

Spezifische ^{15}N -Markierung von Creatinin

R. Medina und H.-L. Schmidt

Lehrstuhl für Allgemeine Chemie und Biochemie
der Technischen Universität München

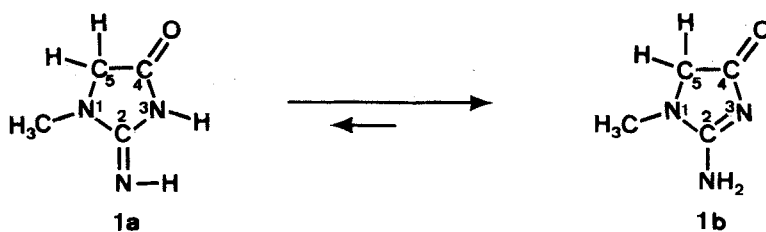
D 8050 Freising-Weihenstephan

Received on March 31, 1976

Summary: By reaction of 1-methyl-2-methylthio-2-imidazoline-4-on-hydroiodide (2) with ammonia- ^{15}N , creatinine- $^{15}\text{NH}_2$ is synthesised in a one step reaction giving an 80% yield on the mmol scale. The specificity of labelling in the amino group is proved by enzymatic hydrolysis and examination of the reaction products by mass spectrometry.

Die Konzentration von Creatinin im Serum ist ein wichtiges

Indiz für die Nierenfunktion; bei Niereninsuffizienz ist der Creatininspiegel stark erhöht. In unsere Untersuchungen über das Diffusionsverhalten von Seruminhaltstoffen während der Klinischen Blutdialyse [1] sollte daher auch Creatinin eingeschlossen werden. Als Voraussetzung für die Durchführung einer spezifischen und empfindlichen Traceruntersuchung mußte die Substanz in der Aminogruppe mit ^{15}N markiert werden.

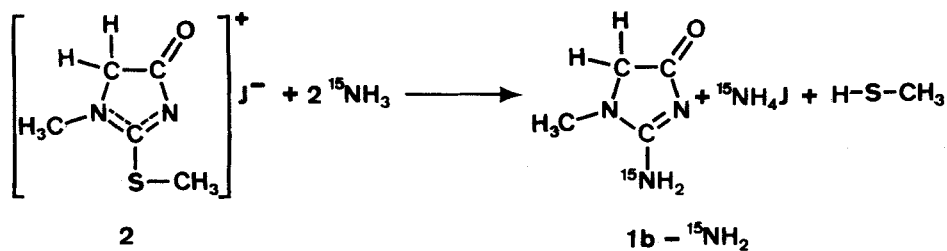


Creatinin = 1-Methyl-2-amino-2-imidazolin-4-on

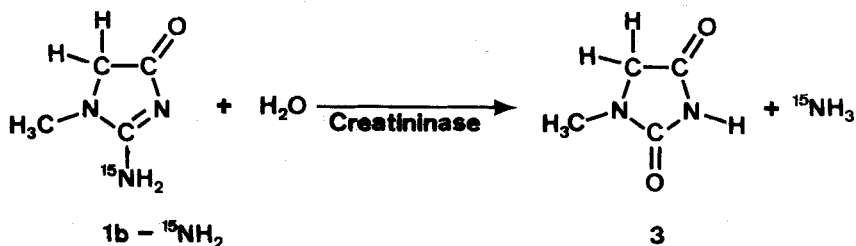
Durch Umsetzung von Sarkosin (N-Methylglycin) mit Cyanamid ist über Creatin (N-Methylguanidoessigsäure) ^{15}N -markiertes Creatinin zugänglich [2, 3]. Eine spezifische Markierung der Aminogruppe gelingt jedoch nicht nach diesem Verfahren; zu entsprechenden Ergebnissen würde auch die Umsetzung von Sarkosin mit Thioharnstoff [4] führen. Beide Synthesen würden außerdem über mehrere Stufen verlaufen. Möglichkeiten zur Einstufen-Synthese von Creatinin- $[\text{}^{15}\text{NH}_2]$ wurden in der Umsetzung von N-Methylglycinamid mit Bromcyan [5] oder in der Substitution des Schwefelatoms von 1-Methylthiohydantoin durch eine N-H-Gruppe gesehen.

Rowley et al. [6] sowie Kenyon und Rowley [7] stellten zur Synthese von Creatin- und Creatininderivaten 1-Methylthiohydantoin durch Umsetzung von Sarkosin mit Ammoniumrhodanid dar. Die durch Hydrolyse daraus zugängliche 3-Methyl-4-thiohydantoinensäure reagiert mit Methyljodid zu N-Carboxymethyl-N-methyl-S-methylisothiuroniumjodid; bei dieser Reaktion bildet sich als Nebenprodukt in ca. 15 % Ausbeute 1-Methyl-2-methylthio-2-imidazolin-4-on-hydrojodid (2).

Diese Verbindung diente uns als Ausgangsprodukt für die einstufige Markierung von Creatinin in der Aminogruppe. Die Substanz wurde im Bombenrohr in äthanolischer Lösung bei 20°C mit einem Überschuß von $^{15}\text{NH}_3$ zur Reaktion gebracht. Das in der NH_2 -Gruppe markierte Creatinin wurde im mMol-Bereich in 80-proz. Ausbeute erhalten.



