

Synthese van radioactief gemerkte organische verbindingen *

Dr. P. Ph. H. L. OTTO

CENTRAAL LABORATORIUM TNO

Voor de bereiding van gemerkte organische verbindingen wordt hoofdzakelijk gebruik gemaakt van methoden uit de synthetische organische chemie. Er zijn echter kenmerkende facetten, die een afzonderlijke bespreking rechtvaardigen.

In het volgende zullen we ons onder meer bezighouden met: Overwegingen die aan een synthese voorafgaan en die samenhangen met: de keuze van het isotoop en de plaats in het molecuul, de specifieke activiteit en de hoeveelheid, de verkrijgbaarheid van gemerkte verbindingen en de keuze uit verschillende mogelijkheden tot synthese.

Enkele bijzondere technieken waarvan men gebruik maakt vooral bij de synthese van gemerkte verbindingen van hoge specifieke activiteit.

De beoordeling van de zuiverheid van gemerkte verbindingen. Problemen die zich voordoen bij het bewaren van gemerkte verbindingen.

Labeled organic compounds are mainly obtained by methods well-known in synthetic organic chemistry. Special features, however, justify a separate consideration. In the following attention will be paid to:

- Considerations preceding a synthesis, which are related to choice of radioisotope, specific activity and quantity, specific labeling, availability of labeled molecules and choice of synthesis.*
- Some special techniques which are used, especially for the synthesis of labeled molecules of high specific activity.*
- Determination of radiochemical purity of labeled compounds.*
- Problems connected with storage of labeled molecules.*

Inleiding

Het aantal toepassingen van radio-isotopen bij het wetenschappelijk onderzoek groeit nog voortdurend. Hiermee gaat samen een toenemende vraag naar een steeds grotere verscheidenheid aan gemerkte organische verbindingen. Reeds vele gemerkte verbindingen zijn commercieel verkrijgbaar, toch kan aan de vraag, in het bijzonder door deze verscheidenheid, slechts zeer ten dele voldaan worden; daarom is de bereiding van gemerkte verbindingen nog altijd een onderdeel van menig traceronderzoek.

Het begrip „gemerkte verbinding”

Een verbinding is gemerkt, wanneer voor een element hierin de isotopensamenstelling anders is dan de natuurlijk voorkomende samenstelling.

Nemen we b.v. een koolstofverbinding. De koolstof hierin is praktisch geheel C^{12} . Vervangen we een deel van de C^{12} door het radio-isotoop C^{14} , dan is de verbinding radioactief gemerkt. De mate van vervanging wordt gekarakteriseerd met behulp van de specifieke activiteit. Naarmate het gehalte aan C^{14} hoger wordt, neemt de specifieke activiteit naar

evenredigheid toe. Wanneer alle koolstof door C^{14} vervangen is, heeft men de theoretisch maximale specifieke activiteit bereikt.

De specifieke activiteit wordt uitgedrukt in desintegraties per tijdseenheid en per gewichtseenheid. Een praktische eenheid is de mc/mM, d.i. $3,7 \times 10^7$ d/sec per millimol.

Naarmate een radio-isotoop een kortere halfwaardetijd heeft en sneller uiteenvalt, is de theoretisch maximale specifieke activiteit hoger.

De meest gebruikte radio-isotopen

Het aantal elementen, waaruit het merendeel van de organische verbindingen is opgebouwd, is klein. De voornaamste zijn C, H, O, N, P, S, de halogenen en enkele metalen. Van twee belangrijke elementen uit deze reeks, de zuurstof en de stikstof, zijn slechts radio-isotopen van een zeer korte levensduur bekend, die daarom niet geschikt zijn voor de bereiding van een gemerkte verbinding. Van de andere elementen is in de regel niet meer dan één radio-isotoop van voldoende lange halveringstijd bekend, of althans verkrijgbaar. Van de ongeveer 1250 radioactieve nucliden, welke thans bekend zijn, worden er daarom slechts een tiental veelvuldig gebruikt voor het synthetiseren van gemerkte organische ver-

* Dit artikel verschijnt tevens in Chemisch Weekblad 1964 nr. 5

bindingen. De voornaamste staan vermeld in tabel I, tezamen met hun specifieke stralingseigenschappen. Het zijn alle zuivere β -stralers, behalve I^{131} , dat ook γ 's uitzendt. Verder is er een grote verscheidenheid in eigenschappen. De halveringstijden variëren van 8 dagen voor I^{131} tot 300.000 jaar voor Cl^{36} . Het kortst levende radio-isotoop dat men heeft kunnen inbouwen in een organisch molecuul, is C^{11} met een halveringstijd van slechts 20,5 minuten, dat een twintigtal jaren geleden gebruikt werd, toen C^{14} nog niet beschikbaar was. Verbindingen, gemerkt met langlevende isotopen (H^3 , C^{14} , Cl^{36}) kunnen in voorraad gehouden worden.

Tritium zendt β 's van de laagste maximale energie uit (0,018 MeV), C^{14} en S^{35} zenden β 's uit van ongeveer gelijke energie (0,16 MeV). P^{32} is met β 's van 1,71 MeV de hardste β -straler uit de reeks. In water is de reikwijdte voor tritium β -straling 0,01 mm, voor C^{14} 0,3 mm, voor Cl^{36} 2,2 mm en voor P^{32} 8 mm. De intensiteit van de I^{131} γ -straling wordt slechts tot de helft verminderd door een laag van 6,3 cm water. Er zijn ook grote verschillen in de verkrijgbare maximale specifieke activiteit. De theoretisch maximale specifieke activiteit wordt alleen bij het tritium verkregen. Het meest beperkt is in dit opzicht Cl^{36} . Dit hangt samen met de lange halveringstijd en met het feit dat Cl^{36} volgens een ny -reactie uit Cl^{35} bereidt wordt, waardoor het altijd met veel inactive drager verdund, verkregen wordt. Met C^{14} gemerkte verbindingen zijn over het algemeen kostbaar, wanneer hogere specifieke activiteiten gewenst worden, omdat isotoopkosten dan een rol gaan spelen.

Sinds kort is de verkrijgbare maximale specifieke activiteit van $BaC^{14}O_3$ verhoogd tot 40 mc/mM.

Behalve I^{131} is nu ook het radio-isotoop I^{125} met

een halveringstijd van 56 dagen en γ 's van 0,036 MeV verkrijgbaar.

Specifieke eisen bij de keuze van een gemerkte verbinding

Keuze van radio-isotoop

Voor sommige toepassingen is er voorkeur voor een bepaald radio-isotoop op grond van de speciale stralingseigenschappen van dat isotoop. In zulke gevallen kan van die speciale eigenschappen een bijzonder goed gebruik gemaakt worden.

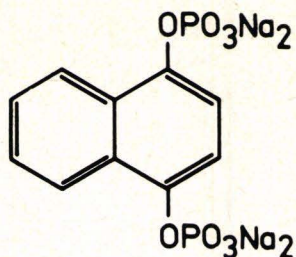
Voor autoradiografie aan weefsels maakt men met voordeel gebruik van de zachte β -straling van het tritium, waardoor fotografisch beelden van een zeer goed oplossend vermogen van details verkregen worden.

De doordringende γ -straling van met I^{131} gemerkte di-iodofluoresceïne, dat gebruikt wordt bij onderzoeken aan de hersenen, kan door de schedelwand heendringen, waardoor het mogelijk is de aanwezigheid van radio-isotoop in het lichaam te localiseren met behulp van detectoren, die zich geheel extern bevinden.

