

LEONHARD BIRKOFER und KLAUS HEMPEL¹⁾

Synthese tritium-markierter Aminosäuren hoher spezifischer Aktivität

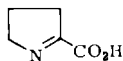
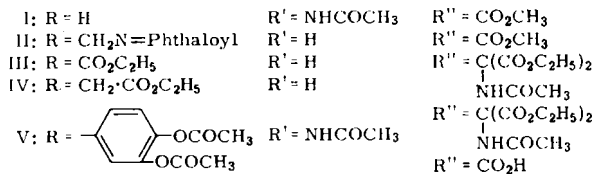
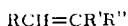
Aus dem Institut für Organische Chemie
und dem Institut für Medizinische Isotopenforschung der Universität Köln

(Eingegangen am 5. Dezember 1962)

Durch katalytische Reduktion ungesättigter Aminosäure-Vorstufen mit Tritium wurden DL-Alanin-[α . β -T₂], γ -Amino-buttersäure-[α . β -T₂], DL-Glutaminsäure-[β . γ -T₂], DL- α -Amino-adipinsäure-[γ . δ -T₂] und DL-Prolin-[2-T] synthetisiert. Außerdem konnten die T-markierten aromatischen Aminosäuren L-Phenylalanin-[2.4-T₂], L-Tyrosin-[3-T], DL-3.4-Dihydroxy-phenylalanin-[2.5.6-T₃], L-Histidin-[2.4-T₂] und DL-Tryptophan-[5-T] aus aromatischen Brom- oder Jodverbindungen durch katalytische Enthalo-genierung mit Tritium dargestellt werden.

T-Markierte Aminosäuren hoher spezifischer Aktivität (1000 mC/mMol und mehr) werden für histoautoradiographische²⁾ sowie für spezielle biochemische Untersuchungen benötigt. Darüber hinaus können T-markierte organische Verbindungen auch in der Strahlentherapie eine gewisse Bedeutung erlangen^{3,4)}. Die hierfür erforderlichen Tritium-Verbindungen werden meist durch Umsetzung geeigneter Vorstufen mit T₂O bzw. T₂ dargestellt. Nachdem wir DL-Lysin-[γ . δ -T₂]⁵⁾ aus dem entsprechenden Dehydrolysin⁵⁾ durch katalytische Reduktion mit Tritium gewonnen hatten, stellten wir weitere T-markierte aliphatische Aminosäuren aus den jeweiligen ungesättigten Vorstufen dar.

Als Ausgangsstoffe dienten folgende Verbindungen: α -Acetamino-acrylsäure-methylester (I)⁶⁾, γ -Phthalimido-crotonsäure-methylester (II), Acetamino-[2-carb-



VI

1) Teil der Dissertat. v. K. HEMPEL, Univ. Köln 1961.

2) G. A. BOYD, *Autoradiography in Biology and Medicine*, Academic Press, New York 1955.

3) B. MARRIAN, B. MARSHALL, I. S. MITCHELL und J. SIMON-REUSS, *Tritium in the physical and biological Sciences*, Vol. 2, 216, International Atomic Energy Agency, Wien 1962.

4) K. HEMPEL und M. DEIMEL, *Z. Strahlentherapie* (im Druck).

5) L. BIRKOFER und K. HEMPEL, *Chem. Ber.* **93**, 2282 [1960].

6) H. HELLMANN, K. TEICHMANN und F. LINGENS, *Chem. Ber.* **91**, 2427 [1958].

äthoxy-vinyl]-malonsäure-diäthylester (III)⁷⁾, Acetamino-[3-carbäthoxy- Δ^1 -propenyl]-malonsäure-diäthylester (IV), α -Acetamino- β -[3.4-diacetoxy-phenyl]-acrylsäure (V)⁸⁾ und Δ^1 -Pyrrolin-carbonsäure-(2) (VI)⁹⁾. II wurde aus γ -Brom-crotonsäure-methylester und Phthalimid-kalium erhalten. IV entstand aus γ -Brom-crotonsäure-methylester und dem Na-Salz des Acetamino-malonesters, wobei Umesterung eintrat.

