

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
13. Jg. 1975, S. 563–569

Untersuchungen zur Herstellung von ^{125}J -markiertem Trijodthyronin und Thyroxin mit hoher spezifischer Radioaktivität

Von R. Ködding und A. von zur Mühlen

Abteilung für Klinische Endokrinologie, Department Innere Medizin, Medizinische Hochschule Hannover

(Eingegangen am 12. Mai/27. August 1975)

Zusammenfassung: Die Reaktionsbedingungen der Monojodierung von *L*-Dijodthyronin und *L*-Trijodthyronin mit nichtradioaktivem Jodid wurden durch Auftrennung des Reaktionsgemisches an Sephadex G-25 mit Natronlauge 10 mmol/l als Eluens und quantitative Jodbestimmung im Eluat näher untersucht. Unter optimalen Bedingungen durchgeführte Markierungen mit ^{125}J lieferten in guter Ausbeute chromatographisch reines *L*-Trijodthyronin bzw. *L*-Thyroxin mit spezifischen Radioaktivitäten zwischen 2 und 3 Ci/mg. Die hergestellten markierten Hormone wurden durch radioimmunchemische Bestimmung überprüft. Sie ermöglichen einen Nachweis von weniger als 2 pg T_3 und weniger als 5 pg T_4 .

Investigation on the synthesis of ^{125}I labelled triiodothyronine and thyroxine of high specific radioactivity

Summary: The reaction conditions of the monoiodination of *L*-diiodothyronine and *L*-triiodothyronine by nonradioactive iodide have been investigated by separation of the reaction mixture on sephadex G-25 with sodium hydroxide 10 mmol/l as eluent and quantitative iodine estimation in the eluate.

When labelling with ^{125}I was performed under optimal conditions, a good yield of chromatographically pure *L*-triiodothyronine or *L*-thyroxine was obtained with a specific radioactivity between 2 and 3 Ci/mg. The synthesized labelled hormones were tested by radioimmunoassay. They enable a detection of less than 2 pg T_3 and less than 5 pg T_4 .

Der quantitative Nachweis von freiem Thyroxin (T_4)¹⁾ und freiem Trijodthyronin (T_3) im Serum im Rahmen der Schilddrüsenfunktionsdiagnostik hat in den letzten Jahren ständig an Bedeutung gewonnen. Bisher konnte jedoch bei diesen Verbindungen der Anteil des freien Hormons im Diffusat von Serum nach Gleichgewichtsdialyse nur prozentual bestimmt werden ((1), weitere Literatur siehe dort). Auch mit den radioimmunchemischen Methoden ist eine direkte Messung der Konzentration von freiem T_3 und T_4 nicht möglich, da mit der spezifischen Radioaktivität der zur Zeit im Handel befindlichen ^{125}J -markierten Hormone (100–500 mCi/mg) die erforderliche untere Nachweisgrenze nicht erreicht wird. Die Möglichkeit der direkten Bestimmung von freiem T_3 und T_4 im Diffusat oder Ultrafiltrat von Serum wäre aber von großem Vorteil. Es sollte daher versucht werden, durch Einführen von einem Atom ^{125}J in ein *L*-3,5-Dijodthyronin- bzw. *L*-3,5,3'-Trijodthyronin-Molekül $^{125}\text{J}\text{-T}_3$ bzw. $^{125}\text{J}\text{-T}_4$

mit hoher spezifischer Radioaktivität herzustellen. Eine solche Synthese wurde von Weeke & Ørskov (2) in Anlehnung an die Proteinmarkierung von Greenwood et al. (3) beschrieben.

Um die optimalen Bedingungen für diese Reaktionen herauszufinden, schien es uns zweckmäßig, die Jodierung zunächst mit nichtradioaktivem Jodid durchzuführen. Wir haben das Reaktionsgemisch an Sephadex G-25 aufgetrennt und die einzelnen Komponenten durch chemische Bestimmung des Jodgehaltes im Eluat erfaßt. Mit dem von uns verwendeten Elutionsmittel gelang eine vollständige Trennung von Dijodthyronin (T_2), T_3 und T_4 im Gegensatz zu anderen Verfahren (2). Durch Variierung des Mengenverhältnisses von Jodthyronin zu Jodid ließ sich die Ausbeute der herzustellenden Verbindung verändern. Die dabei gewonnenen Erkenntnisse wurden bei der Jodierung mit ^{125}J verwendet. Gegenüber der beschriebenen Markierung (2) haben wir das Verhältnis von T_2 bzw. T_3 zu Jodid verringert und insgesamt mit einem kleineren Ansatz gearbeitet. Das isolierte $^{125}\text{J}\text{-T}_3$ bzw. -T_4 wurde von uns durch radioimmunchemische Bestim-

1) Abkürzungen: T_2 = *L*-3,5-Dijodthyronin,
 T_3 = *L*-3,5,3'-Trijodthyronin,
 T_4 = *L*-Thyroxin.

mung getestet. Es wurde eine Eichkurve im niederen Konzentrationsbereich aufgestellt und die untere Nachweisgrenze ermittelt.

Methodik

Reagenzien

L-3,5-Dijodthyronin (T_2), L-3,5,3'-Trijodthyronin (T_3), L-Thyroxin (T_4) (alle Henning Berlin GmbH).
Sephadex G-25 fine (Deutsche Pharmacia GmbH, Frankfurt/M).
 Na^{125}J , spezif. Radioaktivität: 8–15 Ci/mg J (Farbwerke Hoechst AG, Frankfurt/M).
Chloramin T (Trihydrat), Natriumdisulfid ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), Natriumjodid (alle z. A., Merck, Darmstadt).
Alle übrigen Reagenzien: Reinheitsgrad z. A., Merck, Darmstadt.

