

SYNTHESE VON TRINATRIUM-PHOSPHONO/ ^{14}C /FORMIAT

K. Issleib, M. Bubner⁺ und A. Balszuweit^{*}

Sektion Chemie der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg
DDR-4020 Halle/Saale, Weinbergweg 16

⁺ Zentralinstitut für Kernforschung Rossendorf
DDR-8051 Dresden, PF 19

^{*} Pädagogische Hochschule "Lieselotte Herrmann"
Sektion Biologie/Chemie
DDR-26 Güstrow, Goldberger Str. 12

SUMMARY

Trisodiumphosphono/ ^{14}C /formate (TPF) has been prepared in high chemical and radiochemical purity by carboxylation of sodium-di-n-butylphosphite with $^{14}\text{CO}_2$, subsequent alkylation with dimethylsulfate to di-n-butylphosphonomethyl/ ^{14}C /formate and dealkylation of the latter with aid of trimethylbromosilane and alkaline hydrolysis.

Whereas in trisodiumphosphono/ ^{14}C /formate the radioactive carbon has been observed to be stable in its position, the ^{14}C in sodium-di-n-butyl-phosphono/ ^{14}C /formate may be quantitatively exchanged with CO_2 .

key words: ^{14}C , trisodiumphosphonoformate, synthesis, isotope exchange.

ZUSAMMENFASSUNG

Trinatrium-phosphono/ ^{14}C /formiat (TPF) von hoher chemischer und radiochemischer Reinheit wurde hergestellt durch Carboxylierung von Natrium-di-n-butylphosphit mit $^{14}\text{CO}_2$, nachfolgende Alkylierung mit Dimethylsulfat zu Di-n-butyl-phosphono/ ^{14}C /ameisensäuremethylester und dessen Dealkylierung mit Trimethylbromsilan und alkalische Hydrolyse.

Während für ^{14}C im Trinatrium-phosphono/ ^{14}C /formiat stabile Bindung beobachtet wird, ist der Kohlenstoff im Natrium-di-n-butyl-phosphono/ ^{14}C /formiat mit CO_2 quantitativ austauschbar.

Einleitung

Trinatrium-phosphonoformiat, TPF, (1) ist bekannt als Inhibitor virusspezifischer Enzyme, insbesondere der DNS-Polymerasen von Herpesviren (1,2). Die Synthese des ^{14}C -markierten TPF (1*) ist im Rahmen pharmakologischer Untersuchungen (3) von besonderem Interesse.

Die Adaption der für die Herstellung des unmarkierten TPF üblichen Verfahren (4,5,6), ausgehend von Chlorameisensäureestern, ist wegen der notwendigen Synthese von Chlor/ ^{14}C /ameisensäureestern wenig geeignet. Neuere Untersuchungen zur Reaktivität von Alkali-dialkylphosphiten bieten die Möglichkeit, TPF unter direkter Verwendung von CO_2 herzustellen (7,8).

Ergebnisse und Diskussionen

Durch direkte Carboxylierung von Natrium-di-n-butylphosphit (2) wird mit $^{14}\text{CO}_2$ Natrium-di-n-butyl-phosphono/ ^{14}C /formiat (3*) erhalten. Die Verbindung 3 ist, wie auch andere Dialkylphosphonoformiate, nicht direkt zu 1 hydrolysierbar oder mittels Trimethylbromsilan entalkylierbar (8), weil diese Reaktionen unter CO_2 -Eliminierung und Rückbildung des 3wertigen Phosphors verlaufen. Wie aus dem Reaktionsschema I ersichtlich ist, bieten allein die alkalische Hydrolyse in geringer Ausbeute und die Alkylierung der Verbindung 3* zum Di-n-butyl-phosphono/ ^{14}C /ameisensäuremethylester (4*) die Möglichkeit der Synthese stabiler Phosphonoformiate. Als Nebenreaktion der Umsetzung mit Dimethylsulfat ist, wie bei der Verwendung von Alkylhalogeniden (8), CO_2 -Eliminierung zu beobachten.

