

**J.E.N. 569**

Sp ISSN 0081-3397

**SINTESIS DE N-ACETIL-<sup>3</sup>H- $\alpha$ -ASPARTIL-GLUTAMICO  
A ESCALA DE MICROMOLES**

por

C. Suárez

**JUNTA DE ENERGIA NUCLEAR**

**MADRID, 1984**

CLASIFICACION INIS Y DESCRIPTORES

B14

CHEMICAL PREPARATION

GLUTAMIC ACID

ACETYLATION

ACETYL RADICALS

ASPARTIC ACID

ORGANIC COMPOUNDS

TRITIUM COMPOUNDS

Toda correspondencia en relación con este trabajo debe dirigirse al Servicio de Documentación Biblioteca y Publicaciones, Junta de Energía Nuclear, Ciudad Universitaria, Madrid-3, ESPAÑA.

Las solicitudes de ejemplares deben dirigirse a este mismo Servicio.

Los descriptores se han seleccionado del Thesaurus del INIS para describir las materias que contiene este informe con vistas a su recuperación. Para más detalles consúltase el informe IAEA-INIS-12 (INIS: Manual de Indización) y IAEA-INIS-13 (INIS: Thesaurus) publicado por el Organismo Internacional de Energía Atómica.

Se autoriza la reproducción de los resúmenes analíticos que aparecen en esta publicación.

Este trabajo se ha recibido para su impresión en Noviembre de 1.984.



SINTESIS DE N-ACETIL-<sup>3</sup>H- $\alpha$ -ASPARTIL-GLUTAMICO  
A ESCALA DE MICROMOLES

---

C. Suárez

---

El ácido N-Acetil-<sup>3</sup>H- $\alpha$ -Aspartil-Glutámico se ha preparado de acuerdo con el método de Le Quesne y Young [1], teniendo en cuenta las indicaciones de J.K. Whitehead [2] y de Miyamoto y otros [3]. El método de síntesis se ha adaptado a una escala de 22 micromoles.

1.- MATERIALES Y PRODUCTOS QUIMICOS

Materiales

- . Placas de celulosa y de gel de sílice Merck.
- . Radiocromatógrafo Berthold.

Productos Químicos

- . Acido L- $\alpha$ -Aspartil-L-Glutámico de la Senn Chemical (\*).
- . Anhídrido acético-<sup>3</sup>H, procedente del Radiochemical Centre (Amersham) (\*\*).

---

Abreviaturas utilizadas:

(\*) Acido L- $\alpha$ -Aspartil-L-Glutámico: NA-ASP-Glu; N-Acetil-<sup>3</sup>H- $\alpha$ -Aspartil-Glutámico: NA-<sup>3</sup>H-Asp-Glu.

(\*\*) El anhídrido acético-<sup>3</sup>H empleado en la acetilación respondía a las siguientes especificaciones:

As: 8,74 C/ $\mu$ mol.

Líquido, bajo vacío, almacenado a -20°C.

En estas condiciones el producto se autoradioliza a un ritmo del 1% durante las seis primeras semanas, pero a partir de ahí el proceso puede acelerarse. Además en ausencia de disolvente suele observarse formación de ácido acético, ya que 1 mg de anhídrido se hidroliza completamente con 0,18 mg de agua.

## 2. METODO

### 2.1.- Procedimiento de obtención de N-<sup>3</sup>H- -Aspartil-Glutámico

Se disuelven 22,7  $\mu$ moles -5,95 mg- del dipéptido L- $\alpha$ -Aspartil-L-Glutámico en 2 ml de agua, y se agrega hidróxi do potásico 0,1 N hasta alcanzar un pH comprendido entre 8,5-9. Se enfría la solución con hielo y se incorporan bajo enérgica agitación 22,7  $\mu$ moles de anhídrido acético-<sup>3</sup>H disueltos en 1 ml de tolueno redestilado. (En la agitación se ha de conseguir la formación de pequeñas gotitas de tolueno con objeto de que el paso del anhídrido acético-<sup>3</sup>H a la solución acuosa sea inmedia to). Baja el pH del medio, por lo que es necesario agregar gota a gota más hidróxido potásico hasta lograr que se mantenga entre 8,5-9. La agitación y el enfriamiento se continúan durante una hora, transcurrida la cual, se enfría a -20°C, a fin de que se congele la solución acuosa, y se pueda separar por decanta ción el tolueno sobrenadante.

Para eliminar el ión K<sup>+</sup> y el dipéptido no acetila do se pasa la solución por una columna de 1x5 cm de Dowex 50x8, 200-400 mallas (forma H<sup>+</sup>) en donde quedan fijados. La columna se lava a continuación con 6 ml de agua.

El eluido junto con las aguas de lavado se evaporan a sequedad a vacío a 35°C. Es necesario añadir dos veces un po co de agua y evaporar a sequedad seguidamente con el fin de eli minar las trazas del ácido acético radiactivo que puedan aún permanecer en el residuo. Se obtiene un aceite que pesa 5,8 mg.

El NA-<sup>3</sup>H-Asp-Glu obtenido se identifica por compara ción con un patrón de NA-Asp-Glu por cromatografía en lámina delgada, de celulosa, o gel de sílice, utilizando como eluyen tes n-Butanol/AcH/H<sub>2</sub>O, 12:3:5 y n-Butanol/Piridina/H<sub>2</sub>O 1:1:1. Como revelador se ha empleado verde de bromocresol; el compues to aparece como mancha amarilla sobre un fondo verde azulado.

La pureza radioquímica se verificó mediante autorradiografía y radiocromatografía.

