

*Synthese tritiummarkierter Säuren durch Kettenverlängerung nach Arndt-Eistert**

Leonhard BIRKOFER, Klaus HEMPEL und Werner NOUVERTNÉ¹

Institut für Organische Chemie und
Institut für Medizinische Isotopenforschung der Universität Köln.

SUMMARY

Acids labeled with tritium at the α -C-atom were synthesized through the rearrangement of diazo ketones with TOH-dioxane in the presence of silver oxide. This paper describes the preparation of *p*-methoxy-phenylacetic- α -T acid, *p*-hydroxy-phenylacetic- α -T acid, β -alanine- α -T, γ -aminobutyric- α -T acid and δ -aminovaleric- α -T acid.

ZUSAMMENFASSUNG

Durch Umlagerung von Diazoketonen in Dioxan-Tritiumwasser bei Gegenwart von Silberoxyd sind am α -Kohlenstoffatom mit Tritium markierte Säuren darstellbar. Die Synthese von *p*-Methoxyphenylelessigsäure- α -T, *p*-Hydroxyphenylelessigsäure- α -T, β -Alanin- α -T, γ -Aminobuttersäure- α -T und δ -Aminovaleriansäure- α -T wird beschrieben.

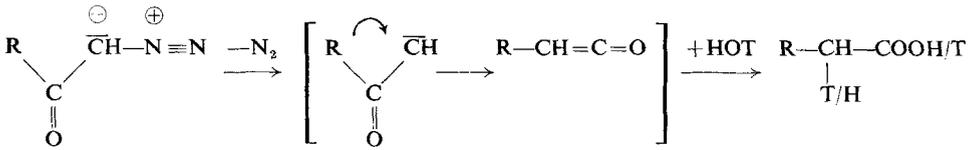
Tritium-Wasser dient bei einer Reihe von Verfahren als Vorstufe für die Tritiummarkierung organischer Verbindungen [1]. Bei diesen Markierungsverfahren handelt es sich in der Regel um Austauschreaktionen, die zu einer uniformen Markierung des gesamten Moleküls führen. Die vorliegende Arbeit beschreibt eine Methode, Tritium, ausgehend von Tritium-Wasser, gezielt in die α -Stellung von Carbonsäuren einzubauen, und zwar durch Ketten-

* Empfangen am 24. Dezember 1964.

¹ Teil der Dissertation von W. NOUVERTNÉ, Universität Köln, 1964.

Werner NOUVERTNÉ dankt EURATOM für die Überlassung persönlicher Mittel.

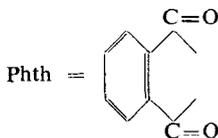
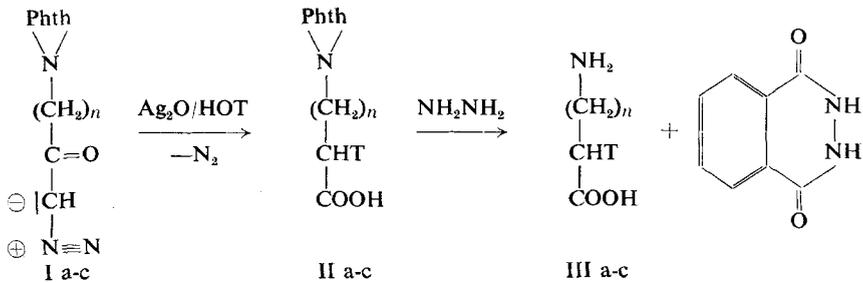
verlängerung nach ARNDT-EISTERT [2]. Damit ist die große Gruppe der nach ARNDT-EISTERT darstellbaren Säuren mit Tritium markierbar.



Während Wasser bei den nichtradioaktiven Synthesen von Carbonsäuren nach ARNDT-EISTERT praktisch in unbeschränkter Menge zur Verfügung steht, ist dies bei der Durchführung dieser Reaktion in tritiumhaltigen Wasser nicht mehr der Fall, vor allem, wenn es sich um Tritium-Wasser hoher spezifischer Aktivität handelt. Da Wasser jetzt der begrenzende Faktor ist, mußten zunächst Bedingungen gefunden werden, die ARNDT-EISTERT-Reaktion mit möglichst wenig Wasser durchzuführen. Hierzu wurden Diazoketone in wasserhaltigem Dioxan, Wassergehalt 2-40 %, mit Silberoxyd bei 80-90° C in die Säuren umgelagert. Die Versuche ergaben, daß die Umlagerung erst von einem Wassergehalt von 20-30 % an zufriedenstellend verlief. Die Umsetzungen erfolgten in der Regel deshalb in Dioxan mit 30 % Wasser.

