

EUR 1828.d

EUROPÄISCHE ATOMGEMEINSCHAFT - EURATOM

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE
LAGERFÄHIGKEIT H-3-MARKIERTER
AMINOSÄUREN HOHER
SPEZIFISCHER AKTIVITÄT

von

W. NOUVERTNE und K. HEMPEL
(Institut für Med. Isotopenforschung der Universität Köln)

1964



Bericht abgefasst vom
Institut für Medizinische Isotopenforschung der Universität Köln (Deutschland)

Euratomvertrag Nr. 016-62-2 RISD

HINWEIS

Das vorliegende Dokument ist im Rahmen des Forschungsprogramms der Kommission der Europäischen Atomgemeinschaft (EURATOM) ausgearbeitet worden.

Es wird darauf hingewiesen, dass die Euratomkommission, ihre Vertragspartner und alle in deren Namen handelnden Personen :

- 1° — keine Gewähr dafür übernehmen, dass die in diesem Dokument enthaltenen Informationen richtig und vollständig sind oder dass die Verwendung der in diesem Dokument enthaltenen Informationen oder der in diesem Dokument beschriebenen technischen Anordnungen, Methoden und Verfahren nicht gegen gewerbliche Schutzrechte verstößt;
- 2° — keine Haftung für die Schäden übernehmen, die infolge der Verwendung der in diesem Dokument enthaltenen Informationen oder der in diesem Dokument beschriebenen technischen Anordnungen, Methoden oder Verfahren entstehen könnten.

Dieser Bericht wird zum Preise von 40,— bfrs . verkauft.
Bestellungen sind zu richten an : PRESSES ACADÉMIQUES
EUROPÉENNES - 98, Chaussée de Charleroi, Brüssel 6.

Die Zahlung ist zu leisten durch Überweisung an die :

- BANQUE DE LA SOCIÉTÉ GÉNÉRALE (Agence
Ma Campagne) - Brüssel - Konto Nr. 964.558,
- BELGIAN AMERICAN BANK AND TRUST COMPANY -
New York - Konto Nr. 22.186,
- LLOYDS BANK (Europe) Ltd. - 10 Moorgate -
London E.C.2,

als Bezug ist anzugeben : „EUR 1828.d - UNTERSUCHUNGEN
ÜBER DIE LAGERFÄHIGKEIT H-3-MARKIERTER
AMINOSÄUREN HOHER SPEZIFISCHER AKTIVITÄT“.

Gedruckt von Guyot, s.a.,
Brüssel, Oktober 1964.

EUR 1828.d

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE LAGERFÄHIGKEIT H-3-MARKIERTER AMINOSÄUREN HOHER SPEZIFISCHER AKTIVITÄT von W. NOUVERTNE und K. HEMPEL (Institut für Medizinische Isotopenforschung der Universität Köln).

Europäische Atomgemeinschaft - EURATOM.

Bericht abgefasst vom Institut für Medizinische Isotopenforschung der Universität Köln (Deutschland).

Euratomvertrag Nr. 016-62-2 RISD.

Brüssel, Oktober 1964 - 18 Seiten - 9 Abb.

Phenylalanin-(2,4- T_2), Lysin-(γ , δ - T_2) und 3,4-Dihydroxyphenylalanin-(2,5,6- T_3) hoher spezifischer Aktivität (8 000 mC/mMol und mehr) wurden in gelöster (Lösungsmittel: 80 %iges Aethanol bzw. Wasser) und in fester Form unter zehn verschiedenen Bedingungen gelagert. Die radiochemische Reinheit wurde in Abhängigkeit von der Lagerzeit papierchromatographisch untersucht.

Am beständigsten waren in Aethanol gelöste H-3-Aminosäuren bei tiefer Temperatur. Unter diesen Bedingungen waren H-3-Phenylalanin und H-3-Lysin bis zu 6 Monaten lagerbar, ohne daß mehr als 1 % H-3-markierte Verunreinigungen entstanden.

EUR 1828.d

STUDY OF THE STABILITY OF TRITIUM LABELLED AMINO ACIDS OF HIGH SPECIFIC ACTIVITY by W. NOUVERTNE and K. HEMPEL (Institut für Medizinische Isotopenforschung der Universität Köln).

European Atomic Energy Community - EURATOM.

Report prepared by the "Institut für Medizinische Isotopenforschung der Universität Köln (Germany).

Euratom Contract No. 016-62-2 RISD.

Brussels, October 1964 - pages 18 - figures 9.

Phenylalanine-(2,4- T_2), lysine (γ , δ - T_2), and 3,4-dihydroxyphenylalanine-(2,5,6- T_3) of high specific activity (8 000 mC/m Mol and more) were stored in solute (solvent: 80 % ethanol or water) and in solid form under ten different conditions. The radiochemical purity of the amino acids was investigated by paper chromatography after varying storage time.

Maximum stability was shown by tritiated amino acids in ethanol solution at low temperature. Under these conditions, tritiated phenylalanine and lysine could be stored up to six month without developing more than one percent tritiated impurities.

EUR 1828.d

STUDY OF THE STABILITY OF TRITIUM LABELLED AMINO ACIDS OF HIGH SPECIFIC ACTIVITY by W. NOUVERTNE and K. HEMPEL (Institut für Medizinische Isotopenforschung der Universität Köln).

European Atomic Energy Community - EURATOM.

Report prepared by the "Institut für Medizinische Isotopenforschung der Universität Köln (Germany).

Euratom Contract No. 016-62-2 RISD.

Brussels, October 1964 - pages 18 - figures 9.

Phenylalanine-(2,4- T_2), lysine (γ , δ - T_2), and 3,4-dihydroxyphenylalanine-(2,5,6- T_3) of high specific activity (8 000 mC/m Mol and more) were stored in solute (solvent: 80 % ethanol or water) and in solid form under ten different conditions. The radiochemical purity of the amino acids was investigated by paper chromatography after varying storage time.

Maximum stability was shown by tritiated amino acids in ethanol solution at low temperature. Under these conditions, tritiated phenylalanine and lysine could be stored up to six month without developing more than one percent tritiated impurities.

EUR 1828.d

STUDY OF THE STABILITY OF TRITIUM LABELLED AMINO ACIDS OF HIGH SPECIFIC ACTIVITY by W. NOUVERTNE and K. HEMPEL (Institut für Medizinische Isotopenforschung der Universität Köln).

European Atomic Energy Community - EURATOM.

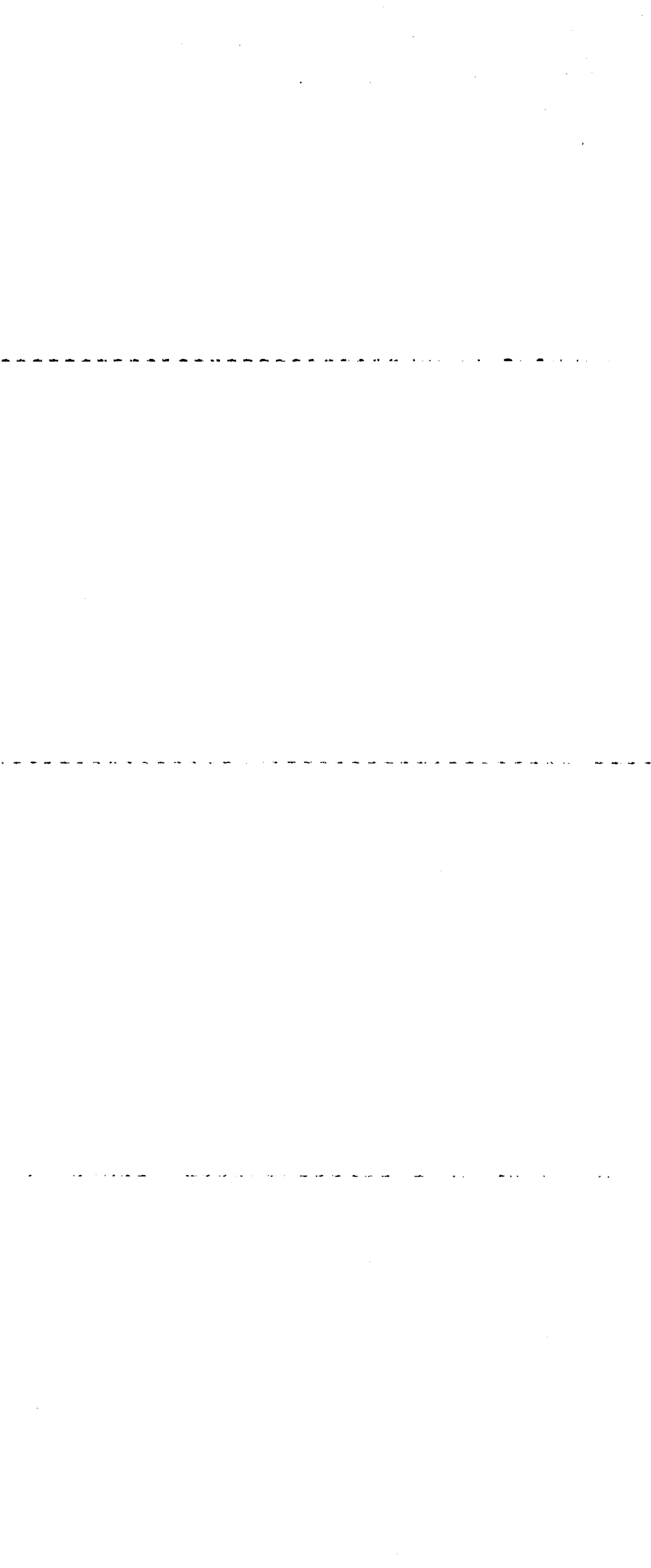
Report prepared by the "Institut für Medizinische Isotopenforschung der Universität Köln (Germany).