## 2.2.- Purificación del NA-<sup>3</sup>H-Asp-Glu

Si bien no se detectó en la cromatografía del producto bruto ningún otro ácido tal como el dipéptido Asp-Glu, o los aminoácidos aspártico o glutámico, apareciendo únicamente la mancha amarilla con R<sub>f</sub> correspondiente al NA-Asp-Glu, la radiocromatografía muestra la presencia de un alto contenido de impurezas radiactivas que rebajan la pureza radioquímica del producto a un 60% (Fig. 1 y Fig. 2a). La purificación se realiza recristalizando el producto de etanol-acetona-éter de petróleo. En las figuras 2a, 2b y 2c se aprecia el progreso de la purificación por recristalización. Una segunda recristalización condujo a un producto cuya pureza radioquímica era superior al 95% (Figs. 3 y 4).

Como la escala de trabajo no permitía ulteriores recristalizaciones, la purificación final hasta el 99% se realizó mediante cromatografía de intercambio iónico. Para ello se fijó la solución acuosa del producto recristalizado en una columna 1x5 cm, con resina aniónica Dowex 1x8, 200-400 mallas, que se encontraba como formiato. Se pasaron a su través 20 ml de agua, y seguidamente 20 ml de ácido fórmico 0,1 M con el fin de eliminar posibles aminoácidos ácidos. A continuación se descargó el NA-<sup>3</sup>H-Asp-Glu con fórmico 1M [4], recogiendo fracciones de 1 ml cuya radiactividad se midió. En la Fig. 5 se muestra el transcurso de la elución del NA-<sup>3</sup>H-Asp-Glu. Se juntaron las fracciones correspondientes a los tubos 25 a 40 y se concentraron a sequedad bajo vacío. La radiactividad del pico de elución representa el 95,5% de la radiactividad total -dato que confirma la pureza radioquímica determinada previamente por radiocromatografía- y su pureza radioquímica, superior al 99% (Fig. 6).

### 2.3.- Recuperación de $\text{NA-}^3\text{H- Asp-Glu}$ procedente de las aguas madres de la recristalización

Se realiza también separándolo de las impurezas mediante cromatografía de intercambio iónico. El producto de partida es el representado en la figura 2c. Las condiciones para la elución ya se señalaron más arriba. Solamente se recogieron como fracciones de 1 ml las correspondientes a la elución con ácido fórmico 1 M (Fig. 7). El paso previo de agua y ácido fórmico 0,1 M se realizó recogiendo el eluido en matraces aforados de 25 ml. Las actividades de los matraces representaban el 18% y el 27% respectivamente del total. El pico de  $\text{NA-}^3\text{H- Asp-Glu}$  eluido con ácido fórmico 1 M representa el 50% de la actividad y contiene un 5% de impurezas (Fig. 8). El resto de la radiactividad se eluyó con ácido fórmico 5 M. No se identificaron las impurezas salvo las que descargan junto con el  $\text{NA-}^3\text{H- Asp-Glu}$ , y que fundamentalmente consisten en Acetilaspártico- $^3\text{H}$ , el cual se elimina volviendolo a pasar nuevamente por la columna aniónica<sup>(\*)</sup> (Fig. 8).

### 3.- ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

Hemos seguido las recomendaciones de E.A. Evans [5], según las cuales los aminoácidos de alta actividad específica (por encima de los 500 mCi/mmol) deben almacenarse en soluciones acuosas a una concentración radiactiva máxima de 1 mCi/ml, utilizando como "scavenger", etanol en una proporción del 2%. En estas condiciones y bajo una temperatura de +2°C, los aminoácidos presentan en general una descomposición inferior al 1% mensual.

---

(\*) Dada la eficacia y sencillez de purificación del  $\text{NA-}^3\text{H- Asp-Glu}$  con columna de intercambio aniónico, consideramos innecesaria la etapa previa de purificación por recristalización, máxime cuando se opera a una escala tan pequeña (0,02 mmoles).



No hemos constatado si en estas condiciones de almacenamiento en solución se produce racemización, lo que a veces ocurre en algunos aminoácidos tritiados ópticamente activos, a diferencia de los correspondientes compuestos marcados con C-14.

#### 4.- RESUMEN

Se ha sintetizado N-Acetil-<sup>3</sup>H-L-α-Aspartil-L-Glutámico de alta actividad específica a escala de micromoles acetilando con anhídrido acético-<sup>3</sup>H disuelto en tolueno redestilado el dipéptido L-α-Aspartil-L-Glutámico. La purificación se realiza mediante columnas de intercambio catiónico y aniónico. La pureza radioquímica en el momento de la preparación es superior al 99%.

BIBLIOGRAFIA

- [1] W.J. Le Quesne y G.T. Young.- J.Chem.Soc. 1, 24 (1952).
- [2] J.K. Whitehead.- Biochem.J. 68, 662 (1958).
- [3] E. Miyamoto, Y. Kakimoto e I. Sano.- J.Neurochem. 13, 999-1003 (1966).
- [4] M. Miyake, Y. Kakimoto y M. Sorimachi.- J.Neurochem. 36, (3) 804-810 (1981).
- [5] E.A. Evans.- "Self-Descomposition of Radiochemicas".- Re view 16.- The Radiochemical Centre. Amersham, England.

