les tubes 21 et 27), la courbe de radioactivité 4 pics (4, 14, 21 et 27). Le dernier pic, dont le sommet se trouve dans le tube 27, occupe la position de la carnitine. On confirme qu'il s'agit bien de carnitine en soumettant à l'électrophorèse sur papier un échantillon du contenu du tube 27. La sub-

(7) S. FRIEDMAN, J.E. MCFARLANE, P.K. BHATTACHARYYA et G. FRAENKEL, *Arch. Biochem. Biophys.*, 59, 484, 1955.

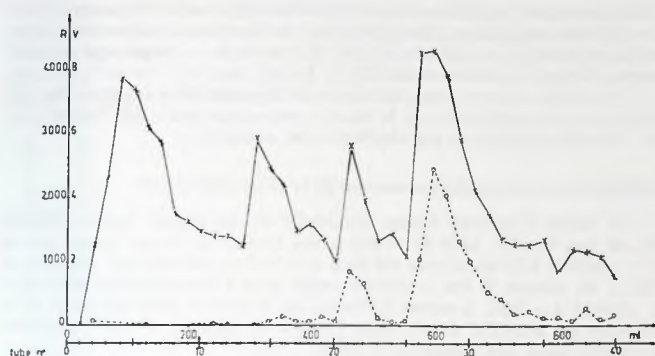


Fig. 2 — chromatographie sur Dowex-50 du produit de méthylation de l'acide β -hydroxy- γ -amino-butérique tritié par échange. Dosage au permanganate et mesures de radioactivité.

Abscisses : = numéros des fractions et volume de l'effluent;
 ordonnées : V = volume KMnO_3 0.02 N nécessaire pour titrer 1 ml.
 ordonnées : R = radioactivité en d/min. contenue dans 10^{-3} ml.

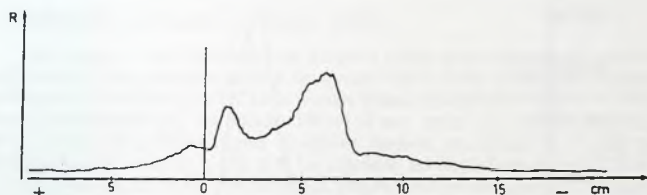


Fig. 3 — électrophorégramme sur papier de la fraction carnitine après purification par chromatographie sur Dowex-50. Enregistrement de la radioactivité. Le produit a été déposé au point 0 de l'abscisse.

stance présente dans le tube 21 ne se laisse pas révéler à l'iode après électrophorèse (*).

Les fractions 26 à 32 sont réunies et évaporées à sec sous pression réduite. Le résidu, redissous dans l'eau, est alors soumis aux épreuves du dosage chimique, de la mesure de radioactivité et de l'électrophorèse sur papier. Le permanganate indique la présence de 112 mg de carnitine (0.76 millimole), ce qui représente un rendement de 30% à partir de l'acide β -hydroxy- γ -amino-butérique soumis à l'action de l'hydrogène tritié. La mesure de radioactivité donne un total de 1.25 mC, soit une activité spécifique de 1.65 mC par millimole.

(*) Ces impuretés chimiques n'ont pas été observées au cours d'expériences pilotes à froid : la chromatographie ne montrait qu'un seul pic identifiable au permanganate et l'électrophorèse sur papier une seule tache révélée par l'iode. Le rendement, à partir de l'acide β -hydroxy- γ -amino-butérique, était de 70%.

L'électrophorèse sur papier ne donne qu'une seule tache révélée par l'iode à -58 mm; cependant l'enregistrement de la radioactivité montre, outre un pic principal à -58 mm, un pic accessoire à -10 mm qui contient environ 30% de la radioactivité (figure 3).

Ce produit encore impur est divisé en deux fractions égales : l'une est utilisée pour la préparation de la bétaïne crotonique tandis que l'autre subit une nouvelle purification par électrophorèse continue.