Herstellung der Lösungen

1. L-3,5-Dijodthyronin (T_2) und L-3,5,3'-Trijodthyronin (T_3) wurden in NaOH 10 mmol/l gelöst.

T_2 -Lösung A: 200 mg/l.

T_2 -Lösung B: 80 mg/l.

T_3 -Lösung A: 200 mg/l.

T_3 -Lösung B: 60 mg/l.

Die Lösungen wurden in kleinen Portionen bei -20°C eingefroren.

2. Natriumjodid wurde in dest. Wasser gelöst. Jodkonzentration: 50 mg/l.

3. Zu der radioaktiven Natriumjodidlösung (5 mCi in 12 μl) wurden nach Zentrifugation (400 g, 3 min) des Originalfläschchens 20 μl Phosphatpuffer 500 mmol/l, pH 7,5, zugegeben. Die Vermischung erfolgte durch nochmalige Zentrifugation. Konzentration etwa 0,16 μg Jodid bzw. etwa 1,6 mCi pro 10 μl (genaue Angaben können angesichts der vom Hersteller angegebenen Toleranzen für die gelieferte Radioaktivitätsmenge und die spezifische Radioaktivität nicht gemacht werden).

4. Chloramin T wurde in Phosphatpuffer 50 mmol/l, pH 7,5, jeweils frisch gelöst.

Lösung A: 4,5 g/l. Lösung B: 1,5 g/l.

5. Natriumdisulfid wurde in Phosphatpuffer 50 mmol/l, pH 7,5, gelöst.

Lösung A: 2,4 g/l. Lösung B: 0,8 g/l.

Jodierung

mit inaktivem NaJ

In einem kleinen Reagenzglas (60 \times 10 mm) oder Mikrolitergefäß wurden 10 μl der NaJ-Lösung ($\approx 0,5 \mu\text{g} \approx 3,94 \text{ nmol Jod}$) mit 20 μl Phosphatpuffer 50 mmol/l oder 500 mmol/l durch Andrücken des Gefäßes an die Gummischeibe eines Rotamixers gemischt. Nach Zugabe von 10 μl der T_2 - bzw. T_3 -Lösung A ($\approx 2,0 \mu\text{g} \approx 3,81 \text{ nmol } T_2$ bzw. $2,0 \mu\text{g} \approx 3,07 \text{ nmol } T_3$) wurde gründlich rotiert. Das Molverhältnis von T_2 bzw. T_3 zu Jodid betrug dabei 0,96:1 bzw. 0,78:1. Danach wurde die Oxydation des Jodids durch Zugabe von 20 μl der Chloramin-T-Lösung A ($\approx 90 \mu\text{g} \approx 0,32 \mu\text{mol}$ Chloramin T) eingeleitet und nach 15–20 s kräftigen Mischens (Rotamixer) durch Zugabe von 100 μl der Natriumdisulfid-Lösung A ($\approx 240 \mu\text{g} \approx 1,26 \mu\text{mol}$ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) abgestoppt (etwa 15 s Rotamixer).

Beim Einsatz der dreifachen Menge T_2 (6,0 $\mu\text{g} \approx 30 \mu\text{l}$) wurde nur der Phosphatpuffer 500 mmol/l verwendet, um die Konstanzhaltung des pH-Wertes im Ansatz zu gewährleisten. Bei Verwendung des Puffers 50 mmol/l stieg der pH-Wert im Ansatz durch 30 μl der stark alkalischen T_2 -Lösung auf etwa 11 an.

Bei der Jodierung ist die Konzentration des verwendeten Phosphatpuffers zwischen 50 und 500 mmol/l nicht kritisch, wenn nur 10 μl der alkalischen T_2 - oder T_3 -Lösung eingesetzt werden. Bei Verwendung von Phosphatpuffer 50 mmol/l steigt durch die Hormonzugabe der pH-Wert im Ansatz zwar auf 8,1 an, sinkt jedoch durch die gepufferte Chloramin-T-Lösung wieder auf 7,7 ab, während bei Verwendung von Phosphatpuffer 500 mmol/l der pH-Wert

während der einzelnen Pipettierschritte nur zwischen 7,5 und 7,6 schwankt, so daß in beiden Fällen während der Reaktion in etwa der gleiche pH-Wert vorliegt. Zweckmäßig wäre die Verwendung einer Konzentration von etwa 200 mmol/l, da diejenige von 500 mmol/l während der Aufbewahrung bei 4°C Kristalle bildet, die sich in der Wärme nur sehr langsam wieder in Lösung bringen lassen.

mit Na^{125}J

In einem Reagenzglas (60 \times 10 mm) wurden 10 μl der mit Phosphatpuffer 500 mmol/l verdünnten Na^{125}J -Lösung (\approx etwa 1,6 mCi bzw. etwa 0,16 μg Jodid) mit weiteren 20 μl dieses Puffers vermischt (Rotamixer). Das weitere Vorgehen erfolgte wie bei der Jodierung mit inaktivem Jodid. Es wurden eingesetzt: 10 μl der T_2 -Lösung B ($\approx 0,80 \mu\text{g } T_2$) oder 10 μl der T_3 -Lösung B ($\approx 0,60 \mu\text{g } T_3$), sowie 20 μl der Chloramin-T-Lösung B ($\approx 30 \mu\text{g}$ Chloramin T) und 100 μl der Natriumdisulfid-Lösung B ($\approx 80 \mu\text{g } \text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$). Das Molverhältnis von T_2 zu Jodid betrug dabei 1,19:1, von T_3 zu Jodid 0,72:1.