Een zeer fraai voorbeeld van een toepassing, waarbij gebruik gemaakt wordt van de speciale eigenschappen van een radio-isotoop, is de behandeling van kankergezwellen met gemerkte „synkavit” [4]. Deze verbinding wordt door het weefsel van de kwaadaardige tumoren in veel grotere concentratie opgenomen dan in normaal weefsel. De verbinding is daardoor geschikt om als drager te dienen van een therapeutische hoeveelheid radioactiviteit. De hoge specifieke activiteit die hierbij vereist is, zou zowel met tritium als met P^{32} bereikt kunnen worden. Men gebruikt echter tritium omdat tengevolge

Tabel I. De voor het bereiden van gemerkte verbindingen meest gebruikte radio-isotopen.

Isotoop	Straling	Halveringstijd	Verkrijgbare max. spec. act.	Spec. activiteit van verkrijgbare gemerkte verbindingen
H^3	β 0.018 MeV	123 a	60 c/mM H_2 > 99% H^3	$10 \cdot 10^3$ mc/mM
C^{14}	β 0.155 MeV	5568 a	25 mc/mM $BaCO_3$ 40% C^{14}	1-10 mc/mM
S^{35}	β 0.167 MeV	87 d	> 30 c/mM H_2SO_4 > 2% S^{35}	1-10 mc/mM
P^{32}	β 1.71 MeV	14.5 d	> 160 c/mM H_3PO_4 > 2% P^{32}	1-10 mc/mM
Cl^{36}	β 0.71 MeV	$3.1 \cdot 10^5$ a	72 μ c/mM HCl 0.7% Cl^{36}	—
I^{131}	β 0.61 MeV γ 0.36 MeV	8 d	> $33 \cdot 10^3$ c/mM NaI > 20% I^{131}	1-500 mc/mM



synkavit

van het geringe doordringende vermogen van de laag-energetische tritium- β -straling het effect van deze straling beperkt blijft tot de cellen, waarin de getritieerde moleculen worden opgenomen.

Specifieke activiteit en hoeveelheid

Wanneer het toepassen van een gemerkte verbinding overwogen wordt, dan rijst al spoedig de vraag: welke specifieke activiteit moet de verbinding hebben en hoeveel ervan is benodigd voor het tracerexperiment. Het antwoord hierop hangt nauw samen met de aard van het tracerexperiment en de wijze waarop dit kan worden uitgevoerd.

Het is van groot belang de verschillende variabelen — zoals de schaal waarop het experiment wordt uitgevoerd, de chemische vorm van het materiaal waaraan de metingen worden verricht en de radio-activiteitsdetector, die wordt gebruikt en tenslotte de vereiste nauwkeurigheid van de meetresultaten — zodanig op elkaar af te stemmen, dat een zo gunstig mogelijke combinatie verkregen wordt.

Te hoge eisen aan specifieke activiteit en hoeveelheid kunnen het uitvoeren van de synthese en van het tracerexperiment onnodig moeilijk en kostbaar maken. Illustreerend we dit met een schematisch voorbeeld dat aan de praktijk ontleend is.

Een verbinding A (mol. gew. 100) ondergaat een reactie in een verdunde (1%) oplossing, waarbij een reeks producten $P_1, P_2 \dots P_n$ ontstaan. Het experiment wordt uitgevoerd op de 10 ml schaal in een zeer speciale apparatuur. De producten worden langs preparatief chromatografische weg gescheiden en de opbrengst door weging bepaald. Men wil nu de invloed van de reactietijd en andere reactie-omstandigheden in een serie experimenten nagaan, waarbij men de producten die met een opbrengst van 1% gevormd worden nog kwantitatief wil bepalen. De lastige en tijdrovende preparatief chromatografische scheiding wil men vermijden, door gebruik te maken van dunnelaagchromatografie en tracers. De verdeling van de radio-activiteit over het chromatogram kan dan bepaald worden door aftasten met een detector in een speciaal daarvoor geconstrueerd apparaat (een chromatogram-scanner, fig. 6). Uit de plaats en de gemeten activiteit kent men het produkt en de opbrengst. Is de stof gemerkt met C^{14} , dan is een specifieke activiteit vereist van 1 mc/mM. De oplossing waarvan men uitgaat bevat 10 mM van stof A. Wanneer de prijs hiervan f 2.000,— per mc bedraagt, dan komen de totale isotoopkosten dus op f 20.000,— per experiment. Daar per chromatogram slechts 10 μ l oplossing nodig is, wordt van de totale hoeveelheid aanwezig radio-isotoop een zeer gering deel efficiënt gebruikt. Het is dus van belang het experiment op veel kleinere schaal uit te voeren. De besparing op isotoopkosten rechtvaardigt zeker de moeite van het oplossen van de problemen die hiermede samengaan. Kan het volume b.v. teruggebracht worden tot 1 ml, dan bedragen de totale isotoopkosten per experiment nog slechts f 200,—.

Tenslotte, wanneer het gaat om een groot aantal oriënterende experimenten, waarbij een grote nauwkeurigheid bij de kwantitatieve bepaling van de opbrengsten van de ontstane producten niet op de eerste plaats komt, dan zou men de dunnelaagchromatografie kunnen combineren met autoradiografie (fig. 7) en in het uiterste geval de vereiste specifieke activiteit terugbrengen tot 10 μ c/mM, waardoor de totale isotoopkosten kunnen dalen tot f 2,— per experiment.

De plaats van het radio-isotoop in het molecuul

Als in een molecuul meerdere atomen van het te merken element voorkomen, kunnen er eisen zijn ten aanzien van de plaats van het radio-isotoop in het molecuul. Er zijn hier verschillende mogelijkheden: de activiteit kan zich op één bepaalde plaats in het molecuul bevinden, over meerdere bepaalde plaatsen verdeeld, of verdeeld over alle plaatsen. De verdeling over de verschillende plaatsen kan gelijkmatig of ongelijkmatig zijn. Is de activiteit gelijkmatig over alle beschikbare plaatsen verdeeld, dan spreekt men van een uniform gemerkte verbinding. De eisen die men zal stellen zullen weer nauw samenhangen met de aard van het traceronderzoek, o.m. of men geïnteresseerd is in het lot van het molecuul als geheel, in een brokstuk ervan of in het lot van een bepaald atoom.

Belangrijk is hierbij altijd de „stabiliteit van de label”, d.w.z. of een bepaald radio-actief atoom onder de omstandigheden van het tracerexperiment zodanig met het molecuul verbonden is, dat de radio-activiteit representatief blijft voor het molecuul of het gewenste deel van het molecuul. We raken hiermede aan een belangrijk gebied voor de toepassing van tracers. Speciaal in biochemische systemen bestaat een voortdurende uitwisseling tussen atomen. Dit is juist uit tracerstudies gebleken. Men moet hier altijd bedacht zijn op onverwachte uitwisselingen.

Als voorbeeld vermelden wij het onderzoek met gemerkte verzadigde vetten. Om de weg van deze vetmoleculen in het organisme na te gaan, werden zij gemerkt met deuterium. Deuterium werd ingevoerd in de paraffineketens van de vetzuurresten door hydrering (deuterering) van onverzadigde vetten. De aldus gemerkte vetten bleken echter in het levend organisme snel deuterium te verliezen door uitwisseling met waterstofatomen uit water. Door verder traceronderzoek heeft men aannemelijk kunnen maken, dat er in het organisme een evenwicht bestaat tussen bepaalde verzadigde en onverzadigde vetten. Deze op zich bijzonder interessante resultaten houden echter in, dat het isotoop niet langer representatief is voor de vetmoleculen. Voor onderzoeken, waarbij men de weg van deze vetmoleculen in het organisme wil nagaan, zal men dus vetten moeten gebruiken, die op andere plaatsen gemerkt zijn.