Purification par électrophorèse continue de la dl-carnitine tritiée

On utilise l'appareil Spinco Model CP et des rideaux Spinco 400-235 qui ont une hauteur utile de 30 cm et une largeur de 35 cm. Le solvant de pH 4 contient 8.75 ml d'acide acétique et 2.5 ml de pyridine par litre (on le prépare en diluant 2 fois le solvant utilisé pour l'électrophorèse analytique sur papier). Le débit, à travers le rideau, est d'environ 30 ml par heure et la différence de potentiel de 600 volts (courant stabilisé de 80 mA). L'effluent est recueilli dans une batterie de 32 tubes.

Les 56 mg de carnitine (sous la forme de chlorure) sont purifiés en 3 fois. Chaque fraction est dissoute dans 10 ml d'eau et appliquée à la partie supérieure du rideau à 10 cm du bord positif; l'application dure 30 heures et le tube d'admission est finalement lavé 3 fois avec 1 ml d'eau que l'on infuse également dans le papier.

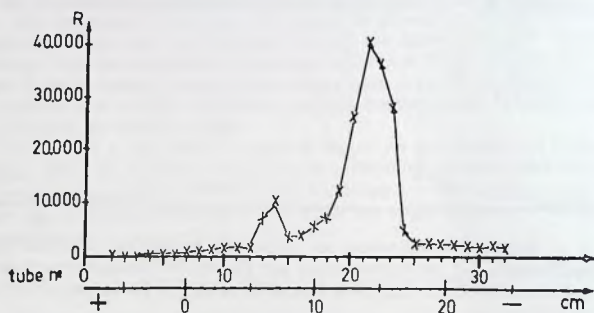


Fig. 4 — électrophorèse continue d'une partie de la carnitine obtenue par chromatographie sur Dowex-50.

Abscisses : numéros des tubes recueillant l'effluent du rideau et migration transversale (en cm) par rapport au point où le produit est introduit dans le papier;

ordonnées : radioactivité en d/min. mesurée sur 1/600 de chaque fraction.

Le contenu des tubes est amené à un volume constant de 50 ml et une portion aliquote sert à la mesure de la radioactivité. La figure 4 montre le résultat de ces mesures; on retrouve le petit pic d'impureté découvert précédemment dans l'électrophorèse analytique sur papier. On reunit le contenu des tubes correspondant au pic principal (19 à 23 pour l'exemple représenté dans la figure 4); le tampon étant volatil, on évapore à sec pour obtenir un résidu de carnitine. Ce résidu est dissous dans 5 ml HCl N et la solution est évaporée à sec pour obtenir le chlorure.

Un dosage au permanganate montre que les résidus réunis contiennent 41 mg de carnitine et une mesure de radioactivité donne un total de 0.245 mC; l'activité spécifique est donc de 0.88 mC par millimole. Une électrophorèse sur papier montre une seule tache à — 52 mm repérable à l'iode et un seul pic radioactif ayant la même position (figure 5).

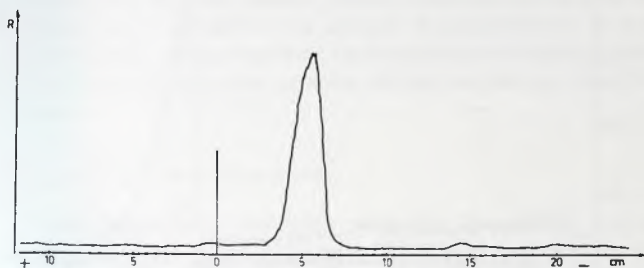


Fig. 5 — électrophorétogramme sur papier de la carnitine purifiée par chromatographie sur Dowex-50 et électrophorèse continue. Enregistrement de la radioactivité. Le point O de l'abscisse indique l'endroit où le produit a été déposé.

