



KERNFORSCHUNGSANLAGE JÜLICH GmbH

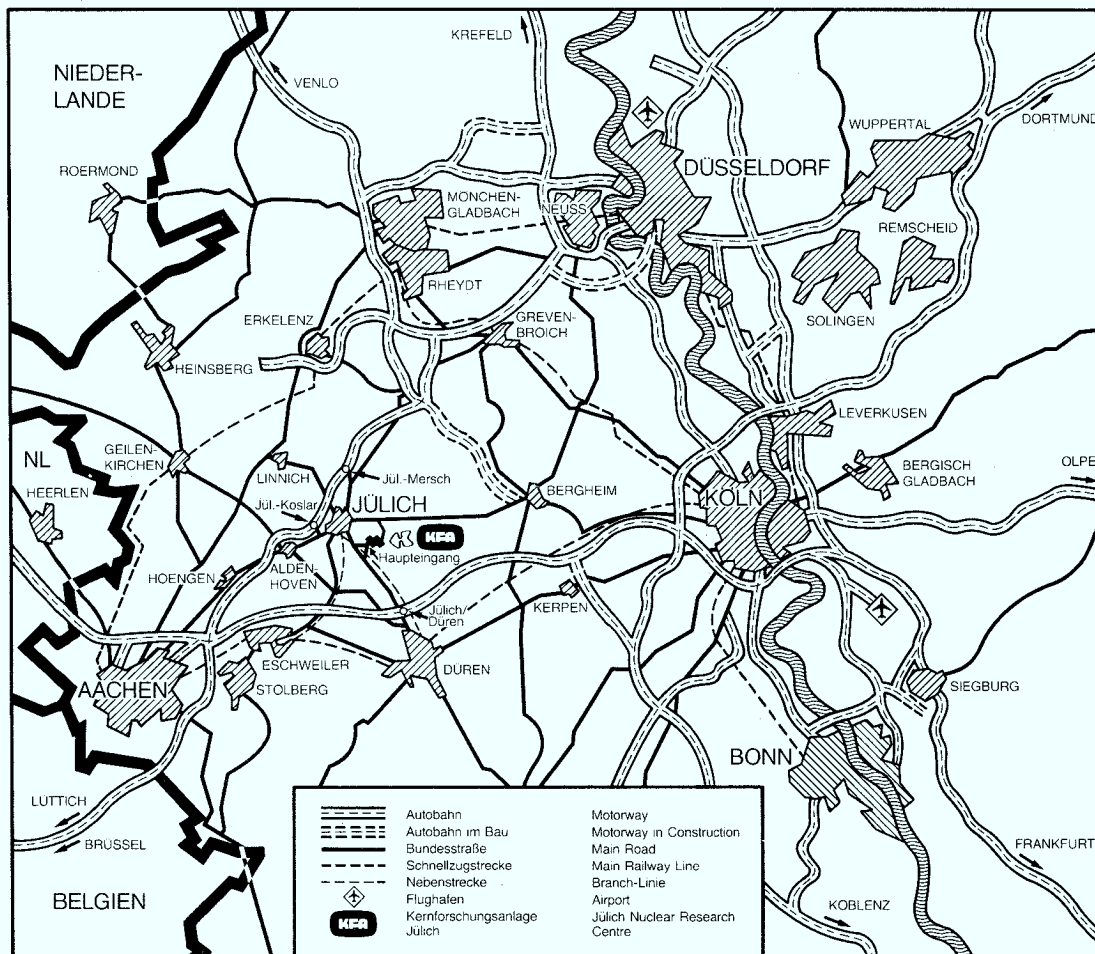
Institut für Chemie
Institut 1: Nuklearchemie

**Untersuchungen zur elektrophilen
Radiobromierung und -iodierung
aromatischer Verbindungen mit
N-Halogenverbindungen ohne Trägerzusatz**

von

G. S. Petzold

Jül - 1810
Oktober 1982
ISSN 0366-0885



Als Manuskript gedruckt

Berichte der Kernforschungsanlage Jülich — Nr. 1810

Institut für Chemie

Institut 1: Nuklearchemie Jül - 1810

Zu beziehen durch: ZENTRALBIBLIOTHEK der Kernforschungsanlage Jülich GmbH

Postfach 1913 · D-5170 Jülich (Bundesrepublik Deutschland)

Telefon: 024 61/610 · Telex: 833 556 kfa d

**Untersuchungen zur elektrophilen
Radiobromierung und -iodierung
aromatischer Verbindungen mit
N-Halogenverbindungen ohne Trägerzusatz**

von

G. S. Petzold

ABSTRACT

There is a special need for radiohalogenated compounds for diagnostic nuclear medicine, in particular for no-carrier-added (nca) short lived cyclotron products. In this study the applicability of chloramine-T (CAT) and dichloramine-T (DCT) has been demonstrated for nca-radiohalogenation with bromine-75,77 and iodine-123 in aqueous and organic solvents. Radio gaschromatography and -HPLC are used for product analysis.

In aqueous solution the optimum reaction conditions with respect to pH, concentration of CAT, reaction time and added bromide-carrier are determined using tyrosine as a model substrate. The suitability of the CAT method for radiobrominations under convenient and mild conditions is demonstrated for some biomolecules such as amino acids and nucleobases as well as for peptides and the proteins urokinase and HSA.

High radiochemical yields (up to 85%) are obtained in the case of activated aromatic systems. Studies on reactivity and selectivity of the radiohalogenation reaction in the aqueous solution show that there are different reaction mechanisms which depend on the pH of the solution. At pH 1 the reacting species are predominantly the interhalogens ICl or BrCl, whereas at pH 7 the reaction probably proceeds via the N-iodo- or N-bromosulfonamide.

Dichloramine-T is found to be a new efficient reagent for radiobromination and -iodination of aromatic compounds in various organic solvents such as acetic acid, dichloromethane or carbon-tetrachloride. A high para-selectivity is observed and the radiochemical yields (80%) are as high as in aqueous solution. A comparison of this reagent with different in-situ halogenation agents shows that DCT is superior with respect to reaction time, concentration of the reagent and thus oxidative side reactions, and ease of handling.

Another application of DCT is the radiohalogenation of olefins via electrophilic addition. The added radiohalogen species are generated in-situ from DCT and radiohalide. By choosing the appropriate solvent, the 1-halo-2-methoxy- (in methanol) or 1-halo-2-chloro- (in CH_2Cl_2) addition products are formed with such olefins as cyclohexene (70%) and tri-O-acetyl-D-glucal (75%).

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
1.1. <u>Bedeutung neutronenarmer Radionuklide in der Nuklearmedizin</u>	1
1.2. <u>Auswahlkriterien für geeignete Radiohalogenisotope</u>	3
1.3. <u>Methoden zur Radiobromierung und -iodierung von Biomolekülen</u>	6
1.4. <u>Problemstellung</u>	12
2. EXPERIMENTELLER TEIL	14
2.1. <u>Produktion der Bromisotope</u>	14
2.2. <u>Reagenzien</u>	16
2.3. <u>Chromatographie</u>	17
2.4. <u>Durchführung der Versuche</u>	17
3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION	22
3.1. <u>Zur Radiobromierung mit Chloramin-T in wässriger Phase</u>	22
3.1.1. Radiobromierung von Aminosäuren und Nukleobasen	28
3.1.2. Untersuchungen zur Selektivität	29
3.2. <u>Zum Mechanismus der Chloramin-T Methode</u>	37
3.2.1. Die Hydrolyse des Chloramin-T	38
3.2.2. Reagierende Spezies	40
3.2.3. Wichtige Nebenreaktionen	49
3.2.4. Reaktionsschema in wässriger Lösung	53
3.3. <u>Radiobromierung von Peptiden und Proteinen</u>	57
3.3.1. Markierung von Peptiden mit Radiobrom	59
3.3.2. Untersuchungen zur trägerfreien Radiobromierung von Albumin und Urokinase nach der Chloramin-T Methode	60
3.4. <u>Dichloramin-T zur Radiobromierung und -iodierung in organischen Lösungsmitteln</u>	63
3.4.1. Vorversuche zur Auswahl des organischen Lösungsmittels	63

	Seite
3.4.2. Einfluß des Lösungsmittels auf die Selektivität	65
3.4.3. Untersuchungen zur Reaktivität	67
3.4.4. Versuche mit Dichloramin-N	69
3.4.5. Vergleich von Chloramin-T und Dichloramin-T mit anderen N-Halogenderivaten zur elektrophilen Radiohalogenierung	70
3.5. <u>Weitere Anwendungen von Chloramin-T und Dichloramin-T (elektrophile Addition an Doppelbindungen)</u>	73
4. ZUSAMMENFASSUNG	76
5. LITERATURVERZEICHNIS	80

1. EINLEITUNG

1.1. Bedeutung neutronenarmer Radionuklide in der
Nuklearmedizin

Die Verwendung neutronenarmer Radionuklide, insbesondere Positronenstrahler, zur Markierung von Biomolekülen erlangt in den Lebenswissenschaften, vor allem in der Nuklearmedizin, immer größere Bedeutung [1]. Nicht nur körpereigene Wirkstoffe und ihre Vorläufer, sondern auch ihre chemischen Analoga werden zur Organdarstellung und Funktionsdiagnostik radioaktiv markiert. Für in-vivo Untersuchungen sind die physikalischen Eigenschaften der verwendeten Nuklide von besonderer Bedeutung. Es sollten keine α - oder β^- -Strahler sein, sondern möglichst EC- oder β^+ -Strahler. Die γ -Strahlung sollte die Körperbarriere durchdringen und optimal nachweisbar sein (50-300 keV). Positronenstrahler bieten außerdem die Möglichkeit der Ortsauflösung durch Nutzung der γ,γ -Koinzidenz nach Positron-Vernichtung.

Die nuklearmedizinische Funktionsdiagnostik hat besondere Bedeutung, weil mit ihrer Hilfe Stoffwechselvorgänge im lebenden Organismus nicht-invasiv erfaßt werden können. Geeignete markierte Metabolite oder ihre Analoga können beispielsweise Auskunft geben über den Energiestoffwechsel von Herz und Hirn. Da das Herz seine Energie zu etwa 60 % aus Fettsäuren gewinnt, sind zahlreiche Fettsäuren, insbesondere Radiohalogen-markierte Halogenfettsäuren, zur Darstellung und Funktionsdiagnostik des Herzens vorgeschlagen und schließlich erfolgreich klinisch angewendet worden [2-5]. Für den Energiestoffwechsel bzw. Glukosetransport des Hirns werden mit Erfolg Glukosederivate, z.B. 2- ^{18}F -2-deoxy-2-fluor-D-glukose [8,9] und 3- ^{11}C -O-methyl-D-glukose [6,7], eingesetzt. Ein weiteres Forschungsgebiet ist die Tumordarstellung. Die Darstellung von Melanomen gelang z.B. durch die Verwendung von L-3- ^{123}I - α -methyl-tyrosin, welches sich im Tumor anreichert, da es als Vorläufer bei der Melaninsynthese eingebaut wird [10,11]. Die Markierung von Antitumor-Antikörpern ist ebenfalls ein vielversprechender Versuch zur Tumordarstellung [12].

Das moderne Konzept der nuklearmedizinischen Forschung basiert auf der externen Erfassung regionaler Funktionen. Es umfaßt die wichtigsten Organe und Krankheiten, zu deren Untersuchung sogenannte Radiopharmaka eingesetzt werden können. Hierbei versucht man in neuerer Zeit, als biochemischen Ansatz markierte Metabolite, Enzyminhibitoren, rezeptorspezifische Pharmaka oder auch Antikörper-Antigen Systeme einzusetzen.