Euratom Contract No. 016-62-2 RISD.

Brussels, October 1964 - pages 18 - figures 9.

Phenylalanine-(2,4- T_2), lysine (γ , δ - T_2), and 3,4-dihydroxyphenylalanine-(2,5,6- T_3) of high specific activity (8 000 mC/m Mol and more) were stored in solute (solvent: 80 % ethanol or water) and in solid form under ten different conditions. The radiochemical purity of the amino acids was investigated by paper chromatography after varying storage time.

Maximum stability was shown by tritiated amino acids in ethanol solution at low temperature. Under these conditions, tritiated phenylalanine and lysine could be stored up to six month without developing more than one percent tritiated impurities.



EUR 1828.d

EUROPÄISCHE ATOMGEMEINSCHAFT - EURATOM

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE
LAGERFÄHIGKEIT H-3-MARKIERTER
AMINOSÄUREN HOHER
SPEZIFISCHER AKTIVITÄT

von

W. NOUVERTNE und K. HEMPEL
(Institut für Med. Isotopenforschung der Universität Köln)

1964



Bericht abgefasst vom
Institut für Medizinische Isotopenforschung der Universität Köln (Deutschland)

Euratomvertrag Nr. 016-62-2 RISD

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG	5
1 — BISHERIGE ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNGEN ZUR LAGERFÄHIGKEIT VON H-3-AMINOSÄUREN	5
1.1 Lagerbedingungen	5
1.1.1 in Lösung	5
1.1.2 an Feststoffe adsorbiert	5
1.2 Ergebnisse zur Lagerungsfähigkeit	6
1.3 Zur chemischen Natur der Radiolyse-Produkte	6
2 — FOLGERUNGEN UND WEITERE PLANUNG	6
3 — SPEZIELLER TEIL	7
3.1 Die chemische Synthese der untersuchten H-3-Aminosäuren hoher spezifischer Aktivität	7
3.2 Reinigung der synthetisierten H-3-Aminosäuren	8
3.3 Herstellung der H-3-Aminosäure-Proben für die Lagerung	8
3.4 Laufende Reinheitskontrollen der gelagerten H-3-Aminosäure-Proben	9
3.4.1 Nachweis nichtflüchtiger H-3-markierter Verunreinigungen	9
3.4.2 Quantitative Auswertung der Radiochromatogramme	9
3.4.3 Prüfung auf flüchtige H-3-markierte Verunreinigungen	9

ABBILDUNGEN

Abb. 1 — Radiochemische Zersetzung von H-3-Phenylalanin in Lösung	11
Abb. 2 — Radiochemische Zersetzung von H-3-Phenylalanin in fester Form	11
Abb. 3 — Radiochemische Zersetzung von H-3-Lysin in Lösung	12
Abb. 4 — Radiochemische Zersetzung von H-3-Lysin in fester Form	12
Abb. 5 — Radiochemische Zersetzung von H-3-DOPA in Lösung	13
Abb. 6 — Radiochemische Zersetzung von H-3-DOPA in fester Form	13
Abb. 7 — Auftrennung von 2 Jahre lang gelagertem H-3-Phenylalanin durch Hochspannungselektrophorese	14
Abb. 8 — H-3-Aktivitätsnachweis auf Papierchromatogrammen mit Sino-Film	15
Abb. 9 — Papierchromatographische Reinheitskontrolle des H-3-Phenylalanins	16

TABELLEN

Tab. 1 — Haltbarkeit H-3-markierter Aminosäuren hoher spezifischer Aktivität unter verschiedenen Lagerbedingungen	17
Tab. 2 — Art der chromatographischen Medien für die papierchromatographische Reinigung von H-3-Aminosäuren	18
Tab. 3 — Vergleich von Aktivitätsbestimmungen zweier verschiedener Lysinproben	18

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE LAGERFÄHIGKEIT H-3-MARKIERTER AMINOSÄUREN HOHER SPEZIFISCHER AKTIVITÄT

EINLEITUNG

Mit Tritium markierte Aminosäuren hoher spezifischer Aktivität werden für autoradiographische Untersuchungen benötigt. Diese markierten Verbindungen lassen sich nach BIRKOFER und HEMPEL (Chem. Ber. 93, 2282-2284 (1960) u. Chem. Ber. 96, 1373-1381 (1964)) aus geeigneten Aminosäure-Vorstufen und Tritium-Gas (T_2) synthetisieren. Aus methodischen Gründen müssen je Aminosäure mindestens 1 000 Millicurie hergestellt werden. Für autoradiographische Versuche werden aber in der Regel nur wenige Millicurie einer Aminosäure benötigt. Der Rest der H-3-markierten Verbindung sollte nach Möglichkeit so gelagert werden, dass die Verbindung sich nicht radiochemisch zersetzt und bei späteren Versuchen ohne grösseren Arbeitsaufwand verwendet werden kann.

Im vorliegenden Bericht werden erste Ergebnisse systematischer Untersuchungen über die Lagerfähigkeit H-3-markierter Aminosäuren hoher spezifischer Aktivität mitgeteilt.

1 — BISHERIGE ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNGEN ZUR LAGERFÄHIGKEIT VON H-3-AMINOSÄUREN

1.1 — Lager-Bedingungen

1.1.1 in Lösung:

1. 80 %iges Aethanol	— 15°C, 3 mC/ml
2. 80 %iges Aethanol	+ 20°C, 3 mC/ml
3. 80 %iges Aethanol, 0,1 n an HCl,	— 15°C, 3 mC/ml
4. 80 %iges Aethanol, 0,1 n an HCl,	+ 20°C, 3 mC/ml
5. 80 %iges Aethanol, 0,1 n an NaOH,	— 15°C, 3 mC/ml
6. 80 %iges Aethanol, 0,1 n an NaOH,	+ 20°C, 3 mC/ml
7. Physiologische Kochsalzlösung	— 15°C, 6 mC/ml

1.1.2 an Feststoffe adsorbiert:

8. an Seesand
9. an Papier
10. an Natriumchlorid.

Die umfangreiche Arbeit, welche mit der Untersuchung und dem Vergleich dieser verschiedenen Lagerungsbedingungen verbunden war, machte zunächst eine Beschränkung auf wenige H-3-Aminosäuren notwendig. Es wurde deshalb eine aromatische (H-3-Phenylalanin, 8 000 mC/mM), eine basische (H-3-Lysin, 32 000 mC/mM) und eine bereits chemisch in Lösung nicht sehr beständige H-3-Aminosäure (H-3-DOPA — 3,4-Dihydroxyphenylalanin —, spez. Akt. 23 000 u. 13 500 mC/mM) ausgewählt. Inzwischen wurde das Programm um eine saure (H-3-Alphaaminoadipinsäure) und eine aliphatische (H-3-Leucin) Aminosäure erweitert.

