Archive of SID

J. of Nuclear Sci. and Tech.
No. 33, pp. 9-14, 2005

مجله علوم و فنون هسته‌ای
شماره ۳۳، صفحات ۱۴-۹، ۱۳۸۴

سنتز اسید آمینه لوسین نشاندار با تریتیوم [^{3}H]

حجت اله مطلوبی*، غلامحسین شیروانی، نادر صائمیان
مرکز تحقیقات هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی ایران، صندوق پستی: ۳۴۸۶-۱۱۳۶۵، تهران ـ ایران

چکیده: ترکیبات آلی نشاندار، ترکیباتی هستند که در ساختار مولکولی آنها رادیوایزوتوپهایی هستند که پرتوهای رادیوآکتیو گسیل می‌دارند. این ترکیبات نقش مهمّی در تحقیقات ایفا می‌کنند و در مقیاس وسیعی مورد استفاده قرار می گیرند و در بررسی چگونگی سوخت و ساز آنها در اعضای بدن موجودات زنده اطلاعات گسترده‌ای در اختیار پژوهندگان قرار می‌گیرد. در این مقاله اسید آمینه لوسین نشاندار شده با تریتیوم، برای تشخیص بیماری تالاسمی که نخستین بار در ایران سنتز شده، مورد بحث قرار گرفته است. مسیر سنتزی شامل واکنش تراکمی بین متیل آلیل کلراید و دی‌اتیل استامیدومالونات در محلول سدیوم‌اتوکساید در اتانول می‌باشد. در مرحله بعدی ترکیب حاصل با استفاده از کاتالیزگر آدامز و گاز تریتیوم در حلاّل کلروفرم احیا گردید و محصول اتیل-۲-استامیدو-۲-کربتوکسی-٤-متیل‌پنتانوآت با راندمان ۱۰۰٪ تولید نمود. در انتها ترکیب حاصل در اثر واکنش با اسید هیدروبرمیک ۴۸٪ مستقیماً به [٤و٥-تریتیوم] لوسین را با آکتیویته ویژه ۵ کوری بر میلی مول تبدیل گردید.

واژه‌های کلیدی: تریتیوم، لوسین، تالاسمی، اسیدهای آمینه

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***

* e-mail: hmatloubi@aeoi.org.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۳/٤/۱۵ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۳/۵/۲۸

www.SID.ir

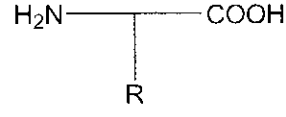
Archive of SID

۱- مقدمه

ایزوتوپهای رادیوآکتیو در چند دهه اخیر به عنوان ردیاب به طور گسترده‌ای در مطالعات و بررسی‌های تحقیقاتی زیست‌شناختی و دارویی به کار رفته‌اند و اکنون هم در بعضی از آزمایشگاههای جهان جزو نیازهای ضروری تحقیقاتی به شمار می‌آیند. از جمله کاربردهای این مواد نشاندار کردن ترکیبات آلی با آنها است. در انتخاب رادیوایزوتوپ مناسب برای نشاندار کردن ترکیبات آلی چندین عامل باید مورد توجه قرار گیرد که از جملهٔ مهمترین آنها، می توان به ساختار این ترکیبات، موارد کاربرد آنها و مشکلات تهیه رادیوایزوتوپهای مورد نظر اشاره کرد. عوامل دیگری که باید در نظر گرفته شوند، قابل دسترس بودن، نیمه عمر رادیوایزوتوپ مورد نظر، پایداری مولکول و هزینه‌های سنتز مولکول نشاندار شده می‌باشد. رادیوایزوتوپهای عناصری که در سنتز ترکیبات آلی به صورت مادّه اوّلیه مورد استفاده قرار می‌گیرند در جدول ۱ مندرج اند [۱ و ۲].

۲- ساختار ترکیبی اسیدهای آمینه

اسیدهای آمینه در ساختار ترکیبی زنجیره پلی پپتیدی وجود دارند و در سنتز مادّه حیاتی پروتئین‌ها دارای نقش اساسی هستند. فرمول کلی اسیدهای آمینه به صورت زیر است که در آن ریشه R ممکن است هیدروژن، یا زنجیرهٔ خطی و یا زنجیرهٔ حلقوی باشد.



