

LEONHARD BIRKOFER und KLAUS HEMPEL

Eine neue Lysin-Synthese, besonders geeignet zur Darstellung von tritiummarkiertem Lysin

Aus dem Chemischen Institut und dem Institut für Medizinische Isotopenforschung
der Universität Köln a. Rh.

(Eingegangen am 3. Juni 1960)

Durch katalytische Hydrierung von Acetamino-[4-amino- Δ^2 -butenyl]-malonsäure-diäthylester-hydrochlorid mit Tritium und anschließende Hydrolyse wurde DL-Lysin-[4.5-T₂]-dihydrochlorid dargestellt.

Für autoradiographische Untersuchungen¹⁾ werden tritiummarkierte Aminosäuren mit hoher spezifischer Aktivität benötigt. Solche Aminosäuren führen im Gegensatz zu ¹⁴C-Aminosäuren wegen der geringen Reichweite der β -Teilchen des Tritiums zu Autoradiogrammen mit optimaler Auflösung.

Da Tritium in nahezu reiner Form (96-proz.) nur als T₂-Gas im Handel ist, empfiehlt sich die Verwendung dieses Gases zur Synthese von markierten Verbindungen hoher spezifischer Aktivität. Der Tritiumeinbau kann mittels katalytischer Hydrierung oder, wie beim Valinester gezeigt wurde, durch katalytischen Austausch²⁾ erfolgen. Das Austauschverfahren nach K. E. WILZBACH³⁾ dagegen ist ungeeignet, denn es liefert in der Regel T-markierte Verbindungen, deren spezifische Aktivität für autoradiographische Arbeiten nicht ausreichend ist.

R. SCHOENHEIMER⁴⁾ und Mitarbeiter stellten mit Deuterium markiertes Lysin dar, indem sie durch katalytische Reduktion von Phenol und anschließende Oxydation Cyclohexanon-[2.3.4.5.6-D₅] gewannen und das entsprechende Caprolactam in Anlehnung an die Methode von J. C. ECK und C. S. MARVEL⁵⁾ über α -Brom- ϵ -benzamino-capronsäure in DL-Lysin-[3.4.5-D₃] überführten. Dieser Weg dürfte auch für die Darstellung von mit Tritium markiertem Lysin gangbar sein. Er hat jedoch den Nachteil, daß Tritium auf einer sehr frühen Stufe der Synthese eingeführt werden müßte und noch viele Operationen mit einem hochaktiven Präparat durchzuführen wären.

Der Idealfall für die Tritiierung des Lysins wäre eine Synthese, bei der erst in der letzten Stufe der Wasserstoff bzw. das Tritium durch katalytische Reduktion eingebaut würde. In der Literatur fand sich keine derartige Methode. Es wurde deshalb ein neues Verfahren ausgearbeitet, das dieser Forderung annähernd entspricht.

Das aus 1,4-Dibrom-butene-(2) und Phthalimid-kalium dargestellte 1-Brom-4-phthalimido-butene-(2) (I) wurde mit dem Natriumsalz des Acetamino-malonsäure-

¹⁾ A. NIKLAS und W. MAURER, Autoradiographie in HOPPE-SEYLER/THIERFELDER, Hdbch. d. physiol. u. path.-chem. Analyse, 10. Aufl., Bd. II, S. 734, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1955.

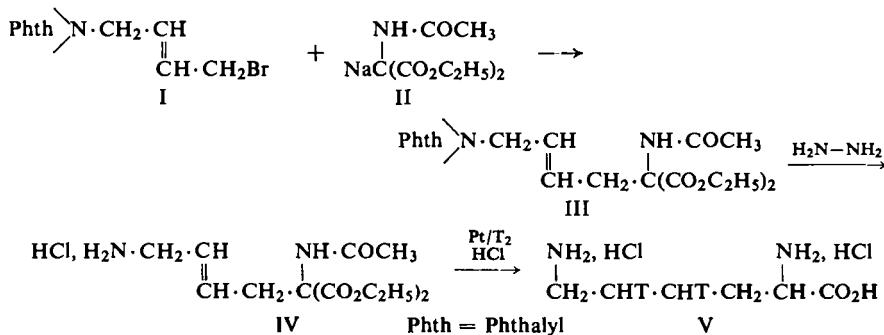
²⁾ H. HARRIS, Biochem. J. **74**, 276 [1960]. ³⁾ J. Amer. chem. Soc. **79**, 1013 [1957].