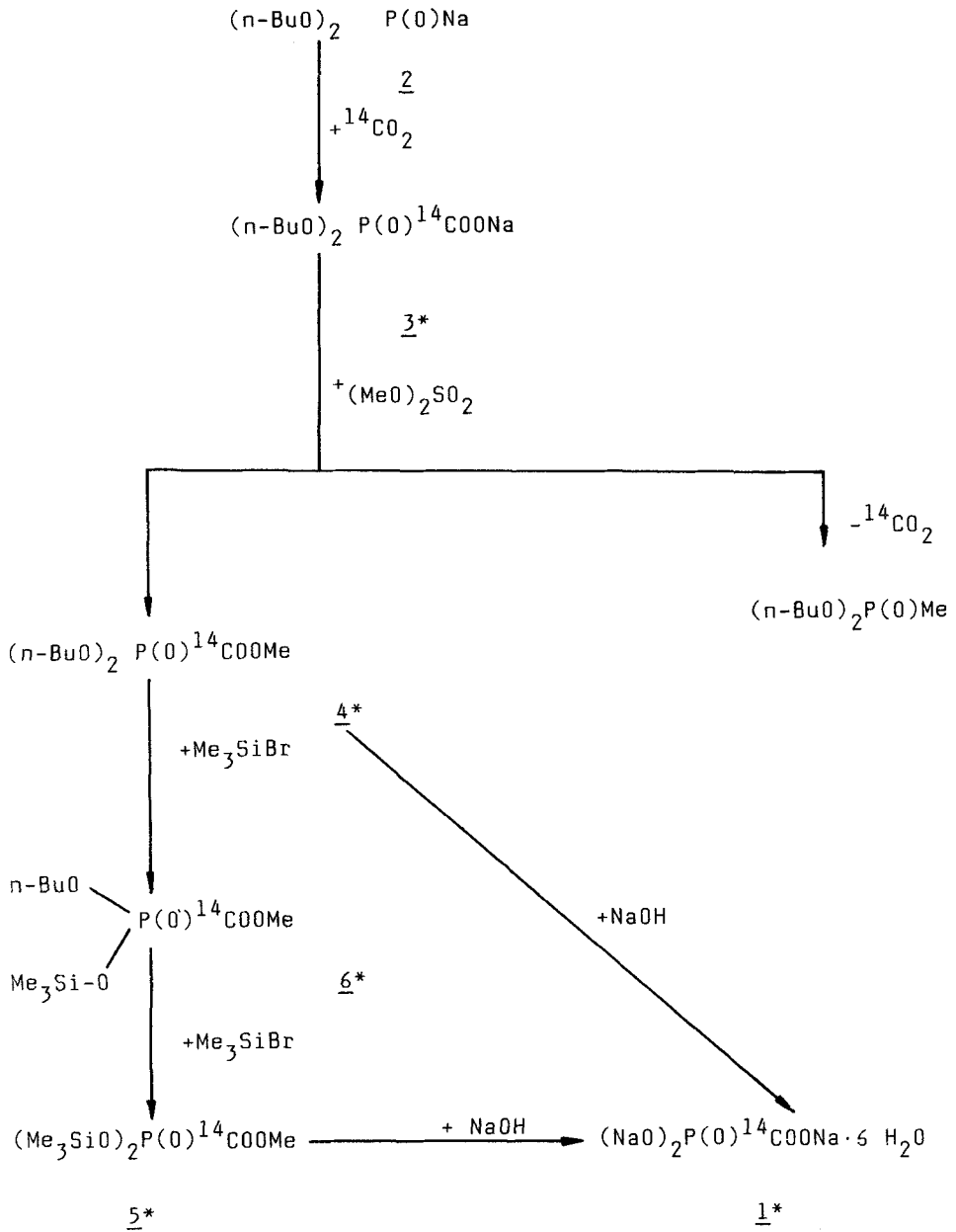
Das entstehende $^{14}\text{CO}_2$ kann quantitativ zurückgewonnen werden. Die Entalkylierung von $\underline{4}^*$ zu Bis(trimethylsilyl)-phosphono/ ^{14}C /ameisensäuremethylester ($\underline{5}^*$) erfolgt über die Stufe des n-Butyl-trimethylsilyl-phosphono/ ^{14}C /ameisensäuremethylesters ($\underline{6}^*$). Die quantitative Reaktion von $\underline{4}^*$ mit Trimethylbromsilan (9,10) kann dünn-schicht-chromatographisch kontrolliert werden. Die alkalische Hydrolyse von $\underline{5}^*$ zu $\underline{1}^*$ verläuft ebenfalls quantitativ. Die Synthese von $\underline{1}^*$ erfolgt über alle Stufen ohne Isolierung der Zwischenprodukte in einer Ausbeute von 50 - 60 %, bezogen auf $^{14}\text{CO}_2$, wobei lediglich die Alkylierung die angegebenen Verluste zur Folge hat.

