

# Gewinnung trägerfreier Syntheseprodukte in bestrahltem Valin durch heiße $^{11}\text{C}$ -Atome aus ( $\gamma$ , n)-Kernreaktionen

Carrierfree Synthesis Products from Irradiated Valine by Means of Hot  $^{11}\text{C}$ -Atoms of Giant Resonance Reaction

G. Gundlach, E. L. Sattler und U. Wagenbach

Biochemisches Institut und Strahlencentrum der Justus-Liebig-Universität Gießen

Z. Naturforsch. **40c**, 351–355 (1985); eingegangen am 29. November 1984

Herrn Prof. Dr. A. Schraub zum 75. Geburtstag zugeeignet

Carrierfree Synthesis, Amino Acids, Valine, Leucine ( $\gamma$ , n)-Nuclear Reaction

The hot  $^{11}\text{C}$ -atom derived from ( $\gamma$ , n)-nuclear reaction of the 40 MeV-Bremsstrahlung of a electron linear accelerator may react with valine irradiated. Besides retention-labelling of valine new products which are essentially carrierfree may be produced. By this means leucine has been separated using HPLC and identified by electrophoresis in amounts of 25 MBq labelled compound.

Limitierend für die Anwendung von  $^{11}\text{C}$  und anderen kurzlebigen Radionukliden für medizinische und biochemische Untersuchungen sind die Schwierigkeiten, die nukleogenen Atome schnell in eine chemische Verbindung einzubauen. Die Einbaumethode für  $^{11}\text{C}$  sollte daher folgende Forderungen erfüllen:

- Die Synthese des organischen Moleküls muß innerhalb einer durch die Halbwertszeit von 20,4 Minuten gegebenen kurzen Zeit erfolgen.
- Die Synthese soll das markierte Molekül in möglichst hoher radiochemischer Ausbeute liefern, bei gleichzeitig hoher spezifischer Aktivität.
- Die markierte Verbindung soll aus der Reaktionsmischung leicht und schnell von den Reaktanden abtrennbar, auf Reinheit prüfbar und charakterisierbar sein.

Daher wird in vielen Laboratorien nach schnellen, mit hoher Ausbeute ablaufenden Markierungsmethoden für  $^{11}\text{C}$  gesucht [1–5].

Wird das  $^{11}\text{C}$ -Atom durch Kernreaktion direkt im organischen Molekül erzeugt, erhält man durch Rückstoß markierte Verbindungen. Der Nachteil dieser Methode liegt in der strahlenchemischen Zersetzung der Targetmoleküle und der großen Zahl möglicher markierter Produkte. Im wesentlichen sind dabei folgende Reaktionen „heißer“  $^{11}\text{C}$ -Atome mit einem organischen Targetmolekül zu erwarten:

- Abstraktion von Wasserstoff; energiereiche Spezies wie  $^{11}\text{C}$ -Methin,  $^{11}\text{C}$ -Methylen und  $^{11}\text{C}$ -Methyl werden gebildet und reagieren weiter.

Reprint requests to Prof. Dr. G. Gundlach.

Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, D-7400 Tübingen  
0341–0382/85/0500–0351 \$ 01.30/0

- Die Insertion von  $^{11}\text{C}$  oder wasserstoffreicheren Folgeradikalen führt zu trägerfreien Syntheseprodukten mit einem zusätzlichen C-Atom. Solche Moleküle können sich stabilisieren oder zu Fragmenten zerfallen.

Ein möglicher Beitrag durch heiße  $^{12}\text{C}$ -Atome aus dem im natürlichen Isotopengemisch mit 1,1% enthaltenen  $^{13}\text{C}$  ist als sehr gering anzusehen.

- Ein C-Atom des Targetmoleküls wird durch ein heißes  $^{11}\text{C}$ -Atom substituiert. Diese direkte Markierung führt zu niedrigen spezifischen Aktivitäten (Retention) [6–9].