⁴⁾ N. WEISSMAN und R. SCHOENHEIMER, J. biol. Chemistry **140**, 786 [1941].

⁵⁾ J. biol. Chemistry **106**, 387 [1934].

diäthylesters (II) zu Acetamino-[4-phthalimido- Δ^2 -butenyl]-malonsäure-diäthylester (III) kondensiert. Durch Abspaltung des Phthalyl-Restes aus III mit Hydrazin⁶⁾ entstand Acetamino-[4-amino- Δ^2 -butenyl]-malonsäure-diäthylester-hydrochlorid (IV). IV konnte durch katalytische Hydrierung am Platin-Kontakt und anschließende Hydrolyse mit Salzsäure nahezu quantitativ in DL-Lysin-dihydrochlorid übergeführt werden.

Die Reduktion von IV gelingt auch in reiner Tritium-Atmosphäre ebenso schnell wie mit Wasserstoff. Die Tritium-Markierung dürfte unter den gewählten Hydrolyse-Bedingungen gegen Wasserstoff nicht austauschbar sein, wie aus den Erfahrungen mit Deuterium⁷⁾ zu schließen ist. Es wurde so *DL-Lysin-[4.5-T₂]-dihydrochlorid* mit einer spezifischen Aktivität von ca. 1500 mC/mMol dargestellt.



Klaus Hempel dankt dem BUNDESMINISTERIUM FÜR ATOMKERNENERGIE UND WASSERWIRTSCHAFT für die entgegenkommende Unterstützung durch sachliche und persönliche Mittel.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

1-Brom-4-phthalimido-buten-(2) (I): Zu 21.4 g (0.1 Mol) **1,4-Dibrom-butene-(2)** in 500 ccm Dimethylformamid gibt man unter Rühren innerhalb von 20 Min. die Suspension einer äquivalenten Menge (18.5 g) von **Phthalimid-kalium** in 75 ccm Dimethylformamid. Dabei tritt eine spontane Erwärmung auf ca. 40–50° ein. Nach weiterem 3 stdg. Rühren bei 60° wird das Reaktionsgemisch mit 1000 ccm Eisswasser verdünnt. Aus der zunächst milchig getrübten Lösung scheiden sich alsbald Kristalle ab, die mit 150 ccm Essigester extrahiert werden. Dabei geht I in Lösung, während 5.25 g **1,4-Bis-phthalimido-butene-(2)**, das als Nebenprodukt entsteht, als kristalliner Rückstand bleibt. Farblose Plättchen aus Essigester vom Schmp. 230–231°.

C₂₀H₁₄N₂O₄ (346.3) Ber. C 69.36 H 4.07 N 8.09 Gef. C 69.43 H 4.22 N 7.944

Die Lösung von I in Essigester wird über wasserfreiem MgSO₄ getrocknet, das Lösungsmittel i. Vak. abdestilliert und der Rückstand aus 100 ccm Methanol umkristallisiert. I bildet farblose Plättchen vom Schmp. 99–101°. Ausb. 12.6 g (46% d. Th.).