در سنتز پروتئین‌ها، «عامل کربوکسیل» یک اسیدآمینه و عامل آمین اسیدآمینه دیگر یک پیوند (آمیدی) را ایجاد می‌کند. اگر جرم مولکولی مجموعهٔ اسیدهای آمینه‌ای که در تشکیل پیوندها شرکت دارند کمتر از ۵۰۰۰ دالتون باشد (دالتون یکای جرم اتمی هیدروژن است)، این مولکول را پپتید، یا پلی‌پپتید با رشتهٔ پلی‌پپتیدی می‌نامند. چنانچه جرم مولکولی اسیدهای آمینه از این حد تجاوز کند، می توان پلی‌پپتید حاصل را پروتئین نامید [۲].

آزمایش نشان می‌دهد، چنانچه انواع اسیدهای آمینه به صورت نشاندار شده به حیوانی تزریق شوند فقط بیست نوع اسید آمینه در ساخت رشته‌های پلی‌پپتیدی شرکت می‌کنند. اسیدهای آمینه اساسی که در تشکیل رشتهٔ پلی‌پپتیدی ساختار مولکولی مادّه حیاتی پروتئینها شرکت دارند، در جدول ۲ مندرج هستند.

۳- بخش تجربی

طیف‌های فروسرخ (IR) به وسیلهٔ دستگاه FT-IR ساخت کارخانه Brucker تعیین شده‌اند؛ اندازه‌گیری رادیوآکتیویته با دستگاه سوسوزن مایع مدل LS-6500 ساخت کارخانه Beckmann صورت گرفته و گاز تریتیوم مورد استفاده از مرکز رادیوایزوتوپ بوداپست ـ مجارستان تهیّه شده است. طیف‌های تشدید (رزونانس) مغناطیسی هسته پروتون (^{1}H) به وسیلهٔ دستگاه طیف سنج رزونانس مغناطیسی هسته از نوع Unity plus 400 ساخت کارخانه Varian تهیه شده اند.

چون ترکیب اسیدآمینه لوسین نشاندار شده با تریتیوم، کاربرد بسیاری در تشخیص بیماری تالاسمی دارد [۳]، در این مقاله چگونگی سنتز این ترکیب و نشاندار کردن آن با تریتیوم شرح داده شده است. این سنتز مشتمل بر پنج مرحله است که به شرح آنها پرداخته‌ایم.

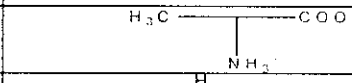
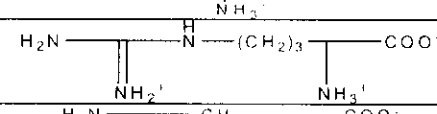
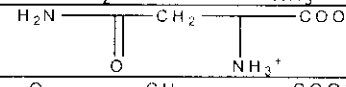
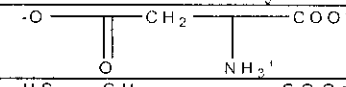
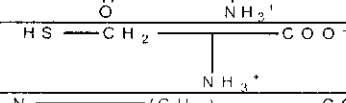
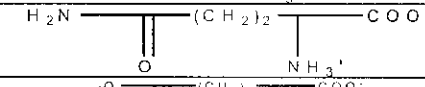
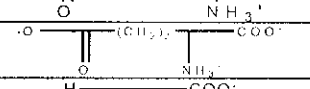
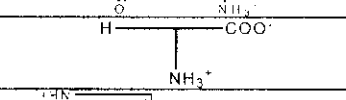
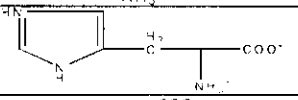
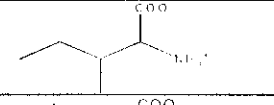
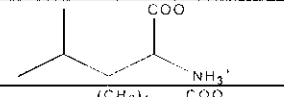
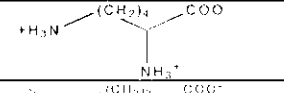
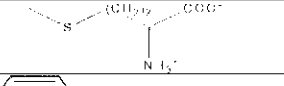
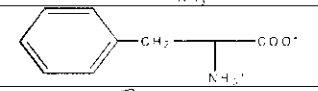
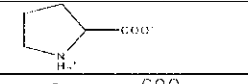
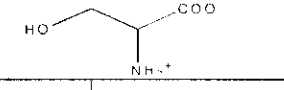
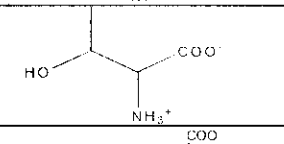
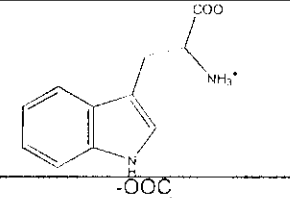
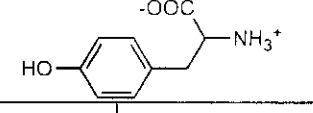
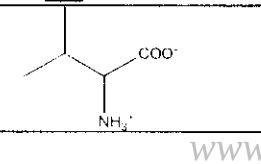
جدول ۱ـ رادیوایزوتوپهای مورد استفاده در سنتز ترکیبات آلی نشاندار.