Wenn es gelingt, im Anschluß an die Bestrahlung des Targetmoleküls einzelne Reaktionsprodukte

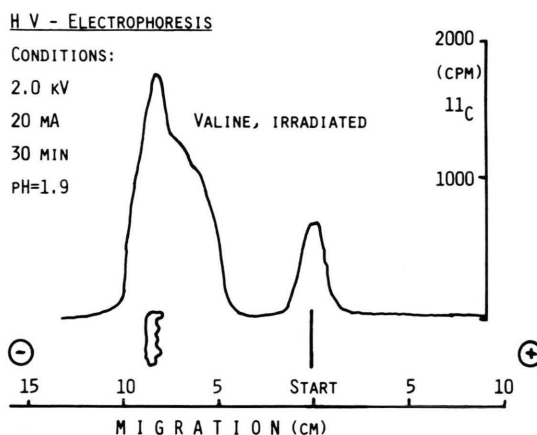


Abb. 1. Hochspannungs-Papierelektrophorese von „aktiviertem“ Valin. Am Start und am Platz des Valins verzeichnet der Radioscanner Radioaktivität. Offensichtlich gibt es auch langsamer wandernde Radioaktivität, welche einem länger-kettigen Produkt zugesprochen werden kann.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

schnell zu isolieren und von Radiolyseprodukten abzutrennen, hat man einen leichten Zugang zu gereinigten,  $^{11}\text{C}$ -markierten Verbindungen. Für die Herstellung von  $^{11}\text{C}$  steht in Gießen ein 65-MeV-Elektronenlinearbeschleuniger zur Verfügung. Durch hochenergetische Bremsstrahlung wird  $^{11}\text{C}$  über die  $^{12}\text{C}(\gamma, n)^{11}\text{C}$ -Kernphotoreaktion direkt im organischen Targetmolekül erzeugt. Abb. 1 stellt die grobe Auftrennung der in der kristallisierten Aminosäure Valin induzierten  $^{11}\text{C}$ -Radioaktivität nach Hochspannungselektrophorese dar.  $^{11}\text{C}$ -Radioaktivität wandert bei  $\text{pH} = 1,9$  zur Kathode. Ein Teil der gewanderten Radioaktivität zeigt geringere elektrophoretische Motilität als die Targetamino-säure. Unter den hier gewählten Bedingungen würde eine um ein C-Atom verlängerte Aminosäure wie z.B. das durch Insertion von  $^{11}\text{CH}_2$  aus Valin entstehende Leucin oder Isoleucin langsamer wandern.

Ziel unserer Untersuchungen war die Prüfung, ob durch Insertionsreaktionen die Bildung radioaktiv markierter, nahezu trägerfreier homologer Syntheseprodukte aus  $^{11}\text{C}$ -Aminosäuren in vernünftigen Ausbeuten möglich ist.

Für die saubere und schnelle Auftrennung der in Valin erzeugten  $^{11}\text{C}$ -Radioaktivität und die Gewinnung von markierten homologen Syntheseprodukten sind die analytische und präparative Hochdruckflüssigkeitschromatographie geeignet, wenn sie

- die Trennung innerhalb einer Halbwertszeit des  $^{11}\text{C}$  ermöglichen,
- die bestrahlte Targetverbindung von Fragmentierungs- und Syntheseprodukten unter ausreichender Auflösung separieren,
- die einfache Einbringung der Probe in Trennprozesse ermöglichen,
- über eine genügend große Kapazität verfügen.

Die Trennung von homologen Alkylaminosäuren an unpolaren stationären Phasen ist analytisch leicht möglich mit stark polaren Eluenten [10]. Abb. 2 links zeigt die Elutionsfolge an einer C-18-Umkehrphase mittels Perchlorsäure. Mit steigender Zahl an C-Atomen zeigen die Aminosäuren zunehmend Retention an der stationären Phase. In diesem System sollte ein  $^{11}\text{C}$ -Isoleucin aus dem Targetmolekül Valin innerhalb von 10 Minuten abtrennbar sein.