1.2 — Ergebnisse zur Lagerungsfähigkeit

Die Ergebnisse der bisherigen Untersuchungen werden durch die Abb. 1-6 wiedergegeben. Diese lassen folgende Schlüsse zu :

1. Die an Feststoffen adsorbierten H-3-Aminosäuren sind weniger beständig als die gelösten H-3-Aminosäuren. Das gilt insbesondere für H-3-Lysin und weniger für H-3-Phenylalanin. Bei H-3-DOPA ist eine Beurteilung wegen der sehr grossen Labilität nicht durchführbar.

2. Ganz allgemein waren in Aethanol gelöste H-3-Aminosäuren beständiger als in 0,9 % NaCl gelöste. Verständlicherweise waren die tiefgekühlten aethanolischen Lösungen beständiger als die bei Zimmertemperatur gelagerten.

3. Bei Lagerung unter optimalen Bedingungen, d.h. in 80 %igem Aethanol bei -15°C evtl. mit 0,1 n an HCl, war H-3-Phenylalanin am beständigsten. Erst nach 130 bzw. 180 Tagen enthielten die Präparate 1 % H-3-markierte Verunreinigungen. Diese Zeit soll als „Lagerfähigkeit“, bezeichnet werden. Eine ca. 2-3 mal kleinere Lagerfähigkeit zeigt H-3-Lysin. Die Lagerfähigkeit von H-3-DOPA beträgt dagegen nur ca. 1 Tag (80 % Aethanol) bzw. ca. 5 Tage (80 % Aethanol, 0,1 n an HCl). Ein Teil dieser Labilität dürfte bei DOPA rein chemischer Natur sein.

Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die „Lagerfähigkeit“ der 3 markierten Aminosäuren unter den 10 verschiedenen Bedingungen.

Bei einer H-3-Aktivitäts-Konzentration von 3 mC/ml 80 %igem Aethanol werden pro Tag 920 rad frei.

1.3 Zur chemischen Natur der Radiolyse-Produkte

In einigen Fällen wurden längere Zeit gelagerte H-3-Aminosäuren mit Hochspannungselektrophorese von H-3-markierten Verunreinigungen abgetrennt. Abb. 7 gibt ein Beispiel für H-3-Phenylalanin wieder. Bei Abb. 7A handelt es sich um eine saure aethanolische Lösung und bei Abb. 7C um eine Adsorption von H-3-Phenylalanin an NaCl.

Auf Grund der Wanderungsrichtung und der Geschwindigkeit kann bestimmt werden, ob es sich bei den H-3-markierten Verunreinigungen um Säuren, Amine oder Neutralstoffe handelt. Die Kenntnis der bei der Lagerung entstehenden markierten Verunreinigungen ist für die Erprobung von säulen-chromatographischen Verfahren zur Reinigung nützlich.

Im übrigen sollte der Gesichtspunkt nicht ausser acht gelassen werden, dass unter den „Verunreinigungen“, Substanzen von biologischem Interesse sein könnten, welche evtl. durch Synthese nur mit grösseren Schwierigkeiten zu erhalten wären.

2 — FOLGERUNGEN UND WEITERE PLANUNG

1. Tabelle 1 zeigt, dass sich eine Lagerung mit Adsorption an Feststoffe offenbar nicht empfiehlt. Bei den weiteren Versuchen soll auf diese Bedingung verzichtet werden.

Wegen der Zweckmässigkeit von physiologischen Kochsalzlösungen für biologische Versuche sollen die Versuchsbedingungen wie unter 7 weiterhin verfolgt werden.

Die Lagerung bei tiefer Temperatur und evtl. auch bei Zimmertemperatur in geeigneter aethanolischer Lösung bietet die grössten Aussichten.

2. Der Einfluss der H-3-Aktivitätskonzentration (mC/ml) auf die Grösse des radiochemischen Zerfalls wurde bisher nicht untersucht. Es soll an Beispielen untersucht werden, inwieweit eine geringere Aktivitätskonzentration die Lagerfähigkeit erhöht.

Desgleichen soll an einigen Beispielen die Bedeutung der spezifischen Aktivität, bzw. der Aminosäure-Menge/ml untersucht werden. Es kann angenommen werden, dass die Lagerfähigkeit bei geringerer spezifischer Aktivität grösser wird. Allerdings wird dadurch die Verwendbarkeit der Präparate zumindest für autoradiographische Versuche eingeschränkt. Da für rein biochemische Versuche auch Präparate von wesentlich geringerer spezifischer Aktivität von Interesse sind, sollen Versuche mit ca. 100 mal kleinerer spezifischer Aktivität angesetzt werden, z.B. etwa für H-3-DOPA mit 200 mC/mM.

3. Die auf Grund der bisherigen Ergebnisse mögliche Einschränkung der Zahl der Lagerungsbedingungen wird die Untersuchung einer grösseren Zahl von H-3-Aminosäuren möglich machen. Von den im hiesigen Institut synthetisierten mit Tritium markierten Aminosäuren würden hierfür in Frage kommen :

Valin
Gamma-Aminobuttersäure
Glutaminsäure
Histidin
Tyrosin
Ornithin
Arginin

4. Die Untersuchungen über die chemische Natur der H-3-Verunreinigungen sollen weiter fortgesetzt werden. Es erscheint möglich, dass sich bei Kenntnis der Zerfallsprodukte bessere und einfachere Wege der Reinigung bzw. Reinhaltung ergeben. Es fällt auf, dass als Lösung gelagerte H-3-markierte Aminosäuren nur eine sehr geringe Zahl H-3-Zerfallsprodukte zeigen. Bei Adsorption an Feststoffe ist ihre Zahl wesentlich grösser (Abb. 7C). Auch das spricht gegen die Lagerung in fester Form.

3 — SPEZIELLER TEIL

3.1 — Die chemische Synthese der untersuchten H-3-Aminosäuren hoher spezifischer Aktivität

Die H-3-markierten Aminosäuren wurden in einer hierfür entwickelten Apparatur durch Mikro-Synthese hergestellt und zwar ausgehend von gasförmigem 98 %igem Tritium.

Für eine Mikro-Synthese von 10 mg DOPA einer spezifischen Aktivität von 20 000 mC/mM sind je nach Syntheseweg 1 000 bzw. 2 000 mC Tritium (ca. 0,4 - 0,8 ml T₂-Gas) notwendig. Die hergestellten Proben enthielten im Durchschnitt einige Hundert bis Tausend mC der H-3-markierten Substanz.

3.2 — Reinigung der synthetisierten H-3-Aminosäuren

Bei der Mikro-Synthese der H-3-Aminosäuren entstehen diese nicht in reiner Form. Die Präparate enthalten radioaktive und inaktive Verunreinigungen. Im Rahmen der hier bearbeiteten Problemstellung sind vor allem die radioaktiven Verunreinigungen von Interesse. Nach Art der verwandten Reinigungsverfahren kann aber auch mit einer Beseitigung der inaktiven Verunreinigungen gerechnet werden.

Die synthetisierten H-3-Aminosäure-Präparate wurden zunächst zur Abtrennung der markierten Verunreinigungen papierchromatographisch aufgetrennt. Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die verwandten Lösungsmittel-Systeme.

Anfangs wurde die Aktivitäts-Verteilung längs des Chromatogramms mit einem fensterlosen Methan-Durchfluss-Zähler (Friescke & Höpfner, FH 407) gemessen und registriert. Wegen der grossen H-3-Aktivitäten und der damit verbundenen Verseuchung der Zähler ist dieses Verfahren unzweckmässig.

Es wurde deshalb zu einem photographischen Verfahren übergegangen. Die normalen Röntgenfilme sind zum Nachweis der extrem weichen β -Strahlung des Tritiums nicht geeignet, weil die Emulsion mit einer Schutzschicht überzogen ist. Die H-3- β -Strahlung wird hierdurch vollständig absorbiert. Auf unsere Anregung hin wurde von der Agfa AG, Leverkusen *, deshalb ein einseitig beschichteter Röntgenfilm ohne Schutzschicht (Agfa Sino-Film) hergestellt. Dieser erwies sich zur Ermittlung der H-3-Aktivitäts-Verteilung längs der Chromatogramme als sehr geeignet.

Abb. 8 gibt ein Beispiel für die photographische Bestimmung der H-3-Aktivitäts-Verteilung wieder. In diesem Fall wurden 40 mC H-3-Lysin aufgesetzt. Der Film wurde dann in Kontakt mit dem Chromatogramm 15 Stunden belichtet und anschliessend entwickelt. In diesem Fall treten 4 Verunreinigungen auf.