Biomoleküle sind überwiegend aus C, H, N, O, P und S Atomen aufgebaut. Die Zahl der Radioisotope dieser Elemente mit geeigneten Zerfallseigenschaften ist jedoch sehr begrenzt. Die einzig brauchbaren Positronenstrahler sind ^{11}C (T = 20 min), ^{13}N (T = 10 min), ^{15}O (T = 2,1 min) und ^{30}P (T = 2,3 min). Unter diesen "organischen" Positronenstrahlern kann ^{11}C nur dann zur Markierung komplizierter Biomoleküle verwendet werden, wenn die Markierungsprozedur innerhalb von 2-3 Halbwertszeiten abgeschlossen ist. Weiterhin ist die Anwendung auf schnelle metabolische Prozesse beschränkt, und es ist sehr schwierig, hohe spezifische Aktivitäten in der Größenordnung von einigen 100 bis 1000 Ci/mMol zu erreichen [13]. Für Rezeptorstudien oder zentralwirksame Pharmaka sind jedoch extrem hohe spezifische Aktivitäten erforderlich [14], so daß in den letzten Jahren die Verwendung halogenmarkierter Analoga immer mehr an Bedeutung zugenommen hat [1,15], da hier einfacher höhere spezifische Aktivitäten erreicht werden können.

Das Halogenatom ist in den markierten Verbindungen in den meisten Fällen ein Fremdatom, und die analoge Verbindung hat nicht notwendigerweise die gleichen biochemischen Eigenschaften. Allerdings sind auch zahlreiche Pharmaka bekannt, die Halogene enthalten, da halogenierte Verbindungen leicht herstellbare und billige Ausgangsmaterialien für die Synthese von Pharmaka sind. Halogene dienen als blockierende oder dirigierende Gruppen während der Synthese von aromatischen Arzneistoffen und verbleiben der Einfachheit halber im Molekül, wenn die pharmakologische Wirkung nicht beeinflußt wird [16]. Da Halogene mit Kohlenstoff kovalente Bindungen bilden, können sie im Prinzip auch als "organische" Radioisotope bezeichnet werden. Mit Halogenen können leicht analoge Strukturen von Biomolekülen

synthetisiert werden. So kann man z.B. ohne größere strukturelle Veränderung ein Wasserstoffatom durch Fluor und eine Methylgruppe durch Brom oder Iod ersetzen, da sie vergleichbare Größe haben. Je nach Molekulargewicht der zu markierenden Verbindung bedingt die Einführung des radioaktiven Halogenisotops eine mehr oder weniger starke Änderung der physikalischen und chemischen Eigenschaften der markierten Verbindung. Bei Verwendung dieser analogen Substanzen muß man sicherstellen, daß sie sich biochemisch ähnlich verhalten wie die unmarkierten körpereigenen Verbindungen, bzw. man muß ihr abweichendes Verhalten kennen. So kann z.B. auch die Änderung des biochemischen Verhaltens ausgenutzt werden, wie etwa bei einem blockierten Stoffwechsel, mit dessen Hilfe eine Akkumulation der analogen Verbindung im Zielorgan erreicht werden kann. Dies Konzept liegt beispielsweise bei der 2-[^{18}F]-2-deoxy-2-fluor-D-glukose vor [8].

1.2. Auswahlkriterien für geeignete Radiohalogenisotope

Unter den Halogenisotopen sind nur wenige Radionuklide, die aufgrund ihrer Zerfallseigenschaften in der Nuklearmedizin für in-vivo Untersuchungen eingesetzt werden können. Neben der geeigneten Halbwertszeit bezüglich der zu erfassenden biochemischen Vorgänge und den geeigneten externen Nachweismöglichkeiten sind die generelle Verfügbarkeit und Produktionsmöglichkeit von großer Bedeutung. Die wichtigsten Eigenschaften und Produktionsmöglichkeiten einiger neutronenarmer Halogenisotope sind in Tabelle 1 zusammengestellt. Von den aufgeführten Nukliden werden die Positronenstrahler ^{18}F und ^{75}Br in der Positronenemissionstomographie (PET) eingesetzt. Bei dieser Methode können durch Ausnutzung der Positronenvernichtungsstrahlung mit geeigneten Vieldetektoranordnungen schichtweise Organbezirke räumlich aufgelöst werden [27]. Bei Verwendung von Nukliden, die keine Positronenstrahler sind, kann die räumliche Auflösung auch dadurch erreicht werden, daß die bei der vollständigen Rotation eines Detektors quer zur Körperachse gewonnene Information in Abhängigkeit von der Position der Kamera errechnet wird. Für

Tabelle 1: Zerfallsdaten und einige Produktionsmöglichkeiten von neutronenarmen Radiohalogenisotopen für die in-vivo Funktionsdiagnostik

Nuklid	$T_{1/2}$	Zerfallsart (%)	max. β^+ -Energie	γ -Linien (keV) (% Häufigkeit)	wichtigste Produktionsreaktionen	Energie- bereich (MeV)	Literatur
^{18}F	109,7 min	β^+ (97); EC (3)	0,640 MeV	511 (193,8)	$^{20}\text{Ne}(\text{d}, \alpha)^{18}\text{F}$ $^{16}\text{O}(^3\text{He}, \text{p})^{18}\text{F}$	30 $\rightarrow$ 0 40 $\rightarrow$ 0	[17] [18]
$^{34\text{m}}\text{Cl}$	32 min	β^+ (53); IT (47)	2,49 MeV	146 (31)	$^{35}\text{Cl}(\text{p}, \text{pn})^{34\text{m}}\text{Cl}$	24 $\rightarrow$ 14	[19]
^{75}Br	101 min	β^+ (76); EC (24)	1,72 MeV	511 (151) 287 (91,6)	$^{75}\text{As}(^3\text{He}, ^3\text{n})^{75}\text{Br}$ $^{76}\text{Se}(\text{p}, 2\text{n})^{75}\text{Br}$	100 $\rightarrow$ 15 28 $\rightarrow$ 22	[21, 22] [23]
^{77}Br	56 h	β^+ (0,7); EC (99,3)	0,34 MeV	239 (22,8) 521 (22,1)	$^{75}\text{As}(\alpha, 2\text{n})^{77}\text{Br}$ $^{79,81}\text{Br}(\text{d}, \text{xn})^{77}\text{Kr} \rightarrow ^{77}\text{Br}$	38 $\rightarrow$ 15 50 $\rightarrow$ 20	[20, 22] [24]
^{123}I	13,3 h	EC (100)	-	159 (83)	$^{124}\text{Te}(\text{p}, 2\text{n})^{123}\text{I}$ $^{127}\text{I}(\text{p}, 5\text{n})^{123}\text{Xe} \rightarrow ^{123}\text{I}$	30 $\rightarrow$ 10 160 $\rightarrow$ 20	[25] [26]

diese Methode der "Single-Photon-Emissions-Computer-Tomographie" (SPECT) [28] liegt das Optimum der Ansprechwahrscheinlichkeit der verwendeten Detektoren im Bereich von 100-200 keV. ^{123}I ist mit seiner 159 keV Linie gerade für diese Methode sehr gut geeignet. ^{77}Br ist wegen seiner hochenergetischen γ -Strahlung weniger gut geeignet und kann nur mit einem Hochenergiekollimator für abbildende Messungen eingesetzt werden. Aufgrund der längeren Halbwertszeit kann es jedoch bei der Untersuchung langsamer Stoffwechselvorgänge angewendet werden.

Die Strahlenbelastung ist bei in-vivo Untersuchungen von größter Bedeutung. Die Halbwertszeiten der verwendeten Nuklide sollten deshalb hinreichend kurz sein, so daß selbst bei längeren biologischen Halbwertszeiten für einzelne Organe die absorbierte Dosis möglichst gering ist. Eine optimale γ -Energie (100-200 keV), die mit hoher Nachweisempfindlichkeit detektiert werden kann, ist ebenfalls Voraussetzung für eine niedrige Strahlenbelastung. Im Falle der Positronenstrahler ist eine geringe β^+ -Energie vorteilhaft, weil durch die kleinere Reichweite des Positrons das Auflösungsvermögen für die PET zunimmt.

Ein weiteres Kriterium bei der Auswahl eines geeigneten Nuklids sind die Markierungsmethoden. Die Möglichkeiten zur Einführung des Nuklids in die zu markierende Verbindung sind durch die chemischen Eigenschaften des Nuklids in seiner jeweiligen Oxidationsstufe vorgegeben. Es gibt zwei grundsätzlich unterschiedliche Methoden:

- Direkte Methoden, bei denen das Halogen direkt in die zu markierende Substanz eingebaut wird (Direktmarkierung),
- Konjugationsmethoden, bei denen das Halogen zunächst in ein kleines Molekül eingebaut wird, welches dann in einem weiteren Reaktionsschritt an die zu markierende Substanz angekoppelt wird.

Da das Fluor in der Reihe der Halogene eine Sonderstellung bezüglich seiner chemischen Reaktionen einnimmt, unterscheiden sich Radiofluorierungsmethoden grundsätzlich von den Methoden zur Radiobromierung und -iodierung. Im Falle von Fluor ist es wesentlich schwieriger, ohne Trägerzusatz zu arbeiten, und die radiochemischen Ausbeuten sind wegen der hohen Hydrophilie und

den Sorbtionsverlusten meist gering. Zur Radioiodierung sind zahlreiche Methoden bekannt, nach denen auch ohne Trägerzusatz gute Ausbeuten erhalten werden. Die Entwicklung von geeigneten Radiobromierungsmethoden hat erst vor einigen Jahren begonnen, da die Bromisotope für in-vivo Untersuchungen erst in den letzten Jahren mit hinreichend hoher Gesamtaktivität an Hochstrom-Kompaktzyklotronen erzeugt worden sind.

1.3. Methoden zur Radiobromierung und -iodierung von Biomolekülen

Bei der Radionuklidproduktion fällt das radioaktive Brom bzw. Iod meist als Halogenid an. Es ist deshalb zweckmäßig, zeitsparend und ausbeutesteigernd Markierungsmethoden zu entwickeln oder klassische Halogenierungsverfahren zu modifizieren, die es ermöglichen, direkt vom Halogenid auszugehen. Recht erfolgreich ist die klassische Halogenaustauschreaktion (S_N), die bei nicht isotopem Austausch ohne Trägerzusatz zu Produkten mit hohen spezifischen Aktivitäten führt [29,30]. Für die Darstellung radiohalogenierter Fettsäuren nach dieser Methode sind unterschiedliche Reaktionsbedingungen erarbeitet worden. Der Austausch läßt sich in der Schmelze [15,31], in polaren Lösungsmitteln [31-33] und in unpolaren Lösungsmitteln mit Phasentransfer-Katalysatoren [31,34] durchführen. Die nukleophile Substitution von Tosylat führte ebenfalls zu guten Markierungsergebnissen [34].