Säulenchromatographische Trennung

Trennmateriale: Sephadex G-25 fine. Gelbett: $27 \times 1,0 \text{ cm}$.
Eluens: NaOH 10 mmol/l. Fraktionsvolumen: 1,2–1,7 ml.
Elutionsgeschwindigkeit: 25–30 ml/h ≈ 33 –40 ml/cm $^2 \cdot \text{h}$.

Unmittelbar nach Beendigung der Jodierung wurde das Reaktionsgemisch auf die Säule aufgetragen. Nach Einsickern ins Gel trugen wir zunächst etwa das gleiche Volumen Natronlauge 10 mmol/l auf. Nachdem diese Flüssigkeit von Sephadex aufgenommen war, wurde mit der kontinuierlichen Elution begonnen. Es wurden insgesamt etwa 70 ml in Fraktionen gesammelt. Bei Separationen von nichtradioaktivem Material wurde das Eluat in Probenbechern (2 ml) für den AutoAnalyzer, sonst in Reagenzgläsern (95 \times 16 mm) aufgefangen. Nach Trennung von Markierungsprodukten mußte die Säule etwa 10–15 h mit Natronlauge 10 mmol/l gespült werden (etwa 30 ml/h), damit die Radioaktivität des Eluats soweit absank, daß die Säule für eine neue Trennung verwendet werden konnte.

Jodbestimmung

Die Messung der Jodkonzentration wurde mit einem AutoAnalyzer (Technicon GmbH, Bad Vilbel) durchgeführt (4, 5). Der Nachweis beruht auf der katalytischen Wirkung des Jods bei der Reduktion von Ce^{4+} durch Arsenit. Die Meßgeschwindigkeit betrug 20 Proben/h, das Verhältnis von Probe zu Spülflüssigkeit 1:2. Die alkalischen Fraktionen der chromatographischen Trennung wurden direkt zur Messung eingesetzt.

Radioaktivitätsmessung

Fraktionierte Markierungsprodukte

Die Messung der Fraktionen erfolgte unter gleichbleibender Geometrie über einem Bohrlochdetektor.

Nach der Messung haben wir die wichtigsten Fraktionen zur Verzögerung der Autoradiolyse mit dest. Wasser auf 10 ml verdünnt. Als Verdünnungsmittel wurde Wasser gewählt, um das alkalische Milieu und damit die Löslichkeit von T_3 und T_4 aufrecht zu erhalten (pH: etwa 9,0).

Proben der radioimmunchemischen Bestimmungen

Diese wurden mit einem automatischen Zweikanal-Gamma-spektrometer (^{22}Na -J-Kristall) mit einer Zählhausbeute von 78% gemessen.

Bestimmung von Trijodthyronin und Thyroxin

T_3 und T_4 wurden mit der radioimmunchemischen Methode nach Mitsuma et al. (6), modifiziert nach *Herrmann & Schneider* (7) unter Verwendung von dextranbeschichteter Aktivkohle als Trennmittel von freiem und gebundenem Hormon bestimmt. Die Antiseren wurden für T_3 in einer Verdünnung von $1:2 \cdot 10^5$ bis $1:4 \cdot 10^5$, für T_4 von etwa $1:10^5$ im Ansatz verwendet. Die Lösungen von ^{125}J -markiertem T_3 und T_4 (Fraktionen der chromatographischen Trennungen) wurden mit Barbitol-Puffer (6) soweit verdünnt, daß 100 μl etwa 10^4 Imp./min enthielten.

Es wurde die Radioaktivität des gebundenen (B) und des freien (F) Hormons gemessen und für die Auswertung die Radioaktivität des gebundenen Hormons entweder direkt (Imp./min) oder als prozentualer Anteil der insgesamt eingesetzten Radioaktivität $T (= \frac{B}{T} \cdot 100)$ zugrundegelegt.

Ergebnisse

Säulenchromatographische Trennung

Bei der Trennung der Jodthyronine an Sephadex G-25 wurde Natronlauge 10 mmol/l als Eluens benutzt, wie sie erstmals von *Mougey & Mason* (8) und später von anderen Autoren (9–14) zur Trennung von Jodid, T_3 und T_4 verwendet worden ist. Dieses Eluens liefert in Abwesenheit von Protein gute Trennungen der genannten Verbindungen bei geringen Elutionsvolumina. Aufgrund theoretischer Überlegungen war zu erwarten, daß T_2 nach Jodid und vor T_3 eluiert werden würde. Unsere Frage war, ob T_2 einwandfrei von T_3 abzutrennen ist, um sicherzustellen, daß das aus T_2 hergestellte markierte T_3 nicht durch unverbrauchtes Ausgangsprodukt verunreinigt ist. Wir haben daher zunächst authentische Präparate von Jodid, T_2 , T_3 und T_4 einzeln, in verschiedenen Gruppen und als gesamte Mischung chromatographiert, wobei jeweils eine Jodmenge von etwa 0,7 bis 1,0 μg pro Verbindung eingesetzt wurde. Die quantitative Jodbestimmung im Eluat zeigte, daß alle genannten Verbindungen voneinander getrennt werden können (vgl. Abb. 2a und b) und daß bei wiederholter Chromatographie das Elutionsvolumen jeder Verbindung exakt reproduzierbar ist. Die einzelnen Substanzen konnten somit bei Auftrennung eines Reaktionsgemisches nach Jodierung sowohl mit inaktivem als auch mit radioaktivem Jod anhand ihrer Elutionsvolumina identifiziert werden.