Verkrijgbaarheid van gemerkte verbindingen

Wanneer men alle eisen betreffende het in te voeren radio-isotoop, de specifieke activiteit en hoeveelheid en eventueel de plaats van het radio-isotoop in het molecuul heeft geformuleerd, is het zaak na te gaan in hoeverre deze verbinding of een andere gemerkte verbinding die als uitgangsstof zou kunnen dienen, verkrijgbaar is.

Hiertoe bestaan verschillende mogelijkheden:

1. Door de „International Atomic Energy Agency” wordt de „International Directory of Radioisotopes” uitgegeven.

topes" uitgegeven [1]. Hierin staan alle gemerkte verbindingen vermeld, die op commerciële basis bereid worden. Op het ogenblik zijn dit een kleine 1300 C^{14} -gemerkte verbindingen, een 200 H^3 -gemerkte verbindingen en een 100 à 200 verbindingen gemerkt met respectievelijk I^{131} , P^{32} en S^{35} . Zie ook [2].

2. Sedert enige tijd bestaat er een Euratom-verzameling van gemerkte verbindingen. Het betreft hier gemerkte verbindingen die in researchlaboratoria voor eigen onderzoek gesynthetiseerd werden in een grotere hoeveelheid dan voor eigen gebruik nodig was. Deze verbindingen kan men via Euratom in Brussel ¹⁾ verkrijgen tegen betaling van een redelijke vergoeding.
3. Voor bijzondere gevallen bestaat de mogelijkheid om een verbinding, die niet te verkrijgen is, te laten synthetiseren in een daartoe speciaal ingericht laboratorium. De Isotopenafdeling van het Centraal Laboratorium TNO te Delft beschikt over een dergelijk laboratorium waar gemerkte verbindingen in opdracht kunnen worden bereid. In beperkte mate kunnen ook personen van buiten als gast worden toegelaten, om een synthese zelf uit te voeren ²⁾.

Synthetische methoden

Gemerkte verbindingen worden hoofdzakelijk bereid door middel van organisch-chemische synthese [5], [6]. Daarnaast wordt ook een beperkt aantal verbindingen verkregen volgens methoden waarbij van de energie van kernstraling gebruik gemaakt wordt, en volgens biosynthetische methoden [3].

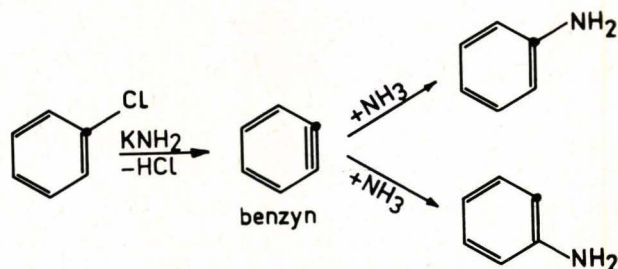
a. Bereiding door organisch-chemische synthese

Met betrekking tot de organisch-chemische synthese kan men de radio-isotopen in twee groepen indelen:

1. C^{14} , S^{35} e.d. meerwaardige elementen, welke deel uitmaken van het molecuulskelet. De invoering van deze isotopen in een molecuul betekent in de regel het uitvoeren van reacties, waarbij het molecuulskelet wordt opgebouwd. Het is vooral hier dat de grote verscheidenheid van organisch-chemische synthetische methoden tot zijn recht komt. Voor ingewikkelde moleculen kan het echter een moeizame en kostbare onderneming worden.
2. H^3 , de halogenen, éénwaardige elementen die zich als het ware aan de periferie van het molecuul bevinden. Het invoeren van deze isotopen in een molecuul komt dikwijls neer op eenvoudig een additie aan een onverzadigde verbinding of een uitwisseling van isotopen in het gereede molecuul. Soms kunnen ingewikkelde ver-

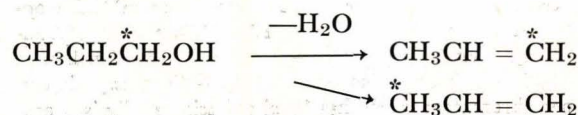
bindingen, die voor synthese niet of moeilijk toegankelijk zijn, op deze wijze met radio-isotopen gemerkt worden.

De keuze van de organisch preparatieve methode voor de gemerkte verbinding wordt door diverse factoren beïnvloed. In het algemeen streeft men er naar het radio-isotoop zoveel mogelijk in te voeren in een laatste stap van de synthese om het aantal bewerkingen met radio-actief materiaal tot een minimum te beperken en een zo hoog mogelijke opbrengst te verkrijgen t.o.v. de vaak kostbare radio-actieve uitgangsstof. Vanzelfsprekend maakt ook de gemakkelijke verkrijgbaarheid van een bepaalde gemerkte verbinding als uitgangsstof voor de synthese een belangrijk punt van overweging uit. Wil men een verbinding op een specifieke plaats gemerkt hebben, dan worden nog extra eisen aan de te volgen synthese gesteld. Vele organische reacties verlopen niet zo eenvoudig als zij op papier geschreven worden en men moet altijd bedacht zijn op uitwisseling of isomerisatie, waardoor het molecuul ook op andere plaatsen dan de bedoelde gemerkt kan worden. Hiermede komen we weer op terrein, waar op tracertechnieken met vrucht werden toegepast. Een bekend voorbeeld is de omzetting van 1-chloorbenzeen- C^{14} met kaliumamide in vloeibaar ammoniak [7]. De hierbij gevormde aniline is niet alleen gemerkt op de 1-plaats, maar ook de ortho-plaatsen zijn gemerkt, omdat intermediair benzyn gevormd wordt:



Bij de omzetting van allylchloride- C^{14} met thionylchloride hangt het van de reactieomstandigheden af of het verkregen allylchloride gemerkt is op de 1-plaats, de 3-plaats (allylomlegging), of dat de activiteit verdeeld is over de 1- en de 3-plaats [8].

Er zijn verschillende methoden voor de bereiding van propaan- C^{14} uit propanol- C^{14} [9]. Dehydratie onder invloed van verhit aluminiumoxide of metafosforzuur leidt tot een evenwichtsmengsel van 1- C^{14} -propaan-1 en 3- C^{14} -propaan-1:



Zuiver 1- C^{14} -propaan-1 kan worden verkregen door omzetting van propanol- C^{14} in het bromide met fosfor en broom, vorming hieruit van de quarternaire ammoniumbase met trimethylamine en zilveroxide en ontleding volgens Hofmann:

¹⁾ Europese Gemeenschap voor Atoomenergie (Euratom), Directoraat-generaal „Onderzoek en Onderwijs Radio-isotopen”, Belliardstraat 51-53, Brussel (België).

²⁾ Belangstellenden kunnen zich hiervoor richten tot de Isotopenafdeling van het Centraal Laboratorium TNO, postbus 71, Delft, tel. 01730-22344.

