سنتز اسيد آمينه لوسين نشاندار با تريتيوم [^{3}H]

حجت اله مطلوبي*، غلامحسين شيرواني، نادر صائميان
مركز تحقيقات هسته‌اي، سازمان انرژي اتمي ايران، صندوق پستي: ۳۴۸۶-۱۱۳۶۵، تهران – ايران

چكيده : تركيبات آلي نشاندار، تركيباتي هستند كه در ساختار مولكولي آنها راديوايزوتوپهايي هستند كه پرتوهاي راديوآكتيو گسيل مي‌دارند. اين تركيبات نقش مهمّي در تحقيقات ايفا مي‌كنند و در مقياس وسيعي مورد استفاده قرار مي گيرند و در بررسي چگونگي سوخت و ساز آنها در اعضاي بدن موجودات زنده اطلاعات گسترده‌اي در اختيار پژوهندگان قرار مي‌گيرد. در اين مقاله اسيد آمينه لوسين نشاندار شده با تريتيوم، براي تشخيص بيماري تالاسمي كه نخستين بار در ايران سنتز شده، مورد بحث قرار گرفته است. مسير سنتزي شامل واكنش تراكمي بين متيل آليل كلرايد و دي‌اتيل‌استاميدومالونات در محلول سديوم‌اتوكسايد در اتانول مي‌باشد. در مرحله بعدي تركيب حاصل با استفاده از كاتاليزگر آدامز و گاز تريتيوم در حلاّل كلروفرم احيا گرديد و محصول اتيل-۲-استاميدو-۲-كربتوكسي-۴-متيل‌پنتانوآت با راندمان ۱۰۰% توليد نمود. در انتها تركيب حاصل در اثر واكنش با اسيد هيدروبرميك ۴۸% مستقيماً به [۴و۵-تريتيوم] لوسين را با آكتيويته ويژه ۵ كوري بر ميلي مول تبديل گرديد.

واژه های كليدی: تريتيوم ، لوسين ، تالاسمی

Synthesis of the DL-[^{3}H] Leucine

H. Matloubi*, G. Shirvani, N. Saemian
Nuclear Research Center, AEOI, P.O. Box: 11365-3486, Tehran - Iran

Abstract: Labelled organic compounds have been widely applied to solve the research problems in life, science and chemistry. The preparation of labelled compounds, with carbon-14 and tritium-3 are probably more extensively and variously used in compare with any other isotopes. These isotopes emit only beta-particle. In this paper the synthesis of DL [^{3}H] Leucine which was prepared for the first time in Iran is described. This compound is used for diagnosis of talasemi disease. The synthetic pathway is achieved by using the condensation of methyl allyl chloride with diethyl acetamido malonate in the presence of sodium ethoxid in ethanol .In the next step of the synthesis, the latter compound was hydrogenated with $^3H_2$(g.) over the Adams catalyst in chloroform, which was produced ethyl 2-acetamido-2-carbetoxy -4-methyl pentanoate with a yield of 100%. In final step, the resulted product was converted directly to [4,5-^{3}H] Leucine with the specific activity 5 Ci/mmol, by reflaxing with the hydrobromic acid of 48%.

Keywords: ***tritium, leucine, talasemi, amino acids***

مقدمه :

ايزوتوپهاي راديواكتيو بعنوان رديا‌ب در چند دهه اخير به طور گسترده اي در مطالعه و بررسيهاي تحقيقاتي زيست شناختي، داروئي به كار مي روند و امروزه در بعضي از آزمايشگاههاي جهان اين مواد جزء نيازهای ضروري تحقيقاتي به شمار مي آيند. براي كاربرد اين

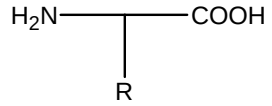
مواد كافي است كه تركيبات آلي را نشاندار نمود. در انتخاب راديوايزوتوپ مناسب براي نشاندار كردن تركيبات آلي چندين عامل بايد مورد توجه قرار گيرد كه از مهمترين آنها، مي توان به ساختار اين تركيبات، موارد استفاده آنها و مشكلات تهيه راديوايزوتوپها مورد نظر اشاره كرد. عوامل ديگري كه بايد در نظر گرفته شود عبارتند از: قابل دسترس بودن و نيمه عمر راديوايزوتوپ مورد نظر، پايداري مولكول و هزينه هاي سنتز مولكول نشاندار شده مي باشد. جدول شماره(۱) فهرست راديوايزوتوپهاي عناصري كه در سنتر تركيبات آلي بصورت ماده اوليه مورد استفاده قرار مي گيرد نشان داده شده است .[۲و۱]