J.F.N. D.Q. 67 6464

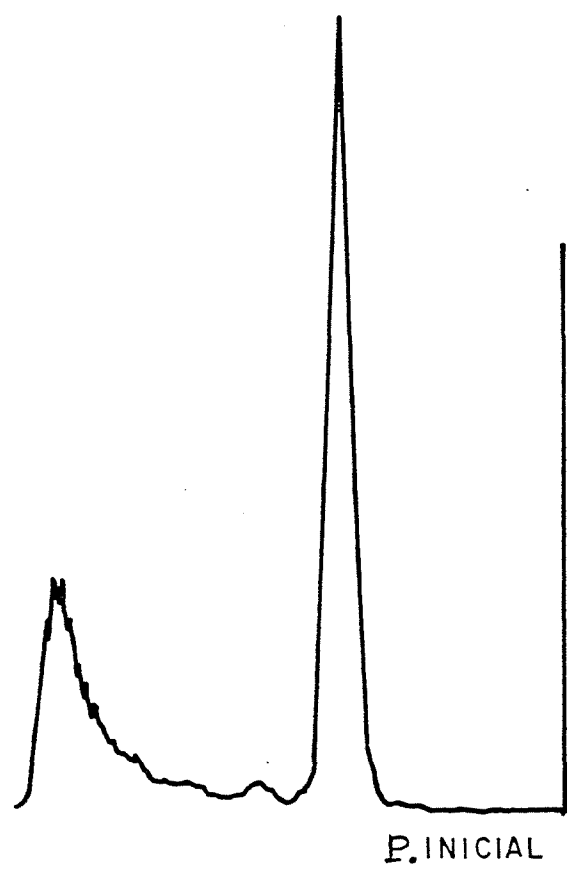


Fig. 1.- Radiocromatograma del producto de acetilación del Asp-Glu con anhídrido acético-<sup>3</sup>H (placa de celulosa Merck, Butanol/AcH/H<sub>2</sub>O, 12:3:5)

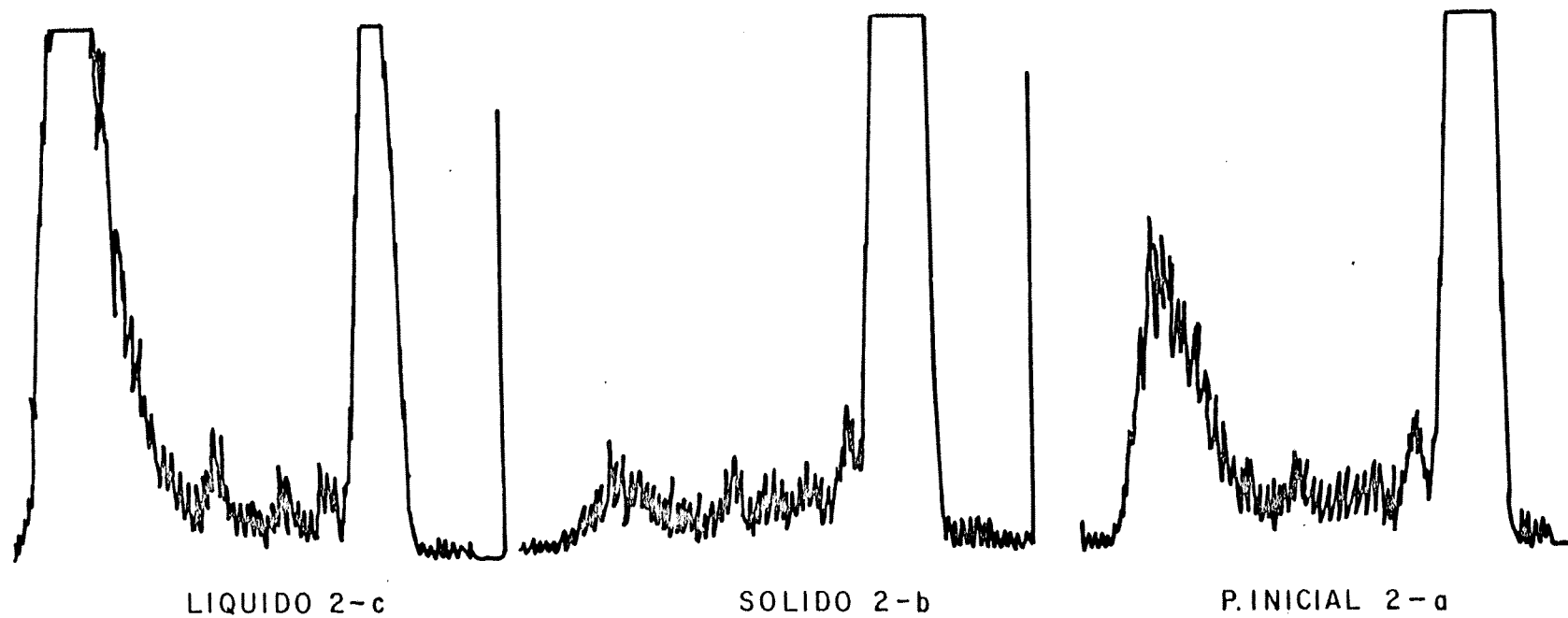


FIG. 2.- Radiocromatogramas del producto de acetilación del Asp-Glu con anhídrido acético-<sup>3</sup>H.

(Placas de gel de sílice Merck; Butanol/AcH/H<sub>2</sub>O, 12:3:5)

- 2-a Producto inicial
- 2-b Producto recristalizado
- 2-c Aguas de recristalización