In der Abb. 2 rechts ist das unter diesen Bedingungen erhaltene Radio-Chromatogramm von bestrahltem Valin angegeben (obere Kurve  $^{11}\text{C}$ -Radioaktivität, untere Kurve Refraktometersignal). Die Elution des getrennten Valins wird durch das Refraktometersignal bei ca. 4,5 Minuten angezeigt. Die injizierte  $^{11}\text{C}$ -Radioaktivität wird in 8 Fraktionen unterteilt. Die Fraktion 4 ist dem Valin-Substanzsignal zuzuordnen, für andere Fraktionen findet sich kein entsprechendes Signal, womit die Annahme gerechtfertigt scheint, daß hier praktisch trägerfreie Substanzen

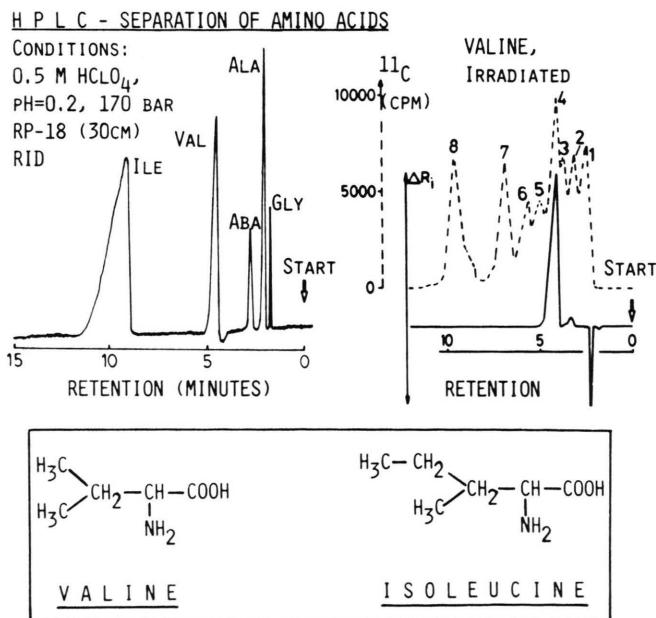


Abb. 2. Rechts: HPLC-Trennung von „aktiviertem“ Valin. Von den acht deutlichen Radioaktivitäts-Peaks ist der vierte Valin zuzuordnen; links: HPLC-Trennung aliphatischer Aminosäuren, nur Refraktometerkurve. Fraktion 8 (rechte Abb.) ist mit Leucin bzw. Isoleucin (linke Abb.) identisch.

vorliegen ( $^{12}\text{C}$  aus  $^{13}\text{C}$  sollte zu einer geringen Veränderung der spezifischen Aktivität führen; ebenso können strahlenchemische Reaktionen in ähnlichen Produkten enden, wobei allerdings Erweiterungen um ein C-Atom fraglich sind). Ca. 7% der injizierten  $^{11}\text{C}$ -Radioaktivität werden in der Fraktion 4 wiedergefunden, 6% in der Fraktion 7 und 11% in der Fraktion 8; innerhalb von 20 Minuten werden 80% der Aktivität eluiert. Die in der Fraktion 8 eluierte Radioaktivität entspricht in ihrem Verhalten dem der Aminosäuren Leucin oder Isoleucin. Um homologe, trägerfreie  $^{11}\text{C}$ -Syntheseprodukte aus größeren Mengen (50–80 mg) bestrahlter Aminosäure isolieren zu können, ist die analytische Trennung in nahezu „präparativem“ Maßstab durchgeführt worden.