Ein anderer Syntheseweg zur Darstellung von aliphatischen Radiohalogenverbindungen ist die elektrophile Substitution an Organoboranen, wobei jedoch die Herstellung der Ausgangsverbindungen aufwendiger ist [35,36]. Einfache aliphatische Verbindungen lassen sich nach diesen Methoden mit guten radiochemischen Ausbeuten bromieren bzw. iodieren, und die erreichbaren spezifischen Aktivitäten sind recht hoch. Bei komplizierteren Molekülen, bei denen häufig ein Austausch wegen der sterischen Hinderung nur mit sehr guten Austrittsgruppen möglich ist, sind die radiochemischen Ausbeuten im allgemeinen geringer. Eine Steigerung der Ausbeute wird häufig durch Zusatz von isotopen Halogenidträger erreicht. Durch die damit verbundene Verringerung

der spezifischen Aktivität werden die Markierungsprodukte für manche in-vivo Anwendungen ungeeignet. Hohe spezifische Aktivitäten ($\gtrsim 1000$ Ci/mMol) sind generell erforderlich, wenn die markierten Verbindungen toxisch sind, oder empfindliche biochemische Gleichgewichte nicht gestört werden dürfen.

Ein Nachteil bei der Verwendung von Substanzen mit aliphatischen X-C Bindungen (X = Br, I) ist die schnelle Dehalogenierung bei in-vivo Untersuchungen. Diese biochemische Dehalogenierung ist in der Natur weit verbreitet und beruht sowohl auf enzymatischen Mechanismen als auch auf nicht enzymatischen Wechselwirkungen der Halogenverbindungen mit -SH Gruppen von freiem und protein-gebundenem Cystein [16]. Viele Untersuchungen bestätigen, daß die Stabilität der X-C Bindung in der Reihe $\text{Cl} > \text{Br} > \text{I}$ abnimmt, und daß die biochemische Stabilität bei einigen ungesättigten Verbindungen etwas höher ist [16,37]. Die Folgen sind eine relativ kurze biologische Halbwertszeit der markierten Verbindung und ein hoher Halogeniduntergrund im Blut, der sich oft störend bei der Messung auswirkt. Obwohl heute noch vorwiegend Radioiodverbindungen hergestellt und eingesetzt werden, ist die Verwendung von Bromverbindungen vorteilhafter. So sind die aliphatischen Br-C Bindungen etwas stabiler als die entsprechenden I-C Bindungen, und das im Körper freigesetzte Bromid wird nicht wie Iodid in der Schilddrüse akkumuliert [38]. Die Probleme der in-vivo und in-vitro Stabilität von radiohalogenierten Verbindungen können in der Regel umgangen werden, wenn man das Brom oder Iod durch elektrophile Substitution in aromatische Systeme einführt. Bis auf wenige Ausnahmen ist aromatisch gebundenes Brom oder Iod metabolisch stabil. Oft verhindert auch Cl, Br oder F in para Position von Phenylringen die Hydroxylierung und die darauf folgende Konjugation mit Glucuronsäure (blockierter Katabolismus). Die Dehalogenierung von Phenylringen erfolgt in-vivo, wenn überhaupt, sehr langsam [16]. Ein Beispiel für die hohe in-vivo Stabilität von aromatisch gebundenem Halogenid sind die 15-(p-Bromphenyl)-pentadekansäure und die 15-(p-Iodphenyl)-pentadekansäure. Beim Abbau der Verbindungen im Organismus wurde kein freies Bromid bzw. Iodid gefunden [5,39,40]. Auch für aromatisch gebundenes Halogenid gilt, daß die Br-C Bindung stabiler ist als die I-C Bindung. Hinzu kommt, daß für einige

aromatische Iodverbindungen (z.B. Thyronine) spezielle Enzyme (Deiodasen) zur Deiodierung bekannt sind; entsprechende Enzyme zur Debromierung sind zumindest im Säugetierorganismus nicht bekannt [41]. Der Ersatz einer Iod- durch eine analoge Bromverbindung muß im Einzelfall durch in-vitro oder Tierversuche getestet werden.

Die schnelle Expansion nuklearmedizinischer Untersuchungsmethoden in-vitro und in-vivo führte zur Entwicklung vielfältiger Markierungsmethoden, insbesondere zur Einführung von Radioiod in aromatische Systeme [42-53]. Viele Iodierungsmethoden sind speziell zur Proteinmarkierung entwickelt worden, da sich für in-vitro Untersuchungen radioiodierte Biomoleküle, vorwiegend in Radioimmunoassays, bestens bewährt haben. Für diese Zwecke werden allerdings längerlebige Strahler verwendet wie ^{125}I (T = 60 d) oder ^{131}I (T = 8 d) [54]. Die genannten Vorteile und die Entwicklung von Produktionsverfahren für die neutronenarmen Bromisotope ^{75}Br und ^{77}Br führten zu einem wachsenden Interesse an möglichst vielfältigen, schonenden und relativ schnellen Markierungsmethoden zur Einführung von Radiobrom in aromatische Verbindungen.

Für elektrophile aromatische Halogenierungen muß das Halogenid erst oxidiert werden, d.h. in elektrophile Spezies umgewandelt werden. Klassische Halogenierungsmethoden sind für eine Markierung ohne Trägerzusatz meist ungünstig oder nur nach Modifizierung anwendbar. So ist z.B. die Bromierung mit molekularem Brom, mit dem fast alle präparativen Bromierungen durchgeführt werden, ungeeignet, da nur relativ kleine spezifische Aktivitäten erhalten werden können, und die radiochemischen Ausbeuten gering sind. Aus diesem Grund sind spezielle radiochemische Methoden entwickelt worden, die es erlauben, direkt vom Halogenid auszugehen. Alle diese Methoden arbeiten nach dem gleichen Prinzip: Das Halogenid wird mit geeigneten Oxidationsmitteln in situ in eine reaktive elektrophile Spezies überführt. Diese Spezies reagiert dann in einer S_{E} -Reaktion mit dem im Reaktionsmedium gelösten Substrat. Schnelligkeit und einfache Durchführbarkeit sind die Vorteile dieser Direktmarkierungsverfahren. Folgende Methoden werden seit Jahren routinemäßig zur Radioiodierung eingesetzt:

- Chloramin-T Methode [42,43,55],
- Iodmonochlorid Methode [44,45,58],
- elektrochemische Iodierung [49-51,62] und
- enzymatische Iodierung [46,47,63,64].

Diese Methoden waren Ansatzpunkte für die Entwicklung von analogen Bromierungsmethoden (s.u.).

Die Chloramin-T Methode ist die am meisten benutzte Methode zur Radioiodierung von Proteinen. Bei ersten Versuchen zur analogen Radiobromierung wurden zwischen Bromierung und Iodierung Unterschiede festgestellt [56,57]. Die guten Ergebnisse bei der Brommarkierung von aromatischen Aminosäuren zeigen, daß eine Radiobromierung von Proteinen möglich sein sollte, und daß die Chloramin-T Methode prinzipiell für die Einführung von Radiobrom in aromatische Systeme geeignet ist [56]. Bei der Iodmonochlorid Methode wird ICl mit radioaktivem Iodid äquilibriert und mit der zu markierenden Substanz in Pufferlösung zur Reaktion gebracht. Die analoge Reaktion mit BrCl zur Radiobromierung ist in dieser Weise nicht durchführbar. Bromchlorid ist eine Verbindung, die bei Raumtemperatur in Substanz instabil ist und nur im Gleichgewicht mit größeren Mengen Cl_2 und Br_2 spektroskopisch nachgewiesen werden konnte [74]. Es wurde jedoch versucht, Radiobromid in einem geeigneten Lösungsmittel mit Cl_2 in situ zu BrCl zu oxidieren. Diese Oxidation wurde bisher in Äthanol [59] und stark saurer, wässriger Lösung [60,61] durchgeführt, jedoch ohne den Nachweis zu erbringen, daß tatsächlich BrCl gebildet wurde.

Über elektrochemische Radiobromierungen sind bisher keine Ergebnisse veröffentlicht worden, obwohl die elektrochemische Radioiodierung recht gute Ergebnisse zeigte.

Die enzymatische Radioiodierung wurde vorwiegend mit Lactoperoxidase durchgeführt. Es ist jedoch aufgrund des Oxidationspotentials nicht möglich, mit diesem Enzym Bromid zu oxidieren. Geeignete Peroxidasen mit höherem Oxidationspotential sind Chloroperoxidase, Bromoperoxidase und Myeloperoxidase. Mit diesen Enzymen wurden gute radiochemische Ausbeuten erhalten [47,57,65]; sie werden jedoch noch nicht routinemäßig eingesetzt. Dies liegt an der aufwendigen Markierungstechnik, die nur für

die Proteinmarkierung gerechtfertigt scheint und an der mangelnden Verfügbarkeit der Enzyme.

Neben diesen Methoden, die vorwiegend zur Proteinmarkierung angewendet werden, ist noch ein anderes nicht-spezifisches Direktmarkierungsverfahren bekannt, die Exponiermethode (excitation labelling) [52,53,71-73]. Bei dieser radiochemischen Methode wird ein Vorläufer des benötigten Isotops mit der zu markierenden Substanz in Kontakt gebracht, im Fall von ^{123}I wird beispielsweise der Vorläufer ^{123}Xe aufgefroren. Die durch den Zerfall entstehenden reaktiven Ionen oder Atome reagieren mit dem Substrat in verschiedenartigen Substitutionsprozessen. Wenn auch in einigen Fällen von guten radiochemischen Ausbeuten berichtet wurde [52], so scheiterte die Methode im allgemeinen jedoch an den kleinen Ausbeuten und der unspezifischen Markierung.

Während für die Proteinmarkierung frühzeitig Markierungsmethoden entwickelt worden waren, setzte die Entwicklung von speziellen Markierungsmethoden für aromatische Radiopharmaka erst viel später ein. Sofern die Substanzen wasserlöslich waren, konnten sie nach den bekannten Methoden markiert werden [75-77]. Substanzen, die sich nur in organischen Lösungsmitteln lösten, wurden zunächst mit geträgertem I_2 oder Br_2 radiohalogeniert. Die radiochemischen Ausbeuten waren gering und die spezifische Aktivität sehr niedrig [78-80].

Die Entwicklung von Markierungsmethoden in organischen Lösungsmitteln brachte eine deutliche Steigerung der radiochemischen Ausbeute, und durch das Arbeiten ohne Trägerzusatz konnten wesentlich höhere spezifische Aktivitäten erreicht werden [68]. Für die in situ Oxidation von Br^- bzw. I^- in organischen Lösungsmitteln werden folgende Reagenzien eingesetzt:

- N-Chlortetrafluorsuccinimid (NCTFS) [33,66-68],
- N-Chlorsuccinimid (NCS) [66,69] und
- Hypohalite wie $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{Cl}(\text{Br})$ und $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{Cl}(\text{Br})$ [70].

Bis auf wenige Ausnahmen [68,5] sind die meisten Reagenzien bisher nur an Modellsubstanzen (monosubstituierte Benzole) erprobt worden, und der Mechanismus der Reaktionen ist noch nicht eindeutig geklärt. Das Spektrum geeigneter Lösungsmittel ist

begrenzt und vergleichende Arbeiten, die die Möglichkeiten und Grenzen der einzelnen Reagenzien aufzeigen, haben erst begonnen [66,70]. Mögliche Nebenreaktionen der Reagenzien sind noch wenig untersucht, so daß die Markierung komplizierterer Moleküle eine genaue Optimierung der Reaktionsparameter erfordert.