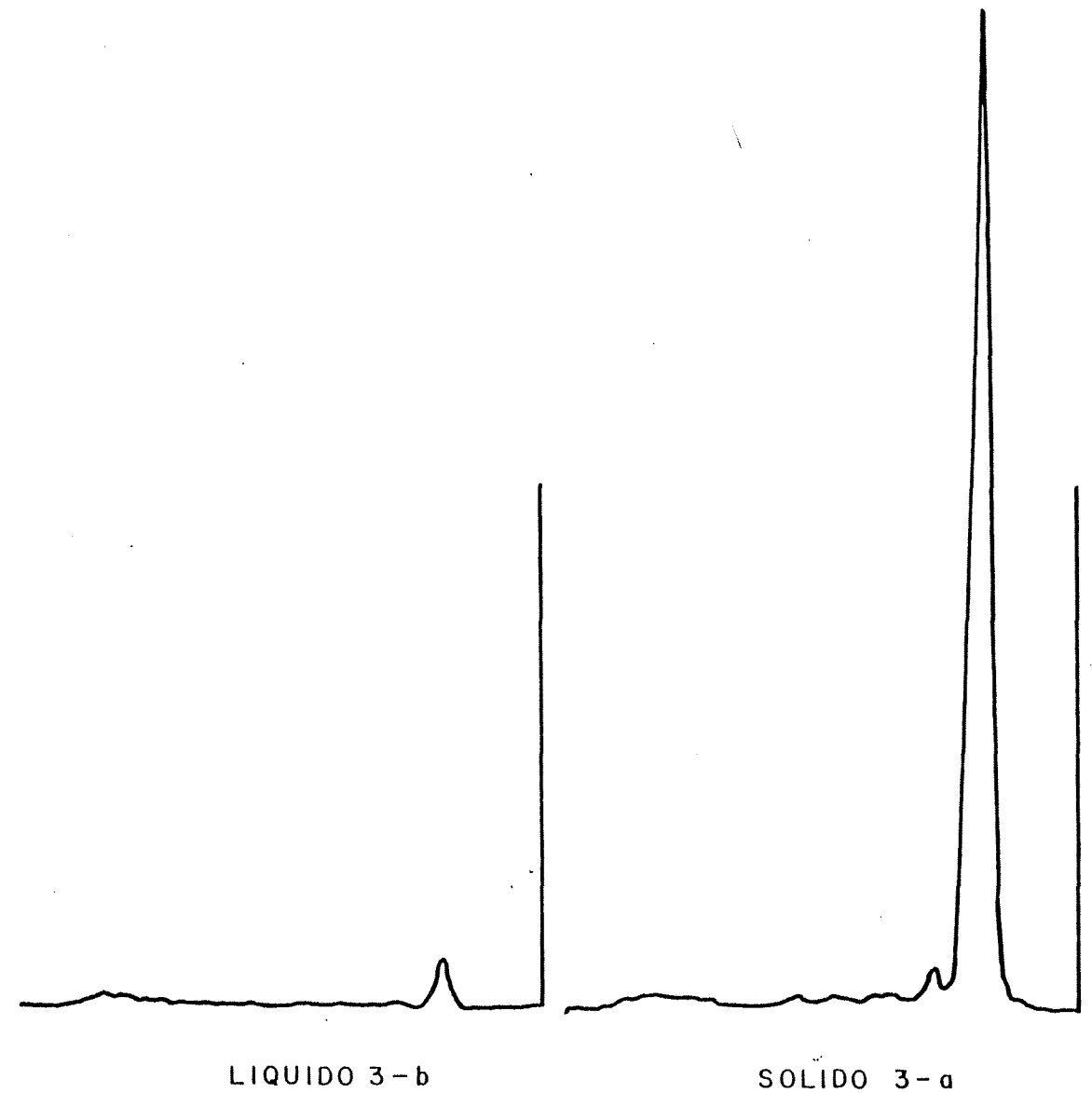


FIG.3.- Radicromatograma de Ac-<sup>3</sup>H-Asp-Glu recristalizado 2 veces. (gel de sílice)  
3-a. Producto recristalizado  
3-b. Aguas de recristalización

J.E.N. D. Q. G. 6482

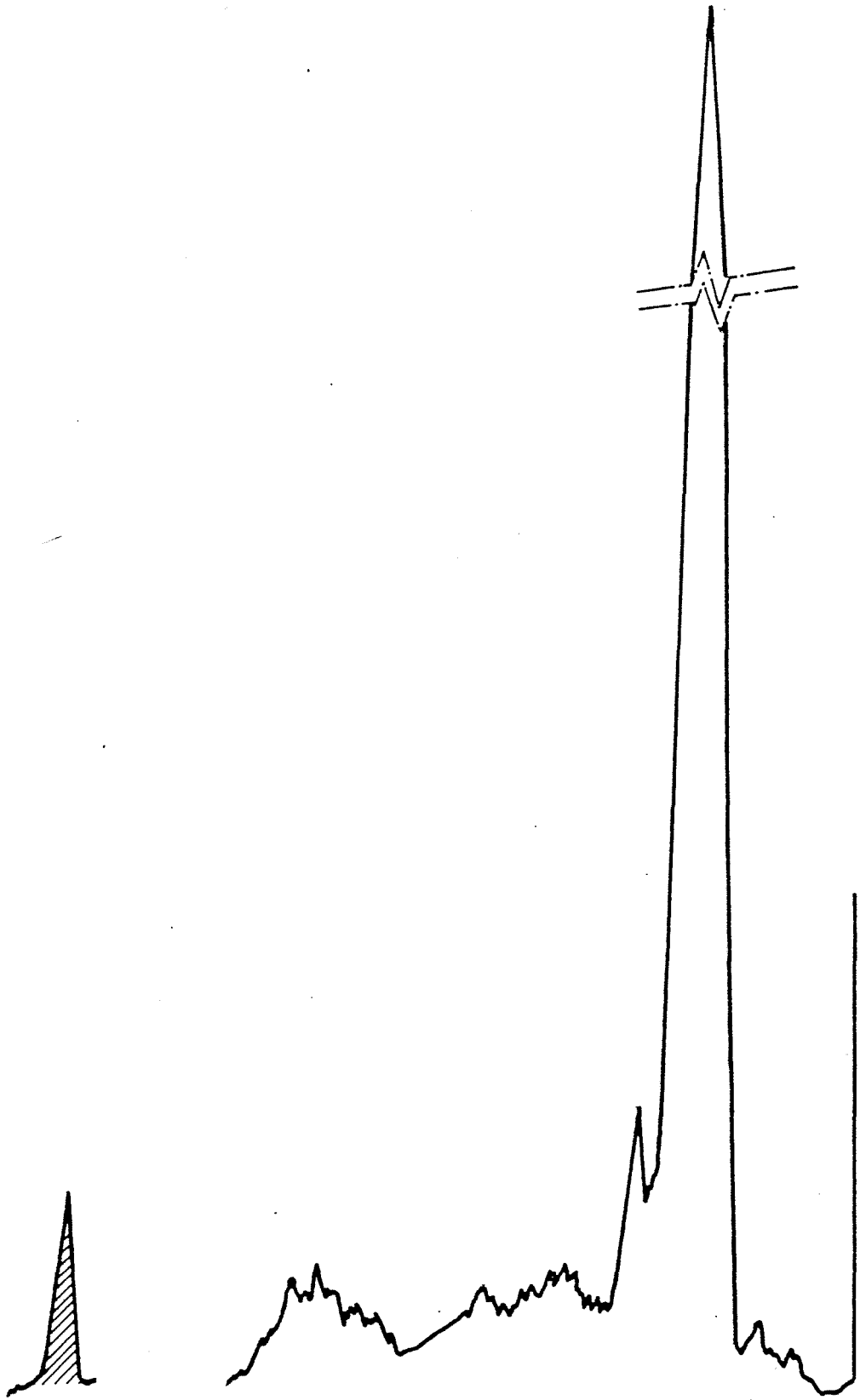


FIG. 4.- Radiocromatograma 3-a, con ampliación de impurezas.  
(El pico rallado corresponde a una actividad 100 veces menor.)

