

## Die Herstellung von $^{14}\text{C}$ markiertem $\beta$ -Chloräthyl-trimethylammonium-chlorid (CCC)

CH. CHWALA

Aus der Biologischen Forschungsabteilung der Österreichischen  
Stickstoffwerke Aktiengesellschaft, Linz/Donau 2

Leiter : Dr. H. Mayr

Eingegangen am 5.4.1967

### SUMMARY

*The preparation of  $\beta$ -Chloroethyl-trimethylammonium-chloride-(Methyl- $^{14}\text{C}$ ) = CCC-(Methyl- $^{14}\text{C}$ ) and CCC-1,2- $^{14}\text{C}$  is described. The technique of labelling the  $\text{CH}_3$ -group is very simple compared with the known procedures. For labelling both of the  $\text{CH}_2$ -groups of CCC we used Ethylene-oxide-1,2- $^{14}\text{C}$  as starting material. In both cases the yield exceeded 90 %, also concerning the radioactivity. After the catalytical combustion to  $\text{CO}_2$ - $^{14}\text{C}$  the determination of activity was carried out in the proportional region in gas-counters. The purification of the two substances and the control of radiochemical purity is described.*

### ZUSAMMENFASSUNG

*Es wird die Herstellung von  $\beta$ -Chloräthyl-trimethylammonium-chlorid (Methyl- $^{14}\text{C}$ ) = CCC-(Methyl- $^{14}\text{C}$ ) und CCC-1,2- $^{14}\text{C}$  beschrieben. Das Verfahren zur Markierung der  $\text{CH}_3$ -Gruppe ist gegenüber bereits bekannten durch seine Einfachheit ausgezeichnet. Für die Markierung der beiden  $\text{CH}_2$ -Gruppen des CCC gingen wir von Äthylenoxyd-1,2- $^{14}\text{C}$  aus. Die Ausbeuten betragen in beiden Fällen, auch betreffend die eingesetzte Aktivität, über 90 %. Die Aktivitätsmessung wurde nach katalytischer Verbrennung zu  $\text{CO}_2$  in Gaszählrohren im Proportionalbereich ausgeführt. Es wird die Reinigung und Prüfung der radiochemischen Reinheit der erhaltenen Substanzen beschrieben.*

Bei Untersuchungen über die Wirkung von  $\beta$ -Chloräthyl-trimethylammonium-chlorid (= CCC) auf Getreide war es von Interesse, die sehr unterschiedliche Reaktion der einzelnen Arten und Sorten in Bezug auf Halm-

verkürzung und Standfestigkeitserhöhung in Abhängigkeit von der aufgenommenen CCC-Menge sowie von verschiedenen Faktoren der Applikation zu studieren. Im Zuge dieser Versuche wurde vergleichsweise sowohl in der  $\text{CH}_3$  — wie in der  $\text{C}_2\text{H}_4$ -Gruppe mit  $^{14}\text{C}$ -markiertes CCC eingesetzt.

Die Herstellung von  $^{14}\text{C}$ -markiertem CCC wird von *Lemmon und Ma*<sup>(1)</sup> beschrieben. Die Autoren gehen von in der  $\text{CH}_3$ -Gruppe markiertem Cholinchlorid aus und erhalten das CCC durch Umsetzung mit Thionylchlorid. Die Reaktion mit Thionylchlorid erfolgt leicht, praktisch quantitativ und ohne Bildung nicht oder schwierig entfernbare Verunreinigungen, so daß die Synthese von CCC aus in beliebiger Position markiertem Cholin der gegebene Weg ist.

Die Markierung von Cholin mit  $^{14}\text{C}$  kann in der Methylgruppe, in einer der beiden  $\text{CH}_2$  — oder in beiden  $\text{CH}_2$ -Gruppen erfolgen. Während die Markierung in der Methylgruppe häufig beschrieben wird, bestehen über die Markierung in der Äthylengruppe kaum Literaturangaben. Über die Herstellung von Cholinchlorid-(Methyl- $^{14}\text{C}$ ) berichten *Lemmon und Ma*<sup>(1)</sup>, *Ferger und du Vigneaud*<sup>(2)</sup>, *Winzler*<sup>(3)</sup>, *Christenson und Tolbert*<sup>(4)</sup>, *Roe und Mitchell*<sup>(5)</sup>. Die einzelnen Verfahren unterscheiden sich durch Verschiedenheit in den Reaktionsbedingungen und Apparaturen bei gleichem Reaktionsschema.