Enthält ein aromatisches System mehrere Angriffspunkte für Elektrophile, so erhält man bei der Anwendung dieser Methoden verschiedene Isomere der radiohalogenierten Verbindung. In gewissen Grenzen läßt sich die Isomerenverteilung durch Lösungsmittel beeinflussen, und oft ist aus sterischen Gründen oder durch Substituenteneffekte eine Position bevorzugt. Die meisten Isomeren lassen sich jedoch schnell chromatographisch, z.B. mit Hilfe der HPLC, trennen, so daß die unerwünschten Isomeren als Nebenprodukte betrachtet werden können, die allerdings die radiochemische Ausbeute des gewünschten Produkts verringern.

In jüngster Zeit sind einige regiospezifische Methoden zur Radiohalogenierung von Aromaten angewendet worden; so z.B. die Zersetzung von Triazenen in Anwesenheit von Radiohalogenid [81,82] oder die elektrophile Substitution an Aryl-Bor-Verbindungen [36] und Aryl-Zinn-Verbindungen [83]. Bisher liegen nur wenige Ergebnisse vor, und es ist noch nicht absehbar, welche Bedeutung diese regiospezifischen Methoden erlangen werden. Nachteilig ist bei diesen Methoden der hohe präparative Aufwand zur Darstellung der Ausgangsverbindungen. Außerdem ist die Anwendung, insbesondere der metallorganischen Verbindungen, begrenzt, da von vielen Substanzen die erforderlichen Bor- bzw. Zinnverbindungen nicht hergestellt werden können. Diese präparativ aufwendigen Methoden sind eine wertvolle Alternative zu den nicht regiospezifischen Verfahren, wenn die gewünschten Markierungsprodukte auf einfachem Weg durch die direkte H-Substitution nicht erhalten werden können, die radiochemischen Ausbeuten zu niedrig sind, oder stereo- und regiospezifische Produkte anders nicht herstellbar sind.

1.4. Problemstellung

Iod-123 ($T = 13,3$ h) und Brom-75 ($T = 1,6$ h) markierte Biomoleküle spielen in der nuklearmedizinischen in-vivo Funktionsdiagnostik eine zunehmende Rolle. Hier sind relativ schnelle und trägerlose Halogenierungsverfahren erforderlich, die vor allem im Falle der Bromierung nicht in ausreichendem Maße vorliegen. Dies gilt insbesondere für aromatische Halogenierungen und für Methoden der Einführung von Radiobrom in Proteine. Es sollten deshalb in der Literatur beschriebene Radioiodierungsmethoden auf ihre Anwendbarkeit, insbesondere für trägerfreie Radiobromierungen, ausgehend vom Radiobromid, untersucht und ggf. modifiziert und optimiert werden. Dabei sollte experimentell geprüft werden, ob sich in situ Oxidationsverfahren unter Verwendung von N-Halogenverbindungen, wie z.B. Chloramin-T, auch zur Radiobromierung aromatischer Biomoleküle eignen.

An monosubstituierten Benzolen sollten Reaktivität und Selektivität der Chloramin-T Methode ermittelt und Untersuchungen zum Mechanismus der Bromierung durchgeführt werden. Von der Aufklärung des Reaktionsmechanismus wurden grundlegende Erkenntnisse über mögliche Nebenreaktionen und/oder Hinweise zur Modifizierung der Methode erwartet mit dem Ziel, neue Halogenierungsreagenzien und Anwendungsmöglichkeiten zu erschließen. In Analogie zur elektrophilen aromatischen Bromierung sollte auch die Anwendbarkeit der Methode auf die Radiobromierung von Olefinen an einem Modellsystem erprobt werden.

Schließlich sollten mit verschiedenen N-Halogenverbindungen wie Dichloramin-T und Halogensuccinimiden Untersuchungen im Hinblick auf ihre Reaktivität und Selektivität bei der Radiobromierung und -iodierung durchgeführt werden mit dem Ziel der Ausbeuteoptimierung im Vergleich zu den aus der Literatur bekannten regiospezifischen Halogenierungsmethoden.

Aus Arbeiten über Radioiodierungen von Proteinen mit Chloramin-T ist bekannt, daß bevorzugt Tyrosin markiert wird. Es sollten deshalb am Tyrosin als Modells substanz zunächst die Parameter für die Radiobromierung mit Chloramin-T optimiert werden. Bei dieser Untersuchung sollte die Abhängigkeit der radiochemischen

Ausbeute vom pH-Wert, der Reagenzkonzentration, der Reaktionszeit und vom Trägerzusatz bestimmt werden. Die Anwendung dieser Markierungsmethode ohne Trägerzusatz sollte an weiteren Aminosäuren sowie an einigen Nukleobasen erprobt werden. Es sollten schließlich einige Peptide und auch Proteine unter den geeigneten Bedingungen ohne Trägerzusatz radiobromiert werden.

Zur Identifizierung, Reinigung und Überprüfung der spezifischen Aktivität der Reaktionsprodukte sollten radiochromatographische Methoden, insbesondere der Hochdruckflüssigkeitschromatographie und der Gaschromatographie, ausgearbeitet werden.

2. EXPERIMENTELLER TEIL

2.1. Produktion der Bromisotope

Die meisten Untersuchungen sind mit dem längerlebigen ^{77}Br ($T = 56 \text{ h}$) durchgeführt worden. Das Radioisotop wurde über den $^{75}\text{As}(\alpha, 2n)^{77}\text{Br}$ -Prozeß erzeugt [21]. Als Targetmaterial wurde eine Cu-As-Legierung (Cu_3As) mit ca. 30 Gew.% Arsen verwendet [22]. Diese Verbindung hat einen hohen Schmelzpunkt und eine relativ hohe Wärmeleitfähigkeit, beides gute Eigenschaften für die Bestrahlung mit einer hohen Strahlstromdichte. Durch Aufschmelzen der Cu_3As -Schicht auf eine Kupferscheibe wurde eine gute Wärmeleitung erreicht. Die gewünschte Verbindung wurde durch Zusammenschmelzen der pulverisierten Ausgangselemente bei 900°C in einer Schutzgasatmosphäre hergestellt. Die Schmelze wurde in zylindrische Formen gegossen und in dünne Scheiben geschnitten. Diese wurden auf 1 mm starke Kupferplatten aufgeschmolzen. Die Cu_3As -Schicht wird auf $110 \mu\text{m}$ abgeschliffen, da bei größeren Dicken ^{77}Br -Verluste durch Abdampfen aufgrund lokaler Überhitzungen auftraten. Die Targetscheiben wurden versilbert ($<0,5 \mu\text{m}$), in eine Targethalterung zum Strahl hin offen eingespannt und von der Rückseite mit Wasser gekühlt (Abb. 1). Die

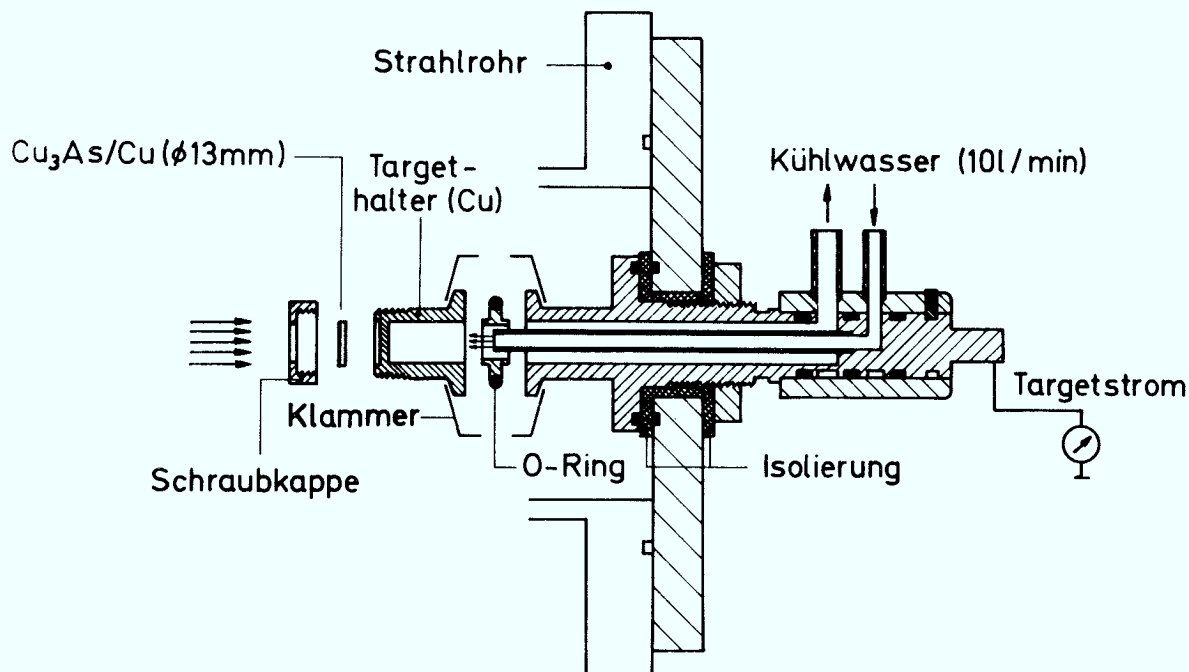


Abb. 1 Schematische Darstellung des Targets für die externe Bestrahlung von Cu_3As zur Produktion von $^{75,77}\text{Br}$ (nach [22])

Silberschicht verhindert einen Diffusionsverlust von Radiobrom im Hochvakuumsystem des Strahlrohres.

Bestrahlt wurde am Kompaktzyklotron CV 28 mit 28 MeV α -Teilchen. Bei externer Bestrahlung wurde mit Strahlströmen von 30 μ A ca. 6 Stunden bestrahlt, wodurch eine Ausbeute von ca. 15 mCi (Bestrahlungsende) erhalten wird. Das gebildete ^{77}Br liegt in einer Radionuklidreinheit von >99 % vor. Die Isolierung des ^{77}Br erfolgt ohne Trägerzusatz durch trockene Destillation bei $\sim 950^\circ\text{C}$. Wegen der relativ hohen γ -Aktivitäten mußte diese Abtrennung unter Fernbedienung in einer Bleizelle erfolgen. Hierzu diente eine automatisierte Apparatur [22], die in Abb. 2 dargestellt ist. Die bestrahlte Targetscheibe wird von der