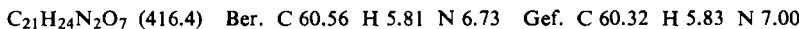
$C_{16}H_{10}BrNO_2$ (280.1) Ber. C 51.47 H 3.60 N 5.00 Gef. C 51.67 H 3.91 N 5.17

Acetamino-[4-phthalimido-Δ²-butenyl]-malonsäure-diäthylester (III): In die 10-proz. äthanol. Lösung von *Natrium-acetamino-malonester* (II) (aus 17.9 g Acetamino-malonsäure-diäthyl-

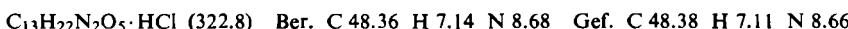
⁶⁾ J. C. SHEEHAN und V. S. FRANK, J. Amer. chem. Soc. 71, 1856 [1949].

7) D. RITTENBERG, A. S. KESTON, R. SCHOENHEIMER und G. L. FOSTER, J. biol. Chemistry 125, 1 [1938].

ester und 1.98 g Natrium) läßt man die äquivalente Menge von *I* (22.5 g) in der 10-fachen Menge Äthanol eintropfen. Das Reaktionsgemisch wird 8 Stdn. unter Rückfluß gekocht, filtriert und einige Stdn. im Eisschrank aufbewahrt. Dabei scheiden sich 30.2 g *III* (90% d. Th.) in farblosen Nadelchen ab. Nach Umkristallisation aus Äthanol schmilzt das analysenreine Produkt bei 131—132°.



Acetamino-[4-amino-Δ²-butenyl]-malonsäure-diäthylester-hydrochlorid (IV): 4.16 g (0.01 Mol) *III* werden zusammen mit 0.67 ccm 85-proz. Hydrazinhydrat in 40 ccm Äthanol 3 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Aus der zunächst schwach gelb gefärbten Lösung scheidet sich nach einiger Zeit Phthalhydrazid ab. Anschließend wird das Lösungsmittel i. Vak. abdestilliert, der Rückstand in 50 ccm Wasser aufgenommen und durch Zutropfen von verd. Salzsäure bis auf p_{H} 3—4 angesäuert. Dabei scheidet sich erneut Phthalhydrazid ab. Das klare Filtrat wird mit verd. Ammoniak neutralisiert und i. Vak. zur Trockne eingeengt. Es bleibt ein öliger Rückstand, der nach Zugabe von 100 ccm Aceton sofort kristallisiert. Ausb. 2.16 g (67% d. Th.). Nach Umkristallisation aus Äthanol farblose Nadelchen vom Schmp. 172°.



*D,L-Lysin-[4,5-T₂]-dihydrochlorid (V)*⁸⁾: 0.01 g PtO₂ werden in 2 ccm Eisessig suspendiert und mit Wasserstoff vorreduziert. Anschließend werden 0.11 g (0.342 mMol) *IV* zugefügt und in reinem T₂-Gas bei Normaldruck reduziert. Nach Aufnahme von 2.1 ccm T₂-Gas (5250 mC) wird das restliche Tritiumgas in das Vorratsgefäß zurückgepumpt und die Reaktion mit inaktivem Wasserstoff beendet. Die Reduktion dauert insgesamt 30—60 Min. Danach wird der Katalysator abzentrifugiert, das Lösungsmittel i. Vak. abdestilliert und der Rückstand über Nacht mit 10 ccm 6 n HCl unter Rückfluß gekocht. Nach Abdestillieren des Lösungsmittels bleibt *V* zurück.

Auf dem Chromatogramm (Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1)) und bei der Papierelektrophorese (Acetat-Puffer p_{H} 5.75) ist Radioaktivität nur über dem Lysinfleck nachweisbar.

Die Gesamtaktivität wird im fensterlosen Methan-Durchflußzähler an Präparaten mit unendlich dünner Schicht (0.1—1 γ/cm^2) bestimmt. Sie beträgt 485 mC, was einer spezif. Aktivität von ca. 1500 mC/mMol entspricht.

⁸⁾ Die hierzu benutzte Apparatur wird in einem anderen Zusammenhang veröffentlicht.