

Mikrosynthese des Glycin(2-¹⁴C)

VON PETER VENKER UND JOACHIM KLECKER

Inhaltsübersicht

Bei vielen biochemischen Arbeiten werden Aminosäuren hoher spezifischer Aktivität benötigt, während gleichzeitig die bei diesen Versuchen eingesetzten Gesamtaktivitäten sehr niedrig sein können.

In solchen Fällen sind Methoden zur Synthese kleiner Aminosäuremengen hoher spezifischer Aktivität für den Experimentator wertvoll. Darüber hinaus aber werden infolge der bei solchen Mikromethoden eingesetzten niedrigen Gesamtaktivitäten die Gefahren des Arbeitens mit aktiven Substanzen auf ein Minimum reduziert.

In vorliegender Arbeit beschreiben wir eine Synthesemethode, die die Herstellung von Glycin(2-¹⁴C) im 2–5-mg-Maßstab gestattet. Da sich, ausgehend vom markierten Glycin, eine ganze Reihe anderer Aminosäuren herstellen lassen, könnte die beschriebene Methode die Grundlage für weitere Mikrosynthesen von markierten Aminosäuren bilden.

Unsere Glycinsynthese beruht im Prinzip auf einer Methode von G. EHRENSVÄRD und R. STJERNHOLM¹). Hiernach wird Diphenylthioharnstoff in alkoholisch-wäßrigem Milieu mit basischem Bleicarbonat zum N,N'-diphenylcyano(¹⁴CN)formamidin umgesetzt. Das Bleisulfid wird abfiltriert, die Lösung eingedampft und nach Aufnahme in Äther mit LiAlH₄ hydriert. Die Autoren erhielten das Glycin durch Verseifung des 2-Amino-N,N'-diphenylacetamidin-2-¹⁴C mit Ba(OH)₂. Die Synthese geht von 7 g K¹⁴CN aus und erreicht eine Ausbeute von 40–50% Glycin.

Wir haben zunächst die Synthese in der angegebenen Weise nachgearbeitet und gelangten zu denselben Ausbeuten wie die genannten Autoren. Bei Mikroansätzen jedoch, die nur von einigen mg KCN ausgingen, waren die Ausbeuten sehr unterschiedlich und betrugen maximal 5%. Wir führen dies vor allem auf folgende Tatsache zurück: Die Ausbeute

G. EHRENSVÄRD u. R. STJERNHOLM, Acta chem. scand. **3**, 971 (1949).

an N,N' -diphenylcyano(^{14}C)formamidin hängt in hohem Maße von der möglichst homogenen Verteilung des basischen Bleicarbonates im alkoholisch-wäßrigen Milieu ab, die jedoch beim Mikroansatz kaum zu erreichen ist.

Wir gingen daher bei unserer Synthese nicht vom Diphenylthioharnstoff, sondern vom Diphenylcarbodiimid aus. Dies reagiert in methanolischer Lösung nahezu quantitativ mit einer wäßrigen KCN-Lösung zum Cyanoformamidin. Die Reduktion erfolgte mit RANEY-Nickel und Wasserstoff in demselben Reaktionsgefäß. Der Katalysator wurde im gleichen Reaktionsgefäß abzentrifugiert, die alkoholische Lösung zur Trockne eingedampft und der Rückstand mit Natronlauge in der Hitze verseift. Die Abtrennung des Na^+ erfolgte mittels Ionenaustauscher. Die Ausbeute an Glycin betrug 35–40%. Die Ausbeutebestimmung erfolgte nach dem Isotopenverdünnungsverfahren. Die Reinheit des erhaltenen Glycins wurde chromatographisch geprüft.

Experimenteller Teil

1. N,N' -diphenylcyano(^{14}C)formamidin: 20 mg frisch destilliertes Diphenylcarbodiimid wurden in 20 ml Methanol und 2 ml Tetrahydrofuran gelöst. Zu dieser Lösung kamen unter kräftigem Rühren 2 mg K^{14}CN , gelöst in 0,5 ml Wasser und danach 1,2 ml einer inaktiven 0,1 n KCN-Lösung. Die Ausbeute an Cyano(^{14}C)formamidin beträgt annähernd 100%. Die Ausbeutebestimmung erfolgte nach dem Isotopenverdünnungsverfahren.

2. 2-Amino- N,N' -diphenylacetamidin-2- ^{14}C : Die Reduktion erfolgte nach Zusatz von RANEY-Nickel mit Wasserstoff bei Zimmertemperatur und Normaldruck innerhalb von 40 Minuten. Um eine möglichst vollständige Reduktion zu erreichen, verblieb das Reaktionsgemisch etwa 2 Stunden unter den Reduktionsbedingungen.

3. Verseifung zum Glycin: Nach erfolgter Reduktion wurde der Katalysator abzentrifugiert und die alkoholische Lösung in ein zweites Reaktionsgefäß überführt. Der Katalysator wurde mehrfach mit kochendem Methanol nachgewaschen und die Lösungen vereinigt. Die Zentrifugation erfolgte direkt in dem ersten Reaktionsgefäß. Die überstehende Methanollösung wurde dann nach Überführung in ein zweites Reaktionsgefäß bis dicht unterhalb ihres Siedepunktes erhitzt und das Abdampfen des Alkohols durch Überleiten von Luft beschleunigt. Ein Verspritzen von Aktivität während des Eindampfens wird so vermieden. Der Rückstand wurde dann 2 Stunden mit einem 20fachen Überschuß 2 n NaOH gegenüber der theoretisch erforderlichen Menge bis dicht unterhalb des Siedepunktes erhitzt.

4. Isolierung des Glycins: Das Verseifungsgemisch wurde zusammen mit 25 ml Wasser auf eine Dowex-50-Säule gebracht und mit 25 ml Wasser nachgewaschen. Im Eluat befindet sich eine geringe Aktivitätsmenge, die keine Ninhydrinreaktion zeigte und vermutlich Oxalsäure zuzuschreiben ist, die durch Verseifung von nicht hydriertem Cyanoformamidin entstanden sein kann.

Das an der Säule haftende Glycin konnte durch Elution mit 40 ml 1 n Ammoniak zurückgewonnen werden. Das Na wird hierbei quantitativ von der Säule zurückgehalten.

Die ammoniakalische Glycinlösung wurde zur Entfernung des Ammoniaks eingedampft. Die Ausbeutebestimmung erfolgte nach dem Isotopenverdünnungsverfahren. Sie beträgt 35—40%. Die Reinheit des Glycins wurde auf chromatographischem Wege geprüft.

Berlin-Buch, Institut für Medizin und Biologie, Arbeitsbereich angewandte Isotopenforschung der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin.

Bei der Redaktion eingegangen am 28. Dezember 1959.