Die spezifische Aktivität der durch ARNDT-EISTERT entstehenden tritiummarkierten Säuren hängt von der spezifischen Aktivität des vorgelegten Wassers ab. Zur Synthese diente Wasser mit geringer spezifischer Aktivität (2 mC/ccm) und Wasser hoher spezifischer Aktivität (230 C/ccm). Wasser geringer spezifischer Aktivität, bis etwa 5 C/ccm, ist im Handel erhältlich, während Tritium-Wasser hoher spezifischer Aktivität durch Verbrennen von Tritium-Gas am Platindioxyd-Kontakt unmittelbar vor der Synthese hergestellt wurde.

Bisher konnten nach ARNDT-EISTERT tritiummarkierte Aminosäuren und tritiummarkierte aromatische Säuren synthetisiert werden.



$n = 1$: Ia, IIa, IIIa (β -Alanin- α -T)

$n = 2$: Ib, IIb, IIIb (γ -Aminobuttersäure- α -T)

$n = 3$: Ic, IIc, IIIc (δ -Aminovaleriansäure- α -T)

Tritiummarkierte Aminosäuren (IIIa-c) wurden aus den Diazoketonen Ia-Ic synthetisiert [3, 4], deren Aminogruppe zur Vermeidung von Nebenreaktionen mit Phthalsäure geschützt ist. Die Diazoketone Ia-Ic lagerten sich in Anwesenheit von Silberoxyd durch kurzzeitiges Erwärmen in Dioxan-TOH (30 % Wasser) nahezu quantitativ in die Säuren IIa-IIc um. Die Phthaloylgruppe ließ sich durch Kochen mit 0,3 m äthanolischer Hydrazinhydrat-Lösung abspalten [5]. Folgende tritiummarkierten Aminosäuren mit einer radiochemischen Reinheit von >95 % wurden bisher so dargestellt : β -Alanin- α -T (IIIa), γ -Aminobuttersäure- α -T (IIIb) und δ -Aminovaleriansäure- α -T (IIIc).

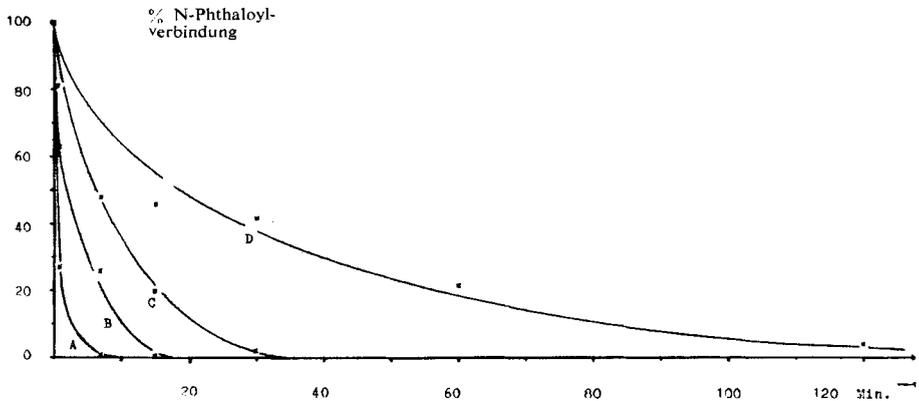
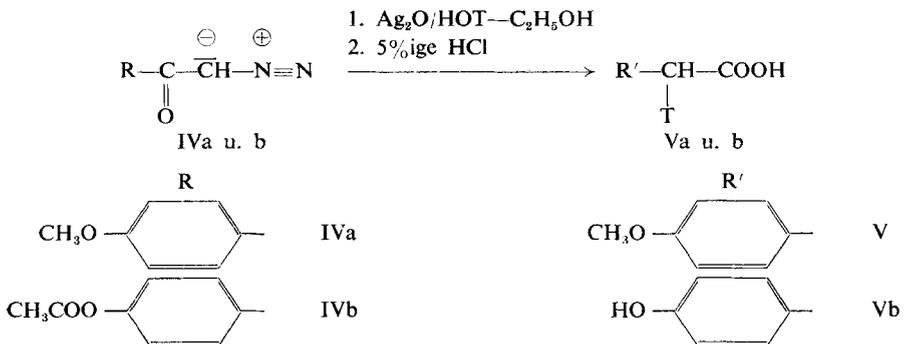