Jodierung von T_3

Bei der Jodierung von T_3 mit inaktivem Jodid haben wir ein Molverhältnis $T_3 : J \approx 0,78 : 1$ gewählt, also einen leichten Jodidüberschuß verwendet. Wie die Jodbestimmung nach chromatographischer Auftrennung des Reaktionsgemisches zeigte, verläuft unter diesen Bedingungen die Umwandlung von T_3 in T_4 fast quantitativ. Spuren von restlichem T_3 (2,5% vom Hormonjod) sowie das überschüssige Jodid wurden an der Säule abgetrennt.

Die Jodierung mit Na^{125}J erfolgte unter etwa den gleichen Bedingungen, nur wurden die gesamten Mengen im Ansatz auf etwa ein Drittel reduziert, um angesichts der zeitlich begrenzten Haltbarkeit von $^{125}\text{J}-T_3$ und $^{125}\text{J}-T_4$ die hergestellte Menge etwas mehr dem Bedarf anzupassen. Es wurde mit einem leichten Jodidüberschuß gearbeitet, um eine Einschleppung von inaktivem Jodid als mögliche Verunreinigung des T_3 niedrig zu halten und somit eine eventuelle Herabsetzung der spezifischen Aktivität des Na^{125}J und damit des herzustellenden T_4 zu vermeiden. Die Messung der Radioaktivität im frak-

tionierten Säuleneluat zeigte, daß T_4 mit großer Ausbeute erhalten wurde (Abb. 1a).

Ein geringer Anteil der Radioaktivität wurde an der Stelle von T_3 eluiert. Wahrscheinlich handelt es sich hierbei entweder um T_3 , bei dem ein Jodatome durch ein radioaktives Jodatome ausgetauscht wurde, oder das durch Abspaltung eines nichtaktiven Jodatoms am äußeren Phenolring von gebildetem T_4 durch Strahleneinwirkung entstanden ist. Die letzte Möglichkeit ist wahrscheinlicher, denn bei der Jodierung mit inaktivem NaJ ist die T_3 -Konzentration nach der Reaktion, gemessen am Jod, wesentlich niedriger. Auch bei *Weeks* (2) erscheint vor dem T_4 -Gipfel Radioaktivität im Eluat.

Ungünstig auf die Jodierung wirkt sich eine Erhöhung der Chloramin-T-Konzentration aus. Bei Einsatz der dreifachen Menge an Chloramin T (90 μg bei 0,16 μg J und 0,60 μg T_3) und Natriumdisulfit entsteht in erheblichem Umfang ein unbekanntes Produkt, das zwischen T_3 und T_4 eluiert wird und von diesen nicht einwandfrei abgetrennt werden kann. Außerdem steigt die Bildung von radioaktivem T_3 erheblich an (Abb. 1b).

Jodierung von T_2

Die Jodierung von T_2 zu T_3 ist etwas problematischer, da ein Teil des entstandenen T_3 unter Aufnahme eines zweiten radioaktiven Jodatoms zu T_4 weiter reagiert. Wir haben die Reaktion mit etwa äquimolaren Mengen ($T_2 : J = 0,96 : 1$) durchgeführt (nichtradioaktives NaJ). Die Jodbestimmung zeigte, daß etwa je ein Drittel T_3 und T_4 gebildet werden, während ein Drittel des T_2 nicht reagiert. Das eingesetzte Jodid war dabei praktisch verbraucht (Abb. 2a).

Man kann das Gleichgewicht dieser Reaktionen zu Gunsten der T_3 -Bildung verschieben, indem man T_2 im Überschuß einsetzt. Läßt man die dreifache Menge T_2 mit J reagieren ($T_2 : J = 2,86 : 1$), so ist die Bildung von T_4 nur noch gering, während erwartungsgemäß der größte Anteil des T_2 nicht umgesetzt wird (Abb. 2b). Da der T_2 -Überschuß von T_3 chromatographisch abgetrennt werden kann und außerdem die Kreuzreaktion des T_3 -Antikörpers gegenüber T_2 nur 1,4% beträgt (7), wäre die Herstellung des markierten T_3 unter diesen Bedingungen durchaus zweckmäßig, wenn nicht durch den T_3 -Überschuß die Gefahr des Einbringens von „kaltem“ NaJ aus nicht hochreinen T_3 -Präparaten in die Reaktion bestünde, die zu den obengenannten Folgen führten.

Für die radioaktiven Jodierungen haben wir daher als Kompromiß mit einem nur geringen Überschuß von T_2 gearbeitet. Bei einem Molverhältnis $T_2 : J = 1,19 : 1$ bildete sich etwa doppelt so viel T_3 wie T_4 (Abb. 2c), so daß bei Einsatz von 1,6 mCi Jodid radioaktives Hormon für mehr als 30 000 T_3 -Bestimmungen zur Verfügung steht, bei Verwendung nur der Fraktionen innerhalb der Halbwertsbreite des Radioaktivitätsgipfels.