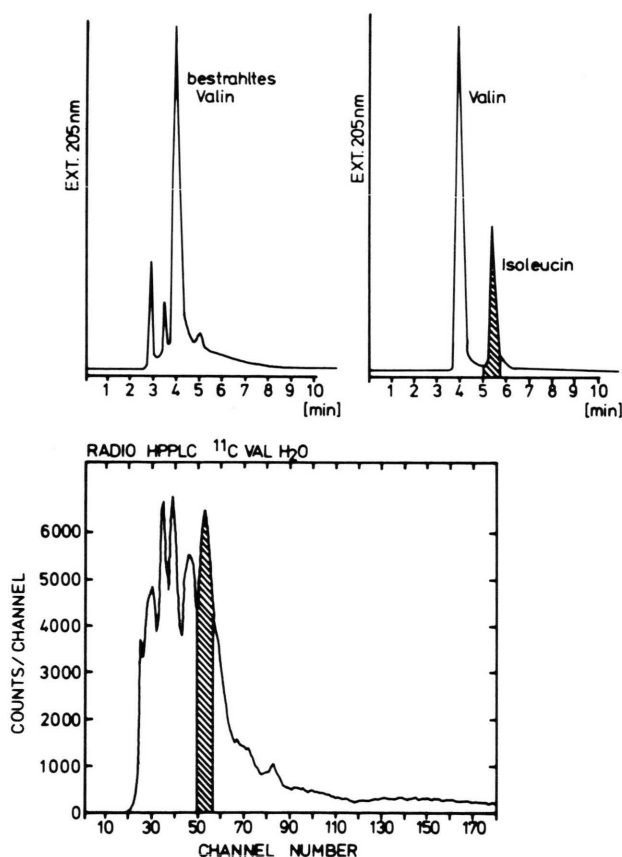


Abb. 3. Präparative HPLC-Trennung von 0,2 Gramm „aktiviertem“ Valin; unten: digital registriertes Radiochromatogramm (Ratemeterkurve, 10 Kanäle pro Minute); oben links: Analogaufzeichnung der UV-Absorptionen bei 205 nm; oben rechts: Vergleichschromatogramm von Valin und Isoleucin. (Geringe Differenzen zwischen der Registrierung der Radioaktivität und der Extinktion ergeben sich aus der Detektoranordnung.)

An einer Zorbax ODS-Umkehrphase (Fa. DuPont) mit bidestilliertem Wasser als Eluens gelingt die Abtrennung einer Fraktion aus bestrahltem Valin, deren chromatographisches Verhalten unter diesen Bedingungen dem von Isoleucin entspricht. Abb. 3 gibt das präparative Radio-Chromatogramm von bestrahltem Valin wieder. Im Chromatogramm ist die Verteilung der eluierten  $^{11}\text{C}$ -Radioaktivität nach Speicherung der Meßdaten und digitaler Ausgabe graphisch dargestellt. Die  $^{11}\text{C}$ -Fraktion, deren Verhalten Isoleucin entspricht, wird in den Kanälen 51 bis 57 eluiert (schraffierte Fläche in Abb. 3 unten).

Da die chromatographischen Systeme alleine nicht die Identifizierung der Fraktion 8 (analytisches System) bzw. der präparativen Fraktion erlauben und die Trennzeiten maximal 10 Minuten betragen, wurden beide Fraktionen aufgefangen und ihr Verhalten unter verschiedenen identischen elektrophoretischen Bedingungen zusammen mit Isoleucin untersucht. Bei pH = 1,9 ist Isoleucin vollständig protoniert, so daß es Mobilität in Richtung Kathode zeigt, bei pH = 6,5 ist Isoleucin ungeladen und elektrisch neutral.

Abb. 4 zeigt das elektrophoretische Verhalten der präparativen HPLC-Fraktion, der inaktives Isoleucin als Träger eingemischt ist, bei pH = 1,9. Bei pH = 1,9 und 4 kV wandern der Träger und die  $^{11}\text{C}$ -Aktivität über eine Distanz von 15 cm ohne Anzeichen weiterer Auftrennung. Bei pH = 6,5 bleiben Träger und Aktivität wie erwartet nahe dem Start