J.E.N. D.O. G. 6473

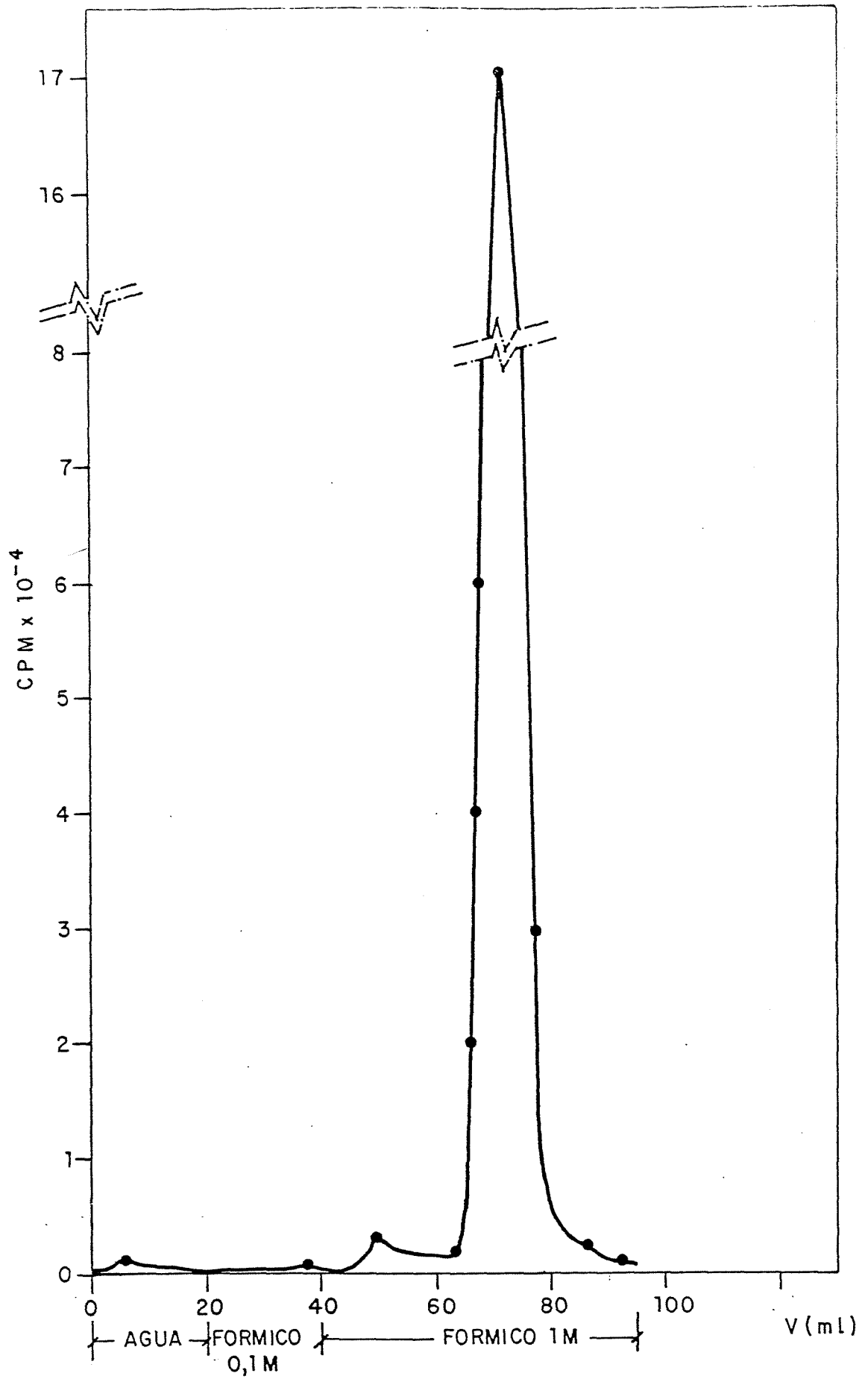


FIG. 5.- Elución de Ac-<sup>3</sup>H-Asp-Glu procedente de las aguas de recristalización.