Diese ungesättigten Vorstufen I–VI wurden am vorreduzierten Palladium/Aktivkohle-Kontakt mit Tritium (T_2) reduziert. Die Reduktion verlief mit überschwerem Wasserstoff ebenso schnell wie mit normalem. Kinetische Isotopie-Effekte konnten bei den ausgeführten Hydrierungen nicht nachgewiesen werden. In allen Fällen war die Reduktion spätestens nach 2 Stdn. beendet. So entstand aus I durch Reduktion mit T_2 DL-Acetyl-alanin- $[\alpha,\beta-T_2]$, das, ohne isoliert zu werden, durch Verseifung mit 6*n* HCl in DL-Alanin- $[\alpha,\beta-T_2]$ übergeführt wurde. Entsprechend konnte aus III über α -Carbäthoxy-*N*-acetyl-glutaminsäure-diäthylester- $[\beta,\gamma-T_2]$ DL-Glutaminsäure- $[\beta,\gamma-T_2]$ und aus IV über α -Carbäthoxy- α -acetamino-adipinsäure-diäthylester- $[\gamma,\delta-T_2]$ α -Amino-adipinsäure- $[\gamma,\delta-T_2]$ synthetisiert werden. DL- β -[3.4-Dihydroxy-phenyl]-alanin- $[\alpha,\beta-T_2]$ wurde in Anlehnung an die Vorschrift von HARRINGTON und RANDALL⁸⁾ aus V durch katalytische Hydrierung mit Tritium und nachfolgende Verseifung hergestellt. Bei analoger Darstellung von γ -Amino-buttersäure- $[\alpha,\beta-T_2]$ aus II mußte zusätzlich die Phthaloyl-Gruppe mit Hydrazin abgespalten werden. Aus VI entstand durch katalytische Reduktion mit T_2 unmittelbar Prolin- $[\alpha-T]$.

Bei den einzelnen Versuchen schwankte die Ausbeute an radioaktiven Aminosäuren zwischen 15% beim β -[3.4-Dihydroxy-phenyl]-alanin- $[\alpha,\beta-T_2]$ und 90% bei der DL- α -Amino-adipinsäure- $[\gamma,\delta-T_2]$, obwohl die chemische Ausbeute stets 80–90% d. Th. betrug. Für die aktive Synthese geht also in manchen Fällen ein beträchtlicher Prozentsatz des eingesetzten Tritiums durch Austauschreaktionen gegen inaktiven Wasserstoff verloren, wodurch die spezifische Aktivität des markierten Moleküls entsprechend absinkt.

Dieser Austausch kann bereits bei der Hydrierung erfolgen oder erst im Verlauf der nachfolgenden Verseifung. So gingen während der Entacetylierung des DL-Acetyl-alanins- $[\alpha,\beta-T_2]$ 45% der Radioaktivität verloren, bei der DL-*N*-Acetyl- α -amino-adipinsäure- $[\gamma,\delta-T_2]$ weniger als 10%. Die Austauschbarkeit des Tritiums bei der Verseifung ist demnach sehr verschieden. Sie dürfte bei den durch die Carboxylgruppe aktivierten α -ständigen T-Atomen besonders groß sein. Als Folge davon müßte die spezifische Aktivität des Tritiums an den beiden ursprünglich ungesättigten C-Atomen verschieden sein.

Austauschreaktionen finden mehr noch während der Hydrierung zwischen dem radioaktiven Wasserstoff und dem Lösungsmittel statt. Wahrscheinlich besteht dabei im Edelmetallkatalysator ein Austauschgleichgewicht zwischen den im Metall gelösten Tritium-Ionen (Tritonen) und den Protonen des Lösungsmittels. Daraus folgt, daß die Verluste an Tritium umso größer sind, je höher die Protonenkonzentration des Lösungsmittels ist und je langsamer die Reaktion abläuft. Damit steht im Einklang,

7) H. FELDMANN, Diplomarb., Univ. Köln 1960.

8) C. R. HARRINGTON und ST. RANDALL, Biochem. J. **25**, 1028 [1931].

9) K. HASSE und A. WIELAND, Chem. Ber. **93**, 1686 [1960].

daß bei der Reduktion eines α -Pyridons in inaktivem Eisessig mit reinem Tritium (T_2) nur weniger als 1 % des eingebauten Wasserstoffs aus dem T_2 stammten, während die restlichen 99 % vom Eisessig herrührten.

KATALYTISCHE ENTHALOGENIERUNG AROMATISCHER HALOGENVERBINDUNGEN MIT TRITIUM

Da sich aromatische Kerne durch Hydrierung ungesättigter Vorstufen nicht tritieren lassen, wurden sie bisher meist durch Austauschreaktionen¹⁰⁾ oder durch hydrolytische Zersetzung metallorganischer Verbindungen markiert. Die erreichbaren spezifischen Aktivitäten sind dabei meist gering. Außerdem bilden sich im Verlaufe dieser Reaktion in erhöhtem Maße radioaktive Verunreinigungen, und zwar durch Nebenreaktionen und radiolytische Zersetzung der Endprodukte. Bei Austauschreaktionen tritt überdies universelle Markierung des aromatischen Kerns und der aliphatischen Seitenkette ein.