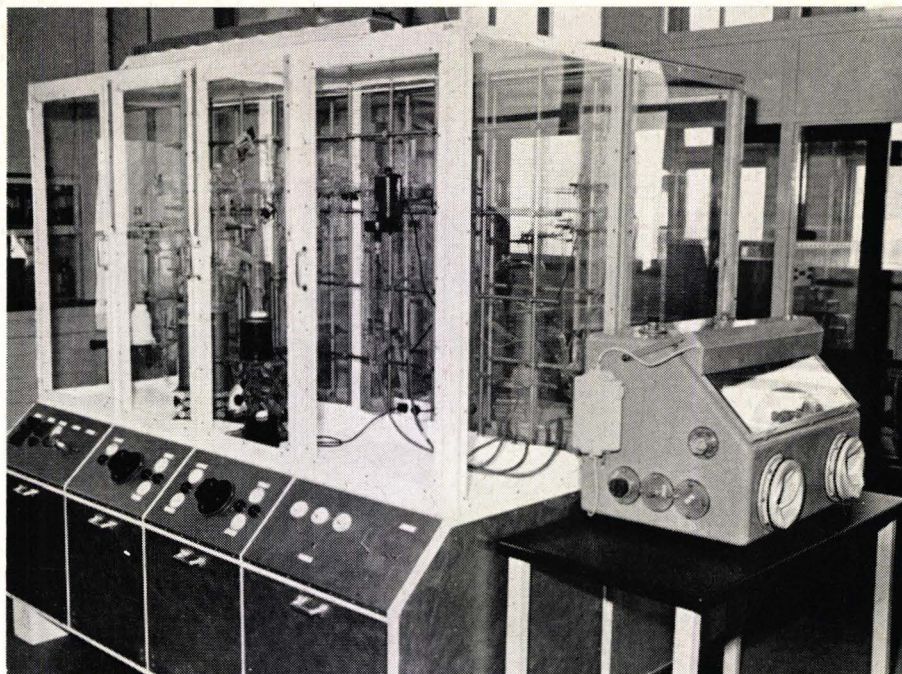
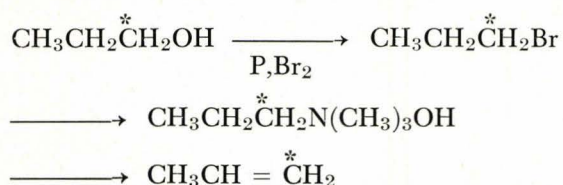
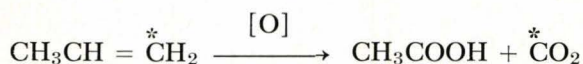


Fig. 1. Hoogvacuümapparatuur voor de synthese van gemerkte verbindingen. De vacuümapparatuur bevindt zich in een gesloten ombouw. De lucht in de ombouw wordt voortdurend afgezogen, zodat er een geringe onderdruk heerst. De bedieningen geschieden zoveel mogelijk van buiten af.



De verdeling van de activiteit over het 1-C¹⁴-propeen-1 werd aangetoond door ozonolyse, gevolgd door verdere oxidatie van de gevormde acetaldehyde en formaldehyde met permaganaat tot respectievelijk azijnzuur en CO₂:



De rechtstreekse oxidatie van 1-C¹⁴-propeen-1 met kaliumpermanganaat blijkt veel ingewikkelder te verlopen. Men treft altijd in meerdere of mindere mate, afhankelijk van de pH waarbij de oxidatie wordt uitgevoerd, activiteit aan in de methylgroep van het azijnzuur. Vermoedelijk verloopt de oxidatie voor een deel over een symmetrisch tussenproduct als isopropanol of aceton.

Het zal uit deze voorbeelden duidelijk zijn, dat niet alleen het merken van een verbinding op een bepaalde plaats, doch ook de bepaling van de plaats van een radio-isotoop in een molecuul, met de nodige omzichtigheid dient te geschieden.

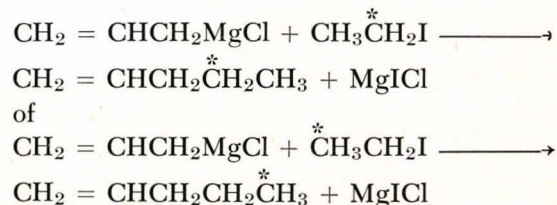
Voor de synthese van gemerkte moleculen is dus veel overgenomen van de *standaardtechnieken* uit de organische chemie. Dit geldt in het bijzonder voor de bereiding van verbindingen van zeer lage specifieke activiteit en in een betrekkelijk grote hoeveelheid (b.v. 10 g, 100 μg C¹⁴/gram).

Gemerkte verbindingen van hoge en zeer hoge specifieke activiteit worden gewoonlijk in kleine hoe-

veelheden bereid en daarbij worden semi-micro- en micro-methoden belangrijk. Voor bewerkingen met kleine hoeveelheden vluchtige verbindingen van hoge specifieke activiteit — zulke bewerkingen komen dikwijls als onderdeel van een synthese voor — zijn speciale *hoogvacuümtechnieken* ontwikkeld.

Fig. 1 geeft een overzicht van een hoogvacuüm apparatuur waarmee het mogelijk is kleine hoeveelheden vluchtige verbindingen, die met vloeibare lucht condenseerbaar zijn, in hoogvacuüm kwantitatief over te brengen van één vat in een ander. Om de diffusie te vergemakkelijken maakt men gebruik van wijde verbindingen en van het vacuüm van een kwikdiffusiepomp. In fig. 2 ziet men de opstelling voor de bereiding van methanol uit C¹⁴O₂ door reductie met LiAlH₄. De opstelling is flexibel en kan ook voor vele andere reacties gebruikt worden.

Fig. 3 geeft de opstelling voor de bereiding van gemerkt pentaen-1 uit allylmagnesiumchloride en gemerkt aethyljodide [10] volgens:



In fig. 4 tenslotte ziet men een opstelling voor hydrogeneringen met tritiumgas. Omdat tritiumgas niet met vloeibare lucht gecondenseerd kan worden, geschiedt het transport met een Töplerpomp. De verbindingsbuizen zijn nauw om het schadelijk volume zo klein mogelijk te houden.

Synthesen met radio-isotopen vragen veel voorbereiding en de reacties worden eerst herhaalde malen

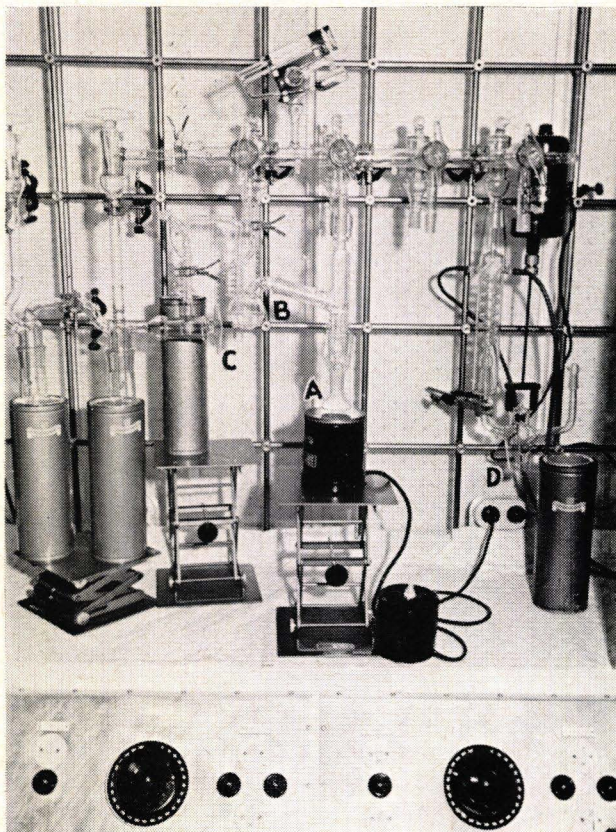


Fig. 2. Opstelling voor de bereiding van $C^{14}H_3OH$. In A wordt de $C^{14}O_2$ vrijgemaakt uit $BaC^{14}O_3$ met geconcentreerd zwavelzuur, dat men door draaien van de kolf B laat toevloeien. De ontwikkelde $C^{14}O_2$ wordt gecondenseerd in de spiraalvallen C door koelen met vloeibare lucht, daarna overgedestilleerd naar het reactievat D, waarin zich $LiAlH_4$ in een hoogkokende ether bevindt. De methanol wordt uit het gevormde methylaal vrijgemaakt door toevoegen van een hoogkokende alcohol en afgedestilleerd in vacuüm in een ampul, die kan worden afgesmolten.