Der Papierstreifen mit dem H-3-Lysin wurde dann aus dem Chromatogramm ausgeschnitten und mit Wasser eluiert. Die so hergestellten H-3-Aminosäuren waren frei von nachweisbaren, radioaktiven Verunreinigungen (radiochemische Reinheit > 99 %).

3.3 — Herstellung der H-3-Aminosäure-Proben für die Lagerung

Die aus den Chromatogrammen gewonnenen wässrigen Eluate wurden eingedampft, in den für die Lagerung verwandten Medien gelöst und bei konstanter Temperatur gelagert. Die Lösungen enthielten 3-mc/ml.

Zur Herstellung von festen Proben wurden die wässrigen H-3-Aminosäuren-Lösungen in Gegenwart des Trägermaterials (1. Papierblättchen 0,3 cm \times 0,3 cm, Schleicher & Schüll, Nr. 2043b; 2. Seesand und 3. Natriumchlorid) in einem 25 ml Schliffkolben im Rotations-Verdampfer (Firma Büchi, Schweiz) bei 40° C im Vakuum zur Trockne eingedampft. Die trockenen Substanzen wurden unter Ausschluss von Feuchtigkeit in Luft bei 20° C gelagert.

* Der Agfa AG sind wir für die Überlassung des Film-Materials zu grossem Dank verpflichtet.

3.4 — Laufende Reinheitskontrollen der gelagerten H-3-Aminosäure-Proben

3.4.1 Nachweis nichtflüchtiger H-3-markierter Verunreinigungen.

Von den gelagerten H-3-Aminosäure-Proben wurden zu verschiedenen Zeiten nach Herstellung aliquote Mengen entnommen und auf Verunreinigungen untersucht. Die Proben wurden papierchromatographisch getrennt, und zwar in folgenden Lösungsmittel-Systemen:

1. n-Butanol/Eisessig/Wasser (2 : 1 : 1)
2. Methylaethylketon/Propionsäure/Wasser (75 : 25 : 30)
3. sec-Butanol/Eisessig/Wasser (4 : 1 : 1)
4. Methylaethylketon/Pyridin/Wasser (70 : 15 : 15)
5. n-Butanol/Aethanol/Ammoniak (25 %ig)/Wasser (4 : 4 : 1 : 1)

Danach wurde die H-3-Aktivitäts-Verteilung längs der Chromatogramme mit einem Radiopapierchromatographen gemessen. Ein Beispiel für H-3-Phenylalanin gibt Abb. 9a wieder. Abb. 9b gibt die H-3-Aktivitäts-Verteilung des gleichen Chromatogramms mit einem Agfa-Sino-Film wieder.

Die Lage der H-3-Aminosäure auf dem Chromatogramm wurde mit Ninhydrin ermittelt (Abb. 9c). Um eine gute Anfärbung zu erhalten, wurde den Proben vor der chromatographischen Trennung 10-20 Gamma der betreffenden Aminosäure in inaktiver Form zugesetzt.

Im Beispiel der Abb. 9 liegt neben H-3-Phenylalanin *eine* Verunreinigung vor.

3.4.2 Quantitative Auswertung der Radiochromatogramme.

Die Maxima der Registrierstreifen wie in Abb. 9a wurden zur Ermittlung der relativen H-3-Aktivität der Maxima ausplanimetriert. Dabei wurde die Fläche als proportional zur H-3-Aktivität angenommen, und es wurde die H-3-Aktivität der einzelnen Maxima in % der gesamten H-3-Aktivität des Chromatogramms berechnet. Tabelle 3, Spalte I gibt Beispiele für zwei verschiedene H-3-Lysin-Proben wieder.

In dem Papierstreifen des Chromatogramms wird die weiche β -Strahlung des H-3 zum grösseren Teil absorbiert. Bei einer nicht homogenen Verteilung der H-3-Aktivität im Papier kann das oben beschriebene Verfahren zu Fehlern führen. Zur Kontrolle wurden deshalb nach einer Registrierung und Flächenbestimmung wie oben beschrieben, die H-3-Aktivitäten mit Sino-Film genau lokalisiert, aus dem Chromatogrammstreifen herausgeschnitten, in O₂ verbrannt und im TriCarb (Packard) gemessen. Die einzelnen H-3-Aktivitäten wurden wiederum in % der Gesamt-Aktivität ausgedrückt. Tabelle 3, Spalte II gibt zwei Ergebnisse wieder.

Ein Vergleich von Spalte I und II zeigt, dass das Verfahren unter I die relative H-3-Aktivität mit genügender Genauigkeit wiedergibt. Wegen des wesentlich geringeren Zeitaufwandes wurde im allgemeinen hiermit gearbeitet.

In den Abb. 1-6 wurde die — mit der Zeit abnehmende — relative H-3-Aktivität der untersuchten H-3-Aminosäuren aufgetragen.

3.4.3 Prüfung auf flüchtige H-3-markierte Verunreinigungen.

Die Untersuchung der gelagerten Proben auf flüchtige H-3-markierte Verbindungen steht noch am Anfang, weil sich die Lieferung des Gas-Chromatographen und der Ionisationskammer (Virus KG, Bonn) für die H-3-Aktivitätsmessung der aus der Säule austretenden Gase verzögerte, so dass erst seit Mitte Dez. 1962 gemessen werden konnte.

Zwecks Prüfung auf flüchtige H-3-markierte Verbindungen wurden aliquote Teile der gelagerten Proben 1. unmittelbar im TriCarb gemessen (Medium : 0,4 % iges PPO und 0,0015 %iges POPOP in Toluol + abs. Äthanol + zu messende Probe). Dann wurde 2. der gleiche aliquote Teil der gelagerten Probe auf Papier aufgetrocknet, verbrannt und im TriCarb gemessen. Hierzu wurden Proben mit relativ grossen Verunreinigungen verwandt, da dabei die Chance zur Auffindung von gasförmigen H-3-Verbindungen am grössten war.

Vorerst wurden Proben von 1. H-3-Phenylalanin (Lagerung in 80 %igem Aethanol, 0,1 n an HCl; 23 % H-3-markierte Verunreinigungen) und 2. H-3-Lysin (gelöst in 80 %igem Aethanol, 0,1 n an HCl) und 3. H-3-Lysin (Physiol. Kochsalzlösung) untersucht. Wegen genauerer Angaben siehe Tabelle 1. Bei den H-3-Lysin-Proben kamen H-3-Verunreinigungen zwischen 10 und 20 % vor.

Die wenigen Messungen, welche bisher durchgeführt werden konnten, zeigen, dass der Anteil flüchtiger H-3-Verbindungen an der Gesamtaktivität der gelagerten Proben nur klein sein kann. Dieses vorläufige Ergebnis bezieht sich nur auf H-3-Phenylalanin und H-3-Lysin unter den oben angegebenen Verhältnissen. Die Messungen leiden z.Zt. noch unter der Unempfindlichkeit der Ionisationskammer, welche u.U. durch Geiger-Müller-Zählrohr zu ersetzen wäre.