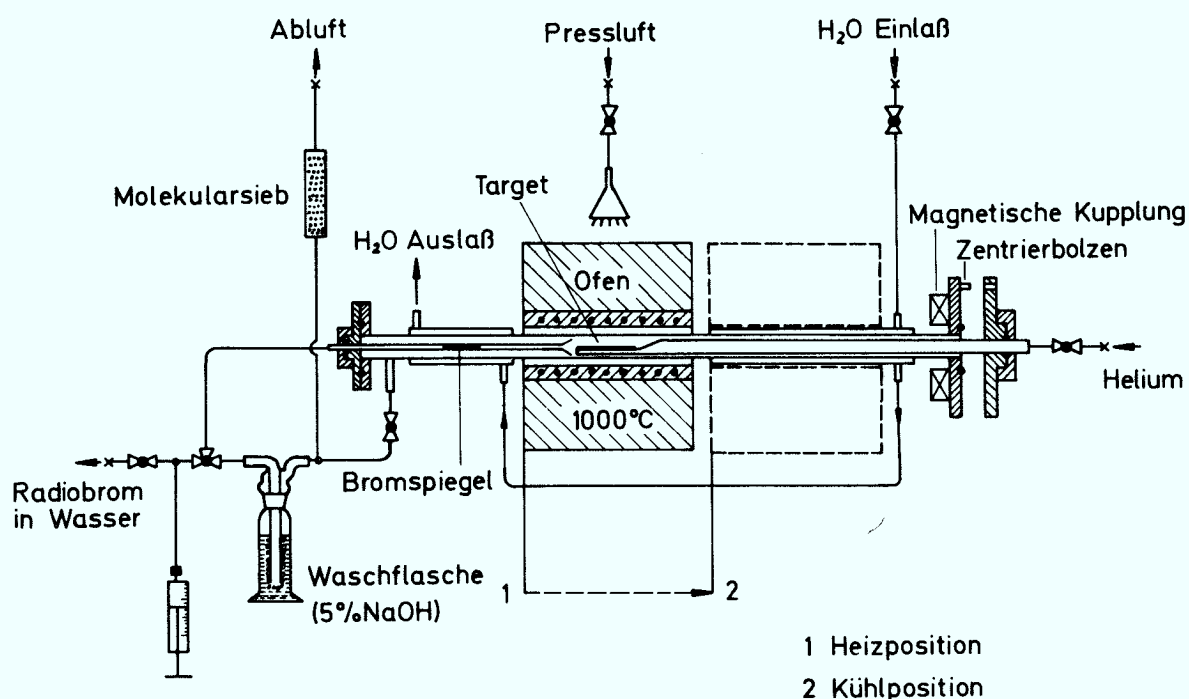


Abb. 2 Automatisierte Apparatur zur trockenen Destillation von $^{75,77}\text{Br}$ aus Cu_3As (nach [22])

rechten Seite in die Mitte des Ofens geschoben. Der Ofen wird magnetisch geschlossen, ein Heliumgasstrom wird durch das System geleitet und die Wasserkühlung wird eingeschaltet. In der Heizposition (Position 1) ist innerhalb von 18 Minuten eine Temperatur von 1000°C erreicht. Das Radiobrom wird durch den Heliumstrom transportiert und kondensiert im kühleren Teil des inneren Quarzrohres (Bromspiegel). Arsen und Selen werden

schlecht transportiert und kondensieren am Ende des Quarzrohres in der Nähe des Ofens. Kupfer und Silber werden nicht transportiert. Nach Beendigung des Ausheizvorganges (Thermochromatographie) wird der Ofen in die Kühlposition (Position 2) gefahren, und der heiße Zylinder wird mit Pressluft rasch abgekühlt. Nach wenigen Minuten hat die Probe eine Temperatur von $\sim 60^{\circ}\text{C}$ erreicht, und es werden 500 μl tridestilliertes Wasser in das Quarzrohr eingeleitet, um den Bromspiegel zu lösen. Die radiochemische Ausbeute des Destillationsprozesses ist $>90\%$. Man erhält eine wässrige Lösung von ^{77}Br -Bromid von hoher spezifischer Aktivität.

Einige Untersuchungen wurden mit ^{75}Br ($T = 1,6\text{ h}$) durchgeführt, das über den $^{75}\text{As}(^3\text{He},^3\text{n})^{75}\text{Br}$ -Prozeß dargestellt wurde [22]. Bei Verwendung eines internen $\text{Cu}_3\text{-As}$ -Targets erhält man bei einem Strahlstrom von 100 μA in 2 Stunden bis zu 250 mCi ^{75}Br . Die Isolierung des ^{75}Br erfolgt nach dem gleichen Verfahren wie für ^{77}Br beschrieben.

2.2. Reagenzien

Die verwendeten Reagenzien L-Tyrosin, Chloramin-T (p.a.), Natriumbisulfit (p.a.), Kaliumbromid (Suprapur), Kaliumiodid (Suprapur) wurden von Merck bezogen und direkt eingesetzt. Die Peptide Gly-Tyr-Gly, Ala-Tyr-Ala, Pro-His-Tyr, Gly-His-Gly, Gly-Phe-Gly und Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly, alle p.a., stammten von der Firma Serva.

Von den verwendeten Aromaten wurden Anilin, Anisol, Toluol, Phenol und Benzol (alle Schuchardt) durch Destillation über eine Spaltrohrkolonne gereinigt.

Die übrigen verwendeten Aromaten, insbesondere die Brom- und Iodisomeren (Schuchardt, Merck, EGA Chemie), die zur Ausarbeitung der chromatographischen Trennungen dienten, wurden nach chromatographischer Analyse ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Die Darstellung von Dichloramin-T (N,N-dichlor-p-toluolsulfonamid) und Dichloramin-N (N,N-dichlor-p-nitrobenzolsulfonamid) erfolgte durch Umsetzung von Toluolsulfonamid (Merck)

bzw. p-Nitrobenzolsulfonamid (EGA Chemie) mit Cl_2 (Fa. Gerling, Holz) in alkalischer Lösung [84,85]. Dichloramin-T (Fp. 83°C) und Dichloramin-N (Fp. 143°C) wurden durch mehrfaches Umkristallisieren gereinigt.

Die Pufferlösungen (0,05 M) wurden nach Standardmethoden [86] aus den entsprechenden Reagenzien (p.a. Merck) hergestellt und mit einem pH-Meter überprüft.

Für Radioiodierungen wurde ^{131}I -Iodid (Amersham) eingesetzt.

2.3. Chromatographie

Die Apparatur zur Hochdruckflüssigkeitschromatographie bestand aus folgenden Bauteilen:

Pumpe DMPAE 10.4 (Orlita), Pulsationsdämpfer PDM 3350 (Orlita), Manometer Typ 82.2 (Wika), HPLC Probenaufgabeventil 7120 (Latek). UV-Absorptionsdetektor 440 ($\lambda = 254 \text{ nm}$) (Waters), RI-Detektor 401 (Waters) und Fraktionssammler Microcol T80 (Gilson, Abimed).

Ein Teil der Reaktionslösung wurde unter Verwendung der beschriebenen Apparatur durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie aufgetrennt und das Eluat diskontinuierlich zu 0,5 min Fraktionen aufgefangen. Die verwendeten Säulen und Eluentien sind in Tabelle 2 und Tabelle 3 aufgeführt. Bei Verwendung der Si-60 Säule zur Chromatographie wurde die wässrige Reaktionslösung mit Methylenchlorid ausgeschüttelt und die organische Phase chromatographisch getrennt.

2.4. Durchführung der Versuche

Radiohalogenierungen in wässriger Phase

Die zu markierende Substanz wurde in 500 μl Pufferlösung gelöst. Ca. 10 μCi ^{131}I oder ^{77}Br wurden als Halogenid in 1-5 μl wässriger Lösung zugesetzt und sodann 10 μl wässrige Chloramin-T Lösung zugefügt. Nach entsprechender Reaktionszeit wurde durch Zugabe von 100 μl Natriumbisulfitlösung die Reaktion beendet. 200 μl der Reaktionslösung wurde unter den in Tabelle 1 bzw. 2 angegebenen Bedingungen chromatographiert. Durch Messung der

Tabelle 2: HPLC-Daten für die Trennung der radiohalogenierten Biomoleküle von ihren Ausgangsverbindungen

Substanz	Säule	Eluens	k'-Werte
Tyrosin	Lichrosorb RP-18, 10 µm	Wasser:Methanol:Essigsäure	2,2
3-Bromtyrosin	(Merck), 50 cm, Ø 4 mm	100:5:1	10,0
3-Iodtyrosin			14,0
α-Methyltyrosin	Lichrosorb RP-18, 10 µm	Wasser:Methanol:Essigsäure	4,8
3-Brom-α-methyl-tyrosin	(Merck), 50 cm, Ø 4 mm	100:30:1	12,1
Phenylalanin	Lichrosorb RP-18, 10 µm	Wasser:Methanol:Essigsäure	5,3
2-Bromphenylalanin	(Merck), 25 cm, Ø 4 mm	100:30:1	14,5
3-Bromphenylalanin			20,8
4-Bromphenylalanin			24
Histidin	Lichrosorb RP-18, 10 µm	Wasser	1,5
Bromhistidin	(Merck), 50 cm, Ø 4 mm		2,3
Uracil	Lichrosorb RP-18, 10 µm	Wasser:Essigsäure	0,9
5-Bromuracil	(Merck), 25 cm, Ø 4 mm	100:1	3,0
Cytosin			1,1
5-Bromcytosin			5,0

Tabelle 3: HPLC-Daten für die Trennung von radiohalogenierten Aromaten

Substanz	Säule	Eluens	k'-Werte
Benzol	Lichrosorb RP-18	Methanol:Wasser	8,4
Chlorbenzol	10 µm, Merck,	1:1	19,0
Brombenzol	25 cm, 4 mm Ø		23,9
Iodbenzol			33,9
Toluol	Lichrosorb RP-18	Methanol:Wasser	9,6
o,m,p-Bromtoluol	10 µm, Merck,	3:2	23,3
o,m,p-Iodtoluol	25 cm, 4 mm Ø		30,9
Anisol	Lichrosorb RP-18	Methanol:Wasser	7,6
o-Bromanisol	10 µm, Merck,	1:1	15,9
m-Bromanisol	25 cm, 4 mm Ø		25,5
p-Bromanisol			27,4
o-Iodanisol			25,9
m-Iodanisol			36,1
p-Iodanisol			38,5
Anilin	Lichrosorb Si-60	n-Heptan:n-Di-	8,9
o-Bromanilin	10 µm, Merck,	butyläther:Eis-	0,9
m-Bromanilin	50 cm, 5 mm Ø	essig	6,9
p-Bromanilin		500:400:7	7,6
o-Iodanilin			1,0
m-Iodanilin			7,1
p-Iodanilin			8,8
Phenol	Lichrosorb Si-60	n-Heptan:Eisessig	18,0
o-Bromphenol	10 µm, Merck,	1000:15	2,0
m-Bromphenol	50 cm, 5 mm Ø		20,7
p-Bromphenol			24,7
o-Iodphenol			2,8
m-Iodphenol			22,3
p-Iodphenol			27,6

einzelnen Fraktionen im Auto-Gamma-Spektrometer wurden die radiochemischen Ausbeuten ermittelt. Die genauen Reaktionsbedingungen (Konzentrationen, Reaktionszeiten, etc.) sind jeweils in den entsprechenden Tabellen bzw. Kurven angegeben (s. Abschnitt 3.).

Radiohalogenierungen in organischer Phase

Es wurden ca. 10 μCi ^{131}I oder ^{77}Br als Halogenid in wässriger Lösung ins Reaktionsgefäß gegeben und bei einer Temperatur von $\sim 50^\circ\text{C}$ eingedampft. Sodann wurde die zu markierende Substanz sowie 500 μl eines organischen Lösungsmittels zugegeben und einige Minuten mit einem Magnetrührer gerührt. Schließlich wurden 10 μl einer Lösung von Dichloramin-T in Methylenchlorid zugegeben. Nach angemessener Reaktionszeit wurden - wie oben beschrieben - 200 μl chromatographiert und die radiochemischen Ausbeuten ermittelt.

Im Falle von Trifluoressigsäureanhydrid als Lösungsmittel wurde die Reaktion durch vorsichtige Zugabe von 1,5 ml einer 3%igen Natriumcarbonat/Natriumsulfit-Lösung beendet.

Genaue Reaktionsbedingungen sind jeweils bei den Tabellen zur Radiohalogenierung in organischer Phase angegeben.

