

LEONHARD BIRKOFER, KLAUS HEMPEL und WERNER NOUVERTNÉ

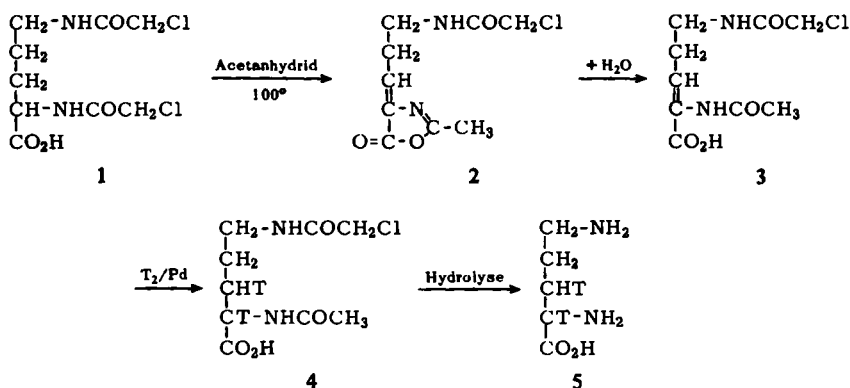
Synthese von tritiummarkiertem Ornithin und Arginin hoher spezifischer Aktivität

Aus dem Institut für Organische Chemie und dem Institut für
Medizinische Isotopenforschung der Universität Köln

(Eingegangen am 7. April 1965)

Durch katalytische Hydrierung von α -Acetamino- β -[2-chloracetamino-äthyl]-acrylsäure mit Tritium und anschließende Hydrolyse wurde DL-Ornithin-[α,β -T₂] dargestellt. Dieses ließ sich durch Umsetzung mit *O*-Methyl-isoharnstoff in DL-Arginin-[α,β -T₂] überführen.

Bereits früher konnten einige tritiummarkierte Aminosäuren hoher spezifischer Aktivität durch katalytische Reduktion oder durch katalytische Enthalogenierung geeigneter Aminosäurevorstufen mit Tritium synthetisiert werden^{1,2)}. In Fortsetzung dieser Arbeiten stellten wir tritiummarkiertes Ornithin aus zwei verschiedenen, ungesättigten Vorstufen durch katalyt. Reduktion mit Tritium-Gas dar. Erstens aus α -Acetamino- β -[2-chloracetamino-äthyl]-acrylsäure (3) und zweitens aus 3-Nitro-pyridon-(2) (6). In Anlehnung an das Verfahren von *Bergmann* und *Stein*³⁾ zur Gewinnung von Azlactonen und ungesättigten Aminosäuren wurde 3 aus *N,N'*-Bis-chloracetyl-ornithin (1) durch kurzzeitiges Erwärmen mit Acetanhydrid auf 100° hergestellt. Dabei bildete sich zunächst das Azlacton 2. Dieses hydrolysierte während der Aufarbeitung zu 3, das mit Tritium zu *N* ^{α} -Acetamino-*N* ^{δ} -chloracetamino-n-valeriansäure-[α,β -T₂] (4) reduziert und durch Verseifen mit guter Ausbeute in Ornithin-[α,β -T₂] (5) umgewandelt werden konnte.



1) L. Birkofer und K. Hempel, Chem. Ber. **93**, 2282 (1960).

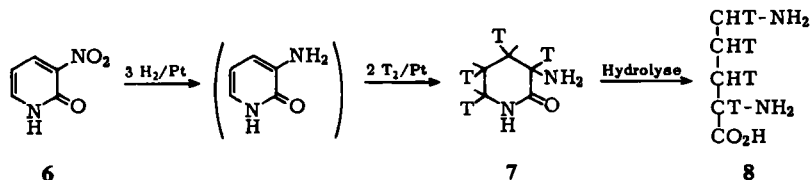
2) L. Birkofer und K. Hempel, Chem. Ber. **96**, 1373 (1963).

3) M. Bergmann und F. Stein, Liebigs Ann. Chem. **448**, 20 (1926).