Abb. 1 — Radiochemische Zersetzung von H-3-Phenylalanin in Lösung

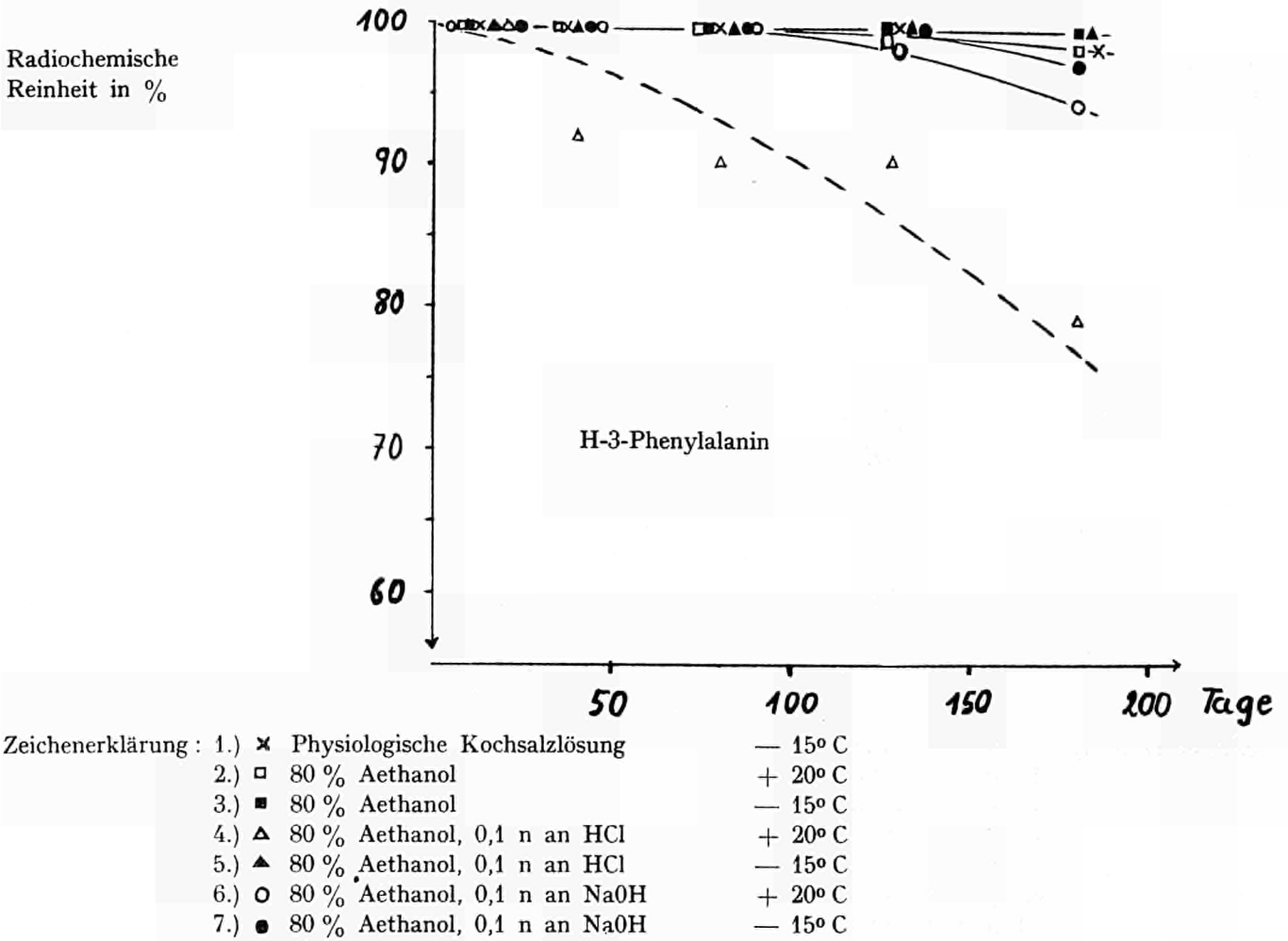


Abb. 2 — Radiochemische Zersetzung von H-3-Phenylalanin in fester Form

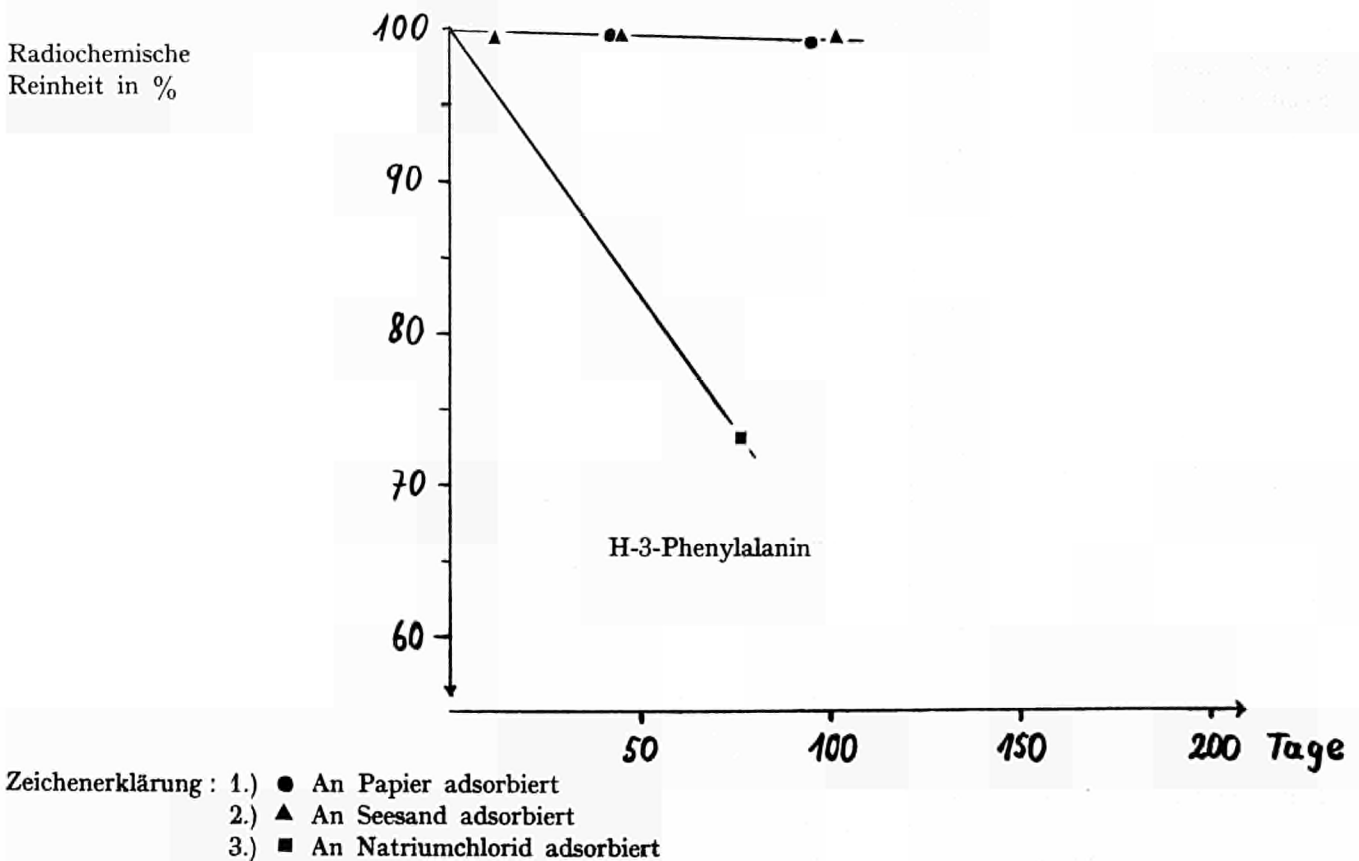