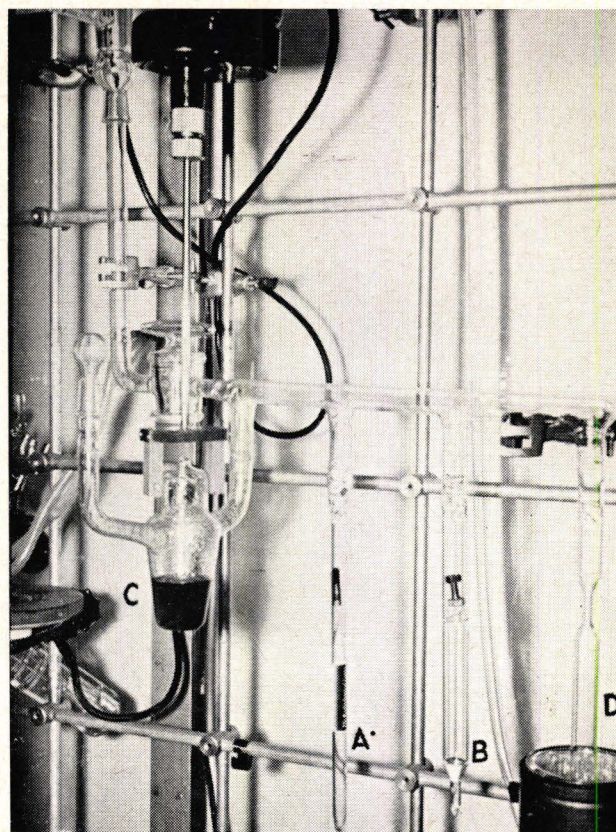


Fig. 3. Opstelling voor de bereiding van gemerkte penteen-1. De synthese wordt geheel uitgevoerd in het kleine zijstuk, dat aan het grote vacuümsysteem (fig. 2) is bevestigd. Het gemerkte aethyljodide (uit ampul A) wordt verdund met inactieve aethyljodide (uit ampul B) en gedestilleerd bij allylmagnesiumchloride in een hoogkokende ether (kolf C). Na afloop wordt het gevormde penteen-1 gecondenseerd (in ampul D) en afgesmolten.

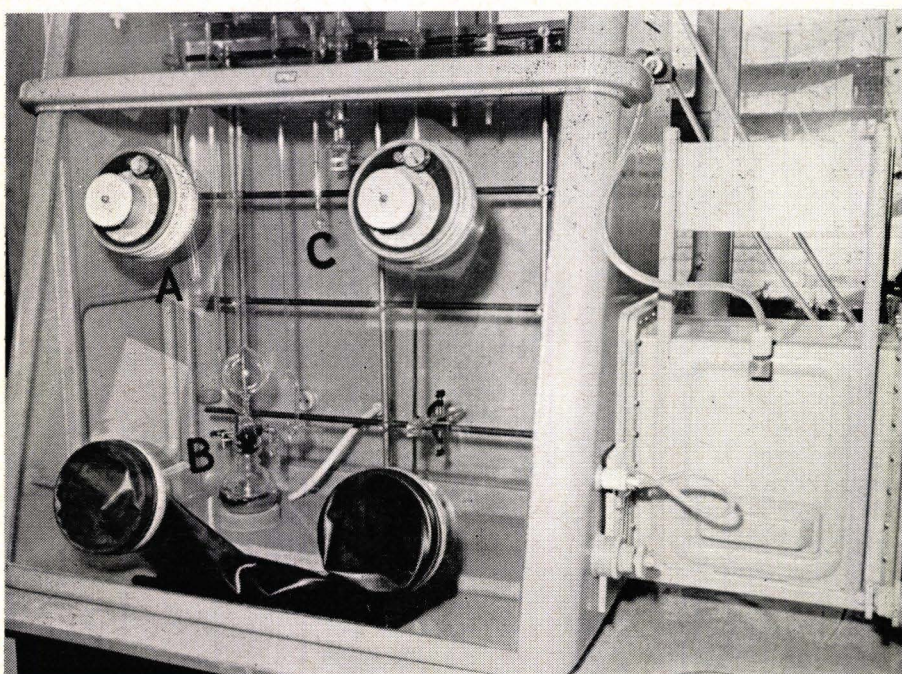


Fig. 4. Apparatuur voor hydrogeneringen met tritiumgas. Men onderscheidt de voorraadbuis met tritium (A), de Töplerpomp (B) en het reactievat (C). Het geheel is geplaatst in een luchtdicht afgesloten glove-box, waarin een geringe onderdruk wordt onderhouden.

met niet radio-actief materiaal uitgevoerd totdat men alle moeilijkheden overwonnen en voldoende vaardigheid ontwikkeld heeft.

Een handig meetinstrument voor het volgen van syntheses met radio-actieve isotopen door controle van de oplossingen op radio-activiteit is de Well-counter (fig. 5). De methode kan gemakkelijk gestandaardiseerd worden en is dan geschikt voor het bepalen van de radiochemische opbrengst en de specifieke activiteit van verbindingen gemerkt met C^{14} , S^{35} , P^{32} , I^{131} , Cl^{36} enz. De gevoeligheid voor C^{14} en S^{35} is niet groot, de onderste grens ligt bij ongeveer $1 \mu\text{C/ml}$, doch daar het bij syntheses meestal om hogere specifieke activiteiten gaat, is juist het voordeel hiervan dat men niet met inactief materiaal behoeft te verdunnen. Na afloop van de meting kan de verbinding uit de oplossing worden teruggevoerd, zodat niets van het kostbare gemerkte product verloren gaat ³⁾.

b. Synthetische methoden waarbij kernstraling een rol speelt

Bij de tritiëring volgens Wilzbach [11] wordt de chemisch zuivere verbinding in contact gebracht met tritiumgas van hoge specifieke activiteit. Onder invloed van de ioniserende straling van het tritium wordt waterstof uitgewisseld tegen tritium. Een voordeel van deze methode is, dat men zo een moeilijke synthese kan vermijden. Er ontstaan echter veel radio-actieve bijprodukten van zeer hoge specifieke activiteit. Dit is een groot nadeel van deze methode, omdat de verwijdering van deze radio-actieve bijprodukten in het algemeen een moeilijke zaak is. We zien deze methode daarom meer als noodoplossing voor het merken van verbindingen, die door synthese bijzonder moeilijk toegankelijk zijn (eiwitten, nucleïnezuren e.d.).

Gunstiger resultaten heeft men verkregen met onverzadigde verbindingen, die in goede opbrengst gehydrogeneerd worden en met jodiumhoudende verbindingen, waaruit het jodium preferent door tritium wordt vervangen.

Interessant, doch niet van praktische betekenis voor de synthese van gemerkte moleculen in het algemeen, zijn de resultaten verkregen bij bestraling van organische verbindingen met thermische neutronen in een reactor. Er is ons slechts één geval bekend waarin volgens deze methode een gemerkte verbinding met enig succes verkregen werd, d.i. de bestraling van gekristalliseerde ferroceen [12]. Hierbij wordt Fe^{58} omgezet volgens $Fe^{58} (n,\gamma) Fe^{59}$. Een neutron wordt ingevangen en een γ -kwant van ~ 8 MeV uitgezonden. Door de terugstoot bij het uitzenden van het γ -kwant krijgt het ijzeratoom een kinetische energie van ~ 600 eV, waardoor het uit het molecuulverband wordt losgeslagen (chemische bindingsenergieën zijn van de orde van 5 eV). Onder de omstandigheden van het experiment wordt uit het Fe^{59} ferroceen teruggevormd met een rendement van 20%. Dit is bijzonder hoog. In andere onderzochte gevallen bedroeg de opbrengst gewoonlijk minder dan 1% en bevond de activiteit zich



Fig. 5. Opstelling voor Well-counting.