RadioIsotope	Half-Life	Beta(%)	Gamma	Form supplied	Specific act. Or Conc.
^{3}H	12.26yr	β^{-}0.0176	None	Gas, carrier-free	2.95c./cc. At STP
^{11}C	20.4min	β^{+}0.968	None	-	-
^{14}C	5600yr	β^{-}0.1585	None	$BaCO_3$	1200-160mc/g.c
^{18}F	112min.	β^{+}0.65	None	Floride Soln	-
^{32}P	14.3d	β^{-}1.712	None	H_3PO_4 in HCl soln. H_3PO_3 in HCl soln	~40 c./g.p Carrier free
^{35}S	87.1d	β^{+}0.165	None	H_2SO_4 in HCl soln BaS in $Ba(OH)_2$ soln. S in benzen soln.	Carrier free >10000mc./g.s >1000mc./g.s

جدول شماره۱: راديوايزوتوپهای مورد استفاده در سنتز تركيبات آلی نشاندار

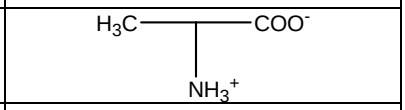
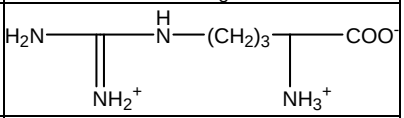
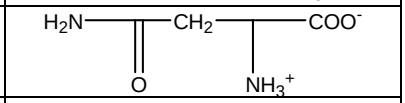
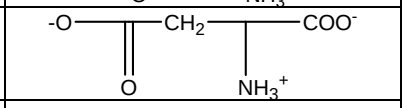
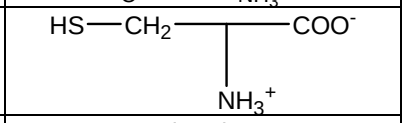
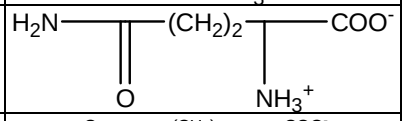
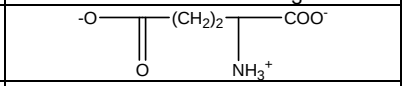
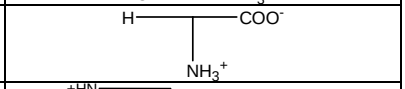
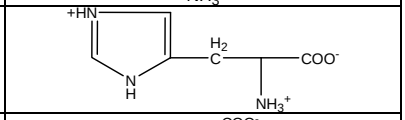
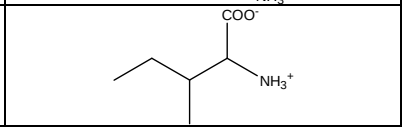
ساختار تركيبي اسيد آمينه :

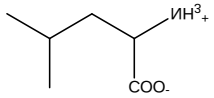
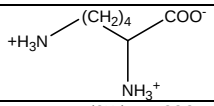
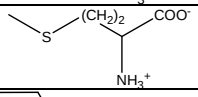
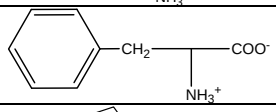
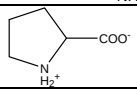
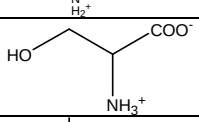
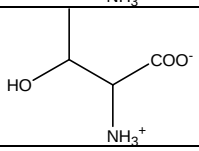
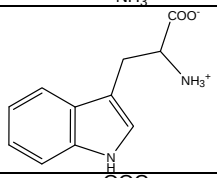
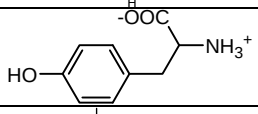
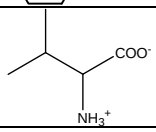
اسيدهاي آمينه در ساختار تركيبي زنجيره پلي پپتيدي شركت دارند و نقش اساسي در سنتز ماده حياتي پروتئين ها دارا مي باشند. فرمول كلي اسيدهاي آمينه بصورت زير است كه ريشه R مي تواند هيدروژن ويا يک زنجيره خطي يا حلقوي باشد.