3-Nitro-pyridon-(2) (**6**) ließ sich in wasserfreiem Eisessig bei Raumtemperatur unter Normaldruck zu Ornithin- δ -lactam (entspr. **7**) reduzieren und durch saure Hydrolyse in Ornithin überführen. Zur vollständigen Reduktion von **6** sind insgesamt 5 Moll. Wasserstoff erforderlich. Die für die Reduktion der Nitro-Gruppe benötigten drei Moll. wurden innerhalb einer Stunde aufgenommen, während die nachfolgende Reduktion des Pyridon-Rings zwölf Stunden dauerte.

Um eine unerwünschte Markierung der Amino-Gruppe zu vermeiden, wurde bei der Synthese des tritiummarkierten Ornithins (**8**) **6** zunächst mit inaktivem Wasserstoff vorreduziert, bis zur Aufnahme von etwas mehr als drei Molekülen. Erst die Reduktion des Pyridon-Rings erfolgte mit Tritium-Gas. Ornithin erhält man so aus **6** mit einer Ausbeute von 80–90%. Die radiochemische Ausbeute ist dagegen sehr viel geringer; nur 0.3% des aufgenommenen Tritiums werden in Ornithin eingebaut. Aus **6** läßt sich folglich nur Ornithin-[α . β . γ . δ -T₄] (**8**) geringer spezifischer Aktivität synthetisieren.

Der geringe Einbau an Tritium kommt dadurch zustande, daß das Tritium-Gas durch inaktiven Wasserstoff des als Lösungsmittel benutzten Eisessigs verdünnt wird. Wahrscheinlich stellt sich am Platin-Kontakt ein Gleichgewicht zwischen den Protonen des Eisessigs und den Tritium-Atomen ein. Da es bisher nicht gelungen ist, die Reduktion von **6** in einem anderen Lösungsmittel als Eisessig auszuführen, kann tritiummarkiertes Ornithin hoher spezifischer Aktivität nur aus dem Acrylsäure-Derivat **3** erhalten werden.



Arginin wurde nach Kurtz⁴⁾ aus dem Kupfer-Komplex des Ornithins mit *O*-Methyl-isoharnstoff in Gegenwart von Natronlauge dargestellt. In dem Kupfer-Komplex ist die α -Amino-Gruppe des Ornithins blockiert, so daß nur noch die δ -Amino-Gruppe reagieren kann. Nach Kurtz soll *O*-Methyl-isoharnstoff fünf Tage einwirken. Diese lange Reaktionszeit ist für Synthesen mit tritiummarkiertem Ornithin hoher spezifischer Aktivität (50–100 mC/ccm) nicht vertretbar, da eine Strahlenenergie von 15000–30000 rad pro Tag in der Lösung frei wird, die bei langen Reaktionszeiten zur Radiolyse der Reaktionskomponenten führen muß. Es wurde deshalb versucht, die Umsetzung durch Steigerung der Konzentration des *O*-Methyl-isoharnstoffs zu beschleunigen.

In einer gesonderten Versuchsreihe wurde das Mol-Verhältnis Ornithin zu *O*-Methyl-isoharnstoff im Bereich von 1:1 bis 1:40 variiert. Nur bei der Umsetzung mit dem 40fachen Überschuß an *O*-Methyl-isoharnstoff ließ sich nach 12 Stunden papierchromatographisch ausschließlich Arginin nachweisen. Auch die radiochromatographische Reinheitskontrolle ergab unter diesen Bedingungen restlose Umwandlung des eingesetzten Ornithins-[α . β -T₂] (**5**). Das neugebildete Arginin-[α . β -T₂] war zu

⁴⁾ A. C. Kurtz, J. biol. Chemistry **180**, 1253 (1949).