De werkwijze is zeer eenvoudig: enkele ml's van een oplossing van de gemerkte verbinding worden in een tellflesje in de uitboring van het NaI(Tl)-kristal geplaatst. In het geval van β -stralers (C^{14} , S^{35}) is het de remstraling, die gemeten wordt. Het kristal staat in contact met een fotomultiplier, welke hier gekoppeld is met een RCL-128 kanaals analyzer voor γ -spectrometrie. Men kan echter met een veel eenvoudiger elektronische telapparatuur volstaan.

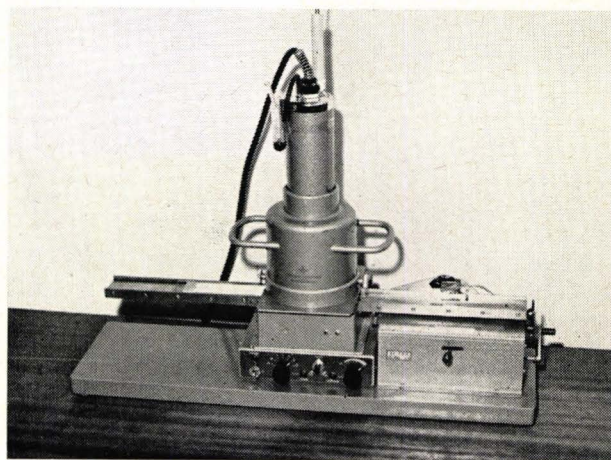


Fig. 6. Apparaat voor het geheel automatisch aftasten van dunnelaagchromatogrammen.

De glasstrip met het dunnelaagchromatogram wordt op de slede bevestigd en onder de detector doorgetrokken. De verplaatsing kan geschieden in stappen variërend van 1-5 mm, of met constante, regelbare snelheid. Bij het aftasten in stappen werkt het apparaat in combinatie met een teller (scaler) en drukker (printer), bij continu aftasten in combinatie met een telsnelheidsmeter (ratemeter) en schrijver (recorder).

³⁾ Deze toepassing van de Well-counter is ontwikkeld op het laboratorium van de heer R. Constant, Isotopenafdeling, Studiecencentrum voor de Kernenergie, Mol, België.

praktisch geheel in ongewenste en voor een deel moeilijk te verwijderen ontledingsprodukten.

c. Biosynthesen

Verschillende gemerkte verbindingen worden langs biosynthetische weg verkregen. Uniform met C^{14} gemerkte glucose en andere koolhydraten worden in bevredigende opbrengst in b.v. tabaksbladeren door fotosynthese uit $C^{14}O_2$ gevormd. Met C^{14} gemerkte vetzuren en aminozuren kunnen met behulp van algen (*Chlorella vulgaris*) verkregen worden. Van meer recente datum is de bereiding van $[Se^{75}]$ -selenomethionine en $[Se^{75}]$ -selenocystine van zeer hoge specifieke activiteit met behulp van gistcellen [13].

Voor de isolatie worden respectievelijk methionine en cystine als niet radio-actieve dragers toegevoegd. Vanwege de grote overeenkomst in vele chemische en biologische eigenschappen is $[^{75}Se]$ -selenomethionine als „tracer” voor methionine gebruikt. Vergeleken met S^{35} biedt Se^{75} het voordeel van een gemakkelijke uitwendige detectie, doordat het gamma's uitzendt [14].

Er zal echter nog veel onderzoek moeten worden verricht alvorens biologisch interessante verbindingen zoals gemerkte vitaminen, hormonen, alkaloiden e.d., waarvan de chemische synthese moeilijk te realiseren is, op bevredigende wijze langs biosynthetische weg verkregen kunnen worden. Zeer lage radiochemische opbrengsten en radiochemisch onzuivere produkten zijn kenmerkend voor zulke bereidingen.

Chemische en radiochemische zuiverheid

De zuiverheid van een gemerkte verbinding moet in twee opzichten beoordeeld worden: de chemi-

sche en de radiochemische zuiverheid.

De chemische zuiverheid geeft aan welk deel van de massa van het produkt voorkomt als massa van de gewenste verbinding. Met radiochemische zuiverheid wordt aangegeven welk deel van de radio-activiteit in het produkt voorkomt als radio-activiteit van de gewenste gemerkte verbinding. Tussen beide bestaat niet noodzakelijk een direct verband. Bijmengsels kunnen in sporen voorkomen en toch een belangrijk deel van de radioactiviteit bevatten. Deze situatie treedt steeds op, wanneer tijdens de synthese het hoofdprodukt op de een of andere wijze met inactief (drager) materiaal verdund wordt, terwijl de radio-actieve verontreinigingen en bijprodukten onverdund en dus van veel hogere specifieke activiteit blijven.

Commercieel verkrijgbare gemerkte verbindingen worden vaak in zeer hoge specifieke activiteiten bereid. Wil men zo'n verbinding gebruiken als uitgangsstof voor een synthese, die op een niveau van lagere specifieke activiteit wordt uitgevoerd, dan moet niet-radio-actieve verbinding worden toegevoegd. De specifieke activiteit van de verontreinigingen blijft hierbij echter onveranderd. Ook bij de tritiëring volgens Wiltzbach heeft men, zoals we hebben gezien, te maken met hoogactieve verontreinigingen.

Het is duidelijk dat zulke radio-actieve verontreinigingen de resultaten van een tracerexperiment kunnen beïnvloeden. Kennis omtrent de radiochemische zuiverheid van het verkregen produkt is daarom van een eerste belang.

Bepaling van fysische constanten zoals de brekings-index, smeltpunt, spectra e.d. welke afhangen van de chemische zuiverheid, geven niet noodzakelijk uitsluitsel over de radiochemische zuiverheid.

In sommige gevallen kan met voordeel een isotopenverduunningsanalyse worden toegepast. Daarnaast

Tabel II. Analyse van $[5-C^{14}]$ -pent-1-een.

Component *)	Perc. voor zuivering		Perc. na zuivering	
	Mol. % (warmte-geleidbaarheid)	% radio-activiteit **)	Mol. % (warmte-geleidbaarheid)	% radio-activiteit **)
Ethaan (etheen)	> 1,2 ***)	> 1	100	0,3 99,7
Propaan	> 0,007***)	0,02		
Propeen	> 0,11 ***)	—		
Isobutaan	≤ 0,001	0,2		
n-butaan	0,02	0,4		
Buteen	0,1	0,3		
Isopentaa	0,3	0,3		
n-pentaa	≤ 0,001	0,04		
1-penteen	79	78		
Cis-2-penteen	≤ 0,001	0,05		
2-me-buteen	≤ 0,001	0,07		
Onbekend	≤ 0,001	0,1		
Onbekend	≤ 0,001	0,07		
n-hexaan?	≤ 0,001	0,02		
1-hexeen	≤ 0,001	0,14		
Joodethaan	20	19,3		

*) De componenten zijn naar retentietijd gerangschikt. De identificatie berust uitsluitend op de overeenkomst van de retentietijd met die van de genoemde verbindingen. Voorbehoud over de identiteit is dus noodzakelijk.

**) (Activiteit comp.): (totale activiteit in monster) $\times$ 100.

***) Tijdens behandeling van het preparaat is enig verlies van de vluchtigste componenten opgetreden.

echter zijn chromatografische methoden gecombineerd met radio-activiteitsdetectie de aangewezen hulpmiddelen. Bekende combinaties zijn: papierchromatografie en dunnelaagchromatografie gevolgd door autoradiografie of scannen (aftasten van een dergelijk chromatogram met een telbuis); kolomchromatografie gecombineerd met scintillatietelling en gaschromatografie gecombineerd met radio-activiteitsmeting aan het uitstromende gas met een ionisatiekamer.