Durch Behandlung der Zwischenprodukte mit CO_2 konnte gezeigt werden, daß unter den angewandten Reaktionsbedingungen der Formiat-Kohlenstoff in $\underline{3}^*$ mit CO_2 austauschbar ist. Quantitativer Isotopenaustausch im geschlossenen System wurde sowohl bei der Behandlung von $\underline{3}$ mit $^{14}\text{CO}_2$ als auch von $\underline{3}^*$ mit CO_2 erreicht, während mit allen anderen Zwischenprodukten ($\underline{4}^*$, $\underline{5}^*$) und dem Endprodukt ($\underline{1}^*$) unter den gegebenen Reaktionsbedingungen mit CO_2 kein Isotopenaustausch stattfindet. Daraus folgt, daß eine Nachbehandlung mit inaktivem CO_2 bei der Carboxylierung von $\underline{2}$, wegen der Erniedrigung der spezifischen Aktivität, nicht sinnvoll ist. Die für pharmakologische Untersuchungen wichtige Stabilität des $\underline{1}$ in neutraler und alkalischer Lösung in Gegenwart von CO_2 ist als ausreichend anzusehen.

Experimenteller Teil

Die Radioaktivität wäßriger Lösungen von TPF ($\underline{1}^*$) und Lösungen von $^{14}\text{CO}_2$ in Ethanolamin-Alkohol wurde durch Flüssigszintillationsmessungen mit dem Gerät Tri-Carb B-2450 der Firma Packard ermittelt.

$\underline{1}^* \dots \underline{6}^* = ^{14}\text{C}$ -markierte Verbindung



Reaktionsschema I

Die radiochemische Reinheit der Zwischenprodukte wurde mittels dünnschichtchromatographischer Analyse an Silufol^(R) UV 254 mit den Systemen: Dioxan-Butanol-NH₃ = 65-20-30, und Benzen-Essigsäuremethylester-Essigsäure = 90-10-1 durch radiometrische Aus-

wertung der Chromatogramme kontrolliert.

Die chemische Reinheit von 1 wurde ³¹P-NMR-spektroskopisch mit dem Gerät WP 200 der Firma Bruker ermittelt.

1. Natrium-di-n-butylphosphit (11) (2)

In einem 250 ml Dreihalskolben, versehen mit Rückflußkühler, Rührer und Thermometer, werden unter Argon 19,4 g (0,1 mol) Di-n-butylphosphit in 75 ml absolutem Toluol mit 2,3 bis 2,4 g Natrium umgesetzt. Die Reaktion verläuft nur anfangs hinreichend exotherm. Unter ständigem Rühren erwärmt man auf 60 - 70 °C bis zur möglichst vollständigen Auflösung des Natriums (10 - 12 h). Die resultierende klare Lösung von 2 wird nach Entfernen des überschüssigen Natriums quantitativ in ein Schlenkgefäß überführt und mit abs. Toluol auf 100 ml aufgefüllt. Die Lösung ist unter Argon haltbar.

2. Natrium-di-n-butyl-phosphono/¹⁴C/formiat (3*)

2 ml der unter 1 bereiteten Lösung von 2 werden unter Argon in einer Vakuumapparatur (12) mit 2 mmol ¹⁴CO₂ (2000 MBq) bei 20 °C umgesetzt. Die Reaktion verläuft unter ständigem Rühren innerhalb von 2 h quantitativ. (n-BuO)₂P(O)¹⁴COONa wird nicht isoliert.

3. Di-n-butyl-phosphono/¹⁴C/ameisensäuremethylester (4*)

Die resultierende Lösung von 3* wird mit 2 ml einer 1,1 molaren Lösung von Dimethylsulfat in Toluol überschichtet, bei 25 °C im geschlossenen System 2 h intensiv gerührt und danach 2 Tage bei Zimmertemperatur stehengelassen. Das teilweise eliminierte ¹⁴CO₂ wird unter Kühlung des Reaktionsgemisches auf -80 °C in einer auf -180 °C gekühlten Vorlage kondensiert, (0,5 - 0,8 mmol). Die abgeschiedenen Salze werden durch Zentrifugieren isoliert und noch zweimal mit je 1 ml Toluol gewaschen. Die vereinigten Lösungen von 4* werden ohne Aufarbeitung weiter umgesetzt.

4. Bis(trimethylsilyl)-phosphono/¹⁴C/ameisensäuremethylester (5*)

Die Toluolenlösung von 4* wird unter Argon mit 0,8 ml Trimethylbromsilan umgesetzt. Im geschlossenen System wird das Reaktionsgemisch 3 h bei 70 - 80 °C gerührt. Die flüchtigen Bestandteile (n-BuBr, Me₃SiBr, Toluol) entfernt man danach im Vakuum. Der Rückstand wird erneut in 2 ml Toluol aufgenommen. Die Vollständigkeit der Entalkylierung wird chromatographisch geprüft. Die Umsetzung ist bei Nachweis der Verbindung 6* zu wiederholen.