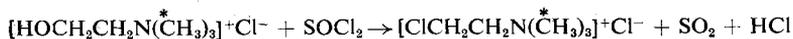
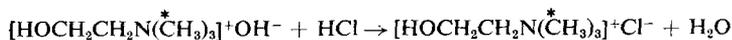
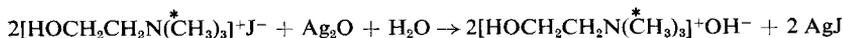
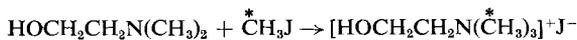
Die Synthese von Cholinchlorid-1,2- $^{14}\text{C}$  aus Acetylen-1,2- $^{14}\text{C}$  über Äthylen-1,2- $^{14}\text{C}$  und Äthylenbromhydrin-1,2- $^{14}\text{C}$  wird von *Walz, Fields und Gibbs*<sup>(6)</sup> beschrieben. *Arnstein*<sup>(7)</sup> referiert eine Synthese von Cholin- $^{14}\text{C}$ , bei der das Isotop nur in der dem Stickstoffatom benachbarten  $\text{CH}_2$ -Gruppe enthalten ist.

#### EXPERIMENTELLER TEIL.

In unserem Labor wurde einerseits in der  $\text{CH}_3$ -andererseits in der  $\text{C}_2\text{H}_4$ -Gruppe markiertes CCC hergestellt, beide Verbindungen mit Ausbeuten von etwa 95 %.

##### 1) $[\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\overset{*}{\text{C}}\text{H}_3)_3]^+\text{Cl}^-$

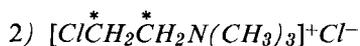
Bei der Markierung in der Methylgruppe gingen wir wie die anderen Autoren von 2-Dimethylaminoäthanol und  $\text{CH}_3\text{J}$ - $^{14}\text{C}$  aus.



Unsere Arbeitsweise war besonders einfach und lieferte bei hoher Reinheit sehr gute Ausbeuten. 15 mg  $\text{CH}_3\text{J-}^{14}\text{C}$  (spez. Akt. 33  $\mu\text{C}/\text{mg}$ ), d.s. 3 % der erforderlichen Gesamtmenge, werden in der Spitze der Glasampulle, in der das Methyljodid geliefert wurde, mit Hilfe von flüssigem Stickstoff ausgefroren. Nach öffnen der Ampulle werden 310 mg (3,84 mMol) auf  $-20^\circ\text{C}$  gekühltes 2-Dimethylaminoäthanol zugesetzt, die Luft aus der Ampulle durch trockenen Stickstoff verdrängt und langsam von  $-195^\circ\text{C}$  auf  $-20^\circ\text{C}$  erwärmt. Dabei schmelzen die zunächst getrennt ausgefrorenen Reaktionspartner und werden mit einem ca. 1 mm dünnen Glasstäbchen, das dann in der Ampulle verbleibt, vorsichtig gemischt; die Ampulle wird verschlossen und 30 Minuten auf  $-10^\circ\text{C}$  gehalten. Dann wird ein Überschuß von inaktivem Methyljodid (2 g) in 2 ml Methanol unter fortwährender Kühlung zugegeben und das Reaktionsgemisch im Dunkeln unter Verschuß 12 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach Abdestillieren von Methyljodid und Methanol wird das Cholinjodid-(Methyl- $^{14}\text{C}$ ) in 20 ml Wasser gelöst und bei  $0^\circ$  mit 1 g  $\text{Ag}_2\text{O}$  gerührt, bis die Lösung  $\text{J}^-$  — frei ist. Wir beobachteten, daß bei Erhöhung der Temperatur, sei es auch nur auf Raumtemperatur, mitunter schwierig abtrennbare aktive Verunreinigungen entstehen. Nach dem Zentrifugieren von  $\text{Ag}_2\text{O}$  und  $\text{AgJ}$  wird die Lösung mit  $\text{HCl}$  auf pH 3 gebracht.