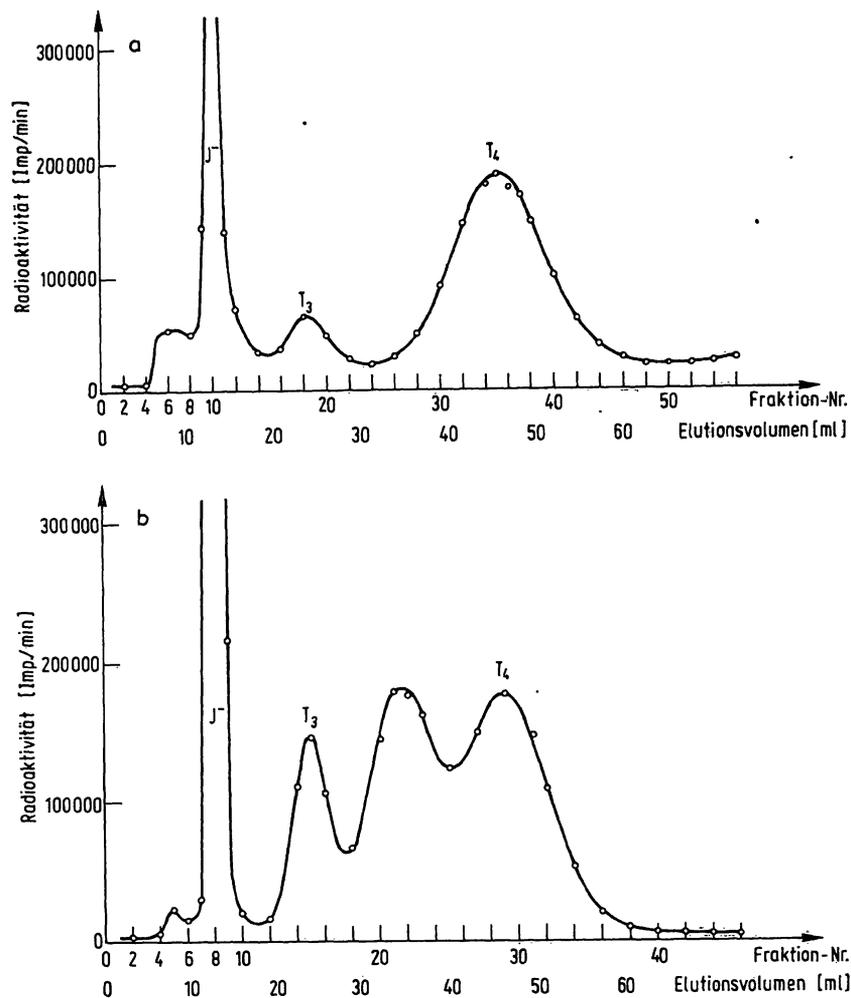


Abb. 1a und b:

Säulenchromatographische Auftrennung eines Reaktionsgemisches nach der Jodierung von T_3 an Sephadex G-25 fine ($27 \times 1,0$ cm). Eluens: Natronlauge 10 mmol/l; Elutionsgeschwindigkeit: $33\text{--}40$ ml/cm 2 · h; Fraktionsvolumen: 1,2–1,7 ml. Jodierung mit ^{125}J iodid. $\text{T}_3\text{:J} = 0,72\text{:}1$. b) Jodierung bei dreifach erhöhter Chloramin-T-Menge.

Auch bei der Markierung von T_2 führte die Steigerung der Chloramin-T- und Natriumdisulfit-Konzentration auf das Dreifache zu einem unbekanntem Produkt, das zwischen T_3 und T_4 eluiert, aber nicht quantitativ von diesen abgetrennt wurde.

Radioimmunchemische Bestimmung von T_3 und T_4

Das hergestellte $^{125}\text{J}\text{-T}_3$ und $^{125}\text{J}\text{-T}_4$ wurde in den radioimmunchemischen Tests für T_3 und T_4 zur Erstellung von Eichkurven eingesetzt, wobei in erster Linie der untere Konzentrationsbereich der Eichkurve näher untersucht wurde, um eine Steigerung der Empfindlichkeit der beiden Methoden gegenüber der Verwendung der im Handel befindlichen markierten Hormone niedriger spezifischer Radioaktivität (T_3 : 500 mCi/mg; T_4 : 100 mCi/mg) festzustellen. Die Eichkurven wurden bei T_3 im Bereich von 2–20 pg, bei T_4 von 5–50 pg zugesetztes „kaltes“ Hormon pro Ansatz aufgestellt. Bei der graphischen Darstellung

der Radioaktivität des gebundenen Hormons B als Funktion der zugesetzten Hormonmenge zeigten die nur schwach gekrümmten Kurven (Abb. 3) in beiden Fällen von B_0 zum ersten Meßpunkt (2 pg T_3 bzw. 5 pg T_4) eine Abnahme von etwa 5% der Radioaktivität. Zur Ermittlung der unteren Nachweisgrenze wurde der Variationskoeffizient der B_0 -Messung bestimmt. Er betrug 1,4% ($n = 8$). Die untere Nachweisgrenze liegt am Rande des 3 s-Bereiches von B_0 , also bei einem B-Wert (Imp./min) der 4,2% niedriger als B_0 liegt. Der Mittelwert ($n = 5$) der B-Werte (Imp./min) von 2 pg T_3 bzw. 5 pg T_4 lag mit 4,8 bzw. 4,9% unterhalb von B_0 deutlich außerhalb dieses Bereiches, so daß die Grenzwerte der Nachweisbarkeit etwas unterhalb dieser Hormonmengen liegen. Die Radioaktivität wurde bei diesen Untersuchungen mit einer Standardabweichung von 0,32% ($\approx 10^5$ Imp.) gemessen.