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

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲- اسیدهای آمینهٔ اساسی که در تشکیل زنجیرهٔ پلی‌پپتیدی مادهٔ حیاتی پروتئین‌ها شرکت دارند.

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	
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)	

www.SID.ir

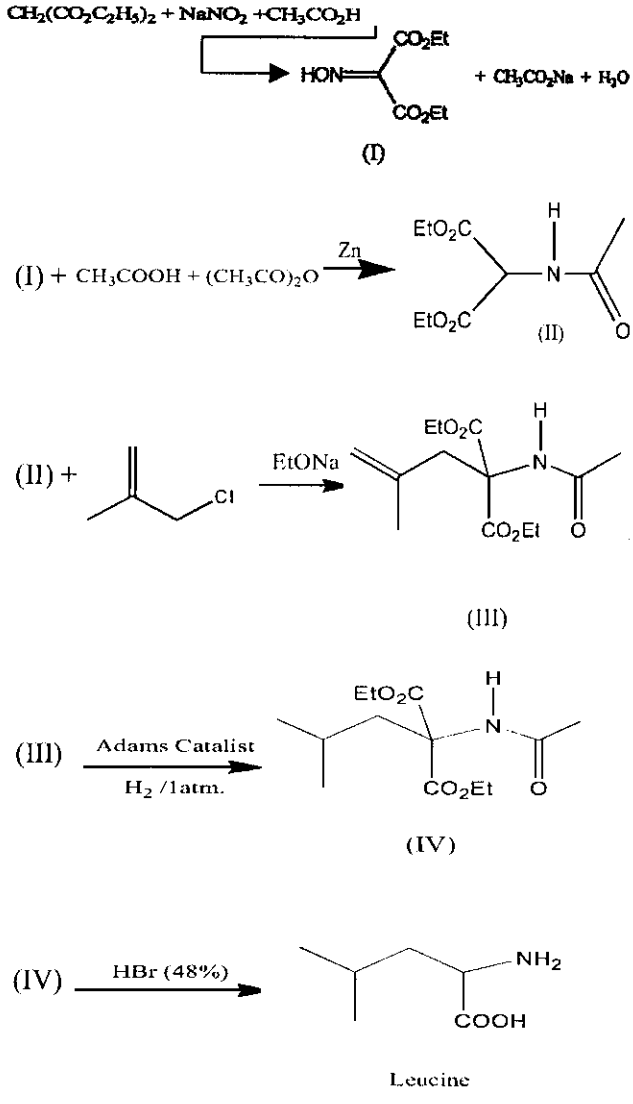
Archive of SID

٤- سنتز لوسین نشاندار شده با تریتیوم

در سنتز لوسین از روش N.F.Albertson and S.Archer استفاده شده است. برای بهینه سازی مراحل سنتز، ابتدا لوسین به صورت غیرآکتیو تهیّه شده، سپس با جایگزینی تریتیوم به جای هیدروژن در جریان سنتز، لوسین نشاندار شده با تریتیوم بدست آمده است [٤].