Das Wasser wird im Vakuum abdestilliert und das praktisch farblose Cholinchlorid-(Methyl- $^{14}\text{C}$ ) mit  $\text{SOCl}_2$  in Benzol chloriert. Das erhaltene  $\text{CCC}$ -(Methyl- $^{14}\text{C}$ ) wird aus Äthanol und wenig Aceton umkristallisiert. Die Ausbeute an chromatographisch reinem  $\text{CCC}$ -(Methyl- $^{14}\text{C}$ ) beträgt 520 mg, d.s. 94 % der Theorie bezogen auf 2-Dimethylaminoäthanol; die Gesamtaktivität ist 450  $\mu\text{C}$ . Die restliche Aktivität war in dem aus den Mutterlaugen kristallisierten Rückstand enthalten.

Die Aktivitätsmessung erfolgte nach katalytischer Verbrennung des  $\text{CCC}$ -(Methyl- $^{14}\text{C}$ ) bei  $650^\circ$  durch ein Gemisch von  $\text{CuO}$ ,  $\text{V}_2\text{O}_5$  und  $\text{KClO}_4$  in Form von  $\text{CO}_2$ - $^{14}\text{C}$  im Proportionalbereich in Gaszählrohren FZ35P der Fa. Prof. Dr. Berthold, Wildbad (DBR) in Verbindung mit dem Zählgerät FH 90A der Fa. Frieseke und Höpfner. Wir wählten den Weg der katalytischen Verbrennung, da nasse Verbrennung von Cholin nach Van Slyke oft zu niedrige  $\text{CO}_2$ -Werte infolge unvollständiger Verbrennung des Kohlenstoffes der  $\text{CH}_3$ -Gruppen liefert (vgl. Van Slyke und Ma <sup>(8)</sup>, Arnstein <sup>(9)</sup>, Gabourel und Ma <sup>(10)</sup>).



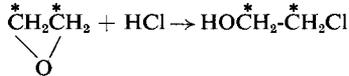
Für die Synthese von  $\text{CCC}$ , welches die Markierung in beiden  $\text{CH}_2$ -Gruppen trägt, wählten wir als Ausgangsmaterial Äthylenoxyd-1,2- $^{14}\text{C}$ .

Zunächst prüften wir mit inaktiven Verbindungen die Brauchbarkeit einiger in der Literatur beschriebener Herstellungsverfahren auf Basis Äthylenoxyd (Meyer und Hopf <sup>(11)</sup>, Le Heux <sup>(12)</sup>, Renshaw <sup>(13)</sup>). Beim Arbeiten nach Meyer und Hopf <sup>(11)</sup> erhielten wir chromatographisch reines  $\text{CCC}$  in

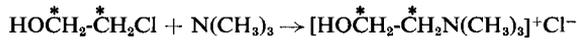
einer Ausbeute von ca. 50 % bezogen auf Äthylenoxyd, wogegen wir beim Verfahren nach Le Heux <sup>(12)</sup> — das Äthylenchlorhydrin stellten wir in der später beschriebenen Apparatur aus dem Äthylenoxyd selbst her — eine Ausbeute von 95 % erzielen, sofern wir die Reaktionspartner Äthylenoxyd und HCl in äquivalenten Mengen einsetzten. Wir arbeiteten also in Anlehnung an diese letztgenannte Methode.

Unser Herstellungsverfahren umfaßt folgende Stufen :

Reaktion des Äthylenoxyd-1,2- $^{14}\text{C}$  mit HCl zu Äthylenchlorhydrin-1,2- $^{14}\text{C}$



Umsetzung von Äthylenchlorhydrin-1,2- $^{14}\text{C}$  mit Trimethylamin zu Cholinchlorid-1,2- $^{14}\text{C}$

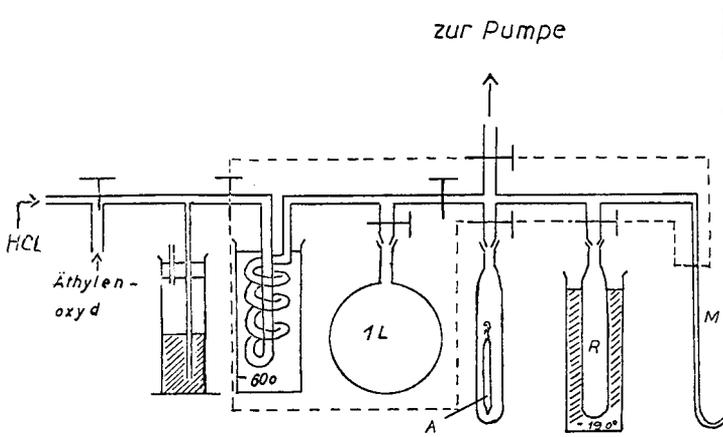


Chlorierung des Cholinchlorid-1,2- $^{14}\text{C}$  zu CCC-1,2- $^{14}\text{C}$ .