در سنتز پروتئين ها، عامل كربوكسيل يک اسيد امينه و عامل آمين اسيد آمينه ديگر يک پيوند (آميدي) را ايجاد مي نمايد. اگر وزن مولكولي مجموعه اسيدهاي آمينه كه در تشكيل پيوندها شركت مي كنند كمتر از ۵۰۰۰ دالتون (وزن اتمي ئيدروژن مساوي با يک دالتون) باشد، اين مولكول را پپتيد و يا پلي پپتيد با يک زنجيره پلي پپتيدي مي نامند و چنانچه وزن مولكولي اسيدهاي آمينه از اين حد تجاوز كند، مي توان اين پلي پپتيد را پروتئين ناميد [۲].

تجربه نشان داده است كه اگر انواع اسيدهاي آمينه بصورت نشاندار شده به حيواني تزريق شود فقط بيست نوع اسيد آمينه در ساخت زنجيره هاي پلي پپتيدي شركت مي نمايند. جدول شماره (۲) اسيدهاي آمينه اساسي را كه در تشكيل زنجيره پلي پپتيدي در ساختار مولكول ماده حياتي پروتوئينها شركت دارند، نشان ميدهد.

Name	Three Letters	One Letters	Molecular Weight	Genetic code	Structure at neutral pH
Alanine	Ala	A	89.1	GC(N)	
Arginine	Arg	R	174.2	AGA AGG CG(N)	
Asparagine	Asn	N	132.1	AAU AAC	
Aspartic Acid	Asp	D	133.1	GAU GAC	
Cysteine	Cys	C	121.1	UGU UGC	
Glotamine	Glu	Q	146.1	CAA CAG	
Glotamic Acid	Glu	E	174.1	GAA GAG	
Glycine	Gly	G	75.1	GG(N)	
Histidine	His	H	155.2	CAU CAC	
Isoleucine	Ile	I	131.2	AUU AUC AUA	

Name	Three Letters	One Letters	Molecular Weight	Genetic code	Structure at neutral pH
Leucine	Leu	L	1310.2	UUA UUG CU(N)	
Lysine	Lys	K	146.2	AAA AAG	
Methionine	Met	M	149.2	AUG	
Phenylalanine	Phe	F	165.2	UUU UUC	
Proline	Pro	P	115.1	CC(N)	
Serine	Ser	S	105.1	AGU AGC	
Thronine	Thr	T	119.1	AC(N)	
Tryptophane	Trp	W	204.2	UGG	
Tyrosine	Tyr	Y	181.2	AUC UAC	
Valine	Val	V	117.1	GU(N)	

جدول شماره ۲: اسیدهای آمینه اساسی شرکت کننده در تشکیل زنجیره پلی پپتیدی ماده حیاتی پروتئینها

بخش تجربي

طيف هاي مادون قرمز (IR) توسط دستگاه FT-IR ساخت كارخانه Brucker و اندازه گيري راديواكتيويته توسط دستگاه سوسوزن مايع مدل LS-6500 ساخت كارخانه Beckmann تعيين گرديده است.گاز تريتيوم مورد استفاده از مركز راديو ايزوتوپ بوداپست - مجارستان تهيه گرديده است. طيف هاي رزونانس مغناطيسي هسته پروتون (^{1}H) توسط دستگاه طيف سنج رزونانس مغناطيسي هسته از نوع Unity plus 400 ساخت كارخانه Varian تهيه شده اند.

تركيب اسيدآمينه لوسين نشاندار با تريتيوم كاربرد فراواني در

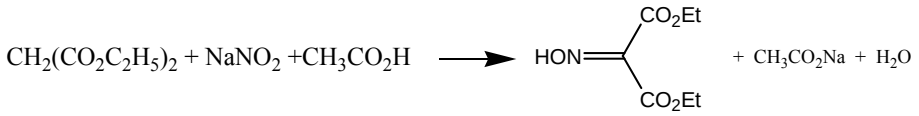
تشخیص بیماری تالاسمی دارد[۳]، بنابراین در این مقاله چگونگی سنتز این ترکیب و نشاندار کردن آن با تریتیوم تشریح شده است. این سنتز شامل پنج مرحله مي باشد که مراحل مختلف آن ذیلاً تشریح مي گردد.