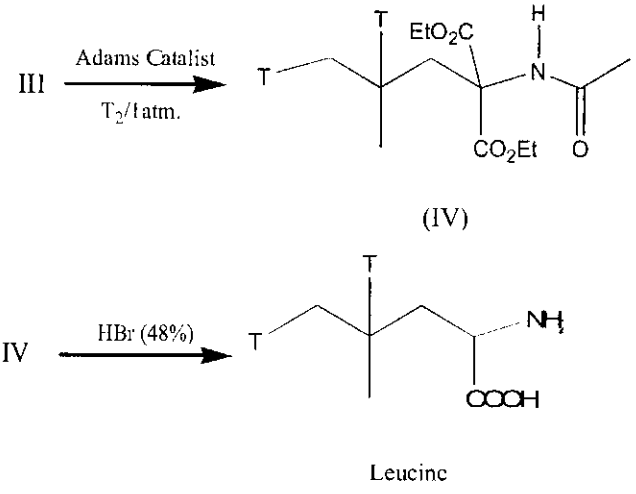
برای سنتز لوسین نشاندار شده، مراحل سنتز نشان داده شده در شکل ۱ بکار رفته‌اند. در آغاز، برای بهینه‌سازی عمل، مراحل سنتز این مادّه به صورت غیررادیوآکتیو با گاز هیدروژن انجام گرفت؛ سپس با جایگزین کردن گاز هیدروژن با تریتیوم، سنتز ترکیب نشاندار شده با تریتیوم [^{3}H] انجام پذیرفت.

الف - مراحل سنتز غیرآکتیو لوسین



شکل ۱- مراحل سنتز غیرآکتیو لوسین.

ب- مراحل سنتز لوسین نشاندار شده با تریتیوم



مرحلهٔ اول: سنتز دی اتیل ایزو نیتروزو مالونات (I)

۵ گرم معادل ۰/۰۳۱۲ مول، دی اتیل مالونات را درون یک بالُن دو دهانه (۵۰ میلی‌لیتری) ریخته و آن را به وسیلهٔ مخلوط یخ و نمک تا حدود $5^{\circ}C$ سرد کرده‌ایم، سپس مخلوط اسید استیک و آب را، ضمن بهم‌زدن مخلوط، به تدریج به آن افزوده‌ایم؛ در این مرحله دما نباید از $5^{\circ}C$ تجاوز کند. سپس در همین دما ٦/٥ گرم معادل ۰/۰۹٤٤ مول نیتریت سدیوم در مدّت یک و نیم ساعت به تدریج به مخلوط اضافه کرده و پس از افزودن نیتریت سدیوم، حمام یخ را به آرامی برداشته و مخلوط را به مدّت ٤ ساعت در دمای اطاق بهم‌زده‌ایم. مخلوط واکنش دوبار با اتر استخراج شده و محلول اتری برای سنتز مرحله بعد بکار رفته است [۵].

مرحلهٔ دوم: سنتز دی اتیل استامید و مالونات (II)

در یک بالُن دو دهانه مجهّز به قیف قطره چکان، محلول I، انیدرید استیک و اسید استیک را مخلوط کرده و بعد ۷/٦ گرم پودر روی به آرامی، در مدّت یک و نیم ساعت، در ضمن بهم‌زدن در دمای $50-40^{\circ}C$، به این مخلوط اضافه کرده و آن را به مدّت ۳۰ دقیقه دیگر بهم‌زده‌ایم. سپس مخلوط واکنش را صاف کرده و دوبار با اسید استیک شسته‌ایم و با عمل تبلور خالص‌سازی کرده‌ایم (بازده ۹۷-۹۵ ٪) [۵].

^{1}*H-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)

www.SID.ir

Archive of SID

مرحلهٔ سوم: سنتز اتیل ۲ استامید ۲ کاربتوکسی ٤ متیل ٤ پنتانوات (III)

در این مرحله ابتدا مادّهٔ ۲- کلرو ۳- متیل پروپان به وسیلهٔ عمل تقطیر خالص شد.