Durch weitere Modifikationen des radioimmunchemischen Tests, z. B. Erhöhung der Konzentration der Reaktionsteilnehmer durch Verkleinerung der Volu-

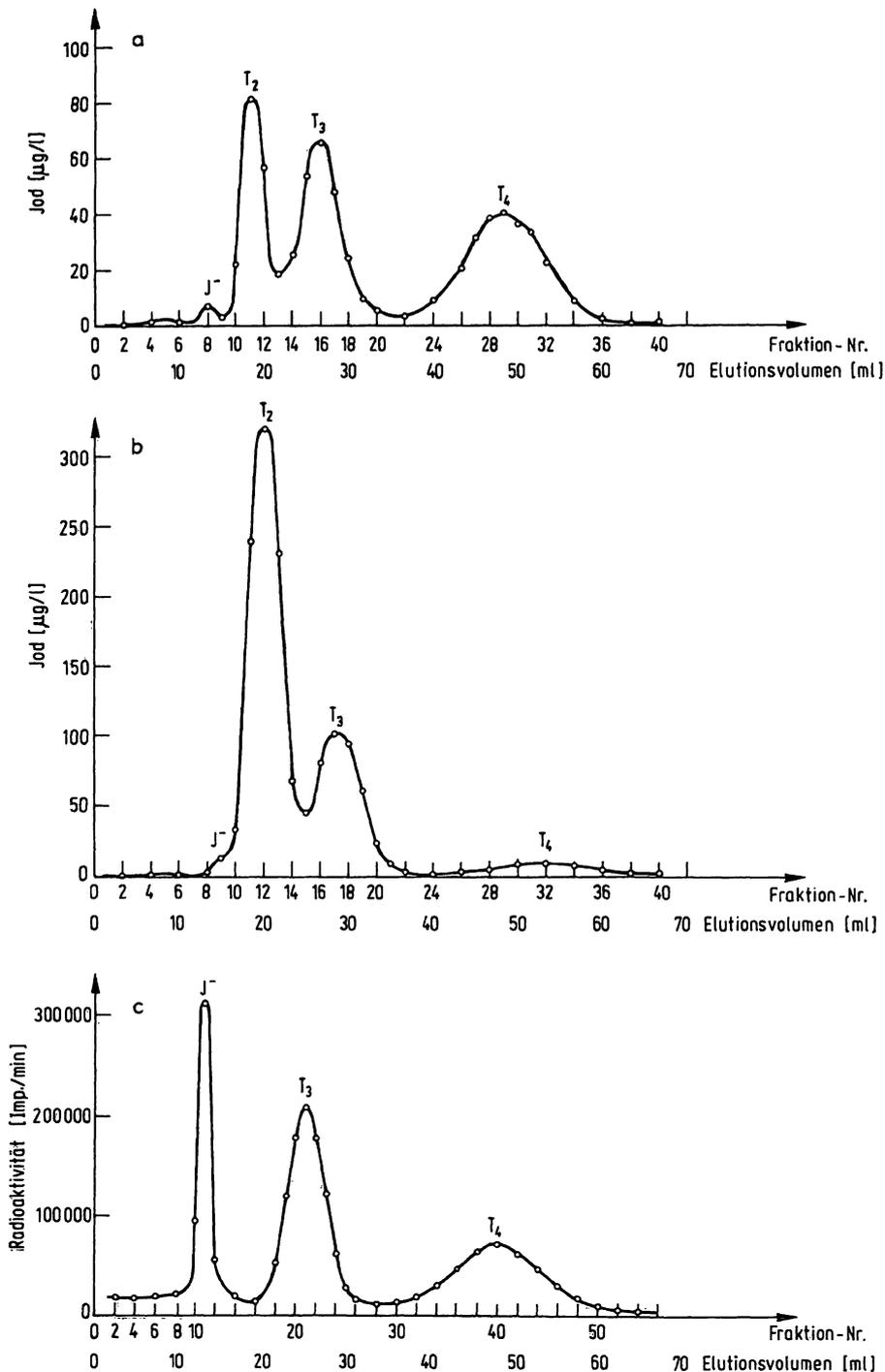


Abb. 2 a-c:

Säulenchromatographische Auftrennung eines Reaktionsgemisches nach der Jodierung von T_2 an Sephadex G-25 fine. Technische Daten wie bei Abb. 1.

a) und b): Jodierung mit inaktivem Jodid, Molverhältnis a) $T_2:\text{J} = 0,96:1$, b) $T_2:\text{J} = 2,86:1$

c): Jodierung mit ^{125}J Jodid, $T_2:\text{J} = 1,19:1$

mina, ließe sich die Nachweisempfindlichkeit sicherlich weiter herabsetzen. Die unspezifische Bindung lag zwei Wochen nach der Markierung bei T_3 unterhalb von 6%, bei T_4 unterhalb von 8%.