Eine gezielte Tritiiierung aromatischer Ringe erfolgt durch katalytische Enthalogenie- rung ihrer Brom- oder Jodverbindungen. Auf diese Weise synthetisierten MARRIAN und Mitarbb.³⁾ 2-Methyl-naphthochinon-(1.4)-diphosphat-[5.6.7- T_3] (Synkavit) sowie JACQUEMIN und Mitarbb.^{10a)} tritium-markiertes Östradiol, Tyrosin und Thyronin. Nach dem gleichen Verfahren haben wir eine Reihe natürlicher aromatischer Amino- säuren mit Tritium markiert.

Als Ausgangsmaterial dienten uns die folgenden bromierten bzw. jodierten aroma- tischen Aminosäuren: L-2.4-Dibrom-phenylalanin, L-3-Jod-tyrosin, L-3.5-Dijod- tyrosin, DL- β -[2.5.6-Tribrom-3.4-dihydroxy-phenyl]-alanin¹¹⁾, L-2.4-Dijod-histidin¹²⁾ und DL-5-Brom-tryptophan¹³⁾.

Die ausgeprägte Absorption im Bereich von 825–805/cm (12.1–12.4 μ) und von 885–870/cm (11.3–11.5 μ) des L-Dibrom-phenylalanins spricht dafür¹⁴⁾, daß es sich um ein 1.2.4-trisubstituiertes Benzolderivat, also um 2.4-Dibrom-phenylalanin handelt.

Bei der Halogenierung und ebenso bei der katalytischen Enthalogenie- rung bleibt die optische Aktivität der Verbindungen in der Regel erhalten. Nur im Falle von DL- β -[2.5.6-Tribrom-3.4-dihydroxy-phenyl]-alanin tritt während der Bromierung vollständige Racemisierung ein.

Aus den oben genannten halogenierten Aminosäuren gewannen wir folgende Ver- bindungen: L-Phenylalanin-[2.4- T_2], L-Tyrosin-[3- T], L-Tyrosin-[3.5- T_2], DL- β -[3.4- Dihydroxy-phenyl]-alanin-[2.5.6- T_3], L-Histidin-[2.4- T_2] und DL-Tryptophan-[5- T].

Bei der katalytischen Enthalogenie- rung gehen bekanntlich von dem eingesetzten Tritium etwa 50 % als TJ bzw. TOH für die Synthese verloren. Ein Austausch des Tritiums gegen inaktiven Wasserstoff des Lösungsmittels, der bei katalytischen Re- duktionen olefinischer Doppelbindungen oft zu großen Verlusten an Tritium führt, wurde hierbei nicht beobachtet. Die spezifische Aktivität der markierten Aminosäuren

¹⁰⁾ A. MURRAY (III) und D. L. WILLIAMS, *Organic Synthesis with Isotopes*, Part II, Inter- science Publishers, London-New York 1958.

^{10a)} C. JACQUEMIN, R. MICHEL, J. NUNEZ und J. ROCHE, *C. R. hebd. Séances Acad. Sci.* **249**, 1904 [1959].

¹¹⁾ M. GUGGENHEIM, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* **88**, 277 [1913].

¹²⁾ K. J. BRUNINGS, *J. Amer. chem. Soc.* **69**, 205 [1947].

¹³⁾ D. G. HARVEY, *J. chem. Soc. [London]* **1958**, 3760; **1959**, 473.

¹⁴⁾ L. J. BELLAMY, *The Infrared Spectra of Complex Molecules*, Methuen & Co., Ltd. London 1958.

ist deshalb weitgehend von der spezifischen Aktivität des eingesetzten Wasserstoffs abhängig. Allerdings muß bei Enthalogenerungen mit einem Wasserstoff-Isotopengemisch mit kinetischen Isotopie-Effekten gerechnet werden. So fand sich z. B. bei der katalytischen Enthalogenerung des 3-Jod-tyrosins 1.44 mal mehr Tritium in Bindung an Tyrosin als in anorganischer Form. Ein ähnlich bevorzugter Einbau des überschweren Wasserstoffs fand sich bei allen darauf untersuchten Enthalogenerungen. Das Ergebnis dieser Untersuchungen ist in Tab. 1 zusammengestellt. Danach wird

Tab. 1. Verhältnis des eingebauten Tritiums zu ionogenem Tritium

| Aminosäure | T-Aktivität der Aminosäure % | T-Aktivität (anorgan.) % | Aminosäure-Aktivität / Aktivität (anorgan.) |
|--|------------------------------|--------------------------|---|
| L-Tyrosin-[3-T] | 59 | 41 | 1.44 |
| L-Histidin-[2.4-T ₂] | 57 | 43 | 1.33 |
| D-Phenylalanin-[2.4-T ₂] | 56 ^{a)} | 44 | 1.27 |
| L-Phenylalanin-[2.4-T ₂] | 54 ^{a)} | 46 | 1.17 |
| DL-β-[3.4-Dihydroxy-phenyl]-alanin-[2.5.6-T ₃] | 52 | 48 | 1.08 |

a) In den Versuchen mit D- und L-Phenylalanin keine identischen Versuchsbedingungen.