20% mit anderen radioaktiven Verbindungen verunreinigt. Zur Unterscheidung, ob es sich um Radiolyse-Produkte des Ornithins bzw. Arginins handelt oder um Nebenprodukte der Reaktion, wurde die Synthese des radioaktiven Arginins mit einem radioaktiven Ornithin von 15 mal geringerer spezifischer Aktivität wiederholt. Aber auch bei diesem Versuch betrug die Menge der radioaktiven Verunreinigungen wieder ca. 20%, so daß es sich bei den Verunreinigungen um Nebenprodukte der Reaktion handeln dürfte.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

α-Acetamino-β-[2-chloracetamino-äthyl]-acrylsäure (3): 3.00 g *N,N'*-Bis-chloracetyl-ornithin (1)⁵⁾ (öliges Produkt) werden 10 Min. in 100 ccm *Acetanhydrid* auf 100° erwärmt. Nach Abziehen des *Acetanhydrids* i. Vak. bleibt ein gelbes Öl zurück, das zur Aufspaltung des Azlacton-Rings in 50 ccm Wasser aufgenommen und 30 Min. auf 60° erwärmt wird. Anschließend engt man die Lösung erneut zur Trockne ein und reibt den öligen Rückstand mit Essigester an. Dabei scheidet sich 3 in schwach gelben Prismen vom Schmp. 155–158° ab. Das Produkt ist sofort analysenrein. Ausb. 0.45 g (17%).

$C_9H_{13}ClN_2O_4$ (248.6) Ber. C 43.48 H 5.23 N 11.28 Gef. C 43.50 H 5.20 N 11.17

DL-Ornithin-[α,β-T₂] (5): 37.4 mg 3 und 40 mg NaHCO₃ werden in 1.5 ccm 50-proz. Äthanol gelöst und am Palladium/Aktivkohle-Kontakt (10% Pd) zunächst mit Tritium-Gas (96-proz. T₂; Hersteller: Radiochemical Centre Amersham, England) in der bereits früher beschriebenen Apparatur²⁾ reduziert. Nach Aufnahme von 0.8 ccm Tritium (2000 mC) wird das restliche Tritium-Gas abgepumpt und die Reduktion mit inaktivem Wasserstoff innerhalb einer Stde. beendet. Anschließend filtriert man den Katalysator ab, wäscht mit 10 ccm Wasser nach und kocht das Filtrat 6 Stdn. in 100 ccm 6*N* HCl unter Rückfluß. Nach Abziehen der Salzsäure i. Vak. bleibt 5 als öliges Beschlag im Kolben zurück. 5 wird in 20 ccm Wasser aufgenommen und nach Klären der Lösung mit Aktivkohle und Zugabe von 480 ccm 80-proz. Äthanol bei –15° gelagert. Die Lösung enthält nach radiopapierchromatographischen Untersuchungen 950 mC 5 und 50 mC sonstige radioaktive Verbindungen. Das entspricht einer radiochemischen Ausbeute von 47%. Die Ornithin-Menge wird photometrisch mit Ninhydrin bestimmt und beträgt 12 mg (60%). Die spezifische Aktivität von 5 ist danach 9300 mC/mMol.

DL-Ornithin-[α,β,γ,δ-T₄] (8): 22.2 mg 3-Nitro-pyridon-(2) (6) werden in 1.5 ccm Eisessig in Gegenwart von 5 mg Platindioxid bei 20° unter Normaldruck mit inaktivem Wasserstoff reduziert. Nach Aufnahme von 12 ccm H₂ wird die Hydrierung mit reinem Tritium-Gas fortgesetzt, bis 2.1 ccm (5250 mC) aufgenommen worden sind. Beendet wird die Reduktion wieder mit inaktivem Wasserstoff. Die weitere Aufarbeitung ist wie bei 5. Man erhält so 15 mC 8 mit einer radiochemischen Reinheit von etwa 90%, was einer radiochemischen Ausbeute von 0.3% (bez. auf das aufgenommene Tritium) entspricht. Die chemische Ausbeute an Ornithin beträgt 19 mg (91%).

Synthese von Arginin-[α,β-T₂]

1. *Vorversuche mit inaktivem Ornithin*: 50 mg *DL-Ornithin* werden in 10 ccm Wasser in Gegenwart von 200 mg Kupfercarbonat auf 60° erwärmt. Nach Bildung des *Ornithin/Kupfer-Komplexes* wird der Überschuß an CuCO₃ abfiltriert und mit einigen Tropfen Wasser nachgewaschen. Zu je 1 ccm des blauen Filtrats werden 0.02, 0.05, 0.10, 0.40 bzw. 0.80 ccm einer Lösung von 2.25 g *O-Methyl-isoharnstoff-hydrochlorid* in 10 ccm 2*N* NaOH gegeben. Das entspricht etwa einem Mol-Verhältnis von Ornithin zu *O-Methyl-isoharnstoff* von 1:1 bis 1:40.