Radiobromierung von Peptiden

Die Peptide wurden in 500 μl Pufferlösung gelöst und ca. 10 μCi ^{77}Br als Bromid in 1-5 μl wässriger Lösung zugesetzt. Sodann wurden 10 μl wässrige Chloramin-T Lösung zugesetzt. Nach entsprechender Reaktionszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 μl Natriumbisulfitlösung beendet. Zur Ermittlung der radiochemischen Ausbeute wurden 200 μl auf einer RP-18 Säule (25 cm; 4 mm ϕ) mit Methanol/Wasser/Eisessig (100:10:1) chromatographiert. Die radiobromierten Peptide hatten etwa die gleichen K' -Werte wie die unmarkierten Peptide.

Radiobromierung von Proteinen

Zu 500 μl Proteinlösung ($\sim 10^{-8}$ mol) wurden 500 μl 0,05 n Phosphatpuffer pH 7 und ca. 100 μCi ^{77}Br als Bromid in wässriger Lösung zugegeben. Sofort anschließend wurden 10 μl Chloramin-T

Lösung (10^{-5} mol) zugegeben und 2 min gerührt. Sodann wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 μ l Cysteinlösung ($5 \cdot 10^{-5}$ mol) beendet. Zur Bestimmung der radiochemischen Ausbeute wurde die Reaktionslösung auf Biogel P4 chromatographiert und die Aktivität der Proteinfraction gemessen.

Radiohalogenierung von Olefinen

Es wurden ca. 10 μ Ci ^{131}I oder ^{77}Br als Halogenid in wässriger Lösung im Reaktionsgefäß bei $\sim 50^\circ\text{C}$ eingedampft. Sodann wurden $2 \cdot 10^{-6}$ Mol Cyclohexen in 500 μ l CH_2Cl_2 bzw. $2 \cdot 10^{-6}$ Mol Tri-O-acetyl-D-glucal in 500 μ l CH_3OH zugegeben und einige Minuten gerührt. Schließlich wurden 10 μ l einer Lösung von Dichloramin-T ($\approx 5 \cdot 10^{-7}$ Mol) in CH_2Cl_2 zugegeben. Nach einer Reaktionszeit von 1 min wurde ein Teil der Lösung chromatographiert und die radiochemische Ausbeute bestimmt. Die Trennung der Cyclohexanderivate erfolgte gaschromatographisch auf einer Säule mit 15 % Tricresylphosphat auf Chromosorb-W-AW-DCMS (4 m; 3,5 mm ϕ) bei 125°C , wobei die Produkte am Chromatographenausgang an Aktivkohle adsorbiert wurden. Die Trennung der Zucker erfolgte durch HPLC auf einer Si-60 Säule (25 cm; 1,6 cm ϕ) mit Diethyläther/n-Hexan (7:3) als Eluens.

Bestimmung der radiochemischen Ausbeute

Die 200 μ l Reaktionslösung, die als Aliquot diente, wurde mit dem Eluens der Chromatographie auf das gleiche Volumen verdünnt wie die aufgefangenen Fraktionen der Produkte, um die gleiche Meßgeometrie und gleiche Absorption der γ -Strahlung zu erhalten. Anschließend wurden die Proben in einem NaI(Tl)-Bohrlochkristall in einem Auto-Gamma-Spektrometer (Packard) gemessen.

Die radiochemische Ausbeute wurde nach folgender Gleichung rechnerisch ermittelt:

$$\text{radiochem. Ausbeute} = \frac{\text{Aktivität d. Produkts in 200 } \mu\text{l Reaktionslösung (cps)} \cdot 100\%}{\text{Gesamtaktivität in 200 } \mu\text{l Reaktionslösung (cps)}}$$

Aus mindestens 3 Einzelmessungen wurde ein Mittelwert gebildet und die Standardabweichung bestimmt.

3. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1. Zur Radiobromierung mit Chloramin-T in wässriger Phase

Die klassische Chloramin-T Reaktion ist technisch einfach und kann schnell durchgeführt werden. In einer Pufferlösung (pH 7,5) wird Radioiodid durch Chloramin-T in Anwesenheit des zu markierenden Proteins oxidiert. Die gebildeten elektrophilen Iodspezies werden mit hoher Ausbeute in die Tyrosylreste des Proteins eingebaut. Überschüssiges Chloramin-T und freies Iod werden anschließend mit Natriumbisulfit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$) reduziert. Das markierte Protein wird dann durch chromatographische Verfahren abgetrennt. Diese Methode wird meistens dann angewendet, wenn ein Protein iodiert werden soll, über dessen chemisches Verhalten keine Erfahrungswerte vorliegen. Aufgrund dieser Vorteile erschien es sehr aussichtsreich, diese Methode auf ihre Anwendbarkeit zur Radiobromierung von aromatischen Verbindungen (bzw. Pharmaka) und Proteinen zu untersuchen. Da die Chloramin-T Methode für Iodierungen eine deutliche pH-Abhängigkeit zeigt [55,87,88] und generell der Reaktionsmechanismus noch nicht eindeutig aufgeklärt ist, müssen sämtliche Parameter der Reaktion für Brom neu optimiert werden. Eine Untersuchung der Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeuten vom pH-Wert, von der Reaktionszeit und von der Reagenzkonzentration sollten zeigen, unter welchen Bedingungen eine Radiobromierung möglich ist. Weil bei der Iodierung von Proteinen bevorzugt Tyrosin markiert wird, wurde Tyrosin als Modellsubstanz für die Optimierung der Radiobromierung ausgewählt. Da ein Teil der Ergebnisse unserer früheren Untersuchungen [89] für die Diskussion weiterführender Arbeiten zur Radiobromierung von Proteinen und insbesondere für die Aufklärung des Reaktionsmechanismus benötigt werden, soll die pH-Abhängigkeit zusammen mit neuen Ergebnissen dargestellt werden.

pH-Abhängigkeit

Für die Untersuchung der pH-Abhängigkeit wurde eine Chloramin-T Konzentration von $3,6 \cdot 10^{-3}$ M, 500 μl Reaktionsvolumen und eine Reaktionszeit von 5 min gewählt. Die bekannte pH-Abhängigkeit der Radioiodierung mit Chloramin-T wurde an Proteinen ermittelt und erfaßt nur den Bereich von pH 4 bis pH 9 [55,87,88].

Da Tyrosin im Gegensatz zu Proteinen über den gesamten pH-Bereich stabil ist, wurde die pH-Abhängigkeit von pH 1 bis pH 14 untersucht. Damit ein besserer Vergleich möglich ist, wurde sowohl die Radiobromierung als auch die Radioiodierung von Tyrosin unter gleichen Bedingungen (Konzentrationen, Zeit, Pufferlösung) durchgeführt. In Abbildung 3 sind die radiochemischen Ausbeuten der Radiobromierung und -iodierung in Abhängigkeit vom pH-Wert aufgetragen.

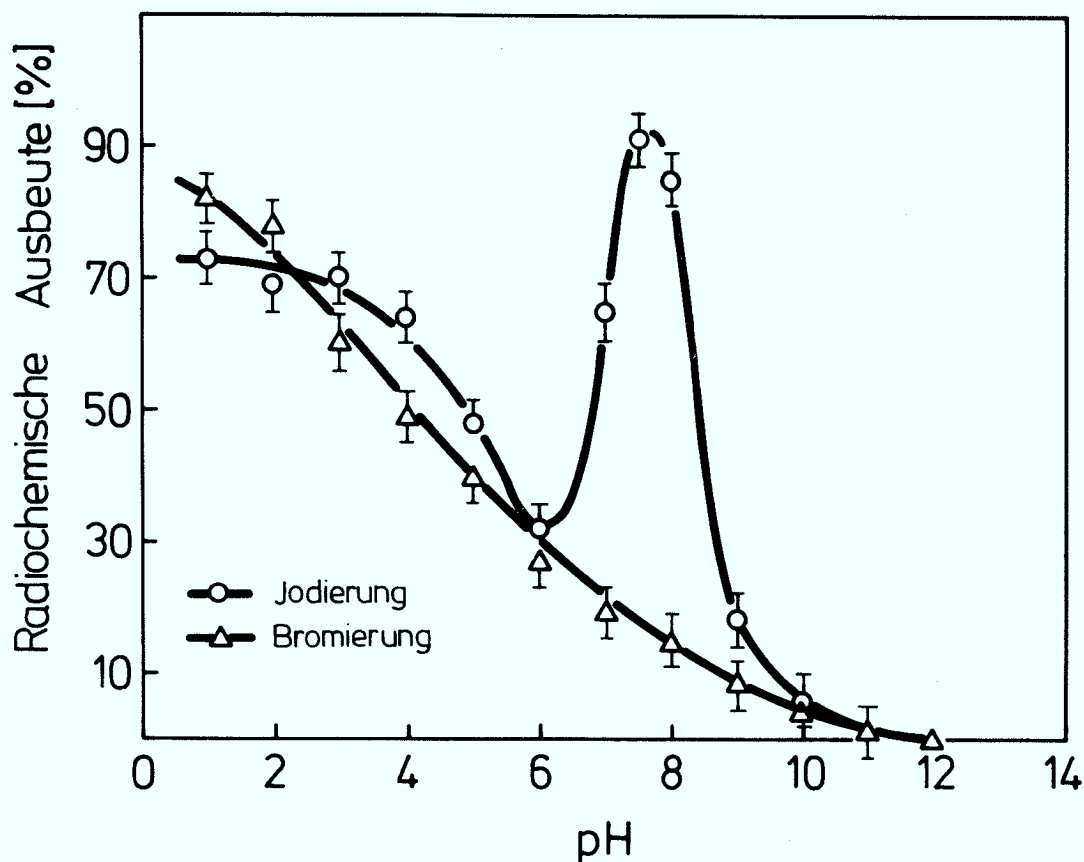


Abb. 3 Radiobromierung und -iodierung von Tyrosin mit Chloramin-T in Abhängigkeit vom pH-Wert der Reaktionslösung [89]
(22 °C, $1,8 \cdot 10^{-6}$ M CAT, $1,2 \cdot 10^{-6}$ mol Tyr in 500 μ l Lösung, 5 min)

Die pH-Abhängigkeit der Radioiodierung zeigt zwei Bereiche maximaler radiochemischer Ausbeute. Das Maximum bei pH 7,5 stimmt recht gut mit den von Hunter gemessenen Werten überein [87]. Ein weiterer Bereich hoher radiochemischer Ausbeute tritt bei pH 1 auf.

Die Radiobromierung zeigt eine recht hohe radiochemische Ausbeute von >80 % bei pH 1; sie nimmt mit steigendem pH-Wert stetig ab. Oberhalb von pH 11 ist sowohl die Ausbeute der Iodierung als auch die der Bromierung praktisch Null.

Die unterschiedlichen radiochemischen Ausbeuten im Bereich pH 1 bis pH 6 ließen sich durch die unterschiedliche Reaktivität der Halogene erklären. Beide Reaktionen führen bei pH 6 zur gleichen Ausbeute von ca. 30 %.

Auf die mechanistischen Aspekte soll in Abschnitt 3.2. eingegangen werden. Es wurde weiterhin untersucht, inwieweit die übrigen Parameter (Zeit, Reagenzkonzentration, Trägerzugabe) die radiochemische Ausbeute bei pH 1 und pH 7 beeinflussen.

Reagenzkonzentrationsabhängigkeit

Aufgrund der Ergebnisse der pH-Abhängigkeit sollte die Optimierung der Radiobromierung von Tyrosin mit Chloramin-T bei pH 1 und pH 7 durchgeführt werden. Da bekannt war, daß die Chloramin-T Konzentration deutlichen Einfluß auf die radiochemische Ausbeute hat [57,90], wurde zunächst die Reagenzabhängigkeit untersucht. Abbildung 4 zeigt die Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute von der Chloramin-T Konzentration bei pH 1 und pH 7.