Tritium bei der katalytischen Enthalogenerung im Vergleich zum Wasserstoff rascher an Kohlenstoff gebunden, als in Form von Tritonen abgegeben. Über Art und Größe dieses kinetischen Isotopie-Effektes geben die Ergebnisse der Tab. 1 keinen Aufschluß, da sie nur vom Verhältnis der kinetischen Isotopie-Effekte der beiden gekoppelten Reaktionen abhängen.

Die radiochemische Reinheit der T-markierten Verbindungen wurde in allen Fällen radiopapierchromatographisch in mehreren Medien untersucht. Die Substanzen waren mit wenigen Ausnahmen zunächst radiochemisch rein. Nach längerem Lagern ließen sich aber stets markierte Verunreinigungen nachweisen. Die Verbindungen mußten dann vor dem Gebrauch papierchromatographisch gereinigt werden.

Die Verunreinigungen entstehen auf Grund von zwei verschiedenen Mechanismen: 1. Der radioaktive Zerfall des Tritiums, bei dem Helium (³He) entsteht, führt bei zweifach T-markierten Molekülen zu einem T-markierten Ionen-Molekül, das sich durch Reaktionen mit anderen Molekülen in eine neue, stabile markierte Verbindung wandelt. 2. Die beim β-Zerfall des Tritiums frei werdende Strahlenenergie löst radiochemische Reaktionen aus, die auch die Zerstörung der Aminosäure¹⁵⁾ bewirken. Bei weitem die Hauptmenge der radioaktiven Zersetzungsprodukte entsteht durch die zuletzt genannte Reaktion. Das Ausmaß dieser radiochemischen Reaktionen läßt sich durch Lösen in einem inerten Lösungsmittel und Aufbewahren bei tiefer Temperatur herabsetzen¹⁶⁾.

Alle Aminosäuren mit Ausnahme des DL-Tryptophans-[5-T] löste man deshalb als Hydrochlorid in 80–90-proz. Äthanol und bewahrte sie bei –20° auf. DL-Tryptophan-[5-T] wurde in schwach alkalischer Lösung gelagert. Die Tritium-Konzentration war in der Regel kleiner als 5 mC pro ccm, was einer Strahlendosis von ca. 1500 rad pro Tag entspricht. Die radiochemische Reinheit wurde fortlaufend kontrolliert.

¹⁵⁾ E. S. G. BARRON, J. AMBROSE und U. P. JOHNSON, Radiat. Res. 2, 145 [1955].

¹⁶⁾ B. M. TOLBERT, Atomlight, Februar 1962.

Unter den gewählten Lagerbedingungen, die noch nicht optimal sein dürften, wurden je 10^5 rad absorbiertener Energie 1 bis 5% der markierten Substanz zerstört. Die radiochemische Reinheit nahm zumindest im Anfang linear mit der eingestrahelten Dosis ab.

DL-Tryptophan-[5-T] und T-markiertes β -[3.4-Dihydroxy-phenyl]-alanin waren um ein Vielfaches strahlenempfindlicher. Bei DL- β -[3.4-Dihydroxy-phenyl]-alanin-[α , β -T₂] und DL- β -[3.4-Dihydroxy-phenyl]-alanin-[2.5.6-T₃] ließ sich durch Zugabe von Ascorbinsäure (0.1%) eine gewisse Stabilisierung erreichen.

Klaus Hempel dankt dem BUNDESMINISTERIUM FÜR ATOMKERNENERGIE UND WASSERWIRTSCHAFT sowie der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT für die entgegenkommende Unterstützung durch sachliche und persönliche Mittel. Außerdem danken wir Frau URSULA STEHR für die Mithilfe bei der Durchführung der Versuche.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

γ -Phthalimido-crotonsäure-methylester (II): In eine Suspension von 37 g (0.2 Mol) *Phthalimid-kalium* in 150 ccm Dimethylformamid wird die Lösung von 38.6 g (0.22 Mol) *γ -Brom-crotonsäure-methylester* in 50 ccm Dimethylformamid eingetropf, wobei unter Braunfärbung Phthalimid-kalium in Lösung geht. Nach 3 stdg. Erwärmen auf 60° wird mit dem vierfachen Vol. Wasser versetzt, mit Chloroform extrahiert, dieses mit 2n KOH und Wasser gewaschen und schließlich über Magnesiumsulfat getrocknet. Nach Abziehen des Lösungsmittels kristallisiert der ölige Rückstand beim Anreiben mit wenig Äthanol. Ausb. 22.4 g II (46%). Farblose Nadelchen aus Wasser, Schmp. 105°.