Das Massenspektrum des Creatinin- $[^{15}\text{NH}_2]$ entsprach vollständig dem von authentischer Vergleichssubstanz; der Molekülpeak und die Massenpeaks einiger Fragmente waren lediglich um eine Masseneinheit verschoben. Durch Hydrolyse des Produktes mit Creatininase wurde N-Methylhydantoin (3) erhalten, dessen Massenspektrum identisch mit dem von Vergleichssubstanz war; das bei dieser Hydrolyse entstandene $^{15}\text{NH}_3$ hatte die gleiche Isotopenhäufigkeit wie das zur Synthese eingesetzte. Die spezifische Markierung von Creatinin in der NH_2 -Gruppe war damit nachgewiesen.



Arbeitsvorschrift

a) Synthese von Creatinin- $[^{15}\text{NH}_2]$.

Auf die Lösung von 2 mMol (544 mg) 1-Methyl-2-methylthio-2-imidazol-4-on-hydrojodid [7] in 4 ml abs. Äthanol in einem Bombenrohr (10 x 2.8 cm) wurden 8 mMol (144 mg) $^{15}\text{NH}_3$ kondensiert. Das Gas war in einer Vakuumapparatur [8] aus 8 mMol (436 mg) $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ (95 Atom-% ^{15}N , Rohstoff-Einfuhr GmbH, Düsseldorf) mit 2 ml N-Oxaäthylenpropandiamin (Chemische Werke Hüls, Marl) freigesetzt worden. Das Gemisch wurde 12 h bei 20° C gehalten; das dann auskristallisierte Creatinin wurde abfiltriert, mit 1 ml abs. Äthanol gewaschen und dann getrocknet. Mit einem Nachkristallisat aus der Mutterlauge wurden 181 mg (80 % d. Th.) des Produktes erhalten. Schmp. 258° C

(Lit. [9] 260° C). Das IR-Spektrum der Substanz stimmte mit dem von Vergleichssubstanz überein.

b) Enzymatische Hydrolyse der markierten Substanz und Isotopenanalyse der Hydrolysenprodukte

5 mg Creatinin- $[^{15}\text{NH}_2]$ wurden in 1.25 ml H_2O gelöst. Die Lösung wurde mit 1.25 ml einer Lösung von ca. 1.5 U Creatininase (EC 3.5.4.21, Beckman Instruments, Intern. Bioproducts / Microbics Depts. Genf) versetzt und bei pH 8.5 und 37° C 1 h inkubiert. Der Fortgang der Hydrolyse wurde durch die Creatinin-Bestimmung mit Pikrinsäure [10] kontrolliert; nach der angegebenen Zeit waren 95 % des Produktes umgesetzt.

Das $^{15}\text{NH}_3$ wurde durch einen Luftstrom aus der Lösung ausgetrieben und in verd. HCl aufgefangen. Das $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ wurde nach dem Verfahren von Rolle [11] in einem Bombenrohr mit CuO und CaO zu $^{15}\text{N}_2$ oxidiert, dessen Isotopengehalt massenspektrometrisch bestimmt wurde (95 Atom-% ^{15}N). Die Inkubationslösung wurde ultrafiltriert (Diaflo Ultrafiltrationsmembran Typ UM 2 der Firma Amicon, Witten) und das Filtrat lyophilisiert. Den Rückstand nahm man in 1 ml Chloroform auf, trug diese Lösung auf eine Dünnschichtplatte (Kieselgel 60 der Firma Merck, Darmstadt) auf und chromatographierte mit dem Fließmittel Butanol / Pyridin / Wasser (2:2:1) [12]. Die 1-Methylhydantoin-Zone (lokalisiert mit Jaffes Reagens [13]) wurde mit Chloroform extrahiert, das Lösungsmittel abgedampft und der Rückstand massenspektrometrisch analysiert.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für eine Sachbeihilfe.

1. Schmidt, H.-L., Kirch, P., Traut, G. u. Keller, H.-E.,
Proceedings of the Second International Conference on
Stable Isotopes, Oak Brook/Ill., in press.
2. Bloch, K. u. Schoenheimer, R., J. Biol. Chem. 131, 116
(1939).
3. Bloch, K., Schoenheimer, R. u. Rittenberg, D., J. Biol.
Chem. 138, 162 (1941).
4. Brad, E. u. Brand, F. C., Organic Syntheses, 3. Aufl.
Vol. 22, John Wiley and Sons, Inc., New York, Chapman and
Hall, Ltd., London 1948, S. 59.
5. Pierron, P., Ann. Chim. 11, 361 (1919).
6. Rowley, G. L., Greenleaf, A. L. u. Kenyon, G. L., J. Amer.
Chem. Soc. 93, 5542 (1971).
7. Kenyon, G. L. u. Rowley, G. L., J. Amer. Chem. Soc. 93,
5552 (1971).
8. Dauben, W. G., Reid, I. C. u. Yankwich, P. E., Anal. Chem.
19, 828 (1947), s. auch Murray III, M. u. Williams, D. L.,
Organic Syntheses with Isotopes, Vol. I, Interscience
Publ., New York, (1958), S. 87.
9. Harris, G., Pollock, J. R. A. u. Stevens, R., Dictionary
of Organic Compounds, 4. Aufl. Vol. II, Eyre and
Spottiswoode Publishers Ltd., London 1965, S. 750.
10. McLean, M. H., Gallwas, J. u. Hendrixson, M., Clin. Chem.
19, 623 (1973), s. auch Beckman Microbics Operations,
Produkt information sheet, bulletin 6906.
11. Rolle, W., Kernenergie 5, 403 (1962).
12. Szulmajster, J., J. Bact. 75, 633 (1958).
13. Stahl, E., Dünnschichtchromatographie, 2. Aufl., Springer,
Berlin, Heidelberg, New York 1967, S. 846.