سنتز لوسین نشاندار با تریتیوم :

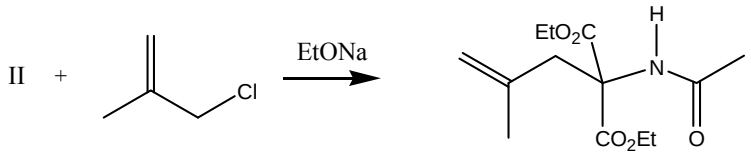
براي سنتز لوسین از روش N.F.Albertson and S.Archer استفاده شده و در ابتدا براي بهینه سازي مراحل سنتز، لوسین بصورت غیر رادیواکتیو تهیه شده و سپس با جایگزینی تریتیوم به جای گاز هیدروژن در مسیر سنتزی، لوسین نشاندار شده با تریتیوم تهیه گردید[۴].

براي سنتز لوسین نشاندار شده از مراحل سنتزي که درشماي (۱) نمایش داده شده, استفاده گردیده است. ابتدا جهت بهینه سازي , مراحل سنتزي این ماده بصورت غیررادیواکتیو با استفاده از گاز هیدروژن انجام گردید وسپس با جایگزیني گاز هیدروژن با گاز تریتیوم , سنتز ترکیب نشاندار با تریتیوم [^{3}H] انجام پذیرفت.

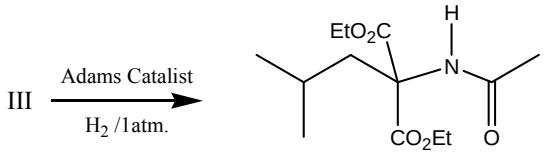
الف) مراحل سنتز غیر اکتیو لوسین: شماي(۱)



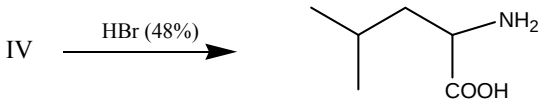
(I)



(III)

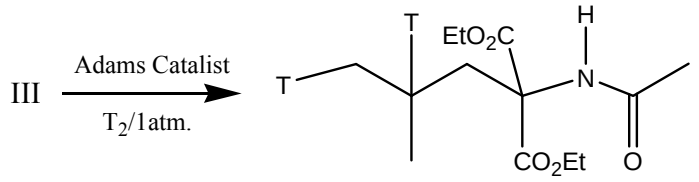


(IV)

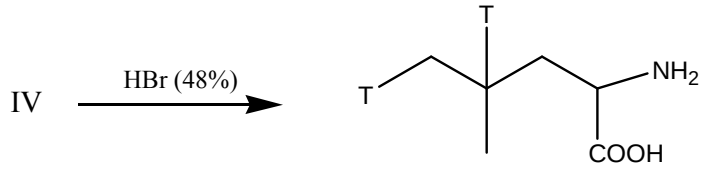


Leucine

ب) مراحل سنتز لوسین نشاندار شده با تریتیوم:



(IV)



Leucine

مرحله اول: سنتز دي اتيل ايزو نيتروزو مالونات(I)

۵ گرم معادل ۰/۰۳۱۲ مول دي اتيل مالونات را داخل يک فلاسک دو دهانه (۵۰ ميلي ليتري) قرار داده سپس توسط مخلوط حمام يخ و نمک تا حدود ۵°C سرد شده وسپس مخلوط اسيد استيک و آب را همراه بهم زدن مخلوط، و به تدريج به آن افزوده شد، در اين مرحله دما نبايد از۵ °C تجاوز کند. سپس در همين دما ۶/۵ گرم معادل ۰/۰۹۴۴ مول نيتريت سديم در مدت زمان يک و نيم ساعت به تدريج به مخلوط اضافه کرده و پس از افزودن نيتريت سديم ، حمام يخ را به آرامي برداشته و مخلوط براي ۴ ساعت در دماي اطاق بهم زده شده است .مخلوط واکنش دوبار با اتر استخراج شده و محلول اتري جهت سنتز مرحله بعدي مورد استفاده قرار خواهد گرفت.[۵]

مرحله دوم: سنتز دي اتيل استاميدو مالونات (II)

در يک فلاسک دو دهانه مجهز به قيف قطره چکان، محلول I و انيدريد استيک و اسيد استيک رامخلوط نموده و سپس ۷/۶ گرم پودر روي به آرامي و در مدت زمان يک و نيم ساعت همراه با هم زدن و در دماي°C ۴۰-۵۰ به مخلوط اضافه نموده و مخلوط رابراي ۳۰ دقيقه ديگر بهم زده وسپس مخلوط واکنش را صاف نموده و دوبار با اسيد استيک شستشو داده و سپس توسط کريستاليزاسيون خالص سازي گرديده است. (راندمان ۹۵-۹۷ %).[۵]

$^1H-NMR(CDCl_3)$: δ 1.3(t, 6H), δ 2.1(s,3H), δ 4.27(q, 4H), δ 5.16(s, 1H), δ 6.54(bs, 1H)

مرحله سوم: سنتز اتيل-۲- استاميد-۲-كاربتوكسي-۴-متيل-۴پنتانوات (III)

در اين مرحله ابتدا ماده ۲- كلرو ۳- متيل پروپن توسط تقطير خالص گرديد.