C₁₃H₁₁NO₄ (245.2) Ber. C 63.69 H 4.49 N 5.71 Gef. C 63.56 H 4.64 N 5.43

Acetamino-[3-carbäthoxy- Δ^1 -propenyl]-malonsäure-diäthylester (IV): In die 6-proz. äthanolische Lösung von *Na-Acetamino-malonsäure-diäthylester* aus 14 g (0.063 Mol) Acetaminomalonester und 1.5 g (0.065 Mol) Natrium werden 12 g (0.0665 Mol) *γ -Brom-crotonsäure-methylester* in 35 ccm Äthanol gegeben und anschließend 18 Stdn. auf dem Wasserbad unter Rückfluß gekocht. Dabei fällt nach einiger Zeit Natriumbromid aus. Das Reaktionsgemisch wird auf 75 ccm eingeengt, mit 400 ccm Wasser versetzt, die Lösung mit Äthylacetat ausgeschüttelt und die organische Phase mit 5-proz. Essigsäure, 5-proz. Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschen. Nach Trocknen über Magnesiumsulfat und Abziehen des Lösungsmittels bleibt ein braunes Öl zurück, das beim Anreiben mit Wasser kristallin wird. Farblose Blättchen aus 85-proz. Äthanol vom Schmp. 75°. Ausb. 4.5 g (23%).

C₁₅H₂₃NO₇ (329.2) Ber. C 54.68 H 7.04 N 4.26 Gef. C 54.65 H 7.01 N 4.31

Acetamino-[2-carbäthoxy-vinyl]-malonsäure-diäthylester (III)⁷⁾: 43.2 g (0.2 Mol) *Acetaminomalonester* werden zu 6.0 g (~0.25 Mol) Natriumhydrid in 100 ccm Dimethylformamid (über NaH getrocknet) gegeben und die Mischung nach 1 stdg. Stehenlassen unter Feuchtigkeitsausschluß filtriert. Zu der auf 80° erwärmten Lösung werden innerhalb von 3 Stdn. 42 g *β -Brom-acrylsäure-äthylester* in 80 ccm Dimethylformamid unter Rühren zugetropft. Nach 6–8 stdg. Erhitzen bei 100° wird das Lösungsmittel i. Vak. entfernt, der Rückstand in 200 ccm Wasser aufgenommen und mit Äther extrahiert. Der Äther wird abgezogen und der Rückstand i. Vak. destilliert. Ausb. 41 g (65%). Schwach gelbes, zähes Öl vom Sdp._{0.04} 140–145°.

L-2.4-Dibrom-phenylalanin: 2 g (0.012 Mol) *L-Phenylalanin* werden fünf Tage lang in einer mit Brom gesättigten Atmosphäre aufbewahrt. Das ölige, rotbraune Bromierungsprodukt wird i. Vak. über KOH getrocknet, in Chloroform/Wasser aufgenommen, die wäßrige Phase wiederholt mit Chloroform ausgeschüttelt, filtriert und i. Vak. bei 40° zur Trockne eingeengt. Beim Neutralisieren des in 20 ccm Wasser gelösten Rückstandes mit Ammoniumcarbonat fallen 2.4 g bromiertes Phenylalanin (ca. 60%) aus, das aus einer Mischung von Mono- und

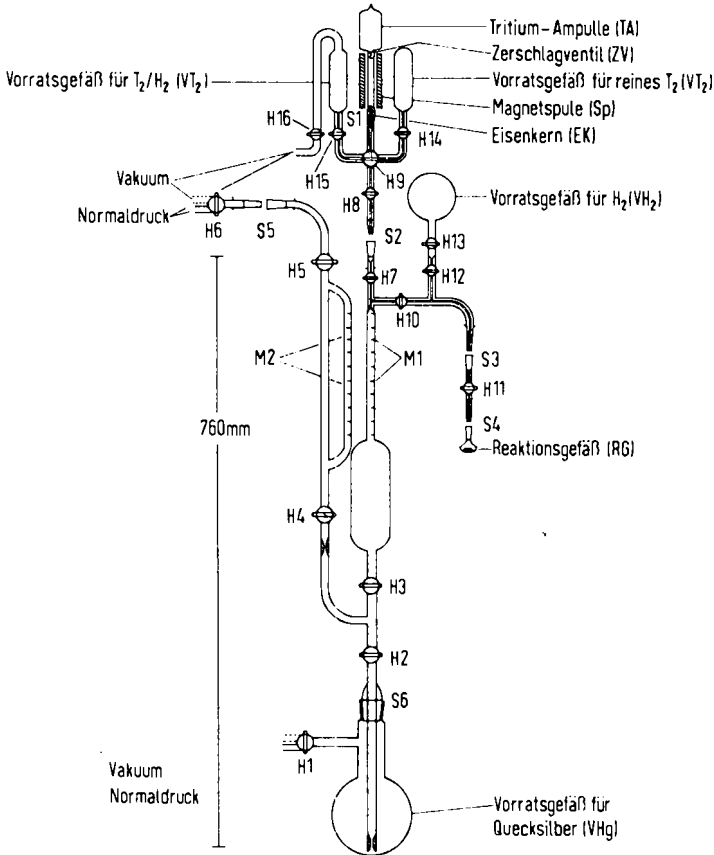
Dibrom-phenylalanin besteht. Beide bromierten Phenylalanine gehen bei der katalytischen Enthalo-genierung in Phenylalanin über.