Die radiochemische Ausbeute ließ sich bei pH 7 durch Erhöhung der Chloramin-T Konzentration bis auf etwa 65 % steigern [89]. Die Abnahme der radiochemischen Ausbeute bei höheren Chloramin-T Konzentrationen könnte auf die Oxidation und Chlorierung des 3-Bromtyrosins zurückzuführen sein, denn bei der Chromatographie traten neben einem Aktivitätspeak von 3-Brom-5-chlortyrosin zahlreiche andere nicht identifizierte Aktivitätspeaks auf. Für weiterführende Arbeiten zur Radiobromierung von kleineren Biomolekülen in saurer Lösung wurde für pH 1 ebenfalls die Konzentrationsabhängigkeit der radiochemischen Ausbeute untersucht. Bei pH 1 ist der Kurvenverlauf ganz anders; im Bereich von 10^{-3} M bis $20 \cdot 10^{-3}$ M wird eine praktisch konstante radiochemische Ausbeute von über 85 % erhalten. Mit einer zehnfach niedrigeren Konzentration erhält man also bei diesem pH-Wert wesentlich höhere Ausbeuten als bei pH 7.

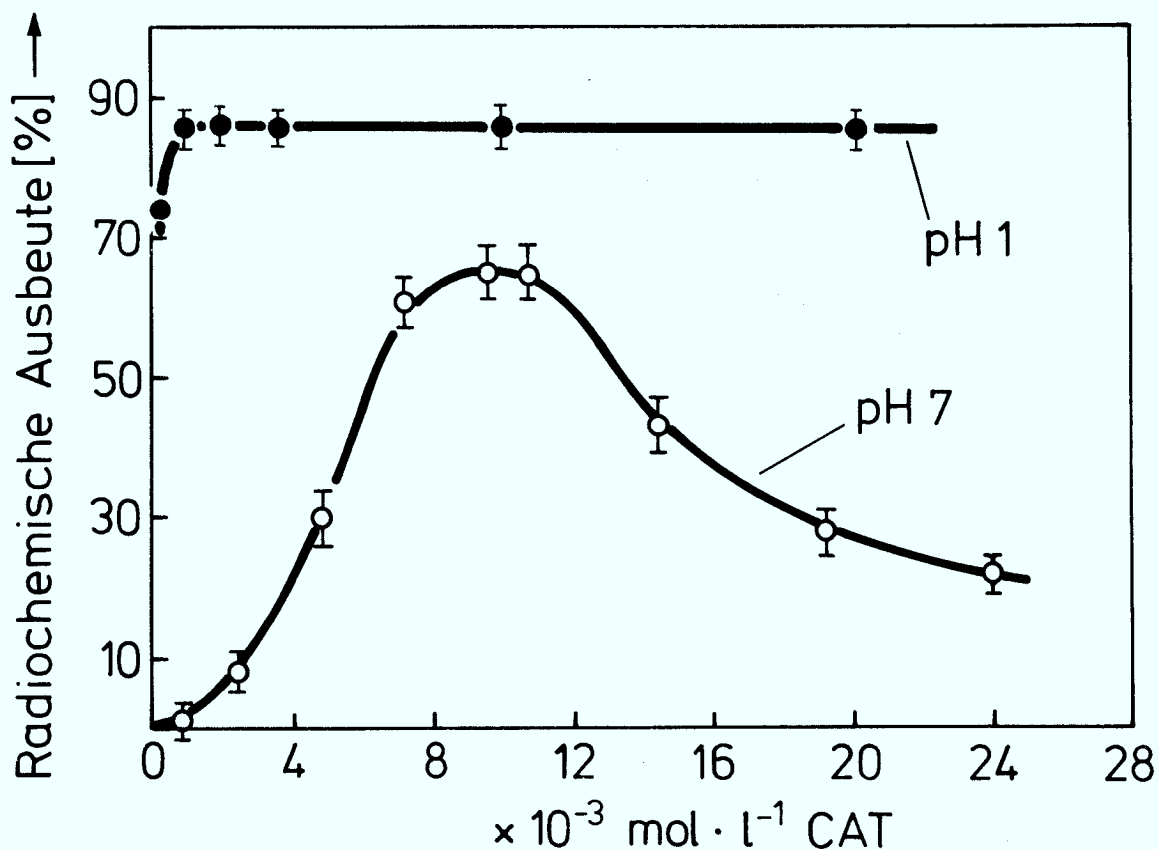


Abb. 4 Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute der Radiobromierung von Tyrosin von der Chloramin-T Konzentration bei pH 1 und pH 7 ($2,6 \cdot 10^{-3} \text{ M Tyr}$, 500 μl Lösung, 22 $^{\circ}\text{C}$, pH 1: 30 sec, pH 7: 5 min)

Zeitabhängigkeit

Bei einer optimalen Chloramin-T Konzentration von 10^{-2} M bei pH 7 und 10^{-3} M bei pH 1 wurde unter sonst gleichen Bedingungen eine Zeitabhängigkeit gemessen. In Abbildung 5 ist die radiochemische Ausbeute in Abhängigkeit von der Reaktionszeit aufgetragen.

Da bei pH 1 trotz Herabsetzung der Chloramin-T Konzentration schon nach wenigen Sekunden radiochemische Ausbeuten von 85 % erhalten werden, sind diese Reaktionsbedingungen, speziell für Moleküle, die in saurem Medium stabil sind, bedeutend günstiger als bei pH 7. Bei der niedrigen Chloramin-T Konzentration und der extrem kurzen Reaktionszeit sind oxidative Nebenreaktionen

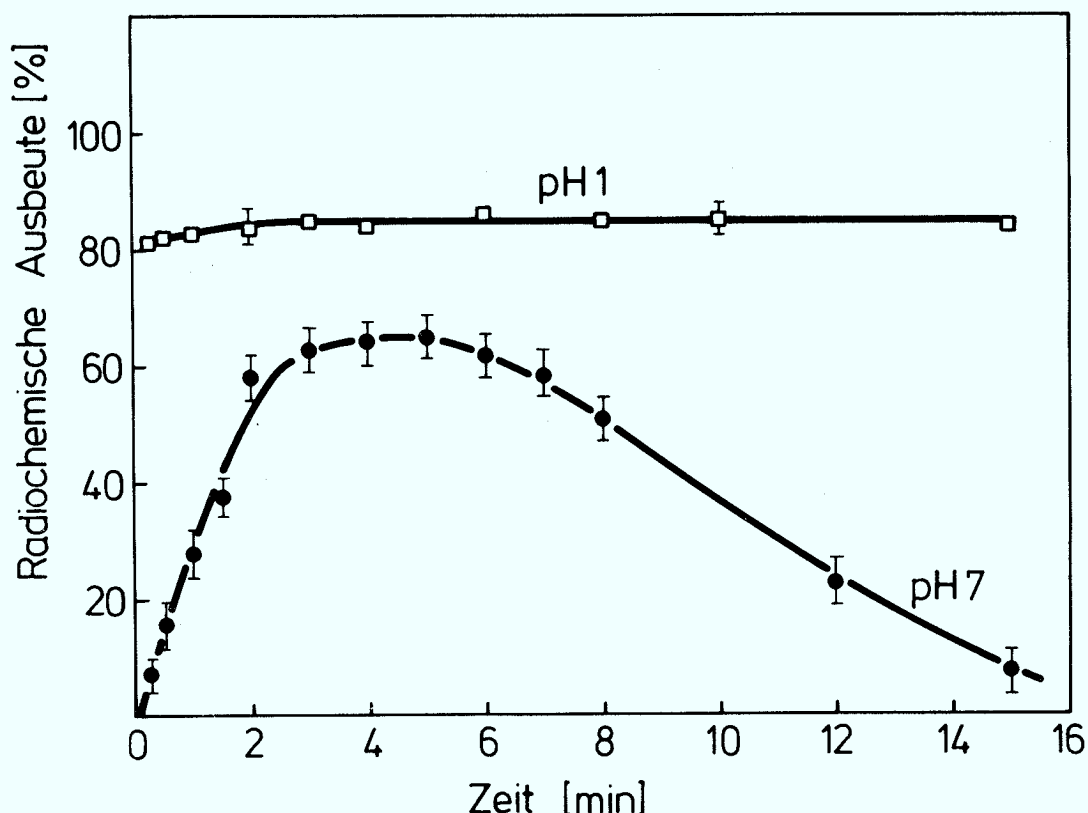


Abb. 5 Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute bei der Radiobromierung von Tyrosin mit Chloramin-T von der Reaktionszeit bei pH 1 bzw. pH 7 [82]
($2,6 \cdot 10^{-3}$ M Tyr, 500 μ l Lösung, pH 1: 10^{-3} M CAT, pH 7: 10^{-2} M CAT, 22 °C)

praktisch zu vernachlässigen, da unter diesen Bedingungen (pH 1) das einzige beobachtete Nebenprodukt 3-Chlortyrosin ist, dessen Bildung offensichtlich recht langsam ist. Auch die Zugabe von Natriumbisulfit ist nicht unbedingt notwendig, sofern die Trennung es nicht erfordert, denn sie hat keinen Einfluß auf die radiochemische Ausbeute und störende Nebenreaktionen durch dieses Reduktionsmittel werden vermieden.

Bei pH 7 werden bei einer Reaktionszeit von 2,5 min nur wenig Nebenprodukte gebildet (ca. 5 %), so daß unter diesen Reaktionsbedingungen (10^{-2} M CAT, pH 7, 2,5 min) auch gute radiochemische Ausbeuten erhalten werden (~65 %). Inwieweit diese Bedingungen eine zu markierende Substanz schädigen, muß im Einzelfall untersucht werden.

Trägerabhängigkeit

Bei der Markierung von Biomolekülen ist in der Regel eine hohe spezifische Aktivität erwünscht, doch es lassen sich nicht alle Reaktionen ohne Trägerzusatz durchführen. Um die radiochemische Ausbeute zu steigern, ist oft ein Zusatz von Träger notwendig. Ob dies auch bei der Radiobromierung von Tyrosin bei pH 7 notwendig ist, sollte durch die Untersuchung der Trägerabhängigkeit der Reaktion festgestellt werden. Es wurde eine Reaktionszeit von zwei Minuten gewählt, bei einer Chloramin-T Konzentration von 10^{-2} M. In Abbildung 6 ist die radiochemische Ausbeute in Abhängigkeit von der Bromid-Träger-Konzentration aufgetragen.