Die spezifische Radioaktivität der beiden hergestellten markierten Hormone wurde ermittelt, indem jeweils zwei Eichkurven mit unterschiedlichen Mengen zuge-

setztem markiertem Hormon bei gleicher Antikörperkonzentration angefertigt wurden (2). Aus dem horizontalen Abstand der beiden Kurven, ausgedrückt als Gewichtsmenge inaktiven Hormons, und der Differenz der zugesetzten Radioaktivität ließ sich die spezifische Aktivität berechnen. Sie lag bei mehreren durchgeführten Markierungen zwischen 2 und 3 Ci/mg.

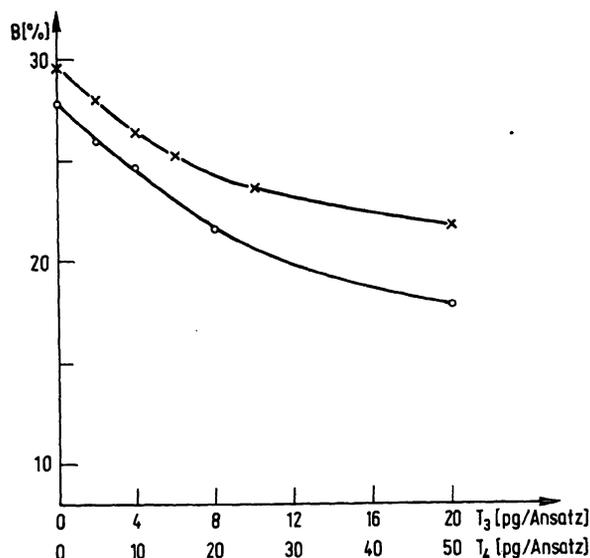


Abb. 3. Standardkurven für T_3 (x—x) und T_4 (o—o) (Mittelwerte von Doppelbestimmungen). B: Gebundenes Hormon (nach Abzug der unspezif. Bindung). Die Verdünnung der Antiseren im Ansatz betrug $1:4 \cdot 10^5$ bei T_3 und $1:1,5 \cdot 10^5$ bei T_4 .

Bei Einführung von einem Atom ^{125}J und einer maximalen spezifischen Radioaktivität für ^{125}J von $2,18 \cdot 10^6$ Ci/Atom errechnet sich für T_3 eine theoretisch maximal erreichbare spezifische Radioaktivität von 3,36 Ci/mg und für T_4 von 2,81 Ci/mg.

Diskussion

Säulenchromatographische Trennung

Bei der Chromatographie von T_3 und T_4 an Sephadex G-25 unter Verwendung von Natronlauge 10 mmol/l als Eluens erhält man sehr gute Trennungen dieser Verbindungen mit mehreren hormonfreien Zwischenfraktionen, wobei T_4 bereits nach 60 ml vollständig eluiert ist. Hingegen führt die Elution mit neutralem Puffer, wie sie von Weeke & Örskov (2) durchgeführt worden ist, nicht zu einer vollständigen Trennung dieser beiden Komponenten. Außerdem ist zur Elution von T_4 trotz geringerer Säulenlänge bei gleichem Säulenquerschnitt die vierfache Menge an Elutionsmittel erforderlich.

Bei der Auftrennung von Markierungsgemischen scheint uns eine möglichst weite Spreizung von T_3 und T_4 bei der Elution wichtig zu sein, da, wie wir zeigen konnten, unter bestimmten Reaktionsbedingungen Nebenprodukte entstehen, die zwischen T_3 und T_4 eluiert werden und von diesen nicht einwandfrei abgetrennt werden können. Nur bei genügend großem Unterschied der Elutionsvolumina von T_3 und T_4 läßt sich der einwandfreie Verlauf einer Markierung kontrollieren.

Auch die Abtrennung von T_2 gegenüber Jodid, T_3 und T_4 , die bisher an Sephadex noch nicht beschrieben worden ist, gelingt unter den oben genannten Bedingungen vollständig, wie die Jodmessungen nach Jodierung mit

inaktivem Jodid gezeigt haben. Das synthetisierte radioaktive T_3 kann somit nicht durch T_2 verunreinigt sein. Bei dieser Überprüfung zeigt sich deutlich der Vorteil der Verwendung von inaktivem Jodid zur Untersuchung der Jodierungsreaktion. Im Gegensatz zu den Markierungen mit Na^{125}J , bei denen die Menge des nicht umgesetzten, inaktiven Ausgangsproduktes nicht meßbar ist, kann bei Jodierung mit inaktivem Jodid der Umsatz bei der Reaktion qualitativ und quantitativ genau ermittelt werden.

Jodierung

Den Einfluß der Chloramin-T-Menge bei der Jodierung haben Greenwood et al (3) mit ^{131}J am Wachstumshormon untersucht. Sie fanden keine Abhängigkeit im Bereich von 35–450 μg Chloramin T bei Verwendung von 5 μg Hormon und etwa der gleichen Gewichtsmenge radioaktivem Jodid wie bei unseren Untersuchungen. Bei der Jodierung von Jodthyroninen jedoch scheint eine stärkere Chloramin-T-Konzentration Veränderungen am Thyronin-Molekül zu bewirken, so daß unbekannte jodhaltige Verbindungen in erheblichem Ausmaß entstehen (s. Abb. 1 b).

Eine ähnliche Wirkung des Chloramin T ist bei der Jodierung von Prolactinen beobachtet worden (15). Es wurden dabei markierte Proteine nachgewiesen, die sich an Sephadex G-100 vom Prolactin trennen ließen. Die Artefakte traten bei Verwendung von Lactoperoxidase an Stelle von Chloramin T nicht auf.