Das *Dibromprodukt* läßt sich auf Grund seiner schwereren Löslichkeit aus 50-proz. Äthanol rein gewinnen. Nadelchen vom Schmp. 240—250° (Zers.). $[\alpha]_D^{25}$: +8.25° (*n* HCl).

$C_9H_9Br_2NO_2$ (323.0) Ber. C 33.47 H 2.81 N 4.34 Gef. C 33.41 H 2.91 N 4.39

Messung der Tritiumaktivität: Die β -Teilchen des Tritiums wurden in einem Flüssigkeits-scintillationsspektrometer der Firma Packard, Modell 314 EX, gemessen. Als Lösungsmittel diente in allen Fällen ein Gemisch von Toluol/Methanol (35:15), das außerdem ca. 1% Wasser, 0.28% 2.5-Diphenyl-oxazol und $3.5 \cdot 10^{-4}$ % 1.4-Bis-[5-phenyl-oxazolyl-(2)]-benzol enthielt. Die Zählausebeute betrug ca. 8%. Die Genauigkeit der Aktivitätsbestimmung war größer als $\pm 3\%$. Absolutmessungen wurden durch Vergleich mit einem T-Toluol-Standard ausgeführt.

Die Aktivitätsverteilung über Papierchromatogrammen konnte mit einem fensterlosen Methandurchflußzähler der Fa. Friesecke & Höpfner, Erlangen, bestimmt werden.



Mikroapparatur zur katalytischen Reduktion mit reinem Tritium.

H1—H16 Hähne, S1—S6 Normalschliffe, M1 und M2 geeichte Gasbüretten

Apparatur zur Synthese mit gasförmigem Tritium (T_2) (Abbild.): Alle Reaktionen mit Tritium (T_2) wurden in einer Spezialapparatur aus Pyrex-Glas ausgeführt, die erlaubt, die

Tritium-Ampulle (TA) zu öffnen, das Tritium abzupumpen und die jeweiligen Reaktionen unter laufender Kontrolle des aufgenommenen Tritiums auszuführen. Nach beendeter Reduktion kann der radioaktive Wasserstoff in ein Vorratsgefäß zurückgepumpt werden.

Die käufliche Tritium-Ampulle (TA) ist über den Schriff S1 mit der Apparatur verbunden. Sie enthält in der Regel 10000 mC Tritium, das sind etwa 4 ccm Gas (unter Normalbedingungen), die bei einem Ansatz verarbeitet werden. Die Apparatur wird zunächst mit der Wasserstrahlpumpe evakuiert und bis zu den Hähnen H5, H10, H14, H15 aus dem Vorratsgefäß VHg mit Quecksilber gefüllt. Dann wird das Zerschlagventil (ZV) der Tritium-Ampulle mit dem Eisenkern (EK) durch einen kurzen Stromstoß in der Spule (Sp) aufgeschlagen. Durch Absenken des Quecksilberspiegels bis H3 kann die Hauptmenge des Tritiums aus TA abgepumpt werden. Nach Schließen der Hähne H7–H9 wird das Tritium auf Normaldruck komprimiert und seine Menge volumetrisch in der Gasbürette M1 bestimmt. Über die Hähne H10–H11 gelangt der radioaktive Wasserstoff, dem unter Umständen auch inaktiver Wasserstoff aus dem Vorratsgefäß VH₂ beigemischt werden kann, in das vorevakuierte Reaktionsgefäß (RG). Intensives Rühren mit einem Magnetrührer sichert hier einen möglichst raschen Ablauf der Reduktion. Während der gesamten Dauer der Reaktion steht der Wasserstoff unter Normaldruck. Die Wasserstoffaufnahme kann volumetrisch in M1 verfolgt werden. Nach Aufnahme der berechneten Gasmenge wird das Reaktionsgefäß auf -80° mit Aceton/Trockeneis gekühlt und der Überschuß an radioaktivem Wasserstoff durch Senken und Heben des Quecksilberspiegels in das Vorratsgefäß VT₂ zurückgepumpt. Danach wird das Reaktionsgefäß noch mehrfach mit inaktivem Wasserstoff gespült, um eventuell vorhandene Reste an gasförmigem Tritium zu entfernen. Dieser Wasserstoff, der nur noch Spuren von Aktivität enthält, wird gesondert von dem reinen Tritium im Vorratsgefäß VT₂ gesammelt und später zu aktiven Vorversuchen verwandt.