در يک بالن دو دهانه مجهز به مبرد و تحت اتمسفر ازت, ۰/۲۳۸ گرم سديم (۰/۰۱ مول)را در ۲۰/۷ گرم اتانول (۰/۳۶مول) حل نموده و سپس ۲/۲۶ گرم (۰/۰۰۸ مول) از تركيب II به بالون اضافه گرديد و مخلوط واكنش تحت رفلاكس قرار داده شد. آنگاه ۱/۲ ميلي ليتر (۰/۰۲ مول) ۲-كلرو-۳ -متيل پروپن قطره قطره به بالون افزوده و سپس مخلوط بمدت ۸/۵ ساعت مجدداً رفلاكس شده و سپس توسط تقطير در خلاء حلال را از آن جدا نموده و جامد باقيمانده توسط كريستاليزاسيون خالص گرديد(راندمان ۸۰-۷۵ %) [۶].

$^1H-NMR(CDCl_3): \delta 1.2(t,\ 6H),\ \delta\ 1.32(s,3H),\ \delta 2(s,\ 3H),\ \delta 3(s,\ 2H),\ \delta 4.26(q,\ 4H),$
$\delta 4.69(s,\ 1H),\ \delta 4.87(s,\ 1H),\ \delta 6.8(bs,\ 1H)$

مرحله چهارم: سنتز اسيد آمينه لوسين غير راديواكتيو (IV)

در اين مرحله از سنتز، احياء باند مضاعف تركيب ۲-استاميد۲-اتوكسي كربونيل-۴-متيل-۴- پنتانوات توسط گاز ئيدروژن، كاتاليست آدامز در حلال كلروفرم بشرح زير انجام مي شود:

در يک بالن يک دهانه ۰/۲ گرم از تركيب (III)، ۰/۱ گرم كاتاليست آدامز و ۰/۵ ميلي ليتر كلروفرم را مخلوط نموده و در ازت مايع جامد مي گردد و بالن تحت خلاء قرار داده مي شود , سپس مخلوط واكنش بمدت ۴ ساعت تحت اتمسفر H_2 قرار گرفته و سپس مخلوط واكنش را صاف نموده و مواد روي صافي را چندين بار با كلروفرم شستشو داده و سپس حلال آن تبخير مي گردد تا كريستالهاي سوزني شكل ظاهر شود. (راندمان ۹۵-۹۰ %)

$^1H-NMR(CDCl_3): \delta 0.8(d,\ 6H),\ \delta\ 1.2(t,6H),\ \delta 1.5(m,\ 1H),\ \delta 1.97(s,\ 3H),\ \delta 2.25(d,\ 2H),$
$\delta 4.17(q,\ 4H),\ \delta 6.8(bs,\ 1H)$

آنگاه به كريستالها ۱ ميلي ليتر HBr ۴۸%افزوده و مخلوط به مدت ۴ ساعت ، رفلاكس شده و در انتهـــا توسط آمونياک ۳۲%، pH محلول رابه ۸-۷ رسانيده، و سپس آن را در يخچال قرار داده تا كريستالها

ظاهر شوند (راندمان ۹۳-۹۰ %)[۷].

$^1H-NMR(D_2O)$: δ 0.9(d,6H), δ 1.7(m, 3H), δ 3.7(t, 1H),

مرحله نهايي : سنتز اسيد آمينه " لوسين راديواكتيو " با تريتيوم :

در اين مرحله براي واكنش احياء از گاز تريتيوم بجاي گاز ئيدروژن استفاده شده و پس از خلاء نمودن بالن در دماي ازت مايع ، از منبع گاز تريتيوم كه به روي بستر اورانيوم بصورت جذب سطحي قرار دارد، استفاده شده و بمدت ۳/۵ ساعت عبور گاز تريتيوم از بالون ادامه مي يابد. پس از احياء نمودن آن، مراحل خالص سازي مطابق مراحل واكنش غير راديواكتيو انجام مي گيرد و سپس ۱ml محلول HBr (48%)به آن اضافه گرديد و عمل Decarboxylation همانند مرحله غير راديواكتيو انجام گرفته است. وزن كريستالهاي برابر ۴۳ ميلي گرم بدست آمد .راديو اكتيويته ويژه لوسين نشاندار شده با تريتيوم برابرmCi/mmol ۶/۰۴ اندازه گيري گرديده است. (راندمان ۹۳-۹۰ %) [۸]