Um die Herabsetzung der spezifischen Radioaktivität des markierten Jodids durch inaktives Jodid, als mögliche Verunreinigung des eingesetzten Hormons, zu reduzieren, ist es ratsam, grundsätzlich mit einem Überschuß des Markierungsmittels zu arbeiten. Lediglich bei der Jodierung von T_2 sollte ein geringer Hormonüberschuß gewählt werden, um die Bildung von T_4 mit zwei radioaktiven Jodatomen, das aus Gründen mangelnder Stabilität (verstärkte Autoradiolyse) für die radioimmunchemische Bestimmung wenig geeignet ist (2), in Grenzen zu halten. Bei sehr reinen T_2 -Präparaten oder, wenn keine besonders hohe spezifische Radioaktivität des markierten Hormons erforderlich ist, kann man den Hormonüberschuß vergrößern und damit die T_3 -Ausbeute erheblich erhöhen, was aus Gründen der Wirtschaftlichkeit von großem Vorteil wäre. Angesichts der hohen Anzahl von radioimmunchemischen Bestimmungen (T_3 : etwa 35.000, T_4 : etwa 25.000), die sich mit einem nach der hier beschriebenen Vorschrift markierten Hormon durchführen lassen, wird es in den meisten Fällen zweckmäßig sein, den Ansatz der Markierung mengenmäßig weiter zu reduzieren und nur etwa 0,5 mCi Na^{125}J einzusetzen.

Haltbarkeit der markierten Hormone

Angesichts der hohen spezifischen Radioaktivität ist die Gefahr der Autoradiolyse besonders gegeben. In wäß-

riger, schwach alkalischer Lösung, stark verdünnt (s. Methodik) sind jedoch T_4 und besonders T_3 relativ gut haltbar (4°C , Dunkelheit). Das Ausmaß der ^{125}J -Bildung unter Zersetzung der markierten Hormone kann durch regelmäßige Bestimmung der unspezifischen Bindung (UB) kontrolliert werden, da unter den genannten Versuchsbedingungen (7) Jodid zu 36% nicht an dextranbeschichtete Aktivkohle gebunden, sondern mit der UB erfaßt wird. Nach starkem Anstieg der UB können die Hormone durch Rechromatographie an Sephadex G-25 gereinigt werden. Wir haben bei einer unspezifischen Bindung unterhalb von 10% keinen störenden Einfluß auf die radioimmunchemische Bestimmung von T_3 oder T_4 feststellen können.

Die untere Nachweisgrenze der radioimmunchemischen Bestimmung mit dem hergestellten markierten T_3 und T_4 zeigt, daß die direkte Bestimmung des freien Anteils dieser Hormone im Diffusat oder Ultrafiltrat von Serum von der Empfindlichkeit her gesehen ohne weiteres möglich ist, wenn man die bisher in der Literatur mitgeteilten Serum-Konzentrationen von 3–7 ng/l für freies T_3 und 13–35 ng/l für freies T_4 zugrunde legt. Über ein derartiges Nachweissystem ist kürzlich berichtet worden (16, 17).

Danksagung

Der Firma Henning Berlin GmbH danken wir für die Überlassung der Präparate von T_2 , T_3 und T_4 .

Literatur

1. Spaulding, S. W. & Gregerman, R. I. (1972), *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **34**, 974–982.
2. Weeke, J. & Ørskov, H. (1973), *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **32**, 357–360.
3. Greenwood, F. C., Hunter, W. M. & Glover, J. S. (1963), *Biochem. J.* **89**, 114–123.
4. Gochman, N. (1964), Technicon-Symposium.
5. Ködding, R. & Krüskemper, H. L. (1975), in *Methoden der Hormonbestimmung* (Breuer, H., Hamel, D. & Krüskemper, H. L., Hrsg.), S. 141–149, G. Thieme-Verlag, Stuttgart.
6. Mitsuma, T., Colucci, J., Shenkman, L. & Hollander, C. S. (1972), *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **46**, 2107–2113.
7. Hehrmann, R. & Schneider, C. (1974), *Radiologie* **14**, 156–160.
8. Mougey, E. H. & Mason, J. W. (1963), *Anal. Biochem.* **6**, 223–233.
9. Makowetz, E., Müller, K. & Spitzzy, H. (1966), *Microchem. J.* **10**, 194–201.
10. Müller, K. (1967), *Clin. Chim. Acta* **17**, 21–29.
11. Blasi, F. & De Masi, R. V. (1967), *J. Chromatogr.* **28**, 33–36.
12. Ködding, R. & Krüskemper, H. L. (1968), *Klin. Wochenschr.* **46**, 143–145.
13. Gehring, D. (1969), *Nuklear Med.* **8**, 306–308.
14. Gyertyányfy, G., Földes, J. & Kollin, Eva (1971), *diese Z.* **9**, 117–122.
15. Rogol, A. D. & Rosen, S. W. (1974), *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **39**, 379–382.
16. Hesch, R. D. (1974), 12. Int. Jahrestagung d. Gesellschaft für Nuclearmedizin, München, S. 11.
17. Weeke, J. & Ørskov, H. (1975), *J. Lab. Clin. Med.*, im Druck.

Dr. R. Ködding
D 3000 Hannover 61
Karl-Wiechert-Allee 9