Transformation en bêtaïne crotonique tritiée

A 56 mg (= 0.38 millimole) de carnitine tritiée sous la forme du chlorure sec obtenu après chromatographie, on ajoute 5 ml d'acide sulfurique concentré et on évacue les vapeurs de HCl à la trompe à eau. On chauffe 4 heures à 130°C. Après refroidissement, on ajoute 150 ml d'eau, puis, par petites fractions, 65 gr de Ba(OH)₂·8H₂O. Après 12 heures environ, on ajoute de l'acide sulfurique N pour amener le pH à 6. Le précipité est centrifugé et lavé 2 fois à l'eau. Le surnageant et les eaux de lavage encore troubles sont portés à ébullition avec quelques morceaux de papier avant d'être filtrés à travers un Schleicher et Schül 589/3; le filtrat est clair. Il est passé à travers 35 ml d'Amberlite CG-45 sous la forme basique avant d'être acidifié par addition de 1 ml de HCl N et évaporé à sec. Le résidu contient la bêtaïne crotonique sous la forme de chlorure.

Un dosage au permanganate sans déshydratation préalable par l'acide sulfurique, indique la présence de 42.6 mg de bêtaïne crotonique (0.33 millimole) soit un rendement de 89% à partir de la carnitine; ce rendement est analogue à ceux que l'on obtient avec les produits non radioactifs. La radioactivité totale est de 0.274 mC, soit une activité spécifique de 0.83 mC par millimole. L'électrophorèse sur papier montre une seule tache révélée par l'iode à — 28 mm (— 32 mm pour le témoin) ce qui indique une disparition complète de la carnitine.

Purification de la bêtaïne crotonique tritiée par chromatographie

Le procédé est le même que celui qui a été décrit à propos de la carnitine.

Dans chaque fraction, on prélève une portion aliquote pour le dosage par le permanganate (avec déshydratation par l'acide sulfurique pour dépister éventuellement de la carnitine) et une autre pour la mesure de radioactivité.

La figure 6 montre que les deux méthodes ne révèlent qu'un seul pic dont le sommet se trouve dans le tube 57.

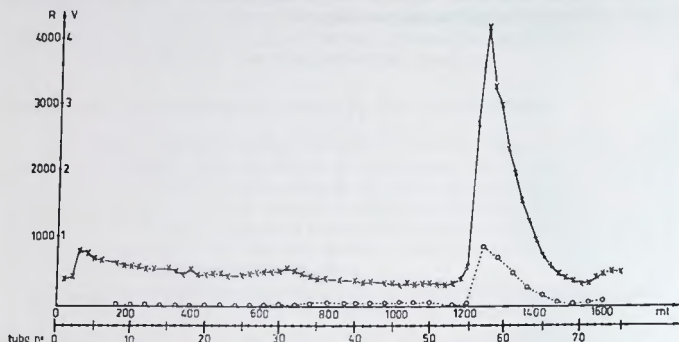


Fig. 6 — chromatographie sur Dowex-50 du produit de déshydratation de la carnitine tritiée. Dosages au permanganate et mesures de radioactivité. Abscisses : numéros des fractions et volume de l'effluent; ordonnées : V = volume KMnO_4 0.02 N nécessaire pour titrer 1 ml; ordonnées : R = radioactivité en d/min. contenue dans 10^{-3} ml.

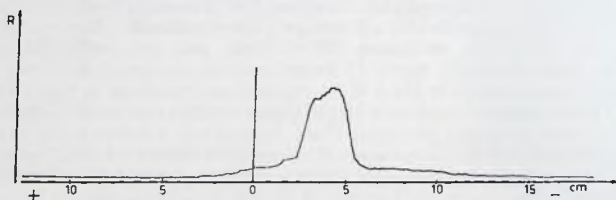


Fig. 7 — électrophorégramme sur papier de la bêtaïne crotonique tritiée purifiée par chromatographie sur Dowex-50. Enregistrement de la radioactivité. Le point 0 de l'abscisse correspond à l'endroit où le produit a été déposé.

Les fractions 56 à 65 sont réunies et évaporées à sec sous pression réduite. Un dosage au permanganate fait sur le résidu indique la présence de 25.1 mg de bêtaïne crotonique (0.195 millimole); la radioactivité totale est de 0.177 mC, ce qui donne une activité spécifique de 0.91 mC par millimole. L'électrophorèse sur papier ne donne qu'une seule tache révélée par l'iode à — 40 mm (témoin — 38 mm) et l'enregistrement de la radioactivité un seul pic qui coïncide avec cette tache (figure 7).