Nicht gebrauchter radioaktiver Wasserstoff wird für nachfolgende Reaktionen eingesetzt. In der Regel wird so nahezu der gesamte Wasserstoff einer Tritium-Ampulle innerhalb weniger Stunden umgesetzt. Es ist deshalb nicht notwendig, das Tritium in der Zwischenzeit als Urantritid (UT₃) zu binden, wie es bei längerer Lagerung von radioaktivem Wasserstoff zweckmäßig ist.

Das zum Fetten der Schriffe verwandte Siliconfett (zäh) wurde im Anschluß an eine Radio-synthese auf seine Tritiumaktivität geprüft. Es enthielt an den am meisten mit T in Kontakt befindlichen Hähnen H7 und H10 1 bis $2 \cdot 10^{-4}\%$ der eingesetzten Radioaktivität.

Darstellung T-markierter Aminosäuren aus den jeweiligen ungesättigten Vorstufen durch Hydrierung mit Tritium: 10 mg Palladium/Aktivkohle-Kontakt (10% Pd), in 2 ccm Lösungsmittel suspendiert, werden mit inaktivem Wasserstoff im Reaktionsgefäß (RG) (Abbild.) vorreduziert. Hierzu gibt man 0.1 mMol der jeweiligen ungesättigten Verbindung und rührt bei Raumtemperatur und Atmosphärendruck bis zur Aufnahme der berechneten Menge Wasserstoff in einer Tritium-Atmosphäre. Nach Filtrieren und Auswaschen des Kontakts wird das Filtrat zur Trockne eingengt und der Rückstand 4 Stdn. mit 6*N* HCl unter Rückfluß gekocht. Die Salzsäure wird abdestilliert und die T-markierte Verbindung nach Zugabe von je 10 ccm Wasser 3 mal zur Trockne eingengt und schließlich, in 80–90-proz. Äthanol gelöst, aufbewahrt. Nähere Versuchsbedingungen siehe Tab. 2.

Katalytische Enthalogenerung aromatischer Brom- und Jodverbindungen mit Tritium: Im Reaktionsgefäß (RG) der Apparatur (Abbild.) werden ca. 100 mg Palladium/Calciumcarbonat-Kontakt, in 1 bis 2 ccm 3-proz. methanol. Kalilauge suspendiert, mit inaktivem Wasserstoff aus dem Vorratsgefäß VH₂ reduziert. Der inaktive Wasserstoff wird abgepumpt, 0.1 bis 0.5 mMol der halogenierten Aminosäure zugegeben und das Halogen durch intensives Rühren in einer Tritium-Atmosphäre abgespalten. Spätestens nach einer Stde. ist in allen

Tab. 2. Synthese T-markierter Aminosäuren

| Markierte Aminosäure | Vorstufe | Lösungsmittel | Hydrierungs- mittel | Dauer der Hydrierung | spezif. Akt. mC/mMol | radioakt. Ausbeute |
|--|--|--|--|-------------------------|-------------------------|-----------------------|
| D,L-Alanin-[α,β -T ₂] | α -Acetamino-acrylsäure-äthylester (I) | Tetrahydrofuran | T ₂ + H ₂ | 3 Min. | 4 500 | a) b) |
| γ -Amino-butter- säure-[α,β -T ₂]c) | γ -Phthalimido-crotonsäure- methylester (II) | Äthanol | T ₂ (Spur) + H ₂ | 1 Stde. | — | a) |
| D,L-Glutaminsäure- [β,γ -T ₂] | Acetamino-[2-carbäthoxy-vinyl]- malonsäure-diäthylester (III) | Äthanol | T ₂ + H ₂ | 2.5 Stdn. | 3 000 | a) |
| D,L- α -Amino-adipin- säure-[4, 5-T ₂] | Acetamino-[3-carbäthoxy- Δ 1-propenyl]- malonsäure-diäthylester (IV) | Äthanol | T ₂ | 3 Min. | 55 000 | 90% |
| D,L- β -[3,4-Dihydroxy- phenyl]-alanin- [α,β -T ₂] | α -Acetamino- β -[3,4-diacetoxy-phenyl]- acrylsäure (V) | Äthanol/H ₂ O (3:1) | T ₂ | 1.5 Stdn. | 9 000 | 15% |
| D,L-Prolin-[2-T]d) | Δ 1-Pyrrolin-carbonsäure-(2)-hydro- chlorid (VI) | Tetrahydrofuran/H ₂ O (1:1) Na-Acetat pH 4.5 | T ₂ + H ₂ | 1 Stde. | 1 500 | a) |

a) Radioaktive Ausbeute nicht angebar, da T₂-Konz. nicht genau bekannt.