در یک بالن دو دهانه مجهز به مبرّد و در محیط ازت، ۰/۲۳۸ گرم سدیوم (۰/۰۱ مول) را در ۲۰/۷ گرم اتانول (۰/۳٦مول) حل کرده، سپس ۲/۲٦ گرم (۰/۰۰۸ مول) از ترکیب II به آن اضافه کرده‌ایم و مخلوط واکنش را تحت رفلاکس قرار داده‌ایم. آنگاه ۱/۲ میلی لیتر (۰/۰۲ مول) ۲-کلرو-۳ -متیل پروپن را قطره قطره به آن افزوده‌ایم و مخلوط را دوباره به مدّت ۸/۵ ساعت رفلاکس کرده‌ایم و بعد با عمل تقطیر در خلاء، حلاّل را از آن جدا، و جامد باقیمانده را با عمل تبلور خالص کرده‌ایم (بازده ۸۰-۷۵ ٪) [٦].

^{1}H-NMR($CDCl_3$): δ1.2(t, 6H), δ1.32(s,3H), δ2 (s, 3H), δ3(s, 2H), δ4.26(q, 4H), δ4.69(s, 1H), δ4.87(s, 1H), δ6.8(bs, 1H)

مرحلهٔ چهارم: سنتز اسیدآمینه لوسین غیر رادیوآکتیو (IV)

در این مرحله از سنتز، احیاء باند مضاعف ترکیب ۲-استامید-۲-اتوکسی کربونیل-٤-متیل-٤- پنتانوات به وسیلهٔ گاز هیدروژن و کاتالیست آدامز در حلال کلروفرم بشرح زیر انجام می‌گیرد:

در یک بالن یک دهانه به حجم ۵۰ cc، ۰/۲ گرم از ترکیب (III)، ۰/۱ گرم کاتالیست آدامز و ۰/۵ میلی‌لیتر کلروفرم را مخلوط و در ازت مایع جامد کرده و بالن را تحت خلاء قرار داده‌ایم؛ سپس مخلوط واکنش را به مدّت ٤ ساعت در اتمسفر H، قرار داده و مخلوط واکنش را صاف کرده‌ایم و مواد روی صافی را چندین بار با کلروفرم شسته‌ایم و بعد حلاّل آن را تبخیر کرده‌ایم تا بلورهای سوزنی شکل ظاهر شوند (بازده ۹۵-۹۰ ٪)

^{1}H-NMR($CDCl_3$): δ 0.8(d, 6H), δ1.2(t,6H), δ1.5 (m, 1H), δ1.97(s, 3H), δ2.25(d, 2H), δ4.17 (q, 4H), δ6.8(bs, 1H)

آنگاه به بلورها ۱ میلی‌لیتر HBr ٤۸٪ افزوده و مخلوط را به مدّت ٤ ساعت، رفلاکس کرده‌ایم و در پایان، با آمونیاک ۳۲٪، pH محلول رابه ۸-۷ رسانیده و آن را در یخچال قرار داده‌ایم تا بلورها ظاهر شوند (بازده ۹۳-۹۰ ٪)[۷].

^{1}H-NMR (D_2O): δ 0.9 (d, 6H), δ1.7 (m, 3H), δ3.7 (t, 1H)

مرحلهٔ نهایی: سنتز اسید آمینه "لوسین رادیوآکتیو" با تریتیوم

در این مرحله برای واکنش احیاء از گاز تریتیوم بجای هیدروژن استفاده شده است و پس از ایجاد خلاء در بالن در دمای ازت مایع، از منبع گاز تریتیوم که بر بستر اورانیوم به صورت جذب سطحی قرار دارد، استفاده کرده و به مدّت ۳/۵ ساعت عبور گاز تریتیوم از بالن را ادامه داده‌ایم. پس از احیاء کردن ترکیب (III) مراحل خالص‌سازی، بر طبق مراحل واکنش غیررادیوآکتیو انجام گرفت. سپس ۱ml محلول HBr (٤۸٪) به آن اضافه شد و عمل Decarboxylation همانند مرحله غیررادیوآکتیو انجام گرفت. جرم بلورهای حاصل ٤۳ میلی‌گرم بود. رادیوآکتیویته ویژه لوسین نشاندار شده با تریتیوم برابر ٦/۰٤mCi/mmol اندازه‌گیری شد (بازده ۹۳-۹۰ ٪) [۸].