Abb. 3 — Radiochemische Zersetzung von H-3-Lysin in Lösung

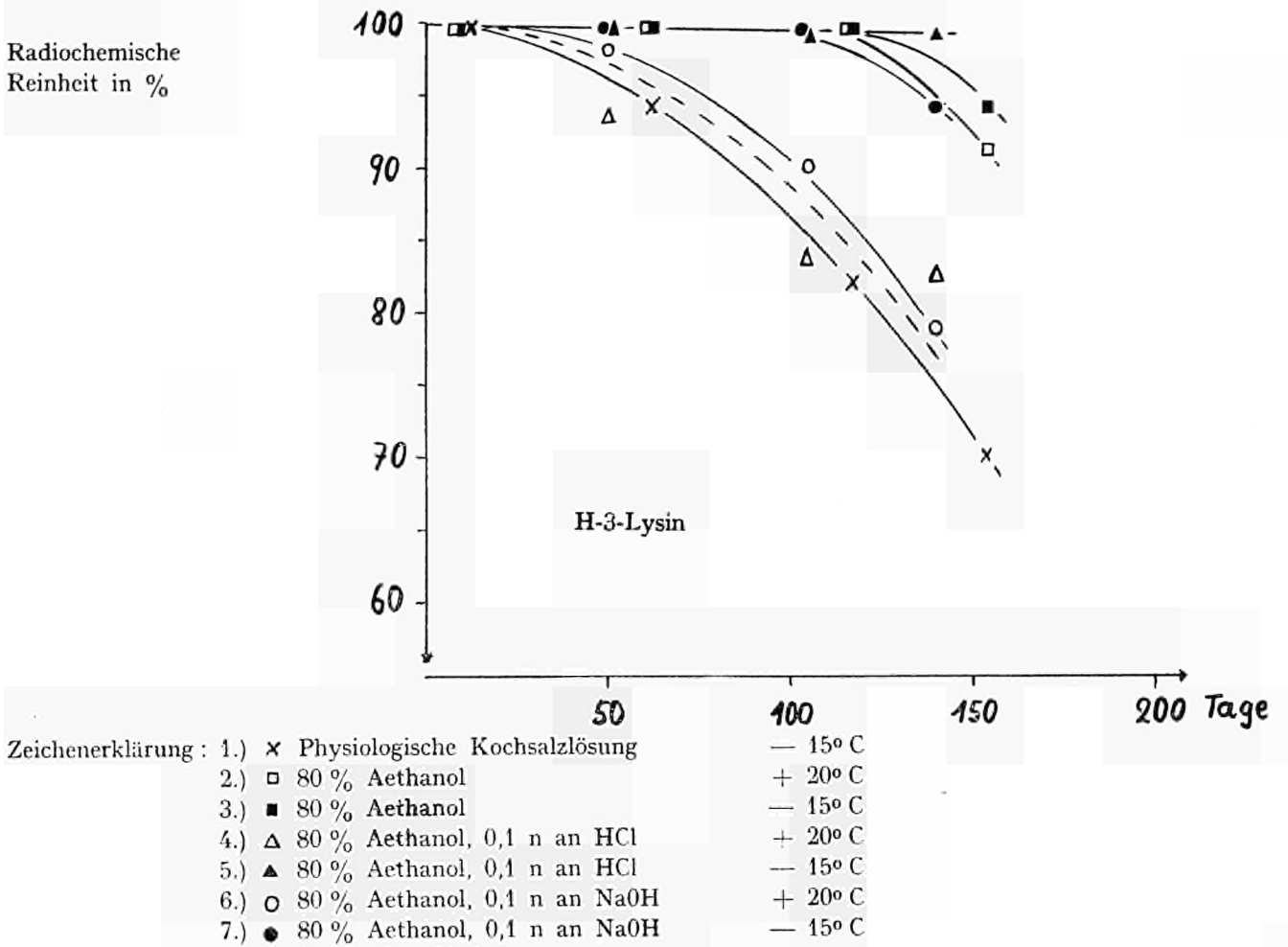


Abb. 4 — Radiochemische Zersetzung von H-3-Lysin in fester Form

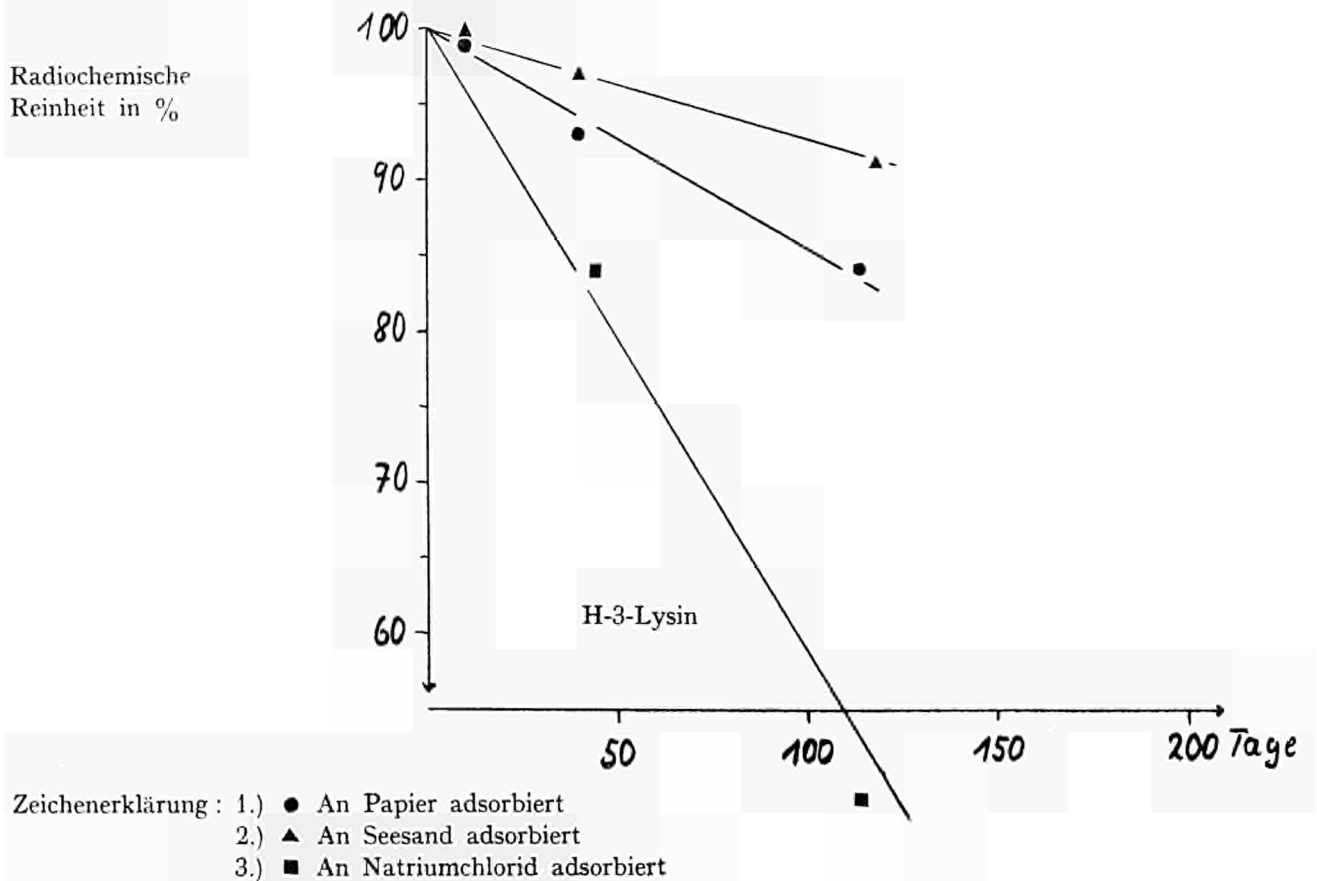
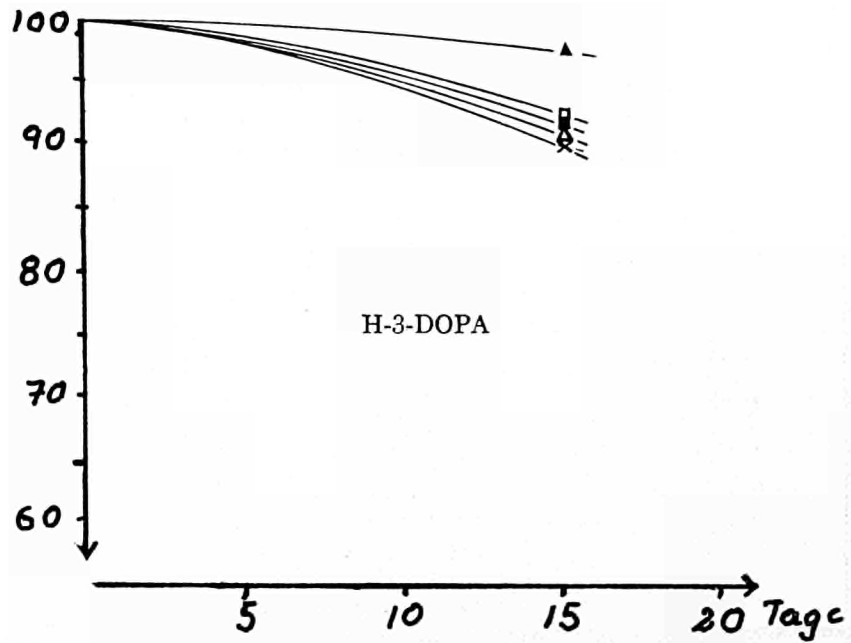