ABB. 1. — Abspaltung der Phthaloylgruppe der N-Phthaloylamino-säuren mit Hydrazin.
 A) N-Phthaloyl- β -alanin- α -T (IIa), 78° C
 B) N-Phthaloyl- γ -aminobuttersäure- α -T (IIb), 78° C
 C) N-Phthaloyl- δ -aminovaleriansäure- α -T (IIc), 78° C
 D) N-Phthaloyl- δ -aminovaleriansäure- α -T (IIc), 20° C

Der zeitliche Verlauf der Abspaltung des Phthaloylrestes durch Hydrazin wurde bei den Verbindungen IIa-IIc papierchromatographisch verfolgt. Abbildung 1 zeigt, daß die Hydrazinolyse um so langsamer eintritt je mehr CH_2 -Reste zwischen Amino- und Carboxyl-Gruppe liegen.



Tritiummarkierte aromatische Carbonsäuren, p-Methoxy-phenylessigsäure (Va) und p-Hydroxy-phenylessigsäure (Vb), wurden aus den Diazoketonen IVa [6] und IVb [7] erhalten. Bei der Synthese der aromatischen Carbonsäuren erfolgte die Umlagerung der Diazoketone nicht in Wasser, sondern zur Vermeidung von Nebenreaktionen in einem Gemisch von Äthanol und Tritium-Wasser. Dabei entstehen primär die Äthylester. Die daraus durch Hydrolyse mit verdünnter Salzsäure gewonnenen Verbindungen Va und Vb waren zu 40% mit anderen radioaktiven Verbindungen verunreinigt. Sie konnten papierchromatographisch gereinigt werden. Der Zusatz von Äthanol zum Tritium-Wasser senkt die spezifische Aktivität des Wassers, da dessen Wasserstoffatome in einem schnellen Austauschgleichgewicht mit den H-Atomen der alkoholischen Hydroxyl-Gruppe stehen [1].

Zur Untersuchung der Austauschbarkeit des an das α -C-Atom gebundenen Tritiums unter den bei der ARNDT-EISTERT-Synthese vorliegenden Bedingungen wurden die tritiummarkierten Säuren IIIa, IIIb und IIIc in Dioxan/Wasser (7 : 3) in Gegenwart von Silberoxyd einige Stunden auf 90° C erwärmt und anschließend die Tritiumaktivität der Säuren mit dem Flüssigkeitsscintillationszähler gemessen. In keinem Fall waren die Verluste an Radioaktivität größer als 5%. Entsprechende Versuche zur Austauschbarkeit wurden auch in 5% wässriger Salzsäure durchgeführt. Auch unter diesen Bedingungen waren Aktivitätsverluste durch Austausch nicht nachweisbar. Diese Versuche zeigen, daß die Tritiummarkierung des α -C-Atoms nicht im Verlauf der nachfolgenden Aufarbeitung wieder ausgetauscht wird. Damit dürfte die spezifische Aktivität (mC/mMol) der über eine ARNDT-EISTERT-Synthese dargestellten Säuren etwa halb so groß sein wie die spezifische Aktivität des vorgelegten Wassers. Das gilt allerdings nur unter der Voraussetzung, daß beim Einbau des Wasserstoffs keine Isotopieeffekte auftreten. Ob bei dieser Tritium-Markierung Isotopieeffekte eine Rolle spielen, wurde nicht untersucht.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

1) *Die Messung der Radioaktivität des Tritiums* erfolgte mit einem Flüssigkeitsscintillationszähler, TriCarb Modell 314EX. Hierzu wurden die Proben in einer Sauerstoff-Atmosphäre zu Wasser verbrannt [8, 9] und dieses in einer Scintillations-Lösung aufgenommen. Die Lösung bestand aus einem Gemisch von Toluol/abs. Äthanol (200 : 125), das zusätzlich 0,6% 2,5-Diphenyloxazol (PPO) und 0,016% 1,4-Dis-(5-phenyloxazolyl-(2))-benzol (POPOP) enthält. Die Zählhausbeute betrug ca. 6%. Alle Messungen wurden mit einer Genauigkeit von $\pm 2\%$ durchgeführt. Zur Messung der Radioaktivität in Papierchromatogrammen diente ein fensterloser Methan-Durchflußzähler der Fa. Frieske & Hoepfner.