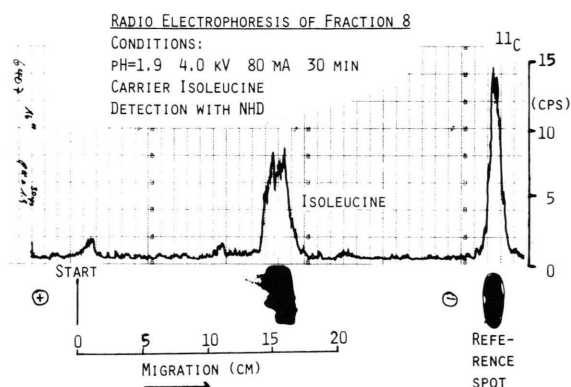


Abb. 4. Hochspannungs-Papierelektrophorese (ca. 100 V/cm) der Fraktion 8 (Abb. 2) bzw. der in Abb. 3 schraffiert angezeigten Fraktion. Isoleucin-Träger wurde zwecks Ninhydrinfärbung zugesetzt. (Die Fläche des in gleicher Menge nach dem Lauf aufgetragenen Referenzpeaks macht deutlich, daß keine bedeutende Radioaktivität durch Wanderung zur Anode verlorengegangen ist.)

liegen, während Alkylamine entsprechend wandern. Das Träger-Isoleucin wurde nach Messung der  $^{11}\text{C}$ -Radioaktivität durch Reaktion mit Ninhydrin angefärbt.

Diese Ergebnisse zeigen übereinstimmend, daß die Bestrahlung von Valin zur Herstellung der homologen, trägerfreien  $^{11}\text{C}$ -Syntheseprodukte Leucin oder Isoleucin angewendet und mittels (präparativer) HPLC in hoher Reinheit in für eine Weiterverwendung ausreichender Zeit isoliert werden können. Die Insertionen finden offenbar am unpolaren Ende der Aminosäuren statt.

## Experimentelle Angaben

### Beschleuniger

$^{11}\text{C}$ -Nuklide wurden durch die  $^{12}\text{C}(\gamma, n) ^{11}\text{C}$ -Kernphotoreaktion mit Hilfe des Gießener 65-MeV-Elektronenlinearbeschleunigers hergestellt.

Betriebsbedingungen: Elektronenenergie 35–45 MeV; Impulsstrom 320 mA; Impulslänge 2  $\mu\text{s}$ ; Wiederholfrequenz 200  $\text{s}^{-1}$ .

Die Abb. 5 stellt das Strahlführungsende des Linearbeschleunigers dar.

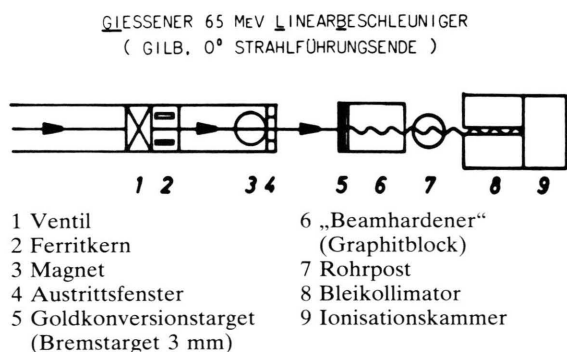


Abb. 5. Bestrahlungsanordnung am Linearbeschleuniger. Die Aktivierung findet in der Rohrpost statt (Pos. 7). Der Graphitblock (Pos. 6) dient zur Aufhärtung der Bremsstrahlung wie auch zur Absorption der Restelektronen und damit zur Reduktion der mit der Aktivierung einhergehenden Radiolyse.

### Hochspannungs-Papier-Elektrophorese

#### CAMAG-Papier-Elektrophorese-System

Puffer: pH = 1,9 aus Eisessig-Ameisensäure-Wasser (150-50-800 V/V); pH = 6,5 aus Pyridin-Eisessig-Wasser (100-10-890 V/V); Papier: Schleicher & Schüll Nr. 2043b.