Abb. 5 — Radiochemische Zersetzung von H-3-DOPA in Lösung

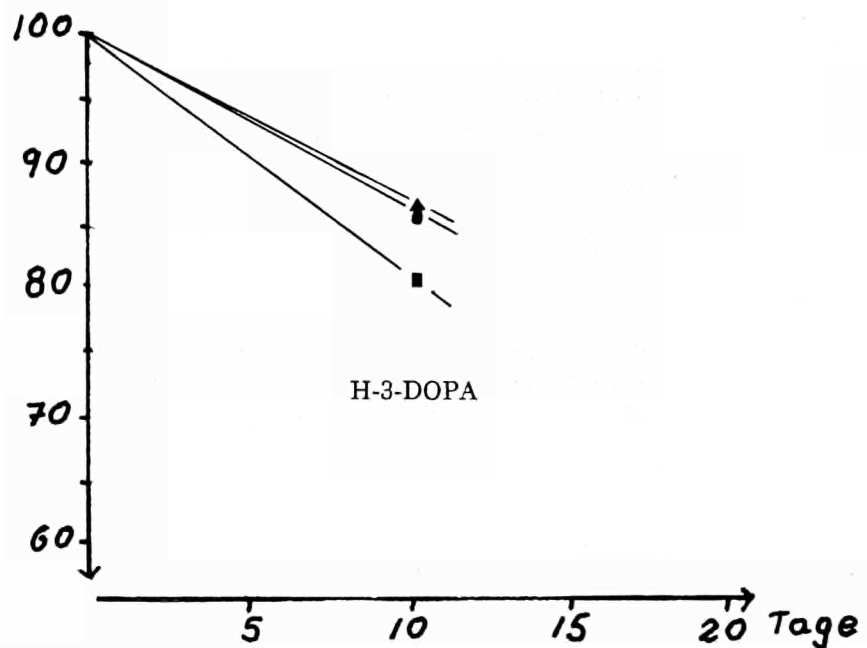
Radiochemische
Reinheit in %



Zeichenerklärung : 1.) × Physiologische Kochsalzlösung — 15° C
 2.) □ 80 % Aethanol + 20° C
 3.) ■ 80 % Aethanol — 15° C
 4.) ▲ 80 % Aethanol, 0,1 n an HCl + 20° C
 5.) ▲ 80 % Aethanol, 0,1 n an HCl — 15° C

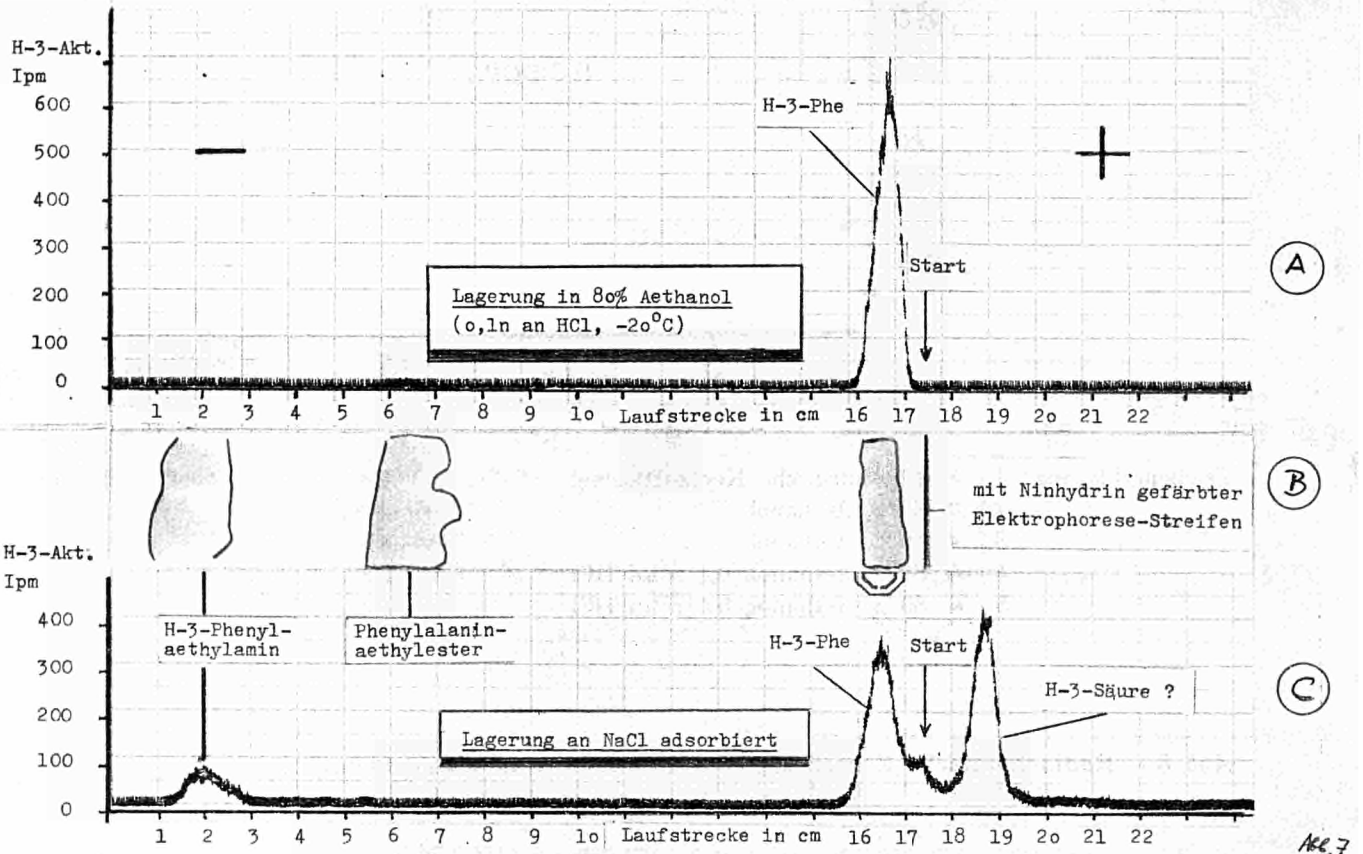
Abb. 6 — Radiochemische Zersetzung von H-3-DOPA in fester Form

Radiochemische
Reinheit in %



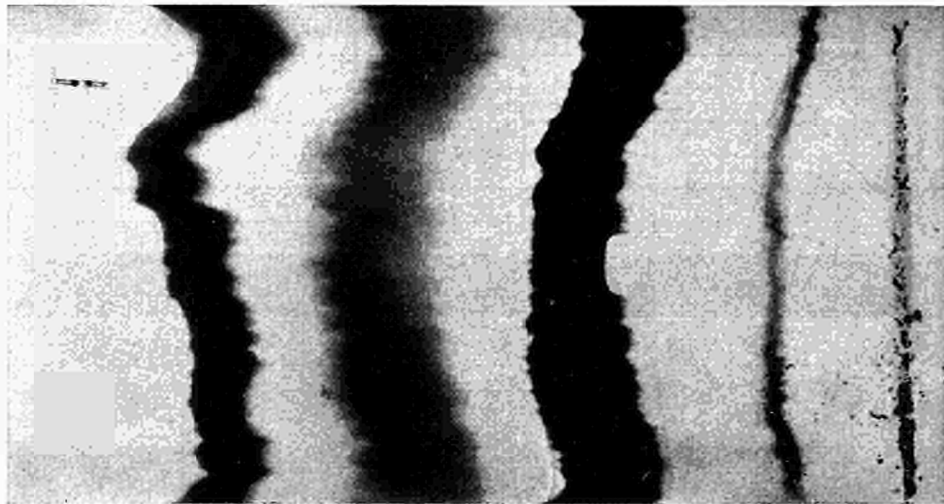
Zeichenerklärung : 1.) ● An Papier adsorbiert
 2.) ▲ An Seesand adsorbiert
 3.) ■ An Natriumchlorid adsorbiert.

Abb. 7 — Auftrennung von 2 Jahre lang gelagertem H-3-Phenylalanin durch Hochspannungselektrophorese. (Hochspannungs-Elektrophorese, Modell HSE (Virus KG, Bonn), Pyridin-Eisessig-Puffer pH 2.1, Spannung : 60 Volt/cm, Temperatur : - 8°, Dauer : 3 Stunden).



- A) Lagerung in 80 %igem Aethanol gelöst (0.1 n an HCl) bei - 20°. Verteilung der Radioaktivität über dem Elektrophorese-Streifen. Die Probe enthält nahezu keine radioaktiven Verunreinigungen.
- B) Elektrophorese-Streifen von A) nach Färbung mit Ninhydrin. Es wurden je 50/μg inaktives Phenylalanin, Phenylaethylamin und Phenylalanin-aethylester als Träger zugesetzt.
- C) Lagerung an NaCl adsorbiert bei + 20°. Verteilung der Radioaktivität über dem Elektrophorese-Streifen. Probe ist stark verunreinigt. Aus dem H-3-Phenylalanin ist während der Lagerung H-3-Phenylaethylamin und eine noch nicht näher charakterisierte Säure (H-3-Phenyllessigsäure?) entstanden.