b) Während der Verseifung mit 6n HCl wurden 45% des organ. gebundenen Tritiums wieder ausgetauscht.

c) Vor der Verseifung Abspalten der Phthaloyl-Gruppe durch Kochen mit Äthanol. Hydrazin-Lösung.

d) Nicht mit 6n HCl unter Rückfluß gekocht.

Fällen die berechnete Menge an Tritium aufgenommen. Nach dem Abfiltrieren und Nachwaschen des Kontakts mit Wasser wird das Filtrat mit verd. Salzsäure angesäuert und wiederholt nach Zugabe von Wasser zur Trockne eingengt. Auf diese Weise werden flüchtige T-Verbindungen entfernt. Bei der Synthese des DL-Tryptophans-[5-T] wird nicht angesäuert.

Die radioaktive Ausbeute beträgt mit Ausnahme von DL-Tryptophan-[5-T] 90–100%. Die spezifische Aktivität der markierten Aminosäuren richtet sich nach der spezif. Aktivität des eingesetzten Tritiums und der Anzahl der je Molekül austauschbaren Halogenatome. Bei Verwendung von reinem Tritium läßt sich je austauschbares Halogenatom eine spezif. Aktivität von ca. 30000 mC erreichen.

Bestimmung der radiochemischen Reinheit: Der Nachweis der radiochemischen Reinheit erfolgt radiochromatographisch in mindestens zwei verschiedenen Medien nach Zugabe von inaktiver Trägersubstanz (s. Tab. 3). Markierte Verbindungen, die nicht radiochemisch rein waren, wurden papierchromatographisch in einem der angegebenen Medien gereinigt.

Tab. 3. Radiochromatographische Reinheitskontrolle

| markierte Aminosäure | Medium | Reinheitsgrad in % |
|---|------------|---|
| DL-Alanin-[α,β -T ₂] | A, B | >98 |
| γ -Amino-buttersäure-[α,β -T ₂] | A | 80 |
| DL-Glutaminsäure-[β,γ -T ₂] | A, B, C | 75 |
| DL- α -Amino-adipinsäure-[4.5-T ₂] | A, B, C | >98 |
| DL-Prolin-[2-T] | A, F | >98 |
| L-Phenylalanin-[2.4-T ₂] | A, B, C | >98 |
| L-Tyrosin-[3-T] | A, E | >98 |
| L-Tyrosin-[3.5-T ₂] | A, E | >98 |
| DL- β -[3.4-Dihydroxy-phenyl]-alanin-[α,β -T ₂] | A, D | >98 in SO ₂ -haltiger Lösung |
| DL- β -[3.4-Dihydroxy-phenyl]-alanin-[2.5.6-T ₃] | A, D | >98 in SO ₂ -haltiger Lösung |
| L-Histidin-[2.4-T ₂] | A, B, D, E | >98 |
| DL-Tryptophan-[5-T] | (A), B | stark verunreinigt (50%) |

- Medien: A Methyläthylketon/Propionsäure/Wasser (75:25:30)
 B Methyläthylketon/Pyridin/Wasser (70:15:15)
 C sek. Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:1)
 D n-Butanol/Eisessig/Wasser (2:1:1)
 E n-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser (30:20:6:24)
 F n-Butanol/Eisessig/Wasser (4:1:5) organ. Phase

Zum Nachweis von Isotopie-Effekten bei der katalytischen Enthalogenerung: Bei den in Tab. 1 angeführten Aminosäuren wurde die Enthalogenerung mit einem Gemisch von T₂ und H₂ (ca. 5 bis 50% T₂) ausgeführt. Dann wurde der Kontakt, wie bereits beschrieben, abfiltriert und die Radioaktivität vor und nach Abdestillation des Lösungsmittels gemessen. Um das Lösungsmittel restlos zu entfernen, wurde die Substanz 3 mal nach Zugabe von Wasser i. Vak. zur Trockne eingengt. Man erhielt so die Gesamtaktivität der Lösung und die Aminosäureaktivität. Die Differenz dieser beiden Werte entspricht der Aktivität des ionogenen Tritiums in Tab. 1. Bei jeder Aminosäure wurden mehrere Messungen ausgeführt. Die einzelnen Werte stimmten gut überein.