### Analytisches HPLC-System (Abb. 6)

Pumpe: WATERS ASSOCIATES M-6000 A (Doppel-Saphirkolben); Injektionssystem: WATERS ASSOCIATES U6k (mit 2 ml Probenschleife) oder RHEODYNE M 7125; Trennsäule: Lichrosorb RP 18 (10  $\mu$ ),  $300 \times 6 \times 4$  mm SS, gepackt nach dem „balanced-slurry“-Verfahren; Detektoren: Refraktometer WATERS R 401 mit Elektronik,  $3 \times 3''$  NaJ (Tl)-Detektor Friesecke & Höpfner, Ratemeter, Telefunk TR-86-Rechner oder  $3 \times 3''$  NaJ (Tl)-Detektor Inter technique S26Y, Koinzidenz-Elektronik, Laboratorium Dr. Berthold, Ratemeter, TR-86 zur digitalen Radioaktivitätsaufzeichnung; Schreiber: Zweikanal-Potentiometerschreiber (Metrawatt BBC).

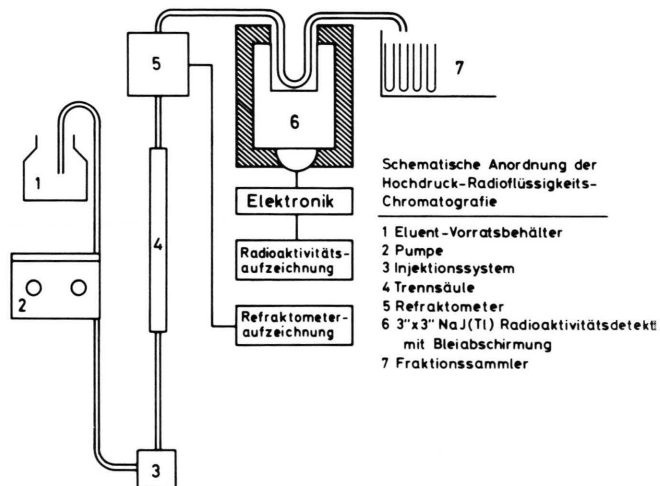


Abb. 6. Schema der HPLC-Anordnung.

### Präparatives HPLC-System

#### DU PONT HPLCP System

Pumpe: DU PONT pneumatische Einkolbenpumpe ca. 80 ml Hub; Injektionssystem: RHEODYNE M 7125 mit 2 ml Probenschleife; Trennsäule: LiChrosorb RP 18, Zorbax ODS 33 mm i.D.  $\times 250$  mm SS; Detektoren: UV-Detektor DU PONT, Refraktometer DU PONT mit präparativer Meßzelle, Radioaktivitätsdetektion wie beim analytischen System.

### Chemikalien

Alle Substanzen waren p.a. oder von der höchsten käuflichen Qualität.

- [1] W. Vaalburg, H. D. Beerling van der Molen, S. Reifers, A. Rijskamp, M. G. Woldring und H. Wynberg, *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **27**, 153–157 (1976).
- [2] M. B. Winstead, C. I. Chern, T. H. Lin, A. Khentigan, J. F. Lamb und H. S. Winchel, *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **29**, 69–73 (1978).
- [3] H. J. Machulla, P. Laufer und G. Stöcklin, *J. Radioanal. Chem.* **32**, 381–400 (1976).
- [4] R. L. Hayes, L. C. Washburn, B. W. Wieland, T. T. Sun, J. B. Anon, T. A. Butler und A. P. Callahan, *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **29**, 186–187 (1978).
- [5] B. Langström und B. Stridsberg, *Int. J. Appl. Radiat. Isot.* **30**, 151–153 (1979).
- [6] G. Gundlach, E. L. Sattler, W. Trampisch und U. Wagenbach, *Z. Naturforsch.* **31c**, 377–382 (1976).
- [7] U. Wagenbach, G. Gundlach, W. Trampisch und E. L. Sattler, *Naturwissenschaften* **7**, 340–341 (1976).
- [8] W. Trampisch, E. L. Sattler und A. Schraub, *Biophysik* **7**, 355–357 (1971).
- [9] W. Trampisch und E. L. Sattler, *Kerntechnik* **18**, 222–227 u. 307–312 (1976).
- [10] I. Molnar und C. Horvath, *J. Chromatog.* **142**, 623–646 (1976).