Abb. 8 — H-3-Aktivitätsnachweis auf Papierchromatogrammen mit Sino-Film.
(Agfa A.G., Leverkusen)

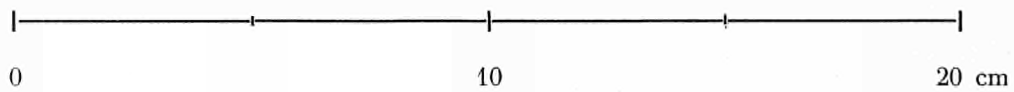


Verunreinigung

H-3-Lysin

Verunreinigung

Start



H-3-DL-Lysin (spez. Aktivität : 32 000 mC/mM)

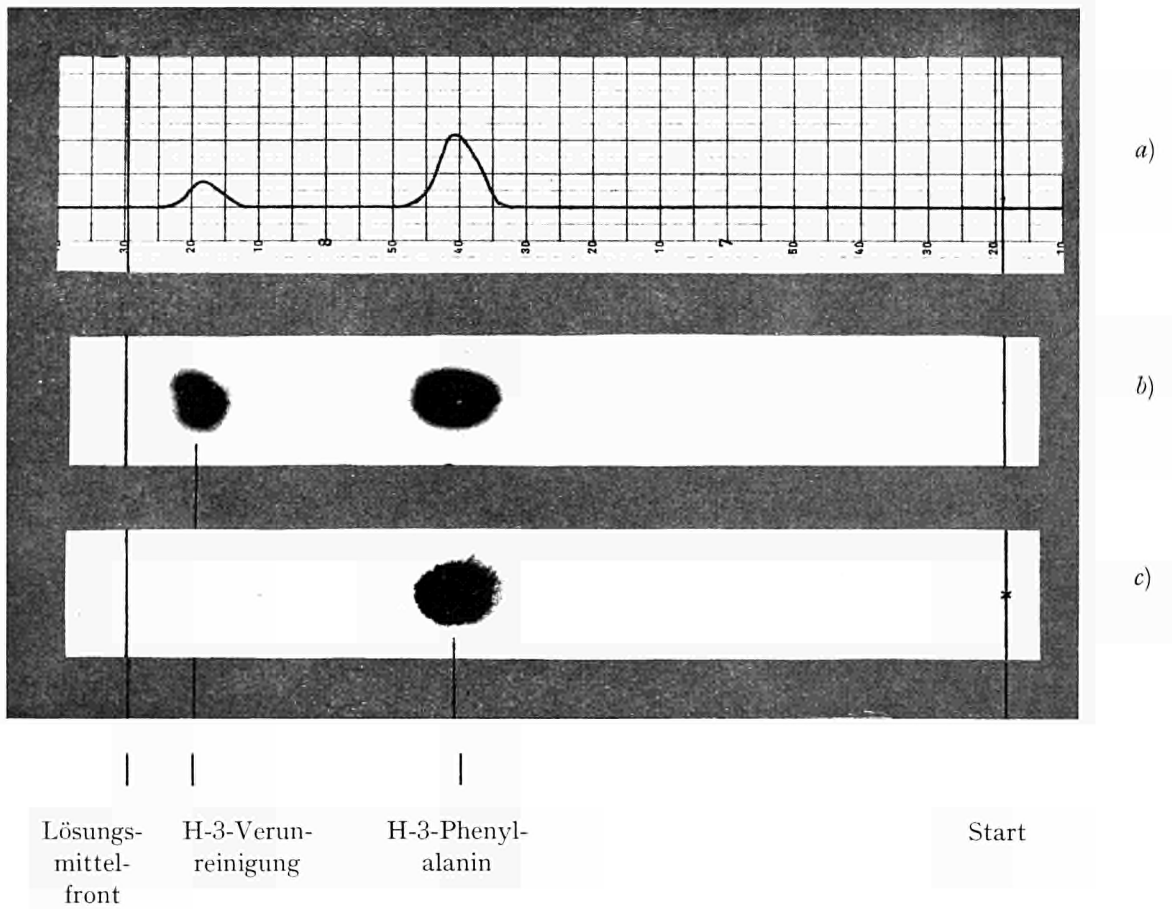
Medium : n-Butanol/Eisessig/Wasser

Laufzeit : 12 Stunden

Aktivität : 40 mC

Belichtungszeit : 15 Stunden

Abb. 9 — Papierchromatographische Reinheitskontrolle des H-3-Phenylalanins
(Lagerung in 80 % Aethanol; 0,1n an HCl; + 20° C)



a) Radiochromatogramm

b) H-3-Aktivitätsnachweis mit Sino-Film (Agfa A.G., Leverkusen)

c) Nachweis der Aminosäure mit Ninhydrin

Chromatographisches Medium : Methyl-aethylketon/Propionsäure/Wasser

Tab. 1 — Haltbarkeit H-3-markierter Aminosäuren hoher spezifischer Aktivität unter verschiedenen Lagerbedingungen.

Lagerbedingungen			Lagerfähigkeit in Tagen bis zu 1 % Verunreinigung		
Lösung	H-3-Konzentration	Temp.	Phenylalanin 8000 mC/mM	Lysin 32000mC/mM	DOPA 13500 u. 23000mC/mM
80 % Aethanol 20 % Wasser	3 mC/ml	— 15° C	130	61	1 - 2
		+ 20° C	80	61	1 - 2
80 % Aethanol 20 % Wasser 0,1 n an HCl	3 mC/ml	— 15° C	> 180	50	5
		+ 20° C	12	8	1 - 2
80 % Aethanol 20 % Wasser 0,1 n an NaOH	3 mC/ml	— 15° C	128	105	—
		+ 20° C	79	25	—
0,9 % NaCl	6 mC/ml	— 15° C	130	12	1 - 2

Feststoff	H-3-Akt. pro Gramm Feststoff	Temp.	s. oben	s. oben	s. oben
Fest an Papier adsorbiert	50 mC	+ 20° C	90	10	1 - 2
Fest an Seesand adsorbiert	15 mC	+ 20° C	102	12	1
Fest an NaCl adsorbiert	1 250 mC	+ 20° C	2 - 3	2 - 3	< 1

Tab. 2 --- Art der chromatographischen Medien für die papierchromatographische Reinigung von H-3-Aminosäuren.

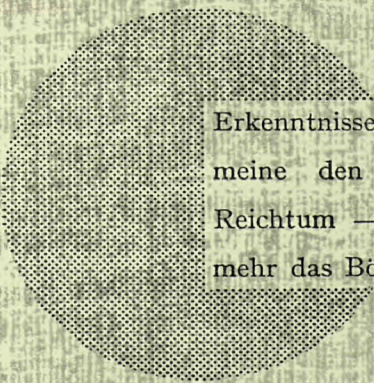
H-3-Aminosäure	Chromatographisches Medium
Phenylalanin	Methylaethylketon Propionsäure/Wasser (75:25:30)
Leucin	
Alpha-amino-adipinsäure	
DOPA	
Lysin	n-Butanol/Eisessig/Wasser (2:1:1)

Tab. 3 --- Vergleich von Aktivitätsbestimmungen zweier verschiedener Lysinproben :

1. Durch Flächenbestimmung der H-3-Aktivitätsmaxima auf Papierchromatogrammen und
2. durch TriCarb-Messungen

	H-3-Substanz	I Flächenbestimmung auf Radio- papierchromatogrammen	I H-3-Aktivität mit TriCarb
Versuch 1	Lysin	83 %	87 %
	Verunreinigung	17 %	13 %
Versuch 2	Lysin	69 %	77 %
	Verunreinigung	31 %	23 %

Gesamt-H-3-aktivität = 100 % gesetzt



Erkenntnisse verbreiten ist soviel wie Wohlstand verbreiten — ich meine den allgemeinen Wohlstand, nicht den individuellen Reichtum — denn mit dem Wohlstand verschwindet mehr und mehr das Böse, das uns aus dunkler Zeit vererbt ist.

Alfred Nobel

CDNA01828DEC

EURATOM — C.I.D.
51-53, rue Belliard
Bruxelles (Belgique)