2) *Apparatur zur Synthese tritiummarkierter Säuren.* — Die Durchführung der Kettenverlängerung erfolgte in der in Abbildung 2 wiedergegebenen Mikrodestillations-Brücke aus Glas (abgewandelt nach SWAIN und

KRESGE) [10]. Die Brücke wurde an eine Glasapparatur zur Hydrierung mit gasförmigem Tritium nach BIRKOFER und HEMPEL [11] angeschlossen. Die Apparatur besteht aus zwei Kölbchen mit einem Fassungsvermögen von je 0,8 ccm. Diese sind durch ein Kapillarrohr von 1 mm Durchmesser miteinander verbunden. Durch den Hahn H2 läßt sich das Reaktionsgefäß K2 von der übrigen Apparatur trennen. Über das Verbindungsstück mit dem Hahn H1 ist die Brücke mit der Hydrierapparatur verbunden. Durch einen Mikrorührer, einem mit Glas überzogenen Eisendraht, kann die im Kölbchen K1 vorhandene Lösung mit Hilfe eines Magnetrührers gerührt werden.

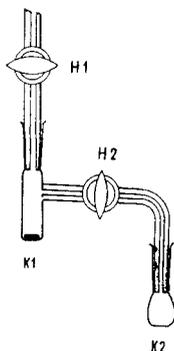


ABB. 2. — Apparatur zur Darstellung tritiummarkierter Säuren durch ARNDT-EISSERT-Synthese.

3) *Herstellung von Tritium-Wasser hoher spezifischer Aktivität.* — 4 ccm Tritium-Gas (Radiochemical Centre Amersham, England) (10 C) wurden in K1 (Abb. 2) unter Rühren mit 25 mg PtO_2 in einem Gemisch aus 0,1 ccm Dioxan und 0,04 ccm Wasser zu T_2O verbrannt. Der Hahn H2 blieb während der Reaktion, die spätestens nach 3 Stunden beendet war, geschlossen. Die spezifische Aktivität des Wassers betrug 4200 mC/mMol (230 C/ccm).

4) *Umlagerung von Diazoketonen in Tritium-Wasser.* — In dem Kölbchen K2 wurden jeweils 5 mg Diazoketon und 5 mg frisch bereitetes Ag_2O vorgelegt, das in K1 befindliche Gemisch von Dioxan und T_2O - H_2O in einer Kältemischung (Aceton-Trockeneis) eingefroren und die ganze Apparatur evakuiert. Nach Schließen von H1 wurde K2 in Aceton-Trockeneis eingetaucht und K1 vorsichtig erwärmt. Das Dioxan/Wasser-Gemisch destillierte unter diesen Bedingungen langsam aus K1 in K2. Die Bildung von Tröpfchen in der Kapillare konnte durch vorsichtiges Erwärmen mit warmer Luft vermieden werden. Nach Abschluß der Destillation wurde H2 geschlossen und K2 im Ölbad auf 80-90° C erwärmt. Unter Stickstoff-Entwicklung lagerten sich die Diazoketone in die Säuren um. Die Reaktion war spätestens nach 15 Minuten beendet. Anschließend wurde das Dioxan-Wasser-Gemisch in das Kölbchen K1 zurückdestilliert. Dieses Tritium-Gemisch kann für weitere Umlagerungen verwendet werden.

Nach Lösen des braunen Rückstandes in K2 mit 50-100 ccm Äthanol/5%iges NH_4OH (1 : 1) wurde der Überschuß an Ammoniak zunächst im Vakuum abdestilliert und anschließend die Silberionen durch Ansäuern mit verd. Salzsäure ausgefällt. Die tritiummarkierten Aminosäuren blieben in Lösung. Aus den Diazoketonen Ia-Ic konnten so die N-Phthaloylderivate des β -Alanin- α -T, der γ -Aminobuttersäure- α -T und der δ -Aminovaleriansäure- α -T erhalten werden. Bei der Herstellung aromatischer Carbonsäuren wurden die Diazoketone IVa und IVb in einem Tritium-Gemisch umgelagert, das aus 0,2 ccm Dioxan, 0,02 ccm Tritium-Wasser und 0,02 ccm Äthanol bestand. Die bei der Umlagerung entstehenden Äthylester wurden durch einstündiges Kochen mit 6 n Salzsäure verseift und so p-Methoxy-phenylelessigsäure- α -T (Va) und p-Hydroxy-phenylelessigsäure- α -T (Vb) synthetisiert.