(Me₃SiO)₂P(O)¹⁴COOMe wird in Lösung weiter verwendet.

5. Trinatrium-phosphono/¹⁴C/formiat · 6 H₂O (1*)

Die erhaltene Lösung von 5* wird bei 20 °C unter Rühren mit 1,2 ml einer 6-n-NaOH-Lösung umgesetzt. Das inhomogene Gemisch wird anschließend bei 65 °C 1 h gerührt. 1* kristallisiert nach Abkühlung auf 0 °C weitgehend aus. Die Löslichkeit in Wasser beträgt etwa 50 mg/ml. Das Produkt wird abfiltriert, mit Toluol und Ether gewaschen und aus 1,5 ml Wasser umkristallisiert.

Nach der Trocknung im Vakuum erhält man 250 bis 300 mg 1*.

Aus den Mutterlaugen kann man nach Einengen und Umkristallisieren aus Wasser noch ca. 50 mg 1* gewinnen. Die chemische Reinheit des Produkts ist >95 %. Radiochemische Verunreinigungen wurden nicht nachgewiesen. ³¹P-NMR in D₂O: H₃PO₄ = 0; δ = + 0,9 ppm.

6. Isotopenaustausch von 1*, 3*, 4*, 5* mit CO₂

(n-BuO)₂P(O)¹⁴COONa (3*), Isotopenaustausch mit CO₂ (Beispiel)

Aus einer nach Punkt 2 hergestellten Lösung von 3* in Toluol werden in der Vakuumapparatur bei -80 °C Spuren von ¹⁴CO₂ entfernt. Anschließend kondensiert man im Reaktionsgefäß 2 mmol CO₂ und rührt im geschlossenen System (Volumen ca. 50 ml) das Gemisch 2 Tage bei 25 °C und läßt 2 weitere Tage stehen.

Bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ wird das CO_2 bzw. $^{14}\text{CO}_2$ aus dem Reaktionsgemisch in einem separaten Teil der Vakuumanlage ausgefroren. Die Menge des CO_2 ermittelt man aus dem Druckanstieg nach Erwärmen auf Raumtemperatur.

Die Radioaktivität des zurückgewonnenen $^{14}\text{CO}_2$ wird nach Absorption in einer 1 m Lösung von Ethanolamin in Alkohol durch Messung aliquoter Mengen dieser Lösung bestimmt.

Die spezifische und die Gesamtaktivität des Trinatrium-phosphono- ^{14}C /formiat erhält man nach Aufarbeitung des Reaktionsgemisches gemäß Punkt 3 bis 5 durch Messung eines aliquoten Teils des erhaltenen Produkts.

Analog werden Austauschversuche mit der unmarkierten Verbindung 3 und $^{14}\text{CO}_2$ durchgeführt. Der CO_2 -Austausch verläuft im geschlossenen System bis zum Gleichgewicht.

Die Verbindungen 4*, 5*, 1* tauschen unter den Versuchsbedingungen von 3. bis 5. kein CO_2 aus.

Literatur

1. Helgstrand, E.; Öberg, B.; in Proceedings of the 10th International Congress of chemotherapy Sept. 1977
Current Chemother. 1978, 329
2. Leinbach, S.S.; Reno, J.M.; Lee, L.F.; Issbell, A.F.; Boezi, J.A.; Biochemistry 15, 426 (1976)
3. Öberg, B.; Pharmac. Ther. 19, 387 (1983)
4. Nylen, P.; Chem. Ber. 57, 1023 (1924)
5. Helgstrand, E.; Johansson, N.G.; Misiorny, A.; Noren, J.O.; Stening, G.; Europa-Patent 3007 und 3275 (1979)
6. Issleib, K.; Koetz, J.; Balszuweit, A.; Lettau, H.; Thust, U.; Pallas, M.; DDR-Patentschrift 215 085 (1983)
7. Issleib, K.; Bubner, M.; Balszuweit A.; DDR-Patentanmeldung WP C07F/292501 (1986)
8. Issleib, K.; Bubner, M.; Balszuweit, A.; Z. anorg. allgem. Chem., im Druck

9. Mc Kenna, C.A.; Schmidhauser, J.; J. Chem. Soc. Chem. Comm. 1979, 739
10. Groß, H.; Böck, Chr.; Costisella, B.; Gloede, J.; J. prakt. Chem. 320, 344 (1978)
11. Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie Bd. 12/2, S. 38
12. Bubner, M., Schmidt, L.; Die Synthese Kohlenstoff-14-markierter organischer Verbindungen, VEB Georg Thieme, Leipzig 1966