۵- بحث و نتیجه‌گیری

استفاده از ایزوتوپهای رادیوآکتیو به عنوان ردیاب در بررسی و تحقیق سوخت و ساز مواد دارویی و تحقیقات زیست شناختی، روش شناخته شده‌ای است.در این مقاله بر اساس مسیر سنتزی ارائه شده در نمودار ۱، ابتدا حدّ واسط کلیدی اتیل-۲- استامید-۲- کاربتوکسی-٤- متیل- ٤ پنتانوات (III)، طی سه مرحله واکنش با بازدهی مناسب تهیّه شد [۵ و ٦] و پس ازبررسی این ترکیب به روش طیف‌نمایی و تأیید ساختار مولکولی آن، در مرحلهٔ بعد ابتدا ترکیب III تحت تأثیر گاز هیدروژن و کاتالیزورآدامز با بازدهی مناسب به ترکیب IV در دمای ازت مایع، احیا شد [۷]. در مرحله نهایی مولکول IV تحت اثر واکنش با اسید هیدروبرومیک ٤۸٪ به لوسین تبدیل گردید. در این مرحله پس از تائید ساختار مولکولهای IV و لوسین با روش طیف‌سنجی، با جایگزینی تریتیوم بجای هیدروژن در مسیر سنتزی نمودار ۱، مولکول لوسین نشاندار شده با تریتیوم در موقعیت ٤ و ۵ با بازدهی مناسب سنتز شد [۸].

تشکر و قدردانی

انجام این کار پژوهشی جز با همکاری بیدریغ گروه کاربرد رادیوایزوتوپ در صنایع، که در تهیه گاز تریتیوم ما را یاری کرده‌اند، میسّر نبوده و موجب سپاسگزاری است . همچنین از آقای مهندس علیرضازاده، در واحد حفاظت در برابر اشعه، که

www.SID.ir

Archive of SID

همواره در اندازه‌گیری رادیوآکتیویته ترکیبات سنتز شده با این گروه همکاری مؤثر داشته‌اند، تشکر و قدردانی می‌کنیم.

References:

1. a) C.L. Comar, Radioisotopes in Biology and Agriculture, Mc-Graw Hill , New York, 201 (1955).
   b) C.A. Sanjose, Nuclides and Isotopes, **14** (1989).
2. a) A.Di. Luccia, L. Lannibelli, D. Ferranti, L. Manca, B. Masala, L. Ferrara, Biochem. Genet, **29**, 421 (1991).
   b) J.B. Clegg, S.E.Y. Goodbourn, M. Braend, Nucleic acids Res, **12**, 7847 (1984).
3. a) R. Galanello, S. Satta, M.G. Pirroni, M. Travi, L. Maccioni, J. Hemoglobin, **22**, 501 (1998).
   b) J. B. Clegg, The Thalassemias, edited by D.J. Weatherall, Churchill Livingstone, Edimburgh, **6**, 54 (1983).
4. a) M.D. Fryzuk, B. Bosnich, J. Am. Chem. Soc. **99**, 6262 (1977).
   b) J. Albertson and K. Archer J.Biol.Chem, **67**, 308 (1945).
5. A.J. Zambito and Eugene E. Howe, ORGANIC SYNTHESIS, CV5, 373 (2002).
6. a) E.E. Reid, J.R. Ruhoff, ORGANIC SYNTHESIS, CV2, 474 (2002).
   b) M.J.Coon and S.Gurin . J.Biol.chem., 49, 1159 (1949).
7. a) H.W. Thompson, E. Mcpherson, B.L. Lences, J. Org. Chem., 2903 (1976).
   b) J. Done, P.R. payne, J. Biochem, **64**, 268 (1959).
8. a) G.B. Heisig, F.H. Stodola, ORGANIC SYNTHESIS, CV3, 213 (2002).

ب) ح. مطلوبی، غ. شیروانی، ن. صائمیان، "سنتز لوسین نشاندار با تریتیوم [^3H]"، سازمان انرژی اتمی، گزارش علمی و فنی شماره RPD-LC-2002-SK-12 (اسفند سال ۱۳۸۰).

www.SID.ir