J.E.M. D.O. Gr 6424

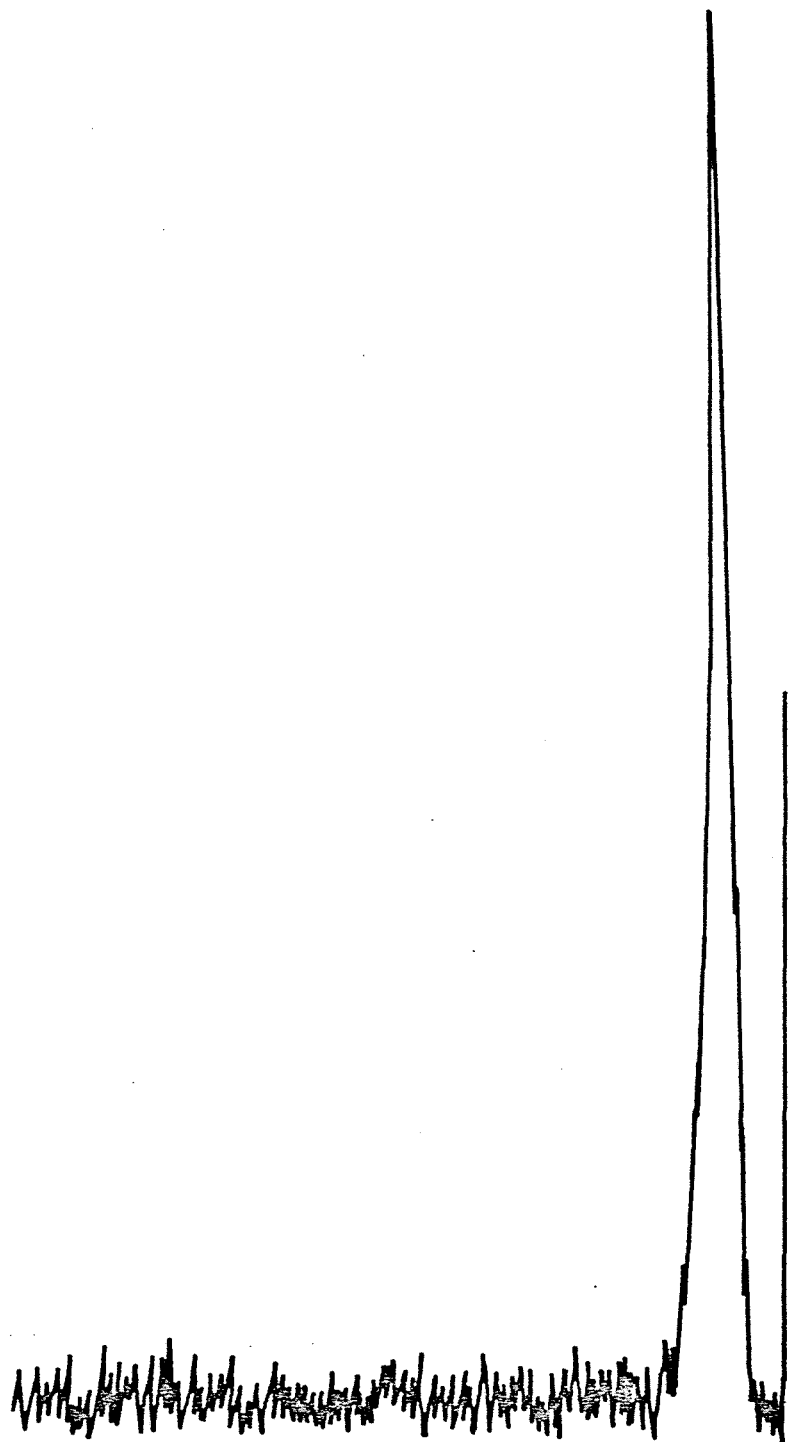


FIG. 6.- Radiocromatograma del Ac-<sup>3</sup>H-Asp-Glu, recristalizado y purificado en columna Dowex 1x8.



J.F.M. D.O.G. 6475

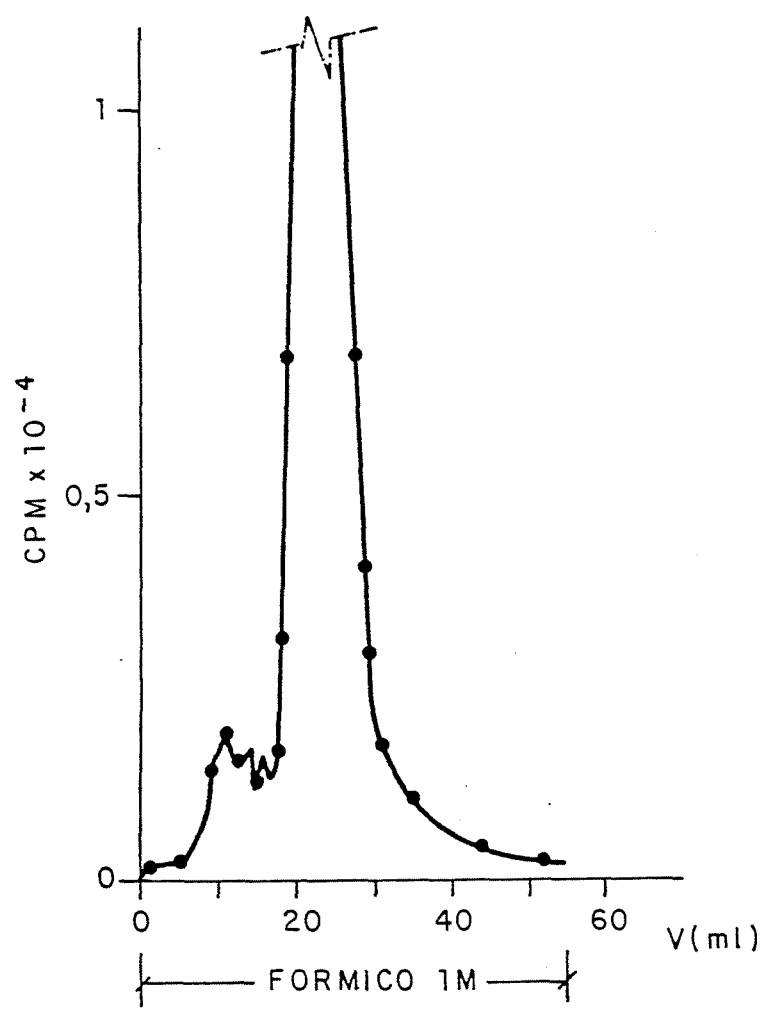


FIG. 7.- Elución de Ac-<sup>3</sup>H-AspGlu procedente de las aguas de recristalización.