Voor de zuivering van gemerkte verbindingen komen naast de klassieke wijzen van zuiveren in het bijzonder *preparatief chromatografische methoden* in aanmerking: kolomchromatografie, preparatieve gaschromatografie en dunnelaagchromatografie en chromatografie op dik papier. Deze methoden sluiten voortreffelijk aan bij op micro- of semi-micro-schaal uitgevoerde syntheses. In tabel II vindt men gegevens over de chemische en radiochemische zuiverheid van een penteen- C^{14} monster, voor en na preparatieve gaschromatografische zuivering [10]. Uit dit voorbeeld blijkt duidelijk, van welke grote waarde de gaschromatografie voor dit soort problemen is.

In dit geval komen de verontreinigingen waarschijnlijk voornamelijk voort uit het aethyljodide- C^{14} , dat 2 jaar oud was en een niet onbelangrijke stralingsschade moet hebben ondergaan. Voor de reactie werd dit verdund met inactief aethyljodide.

Voor het aftasten van dunnelaagchromatogrammen en papierchromatogrammen is het geheel automatische scanapparaat (fig. 6) een bijzonder geschikt instrument. Tenslotte geven we in fig. 7 de resultaten van een bepaling van de zuiverheid van een verbinding van lage specifieke activiteit door middel van de combinatie dunnelaagchromatografie/autoradiografie (fig. 7A).

Het bewaren van gemerkte verbindingen Stralingsschade

Bij het bewaren van een gemerkte verbinding ontstaan er tengevolge van de radio-activiteit allerlei veranderingen in het produkt. Een deel van de radio-actieve atomen valt uiteen. Voor C^{14} is het percentage atomen dat per jaar uiteenvalt maar gering, $10^{-2}\%$ van de aanwezige C^{14} -atomen. Voor tritium is dit percentage al belangrijker: $\sim 5\%$. Een desintegrerend atoom wordt uit het molecuulverband losgerukt. De brokstukken zijn in de regel niet radio-actief, tenzij het gaat om moleculen van een zeer hoge specifieke activiteit, die op meer dan één plaats gemerkt zijn.

De ioniserende straling, die bij de desintegratie vrijkomt, wordt meestal geheel in het produkt geabsorbeerd en kan daar een aanzienlijke ontleding veroorzaken [15], [16]. Gedeeltelijk zijn de ontledingsprodukten gemerkt en vormen radiochemische onzuiverheden. De stralingsdosis, die een C^{14} -gemerk-

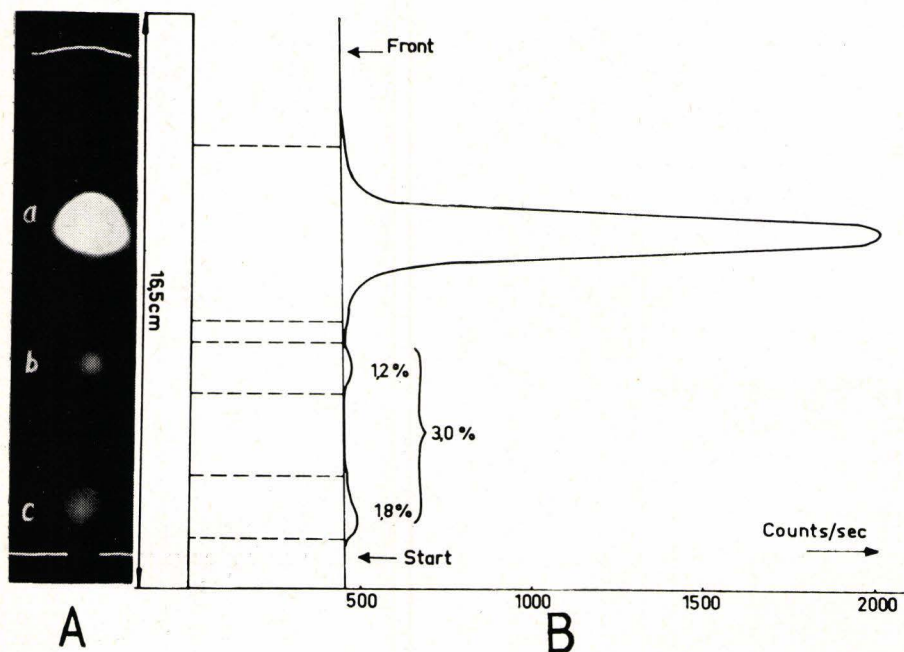


Fig. 7. Autoradiografische zuiverheidsbepaling van fenoldioxaan- C^{14} van lage specifieke activiteit (10 $m\mu c/mg$).

A. Autoradiogram op Kodak x-ray film van een dunnelaagchromatogram van het fenoldioxaan- C^{14} (contacttijd 14 dagen). Naast de hoofdvlek (a) kunnen nog twee zwakke vlekken (b en c) van verontreinigingen worden waargenomen.

B. Deze curve werd verkregen door aftasten van de film met het scanapparaat uit fig. 6, nadat het zilver op de film met I^{131} kwantitatief was omgezet in AgI^{131} , (tijdsduur benodigd voor aftasten 2 uur). De activiteit op het chromatogram was te laag om de activiteitsverdeling rechtstreeks aan het chromatogram zelf te meten.

Tabel III. Stralingsontledingscoëfficiënten.

Verbinding	Ontledingscoëfficiënt (moleculen/100 eV)
Verzadigde koolwaterstoffen	6—9
Onverzadigde koolwaterstoffen	14—2000
Aromatische koolwaterstoffen	1
Alcoholen	4—12
Ethers	7 *)
Ketonen	7 *)
Carbonzuren	5 *)
Esters	4 *)
Organische halogeniden	4
Quarternaire ammoniumzouten	5—2000
Aminozuren	2—30

*) Geschatte waarden.

te verbinding met de gangbare specifieke activiteit van 1 mc/mM gedurende een jaar ontvangt is van de orde van 10^7 rad. (bij een moleculairgewicht van 125); voor een H^3 -gemarkeerde verbinding van 100 mc/mM bedraagt de dosis $\sim 10^8$ rad. De mate van ontleding welke een dosis van 10^7 — 10^8 rad. kan veroorzaken, hangt in sterke mate af van de stralingsgevoeligheid van de verbinding en de omstandigheden waaronder deze bewaard wordt, zoals temperatuur, aanwezigheid van zuurstof, de aanwezigheid en de aard van een oplosmiddel of de aanwezigheid van een inert verdunningsmiddel, dat een groot deel van de straling kan absorberen. In sommige gevallen is ook een invloed van de kristalvorm aangetoond, zoals bij het cholinechloride, dat bij kamertemperatuur bijzonder gevoelig is voor straling, doch boven $80^\circ C$ in een andere kristalvorm overgaat en dan een normale stralingsgevoeligheid vertoont [17], [18].

Van de verschillen in stralingsgevoeligheid tussen verschillende klassen van organische verbindingen geeft tabel III (ontleend aan [16]) een indruk. Aromaten zijn het best tegen straling bestand en aromatische oplosmiddelen zoals benzeen blijken zelfs een beschermende werking te hebben op daarin opgeloste stoffen. Onverzadigde koolwaterstoffen zijn veel gevoeliger voor straling, doch ook in andere

Tabel IV. Ontleding van gemerkte verbindingen onder invloed van eigen straling. Berekende stralingsdosis 10^7 rad.

	spec. act. $\mu C/mg$	ontleding %
Valine-4,4'- C^{14} .HCl	6,0	1—2
Norvaline-3- C^{14} .HCl	17,7	5
Norleucine-2- C^{14}	17,4	2
Choline-(methyl- C^{14}).HCl	13,0	63
Calcium glycolaat-1- C^{14}	5,8	13
Calcium glycolaat-2- C^{14}	4,0	22
Cholesterol-4- C^{14}	6,5	~ 40
Glycine-2- C^{14} .HCl	4,9	< 1
Guanine-4- C^{14} .HCl	2,6	< 1
Barnsteenzuur-2- C^{14}	3,9	< 1

klassen komen uitschieters van bijzondere gevoeligheid voor, b.v. cholesterol- C^{14} en choline-(methyl- C^{14}).HCl (tabel IV, ontleend aan [15]), waarvan in een jaar ongeveer de helft ontleed werd.