⁵⁾ L. Levintow und J. P. Greenstein, J. biol. Chemistry 188, 643 (1951).

Die verschiedenen Mischungen werden auf 3 ccm aufgefüllt und 12 Std. bei 20° aufbewahrt. Nach dieser Zeit ist die Lösung mit den äquivalenten Mengen der Reaktionspartner noch blau gefärbt, während die mit dem 40-fachen Überschuß an *O*-Methyl-isoharnstoff rotviolett verfärbt ist. In dieser Lösung ist außerdem eine geringe Menge eines ähnlich gefärbten Niederschlags ausgefallen. Die Farbänderung ist möglicherweise auf eine Biuret-Reaktion zurückzuführen. Nach Ansäuern der Lösungen mit Salzsäure werden die Cu-Ionen mit H₂S als Kupfersulfid gefällt und abfiltriert. Die Filtrate werden papierchromatographisch auf Ornithin und Arginin untersucht.

2. *Synthese aus aktivem Ornithin*: 90 mC Ornithin- $[\alpha,\beta\text{-T}_2]$ (5) (spezif. Aktivität 3000 mC/mMol) (5 mg) in 1 ccm Wasser werden analog 1. in den Kupfer-Komplex übergeführt und mit einer Lösung von 180 mg *O*-Methyl-isoharnstoff·HCl in 0.8 ccm 2*n* NaOH versetzt. Bei der weiteren Aufarbeitung wie unter 1. erhält man 40 mC tritiummarkiertes Arginin (Ausb. 44%) neben 10 mC radioaktiven Verunreinigungen. Die spezif. Aktivität des DL-Arginins- $[\alpha,\beta\text{-T}_2]$ entspricht der des eingesetzten DL-Ornithins- $[\alpha,\beta\text{-T}_2]$. Das Arginin wird papierchromatographisch gereinigt.

Einfluß der Tritium-Konzentration auf die radiochemische Reinheit des ³H-Arginins: Zur Prüfung wird DL-Arginin aus 5 geringer spezif. Aktivität (200 mC/mMol) synthetisiert. Auch bei dieser Synthese ist das neugebildete Arginin zu 20% mit anderen radioaktiven Verbindungen verunreinigt.

Papierchromatographie und Radioaktivitätsmessungen: Die Reinheit von Ornithin und Arginin wird papierchromatographisch in folgenden den Lösungsmittelsystemen untersucht: *n*-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5 organ. Phase), *n*-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser (30:20:6:24) und *m*-Kresol/1% NH₄OH gesättigt. Als Papier diente Schleicher & Schüll SS 2043b, als Nachweis-Reagenz Ninhydrin und Naphthochinon-(1.2)-sulfonsäure-(4). Das zuletzt genannte Reagenz färbt sich mit Ornithin himmelblau und mit Arginin gelblich blau.

Bei der papierchromatographischen Reinigung der markierten Aminosäuren wird als Laufmittel *n*-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5 organ. Phase) verwendet. Der Nachweis der radioaktiven Verbindungen auf dem Papier erfolgt in diesen Fällen mit Hilfe eines Röntgen-Films⁶⁾ (Agfa-Sino-Film ohne Schutzschicht, Agfa AG, Leverkusen).

Zur Messung der Radioaktivität von Radiochromatogrammen diente ein Methan-Durchflußzähler der Fa. Friesseke & Hoepfner, Erlangen, Typ FH 407/452/49. Alle Absolutmessungen wurden mit einem Flüssigkeitsscintillations-Zähler der Fa. Packard (TriCarb, Typ 314 EX) durchgeführt. Einzelheiten der Meßmethode wurden bereits früher⁷⁾ mitgeteilt.

⁶⁾ Der Agfa AG danken wir für die Überlassung des Filmmaterials.

⁷⁾ K. Hempel, Atompraxis 10, 148 (1964).