La bêtaïne crotonique tritiée n'est donc pas contaminée par de la carnitine et l'impureté qui se trouvait dans la carnitine tritiée de départ a disparu au cours de la conversion en bêtaïne et des opérations de purification.

DISCUSSION

Le but de ce travail étant de marquer la dl-carnitine et la bétaine crotonique avec du tritium en dehors de leurs groupes méthyle, on ne pouvait utiliser, dans une méthode globale d'échange comme celle de Wilzbach, que le précurseur non méthylé de ces substances, c.-à-d. l'acide β -hydroxy- γ -amino-butyrique. Ce procédé nous a d'ailleurs permis d'avoir une purification plus complète et plus certaine des produits marqués.

Préparation de la dl-carnitine tritiée

On est frappé par le très faible rendement du procédé : alors qu'après élimination des tritium labiles la radioactivité totale était encore de 140 mC, on n'a obtenu, après chromatographie et électrophorèse continue, que 0.5 mC (2×0.245) de dl-carnitine, soit un rendement de moins de 0.4%.

Ce faible rendement est dû à plusieurs causes que nous examinerons successivement :

a) le rendement chimique de transformation de l'acide β -hydroxy- γ -amino-butyrique en dl-carnitine est de 30% avec des produits tritiés au lieu de 70% dans des expériences pilotes à froid. La différence doit être attribuée à une importante radiolyse de l'acide β -hydroxy- γ -amino-butyrique exposé 15 jours à 21 curies de tritium (énergie totale des radiations $\beta = 5.64 \times 10^{21}$ eV). La présence de produits de radiolyse s'est également trahie pendant la méthylation en tube scellé sous vide par l'apparition d'une coloration jaune brun.

b) la variation des activités spécifiques est encore beaucoup plus intéressante :

acide β -hydroxy- γ -amino-butyrique après échange	630 mC/millimole
après élimination des tritium labiles	55
carnitine après méthylation	14
après purification chromatographique	1.65
après purification électrophorétique	0.88

Rappelons que la quantité de carnitine est mesurée par un dosage au permanganate après déshydratation.

Ces résultats indiquent que, après exposition au tritium, la plus grande partie de la radioactivité se trouve dans des produits de radiolyse dont l'activité spécifique est beaucoup plus élevée que celle de l'acide β -hydroxy- γ -amino-butyrique et de la dl-carnitine qui en dérive. Ce

travail ne fait qu'attirer l'attention, une fois de plus, sur l'importance de la purification après marquage au tritium par échange selon la technique de Wilzbach. Par ailleurs, l'exposition d'un précurseur, suivie de sa transformation, en une ou plusieurs étapes, dans le produit souhaité est susceptible de présenter des garanties supplémentaires quant à la pureté radiochimique des produits finals grâce aux purifications nécessaires à chaque étape de la synthèse.

La dl-carnitine tritiée finalement obtenue paraît chimiquement et radioactivement pure dans les opérations de chromatographie sur Dowex-50 et électrophorèse continue; cette pureté a finalement été contrôlée par électrophorèse sur papier.

Préparation de la bêtaïne crotonique tritiée

La déshydratation de la carnitine ne semble s'accompagner d'aucune perte de radioactivité puisque l'activité spécifique passe de 0.88 mC par millimole pour la carnitine à 0.91 mC par millimole pour la bêtaïne crotonique. On pourrait tenter d'en déduire que, dans la carnitine tritiée par la méthode que nous avons décrite, aucune radioactivité n'est présente dans les hydrogènes en position α .

La légère augmentation de l'activité spécifique de la bêtaïne crotonique après chromatographie et les enregistrements de radioactivité des électrophorétoqrammes analytiques, indiquent la pureté radiochimique du produit finalement obtenu.

The first part of the ...

The second part of the ...

CHAPTER ...

The third part of the ...

The fourth part of the ...