Hoogst merkwaardig is tenslotte, dat cyclo-octatetraeen, een overigens zeer reactieve verbinding, een bestendigheid tegen straling zou vertonen, vergelijkbaar met die van benzeen [19].

De ervaring leert, dat radio-actief gemerkte verbindingen het best bewaard worden in dichtgesmolten ampullen onder stikstof of in vacuüm, bij lage temperatuur en opgelost in een beschermend oplosmiddel of geabsorbeerd op een vaste onderlaag. Wanneer een gemerkte verbinding lange tijd bewaard is, verdient het altijd aanbeveling, de radiochemische zuiverheid opnieuw na te gaan, alvorens de verbinding in een tracerexperiment te gebruiken.

De Isotopenafdeling van het Centraal Laboratorium TNO

Een belangrijk deel van het werk op de isotopenafdeling bestaat uit het synthetiseren van gemerkte verbindingen en het verrichten van onderzoek met behulp van radiotracers. Daarnaast doet men fysisch werk, gericht zowel op technologische toepassingen van de stralingsmeting als op het nauwkeurig en absoluut meten van radioactieve preparaten.

Voor het chemisch werk beschikt men over een uitgebreide apparatuur, in het bijzonder voor syntheses van verbindingen van hoge specifieke activiteit. Op velerlei gebied werd tracerwerk verricht. Van de onderzoeken die werden uitgevoerd of nog in bewerking zijn, kunnen worden genoemd:

- Bestudering van de uitharding van fenol-formaldehyde harsen. Hiertoe werden o.m. bereid de op specifieke plaatsen gemerkte verbindingen: 4-fenyl-1,3-dioxaan-(2- C^{14}) en 4-fenyl-1,3-dioxaan-(6- C^{14}).
- Onderzoek naar migratie in polymeren. Hiervoor werden verbindingen, die als hulpstoffen bij de kunststofbereiding worden gebruikt (weekmakers, smeermiddelen, antioxidanten), met radioisotopen gemerkt gesynthetiseerd, b.v. dioctylftalaat-(carboxyl- C^{14}).
- Bepaling van de modificatiegraad van gesubstitueerde amylose-ethers.
- Kinetisch onderzoek van copolymerisatiereacties, waarvoor gemerkte monomeren worden gesynthetiseerd.
- Kinetisch onderzoek met isotopen van uitwisselingsreacties aan polyvinylchloriden.
- Synthese van gemerkte polymeren voor de bestudering van de aantasting door schimmels.
- Bestudering van het reactiemechanisme van de katalytische omlegging van propadieën tot propyn, waarbij de katalysator met tritium gemerkt was [20].
- Synthesen van biochemisch interessante verbindingen b.v. methionine- S^{35} , 2,4-dichloorfenoxiazijnzuur-1- C^{14} , en de onlangs gereedgekomen synthese van chloramfenicol-T, waarin het tritium uitsluitend in de aromatische kern voorkomt [21].
- Synthese van C^{14} gemerkte koolwaterstoffen [10].

Literatuur

1. International Directory of Radioisotopes, 2nd. Ed. International Atomic Energy Agency, Wenen 1962.
2. The Isotope Index. Scientific Equipment Co., Publication Dept. 9, P.O. Box 19086, Indianapolis 19, Indiana U.S.A.
3. J. R. Catch: Carbon-14 compounds. Butterworths, London 1961.
4. D. H. Marrian, B. Marshal, J. S. Mitchell, I. Simon-Reuss: Symposium Tritium in the Physical and Biological Sciences. Vienne 1961, Vol. II, p. 211. The treatment of cancer by a radioactive drug.
5. M. Calvin, C. Heidelberger, J. C. Reid, B. M. Tolbert, P. E. Yankwich: Isotopic Carbon. John Wiley & Sons, Inc., New York 1949.
6. A. Murray, D. L. Williams: Organic Synthesis with Isotopes, Part I: Compounds of isotopic Carbon; Part II: Organic compounds labeled with isotopes of the halogens hydrogen, nitrogen, oxygen, phosphorus and sulfur. Interscience Publishers Ltd., London 1958.
7. J. D. Roberts, H. E. Simmons, L. A. Carlsmith, C. W. Vaughan: Rearrangement in the reaction of chlorobenzene-1- C^{14} with potassium amide. *J. Am. Chem. Soc.* **75** (1953), 3290.
8. R. F. Nystrom, J. C. Leak: Reaction of allyl alcohol-1- C^{14} . *J. Am. Chem. Soc.* **75** (1953), 3039.
- 8a. S. H. Sharman, F. F. Caserio, R. F. Nystrom, J. C. Leak, W. G. Young: Allylic Rearrangements XLIII. Some studies of the thermal decomposition of allylchlorosulfinate-1- C^{14} . *J. Am. Chem. Soc.* **80** (1958), 5965.
9. B. A. Fries, M. Calvin: Preparation of 1- C^{14} -propene-1 and the mechanism of permanganate oxidation of propene. *J. Am. Chem. Soc.* **70**, (1948), 2235.
10. P. Ph. H. L. Otto, B. van Zanten: Synthesis of pentene-1-(4- C^{14}) and pentene-1-(5- C^{14}). *Rec. trav chim.* **81**, (1962), 380.
11. K. E. Wilzbach: Tritium labeling by exposure of organic compounds to tritium gas. *J. Am. Chem. Soc.* **79**, (1957), 1013.
12. N. Sutin, R. W. Dodson: The Szilard-Chalmers reaction in ferrocene. *J. Inorg. Nucl. Chem.* **6**, (1958), 91.
13. M. Blau: Biosynthesis of (^{75}Se)-selenomethionine and (^{75}Se)-selenocystine. *Biochim. Biophys. Acta* **49**, (1961), 389-390.
14. M. Blau, M. A. Bender: Se^{75} -selenomethionine for visualization of the pancreas by isotope scanning. *Radiology*, **78** (1962), 974.
15. B. M. Tolbert, P. T. Adams, E. L. Bennett, A. M. Hughes, M. R. Kirk, R. M. Lemmon, R. M. Noller, R. Ostwald and M. Calvin: Observations on the radiation-decomposition of some C^{14} -labeled compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **75**, (1953), 1867.
16. B. M. Tolbert: Self-destruction in radioactive compounds. *Nucleonics* **18** (1960), August, 74.
17. P. Shanley, R. L. Collin: The change in radiation sensitivity of choline chloride at the phase transition. *Radiation Research* **16**, (1962), 674-678.
18. P. Shanley, R. L. Collin: The crystal structure of the high temperature form of choline chloride. *Acta Cryst.* **14**, (1961), 79.
19. L. P. Ellinger: The effect of cyclo-octatetraene on radiation-chemical reactions. *J. Appl. Chem.* **12** (1962), 387-391.
20. J. H. Parmentier, H. G. Peer, A. Schors: The isomerization of allene into methyl-acetylene in the presence of a silica catalyst: a study of the mechanism involved by using tritium-labeled catalyst. Abstracts of Congress Lectures and Scientific Papers, A1-105, IUPAC, London 1963.
21. P. Ph. H. L. Otto: Synthesis of tritiated chloramphenicol, exclusively labeled in the aromatic nucleus. Euratom Conference on methods of preparing and storing marked molecules. Brussels, November 1963.