Es wurden eingesetzt :

20 mMol Äthylenoxyd, davon 38,1 mg 1,2-Äthylenoxyd mit 1 mC  $^{14}\text{C}$  (Commissariat à l'Énergie Atomique, France)



A = Ampulle mit Äthylenoxyd -  $^{14}\text{C}$

R = Reaktionsgefäß

M = Manometer

Abb. 1

20 mMol Salzsäure, gasförmig  
 22 mMol Trimethylamin  
 ein Überschuß  $\text{SOCl}_2$ .

1) Die Apparatur (*Abb. 1*) wird auf  $10^{-3}$  Torr evakuiert. Das Äthylenoxyd-1,2- $^{14}\text{C}$  (38,1 mg mit 1,0 mC  $^{14}\text{C}$ ) wird nach Aufschlagen der Ampulle (A) in das mit flüssigem Stickstoff gekühlte Reaktionsgefäß (R) überführt. In den gekennzeichneten Teil der Apparatur, dessen wesentlicher Teil ein 1 l Rundkolben zur Aufnahme der erforderlichen Gasmengen ist, werden nun 20 mMol Äthylenoxyd (Reinheitsgrad 98 %, Rest Äthylen und Wasser), unter den gegebenen Verhältnissen entsprechend 254 Torr, eingelassen, in Raten in das gekühlte Reaktionsgefäß überführt und dort mit dem aktiven Äthylenoxyd gemischt.

2) Mittels des 3-Weghahnes wird auf die Apparatur zur Erzeugung gasförmiger Salzsäure umgeschaltet. In den gekennzeichneten Teil der Apparatur werden 20 mMol HCl eingelassen und in Raten in das gekühlte Reaktionsgefäß überführt. Spuren Wasser, die sich in der Salzsäure befinden, werden in der auf  $-60^\circ\text{C}$  gekühlten Spirale (Sp) entfernt.

Äthylenoxyd und Salzsäure befinden sich nun in äquivalenten Mengen in getrennt ausgefrorenen Schichten im Reaktionsgefäß.

Noch unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff wird dieses mit trockenem gasförmigen Stickstoff auf Atmosphärendruck aufgefüllt und dann abgeschmolzen. Die Kühlung wird im Laufe einer Stunde allmählich entfernt. Der Inhalt des Reaktionsgefäßes stellt nach Erreichen von Raumtemperatur eine homogene Flüssigkeit dar. Das Reaktionsgefäß wird 15 Minuten geschüttelt und dann 15 Stunden bei Raumtemperatur belassen.

3) Das Gefäß mit dem gebildeten Äthylenchlorhydrin-1,2- $^{14}\text{C}$  wird nun wieder mit flüssigem Stickstoff gekühlt, geöffnet, 5 ml abs. Äthanol und hernach 1,3 g (10 % Überschuß) wasserfreies Trimethylamin zugesetzt. Das Reaktionsgefäß wird wieder zugeschmolzen und die Reaktionspartner 24 Stunden bei  $100^\circ\text{C}$  reagieren gelassen.

Nach Beendigung der Reaktion wird die Lösung in ein Schliffkölbchen gespült. Die Menge des nach dem Abdestillieren des Äthanol zurückbleibenden praktisch farblosen Cholinchlorids-1,2- $^{14}\text{C}$  beträgt 2,71 g, d.s. 97 % der Theorie.

4) Nun wird das Cholinchlorid-1,2- $^{14}\text{C}$  auf die übliche Weise mit Thionylchlorid chloriert.

Die Ausbeute an rohem CCC-1,2- $^{14}\text{C}$  beträgt 3,16 g, d.s. 97 % der Theorie.