بحث و نتيجه گيري :

اصولاً استفاده از ايزوتوپهاي راديواكتيو به عنوان رديا ب در بررسي و تحقيق در مورد متابوليسم مواد داروئي و تحقيقات زيست شناختي يک روش شناخته شده مي باشد.در اين مقاله بر اساس مسير سنتزي ارائه شده در شماي ۱ ابتدا حد واسط كليدي اتيل-۲-استاميد-۲-كاربتوكسي-۴-متيل-۴پنتانوات (III) ,طي سه مرحله واكنش با راندمان مناسب تهيه گرديد [۵و۶], و پس ازبررسي اسپكترسكوپي تركيب فوق و تاييد ساختار ملكولي آن , در مرحله بعد ابتدا تركيب III تحت گاز ئيدروژن و كاتاليزورآدامز با راندمان مناسب به تركيب IV تحت دماي ازت مايع، احيا شد[۷]. در مرحله نهايي ملكول IV تحت واكنش با اسيد هيدروبروميک ۴۸% به لوسين تبديل گرديد. در اين مرحله پس از تائيدساختار ملكولهای IV و لوسين توسط روش اسپكترسكوپي , با جايگزيني گاز تريتيوم بجاي گاز ئيدروژن در مسير سنتز ي شماي ۱ ملكول لوسين نشاندار با تريتيوم در موقعيت ۴و۵ با راندمان مناسب سنتز گرديد.[۸]

تشكر و قدرداني :

انجام این کار پژوهشي جزء با همکاري بیدریغ گروه کاربرد رادیوایزوتوپ در صنایع که در تهیه گاز تریتیوم همکاري نموده اند، میسر نبوده و موجب سپاسگزاري است . همچنین تشکر و قدرداني از آقاي مهندس علیرضا زاده در واحد حفاظت در برابر اشعه که همیشه در اندازه گیري رادیواکتیویته ترکیبات سنتز شده این گروه کمال همکاري را نموده اند.

منابع و ماخذ :

1- a) C.L. Comar, Radioisotopes in Biology and Agriculture, Mc-Graw Hill , New York, (1955), 201

b) C.A. Sanjose, Nuclides and Isotopes, (1989), 14

2- a) A.Di. Luccia, L. Lannibelli, D. Ferranti, L. Manca, B. Masala, L. Ferrara, Biochem. Genet. (1991), 29, 421

b) J.B. Clegg, S.E.Y. Goodbourn, M. Braend, Nucleic acids Res, (1984), 12, 7847.

3- a) R. Galanello, S. Satta, M.G. Pirroni, M. Travi, L.Maccioni, J. Hemoglobin, (1998), 22, 501.

b) J. B. Clegg, The Thalassemias, edited by D.J. Weatherall, Churchill Livingstone, Edimburgh, (1983), 6, 54.

4- a) M.D. Fryzuk, B. Bosnich, J. Am. Chem. Soc. (1977), 99, 6262

b) J. Albertson and K. Archer J.Biol.Chem, (1945), 67, 308.

5- A.J. Zambito and Eugene E. Howe, ORGANIC SYNTHESIS, (2002), CV5, 373.

6- a) E.E. Reid, J.R. Ruhoff, ORGANIC SYNTHESIS, (2002), CV2, 474.

b) M.J.Coon and S.Gurin . J.Biol.chem., (1949), 49 , 1159

7- a) H.W. Thompson, E. Mcpherson, B.L. Lences, J. Org. Chem. (1976), 2903

b) J. Done, P.R. payne, J. Biochem. (1959)64, 268

8- a) G.B. Heisig, F.H. Stodola, ORGANIC SYNTHESIS, (2002), CV3, 213.

ب) حجت اله مطلوبي و همکاران ، سنتز لوسین نشاندار با تریتیوم [^3H] ، سازمان انرژي اتمي ، گزارش علمي و فني شماره RPD-LC-2002-SK-12 (اسفند سال ۱۳۸۰)