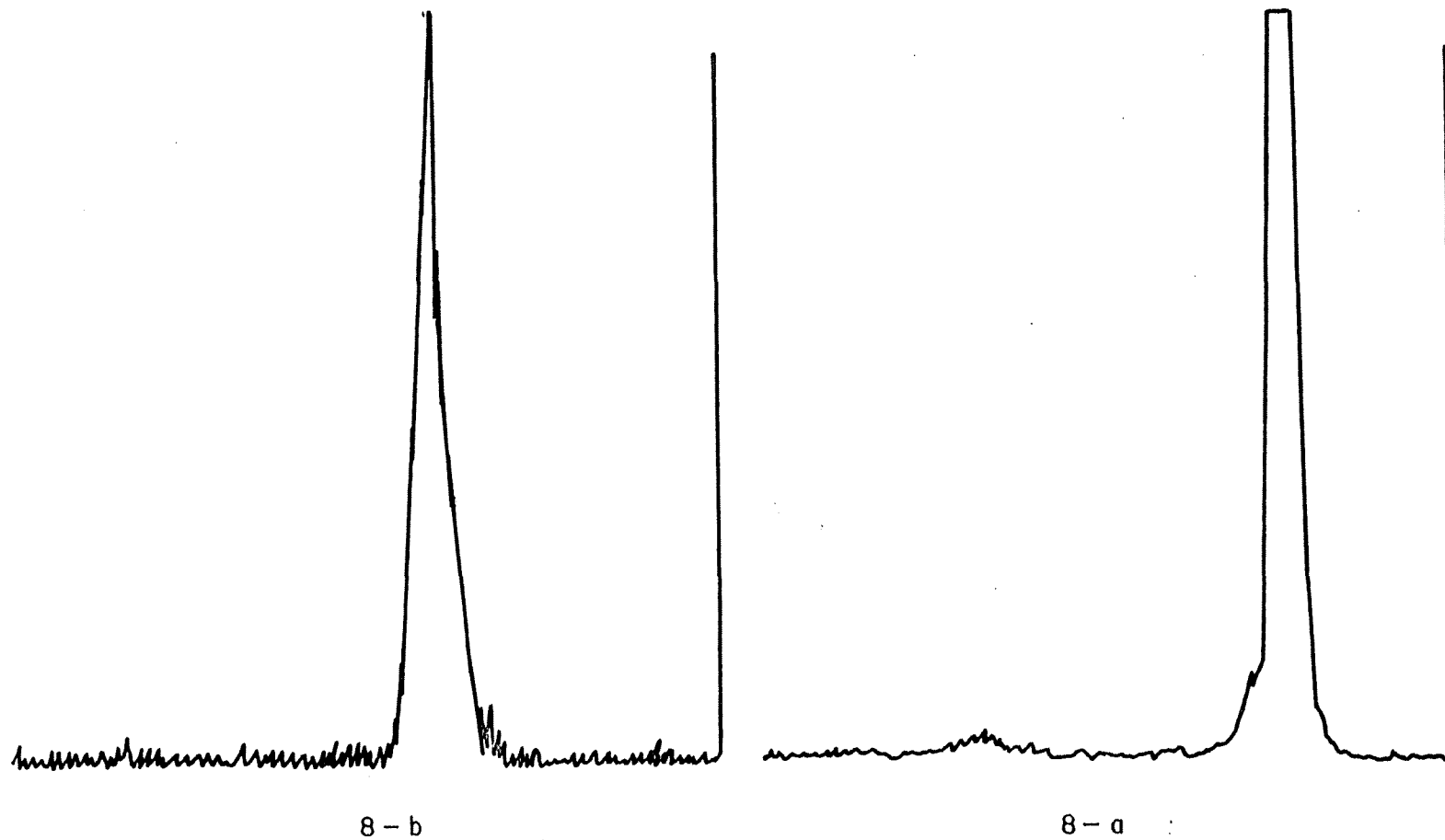


FIG. 3.- Radiocromatogramas del Ac-<sup>3</sup>H-Asp-Glu contenido en las aguas de recristalización, tras la elución con fórmico 1 M, en columna Dowex 1x8.

8a.- 1<sup>a</sup> Elución (Gel de sílice)  
8b.- 2<sup>a</sup> Elución (celulosa)

J.E.N. 569

Junta de Energía Nuclear. Tecnología Nuclear. Madrid.

"High specific activity N-Acetyl-<sup>3</sup>H- $\alpha$ -Aspartyl-L-Glutamic at micromole scale".

SUAREZ, C. (1984) 14 pp. 8 figs. 5 refs.

High specific activity N-Acetyl-<sup>3</sup>H- $\alpha$ -Aspartyl-L-Glutamic acid at micromole scale is prepared acetylating L- $\alpha$ -Aspartyl-L-glutamic with <sup>3</sup>H-acetic anhydride in redistilled toluene. The product is purified through cationic and anionic columns. The radiochemical purity as determined by thin-layer chromatography is greater than 99% at the time of preparation

INIS CLASSIFICATION AND DESCRIPTORS: B14. Chemical Preparation. Glutamic Acid. Acetylation. Acetyl Radicals. Aspartic Acid. Organic Compounds. Tritium Compounds.

J.E.N. 569

Junta de Energía Nuclear. Tecnología Nuclear. Madrid.

"High specific activity N-Acetyl-<sup>3</sup>H- $\alpha$ -Aspartyl-L-Glutamic at micromole scale".

SUAREZ, C. (1984) 14 pp. 8 figs. 5 refs.

High specific activity N-Acetyl-<sup>3</sup>H- $\alpha$ -Aspartyl-L-Glutamic acid at micromole scale is prepared acetylating L- $\alpha$ -Aspartyl-L-glutamic with <sup>3</sup>H-acetic anhydride in redistilled toluene. The product is purified through cationic and anionic columns. The radiochemical purity as determined by thin-layer chromatography is greater than 99% at the time of preparation

INIS CLASSIFICATION AND DESCRIPTORS: B14. Chemical Preparation. Glutamic Acid. Acetylation. Acetyl Radicals. Aspartic Acid. Organic Compounds. Tritium Compounds.