Nach dem Unkristallisieren aus Alkohol und wenig Aceton ist das CCC-1,2- $^{14}\text{C}$  chromatographisch rein, die Ausbeute beträgt 2,85 g, d.s. 93 % der Theorie. Die Gesamtaktivität beträgt 910  $\mu\text{C}$ . Die Aktivitätsmessung wurde wie im Falle des CCC-(Methyl- $^{14}\text{C}$ ) durchgeführt.

Die Reinheitsprüfung des CCC erfolgte mittels Papier- und DS-Chromatographie und anschließender Aktivitätsmessung bzw. Autoradiographie.

Für die Papierchromatographie verwendeten wir Whatman-I-Papier, getränkt mit 0,2 % Natrium-Acetat-Lösung. Bei der DS-Chromatographie wurde als Sorptionsmittel Cellulosepulver MN 300 (ohne Gipszusatz) der Fa. Macherey, Nagel und Co, Düren, verwendet. Als Fließmittel bewährte sich in beiden Fällen n-Butanol-Eisessig-Wasser-Alkohol 8 : 1 : 3 : 2. Der Nachweis wurde mit Dragendorff-Reagens in der Modifikation nach Thies und Reuther<sup>(14)</sup> sowie mit Chargaffs Reagens (Phosphormolybdänsäure und  $\text{SnCl}_2$ ) geführt. Bezüglich der Chromatographie von CCC vergleiche auch Bayzer<sup>(15)</sup>. Die Chromatographie von je 300  $\mu\text{g}$  des  $\text{CH}_3$  — wie des  $\text{CH}_2\text{CH}_2$ - $^{14}\text{C}$  markierten CCC auf Papier bzw. von 15  $\mu\text{g}$  auf der DS-Platte ergab mit beiden Nachweisreagentien völlige Einheitlichkeit der Substanz. Die Autoradiographie mittels Kodirex-Röntgenfilm (Expositionsdauer 3 Wochen) wie auch im Falle der Papierchromatographie die Messung der Aktivität mittels des Radiopapierchromatographen 452 in Verbindung mit dem Methandurchflußzählrohr 407 der Fa. Frieseke und Höpfner bewies die radiochemische Reinheit des hergestellten CCC. In den Mutterlaugen hingegen konnte sowohl beim CCC-(Methyl- $^{14}\text{C}$ ) wie beim CCC-1,2- $^{14}\text{C}$  eine geringe Menge aktives Cholin nachgewiesen werden, wie auch eine Substanz mit größerem RF-Wert als CCC, die ebenfalls mit Dragendorff- und Chargaffs- Reagens reagiert, die wir jedoch nicht weiter untersuchten.

## LITERATURVERZEICHNIS

1. LEMMON, R. M., PARSONS, M. A. and CHIN, D. M. — *J. Am. Chem. Soc.*, 77/4139 (1955).
2. FERGER, M. F. und DU VIGNEAUD, V. — *J. Biol. Chem.*, 185/53 (1950).
3. WINZLER, R. J. — *Nucleonics*, 7(4) 56 (1950).
4. CHRISTENSON, F. und TOLBERT, B. M. — *Nuclear Science Abstracts* 3, 1199 (1949), AECU-373 (Juli 1949), Report 962 unclassified.
5. ROE, A. und MITCHELL, J. E. — *Sci. Soc.*, 67/54 (1951).
6. WALZ, D., FIELDS, M. und GIBBS, J. A. — *J. Am. Chem. Soc.*, 73 : 2968.
7. ARNSTEIN, H. R. V. — *Biochem. J.*, 48 : 27 (1951).
8. VAN SLYKE, D. D., FOLCH, J. und MA. — *J. Biol. Chem.*, 136 (1940) 509.
9. ARNSTEIN, H. R. V. — *J. Chem. Soc.* (1952) 4527.
10. GABOUREL, J. D., BAKER, M. J. und KOCH, C. W. — *Analyt. Chem.*, 23 (1958) 1974.
11. MEYER, K. H. und HOPF, H. — *B.*, 54 : 2279 (1921).
12. LE HEUX. — *Ar.*, 1924, 570.
13. RENSCHAW, R. — *J. Am. Chem. Soc.*, 32 : 128 (1910).
14. THIES, H. und REUTHER, F. W. — *Naturw.*, 41 : 230 (1954).
15. BAYZER, H. — *Experientia*, 20 : 233 (1964).