5) *Abspaltung der Phthaloylgruppe.* — Die N-Phthaloyl-Derivate, N-Phthaloyl- β -alanin- α -T (IIa), N-Phthaloyl- γ -aminobuttersäure- α -T (IIb) und N-Phthaloyl- δ -aminovaleriansäure- α -T (IIc) wurden 60 Minuten in 0,3 m äthanolischer Hydrazin-Hydrat-Lösung unter Rückfluß gekocht, anschließend wurde das Lösungsmittel sowie der Überschuß an Hydrazin i.V. abdestilliert und die Aminosäuren in 80%igem Äthanol aufgenommen.

6) *Bestimmung der radiochemischen Reinheit.* — Die Untersuchung der radiochemischen Reinheit der tritiummarkierten Säuren erfolgte radiopapierchromatographisch. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die dabei angewandten Lösungsmittelsysteme.

7) *Papierchromatographische Reinigung.* — Die aromatischen Säuren Va und Vb wurden papierchromatographisch in Medium B (Tab. 1) gereinigt.

TAB. 1. Lösungsmittelsysteme für die radiopapierchromatographische Reinheitskontrolle tritiummarkierter Säuren. (absteigende Chromatographie)

Säure	Lösungsmittel
N-Phthaloyl- β -alanin (IIa)	C, D, E
N-Phthaloyl- γ -aminobuttersäure (IIb)	C, D, E
N-Phthaloyl- δ -aminovaleriansäure (IIc)	C, D, E
β -Alanin (IIIa)	C, D, E
γ -Aminobuttersäure (IIIb)	C, D, E
δ -Aminovaleriansäure (IIIc)	C, D, E
p-Methoxyphenylelessigsäure (Va)	A, B
p-Hydroxyphenylelessigsäure (Vb)	A, B

Lösungsmittel :

- A Isopropanol/ NH_4OH (25 %)/Wasser (8 : 1 : 1)
- B n-Butanol/Äthanol/ NH_4OH (25 %)/Wasser (4 : 4 : 1 : 1)
- C n-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser (30 : 20 : 6 : 24)
- D n-Butanol/Eisessig/Wasser (4 : 1 : 2,2)
- E Methyläthylketon/Propionsäure/Wasser (75 : 25 : 30)

Die Verteilung der Radioaktivität auf den Chromatogrammen wurde dabei mit einem Röntgenfilm (Agfa-Sinofilm ohne Schutzschicht)¹ bestimmt. Mit diesem Filmmaterial läßt sich in Chromatogrammen (Papier : SS 2043b, Mgl) nach einer Belichtungsdauer von drei Tagen noch 0,1 μC Tritium pro cm^2 nachweisen. Die Bande der tritium-markierten Säure wurde eluiert. Die radiochemische Reinheit so gereinigter Säuren war größer als 98 %.

Herrn Professor Dr. Werner MAURER sei an dieser Stelle für seine Förderung und für sein stetes Interesse am Fortgang der vorliegenden Arbeit gedankt.

LITERATUR

1. MURRAY III, A. und WILLIAMS, D. L. — Organic Syntheses with Isotopes, Intersciences Publishers, Inc., New York (1958).
2. WEYGAND, F. und BESTMANN, H. J. in FOERST, W. — Neuere Methoden der präparativen organischen Chemie III, S. 280, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. (1961).
3. BALENOVIĆ, K. — *Experientia*, **3** : 369 (1947).
4. MICHALSKY, J., BORKOVEC, J. und HAČLACEK, J. — *Chem. Listy*, **49** : 1379 (1955).
5. SHEEHAN, J. C. und FRANK, V. S. — *J. Amer. chem. Soc.*, **71** : 1856 (1949).
6. WILDS, A. L. und MEADER, A. L. Jr. — *J. Org. Chem.*, **13** : 763 (1948).
7. ROHMANN, C. und MEISEL, D. — *Arch. Pharm.*, **294** : 538 (1961).
8. KALBERER, F. und RUTSCHMANN, J. — *Helv. Chim. Acta*, **44** : 1956 (1961).
9. HEMPEL, K. — *Atompraxis*, **10** : 148 (1964).
10. SWAIN, C. G. und KRESGE, A. J. — *J. Amer. chem. Soc.*, **80** : 5281 (1958).
11. BIRKOFER, L. und HEMPEL, K. — *Chem. Ber.*, **96** : 1373 (1963).

¹ Der Agfa A.G., Leverkusen danken wir für die Überlassung des Filmmaterials.