J.E.N. 569

Junta de Energía Nuclear. Tecnología Nuclear. Madrid

"High specific activity N-Acetyl-<sup>3</sup>H- $\alpha$ -Aspartyl-L-Glutamic at micromole scale".

SUAREZ, C. (1984) 14 pp. 8 figs. 5 refs.

High specific activity N-Acetyl-<sup>3</sup>H- $\alpha$ -Aspartyl-L-Glutamic acid at micromole scale is prepared acetylating L- $\alpha$ -Aspartyl-L-glutamic with <sup>3</sup>H-acetic anhydride in redistilled toluene. The product is purified through cationic and anionic columns. The radiochemical purity as determined by thin-layer chromatography is greater than 99% at the time of preparation

INIS CLASSIFICATION AND DESCRIPTORS: B14. Chemical Preparation. Glutamic Acid. Acetylation. Acetyl Radicals. Aspartic Acid. Organic Compounds. Tritium Compounds.

J.E.N. 569

Junta de Energía Nuclear. Tecnología Nuclear. Madrid.

"High specific activity N-Acetyl-<sup>3</sup>H- $\alpha$ -Aspartyl-L-Glutamic at micromole scale".

SUAREZ, C. (1984) 14 pp. 8 figs. 5 refs.

High specific activity N-Acetyl-<sup>3</sup>H- $\alpha$ -Aspartyl-L-Glutamic acid at micromole scale is prepared acetylating L- $\alpha$ -Aspartyl-L-glutamic with <sup>3</sup>H-acetic anhydride in redistilled toluene. The product is purified through cationic and anionic columns. The radiochemical purity as determined by thin-layer chromatography is greater than 99% at the time of preparation

INIS CLASSIFICATION AND DESCRIPTORS: B14. Chemical Preparation. Glutamic Acid. Acetylation. Acetyl Radicals. Aspartic Acid. Organic Compounds. Tritium Compounds.

J.E.N. 569

Junta de Energía Nuclear. Tecnología Nuclear. Madrid

"Síntesis de N-Acetil-<sup>3</sup>H- $\alpha$ -Aspartil-Glutamino a escala de Micromoles".

SUAREZ, C. (1984) 14 pp. 8 figs. 5 refs.

Se ha sintetizado N-Acetil-<sup>3</sup>H-L- $\alpha$ -Aspartil-L-Glutámico de alta actividad específica a escala de micromoles acetilando con anhídrido acético-<sup>3</sup>H disuelto en tolueno redestilado el dipéptido L- $\alpha$ -Aspartil-L-Glutámico. La purificación se realiza mediante columnas de intercambio catiónico y aniónico. La pureza radioquímica en el momento de la preparación es superior al 99%.

CLASIFICACION INIS Y DESCRIPTORES: B14. Chemical Preparation. Glutamic Acid. Acetylation. Acetyl Radicals. Aspartic Acid. Organic Compounds. Tritium Compounds.

J.E.N. 569

Junta de Energía Nuclear. Tecnología Nuclear. Madrid

"Síntesis de N-Acetil-<sup>3</sup>H- $\alpha$ -Aspartil-Glutamino a escala de Micromoles".

SUAREZ, C. (1984) 14 pp. 8 figs. 5 refs.

Se ha sintetizado N-Acetil-<sup>3</sup>H-L- $\alpha$ -Aspartil-L-Glutámico de alta actividad específica a escala de micromoles acetilando con anhídrido acético-<sup>3</sup>H disuelto en tolueno redestilado el dipéptido L- $\alpha$ -Aspartil-L-Glutámico. La purificación se realiza mediante columnas de intercambio catiónico y aniónico. La pureza radioquímica en el momento de la preparación es superior al 99%.

CLASIFICACION INIS Y DESCRIPTORES: B14. Chemical Preparation. Glutamic Acid. Acetylation. Acetyl Radicals. Aspartic Acid. Organic Compounds. Tritium Compounds.

J.E.N. 569

Junta de Energía Nuclear. Tecnología Nuclear. Madrid

"Síntesis de N-Acetil-<sup>3</sup>H- $\alpha$ -Aspartil-Glutámico a escala de Micromoles".

SUAREZ, C. (1984) 14 pp. 8 figs. 5 refs.

Se ha sintetizado N-Acetil-<sup>3</sup>H-L- $\alpha$ -Aspartil-L-Glutámico de alta actividad específica a escala de micromoles acetilando con anhídrido acético-<sup>3</sup>H disuelto en tolueno redestilado el dipéptido L- $\alpha$ -Aspartil-L-Glutámico. La purificación se realiza mediante columnas de intercambio catiónico y aniónico. La pureza radioquímica en el momento de la preparación es superior al 99%.

CLASIFICACION INIS Y DESCRIPTORES: B14. Chemical Preparation. Glutamic Acid. Acetylation. Acetyl Radicals. Aspartic Acid. Organic Compounds. Tritium Compounds.

J.E.N. 569

Junta de Energía Nuclear. Tecnología Nuclear. Madrid.

"Síntesis de N-Acetil-<sup>3</sup>H- $\alpha$ -Aspartil-Glutámico a escala de Micromoles".

SUAREZ, C. (1984) 14 pp. 8 figs. 5 refs.

Se ha sintetizado N-Acetil-<sup>3</sup>H-L- $\alpha$ -Aspartil-L-Glutámico de alta actividad específica a escala de micromoles acetilando con anhídrido acético-<sup>3</sup>H disuelto en tolueno redestilado el dipéptido L- $\alpha$ -Aspartil-L-Glutámico. La purificación se realiza mediante columnas de intercambio catiónico y aniónico. La pureza radioquímica en el momento de la preparación es superior al 99%.

CLASIFICACION INIS Y DESCRIPTORES: B14. Chemical Preparation. Glutamic Acid. Acetylation. Acetyl Radicals. Aspartic Acid. Organic Compounds. Tritium Compounds.