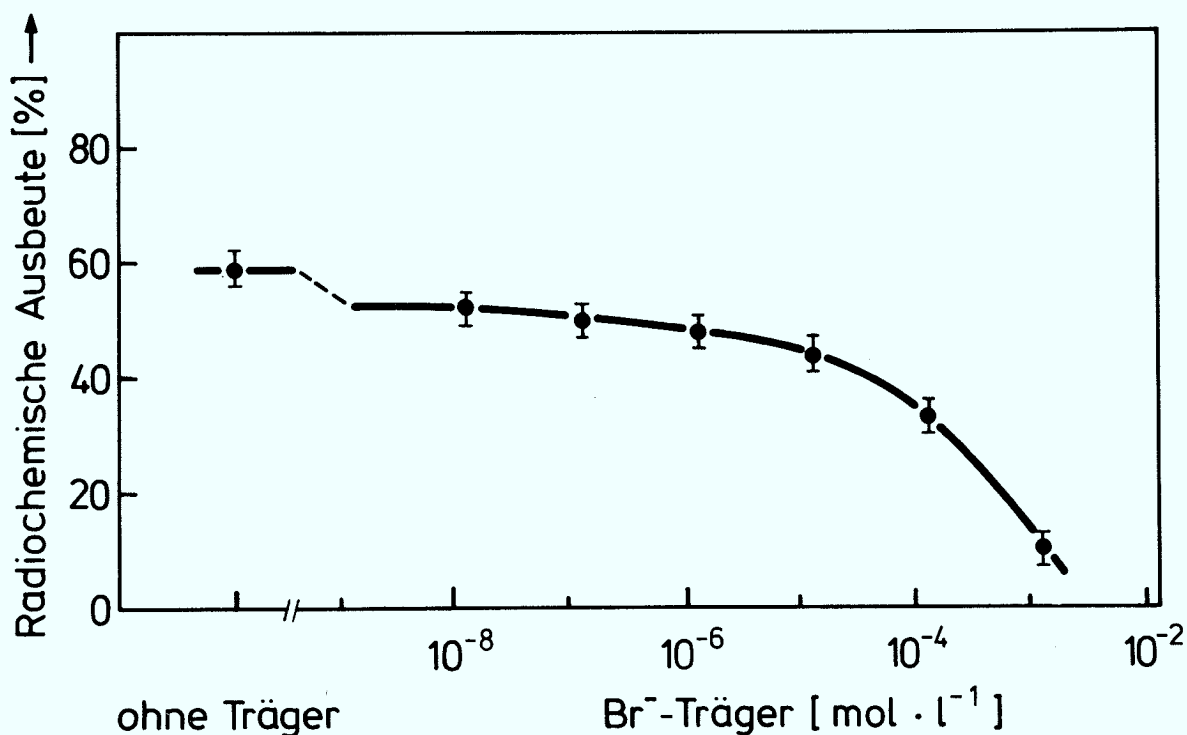


Abb. 6 Abhängigkeit der Radiobromierung von Tyrosin mit Chloramin-T von der Konzentration an Bromid-Träger [82]
($2,6 \cdot 10^{-3}$ M Tyr, 500 μ l Lösung, 10^{-2} M CAT, pH 7, 2 min, 22 °C)

Erstaunlicherweise beobachtet man eine deutliche Abnahme der radiochemischen Ausbeute durch den Zusatz von Bromid-Träger. Selbst bei einer Bromidkonzentration von 10^{-3} M waren Substrat und Reagenz noch in großem Überschuß vorhanden. Dies zeigt, daß

ein hoher Chloramin-T Überschuß im Verhältnis zu Bromid vorhanden sein muß, um eine hohe Markierungsausbeute zu erhalten. Eine Erklärung für diesen Trägereffekt soll im Zusammenhang mit dem Reaktionsmechanismus bei pH 7 diskutiert werden. Andererseits demonstriert diese Kurve, daß die Chloramin-T Methode ideal für Radiobromierungen ohne Trägerzusatz geeignet ist. Der Verlauf der Kurve zeigt weiterhin, daß bei dieser Untersuchung hohe spezifische Aktivitäten erreicht worden sind, unter Berücksichtigung der Bromverunreinigungen der Chemikalien ca. 5000 Ci/mmol.

3.1.1. Radiobromierung von Aminosäuren und Nukleobasen

Die Untersuchungen zur Radiobromierung von Tyrosin mit Chloramin-T als Oxidationsmittel haben gezeigt, daß die optimalen radiochemischen Ausbeuten in saurer Lösung (pH 1) in sehr kurzer Zeit (10 sec) und bei relativ geringer Chloramin-T Konzentration (10^{-3} M) erreicht werden. Biomoleküle, die in saurem Milieu stabil sind und ein aromatisches System enthalten, sind daher für dieses Verfahren interessante Modellsysteme zur Bestimmung der radiochemischen Ausbeute. Aber auch bei pH 7 werden bei einer Chloramin-T Konzentration von 10^{-2} M und einer Reaktionszeit von 2,5 min gute radiochemische Ausbeuten erhalten [89].

In dieser Arbeit sind einige Aminosäuren und die Nukleobasen Cytosin und Uracil bei pH 1 und pH 7 radiobromiert worden, um die Anwendbarkeit der Chloramin-T Methode an unterschiedlichen aromatischen Biomolekülen zu testen. Die radiochemischen Ausbeuten der Bromierung dieser Moleküle bei pH 1 und pH 7 sind in Tabelle 4 zusammengefaßt.

Das α -Methyltyrosin, das im Hinblick auf seine nuklearmedizinische Anwendung zur Pankreasdarstellung [91] radiobromiert wurde, zeigte bezüglich der radiochemischen Ausbeute erwartungsgemäß keinen Unterschied zum Tyrosin. Phenylalanin ließ sich dagegen selbst nach Erhöhung der CAT-Konzentration nur bei pH 1 mit geringer Ausbeute radiobromieren. Offensichtlich ist die Methode auf Aromaten beschränkt, die bezüglich elektrophiler Substitution stark aktiviert sind, wie Phenole und Aniline. Beim Histidin konnte

Tabelle 4: Radiobromierung aromatischer Moleküle mit Chloramin-T*
ohne Trägerzusatz (radiochemische Ausbeute in %)

Markierte Verbindung	pH 1	pH 7
3-Bromtyrosin	85	65
3-Brom- α -methyltyrosin	85	65
p-Bromphenylalanin ^{a)}	3	-
2(5)-Bromhistidin	-	-
5-Bromuracil	80	83
5-Bromcytosin	30	60

*) $1,2 \cdot 10^{-6}$ Mol Substrat in 500 μ l Pufferlösung;
22 °C; pH 1: 10^{-3} M CAT, 1 min; pH 7: 10^{-2} M
CAT, 5 min.

a) 10^{-2} M CAT

deshalb kein Markierungsprodukt nachgewiesen werden, weil das möglicherweise gebildete 2(5)-Bromhistidin relativ instabil ist [92]. Die Nukleobasen ließen sich mit recht guten Ausbeuten radio-bromieren. Die niedrige Ausbeute von 30 % Bromcytosin bei pH 1 ist vermutlich auf die Bildung von Brom-chlor-cytosin zurückzu-führen, welches durch Addition von BrCl an eine Doppelbindung entsteht. Die gute Ausbeute im Fall von Uracil verdeutlicht die hohe Reaktivität von Uracil bezüglich der elektrophilen Substitu-tion [93]. Diese Versuche zeigen, daß die Chloramin-T Methode für die Radiobromierung von wasserlöslichen Biomolekülen, die akti-vierte aromatische Systeme enthalten, bestens geeignet ist.

3.1.2. Untersuchungen zur Selektivität

Untersuchungen zur Selektivität der Bromierung mit Chloramin-T sind besonders interessant im Hinblick auf Moleküle, die mehrere Angriffsmöglichkeiten für das elektrophile Agens bieten. Die Steuerung der Isomerenverteilung durch Variation von pH-Wert und/oder Pufferzusammensetzung ist für die praktische An-wendung von großem Nutzen. Weiterhin geben die Änderungen der Isomerenverteilungen sowie der radiochemischen Ausbeuten in

Abhängigkeit vom pH-Wert Hinweise auf den Reaktionsmechanismus.

Bei der Radioiodierung von Tyrosin wird das Maximum der radiochemischen Ausbeute bei pH 7,5 durch die beginnende Dissoziation der phenolischen -OH Gruppe erklärt [94]. Um die Bedeutung dieser Dissoziation näher zu untersuchen, wurde die Radiobromierung und -iodierung von Phenol in Abhängigkeit vom pH-Wert untersucht. Wenn die Dissoziation von Phenol ($pK_a = 10$) einen Einfluß hat, so sollte bei Bromierung und Iodierung im Bereich von pH 7 bis pH 10 eine deutliche Änderung in der radiochemischen Ausbeute oder in der Isomerenverteilung auftreten. In Abbildung 7 ist die Radiobromierung und in Abbildung 8 die Radioiodierung von Phenol in Abhängigkeit vom pH-Wert aufgetragen. Es sind jeweils die radiochemische Gesamtausbeute und die Isomerenverteilung aufgetragen.

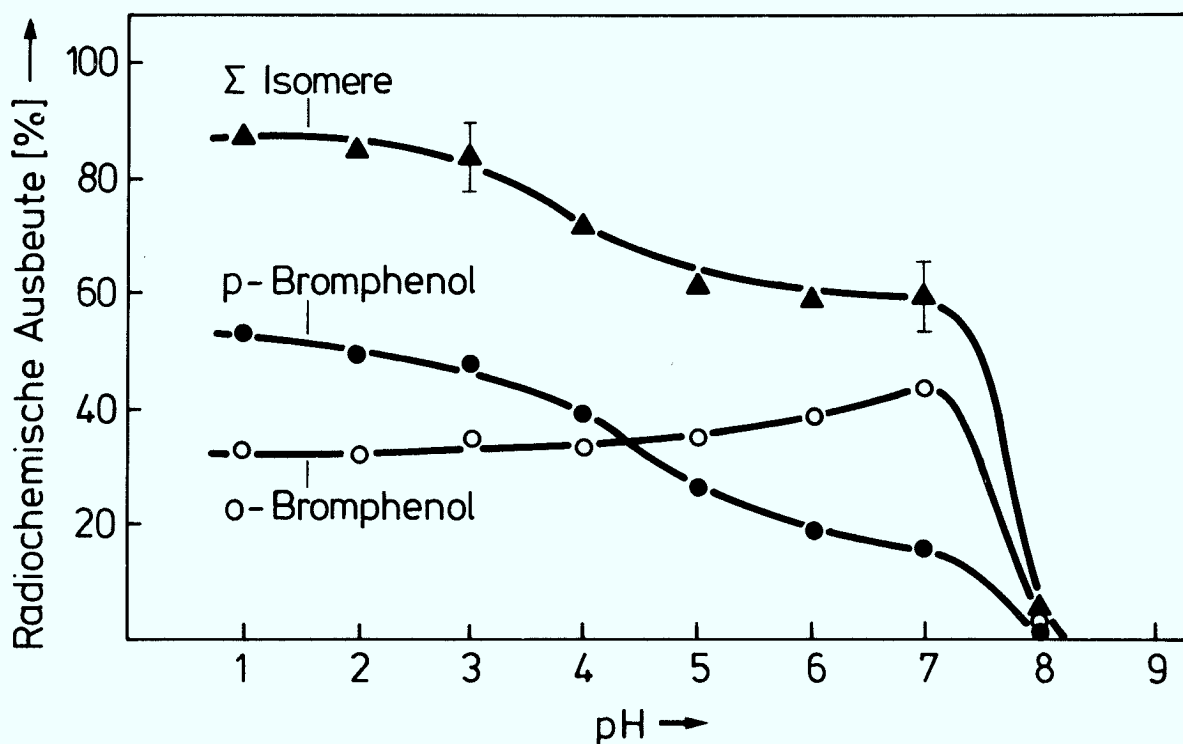


Abb. 7 Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute vom pH-Wert bei der Radiobromierung von Phenol
($4 \cdot 10^{-2}$ M Phenol, 500 μ l Lösung, 10^{-3} M CAT, 3 min, 22 °C)

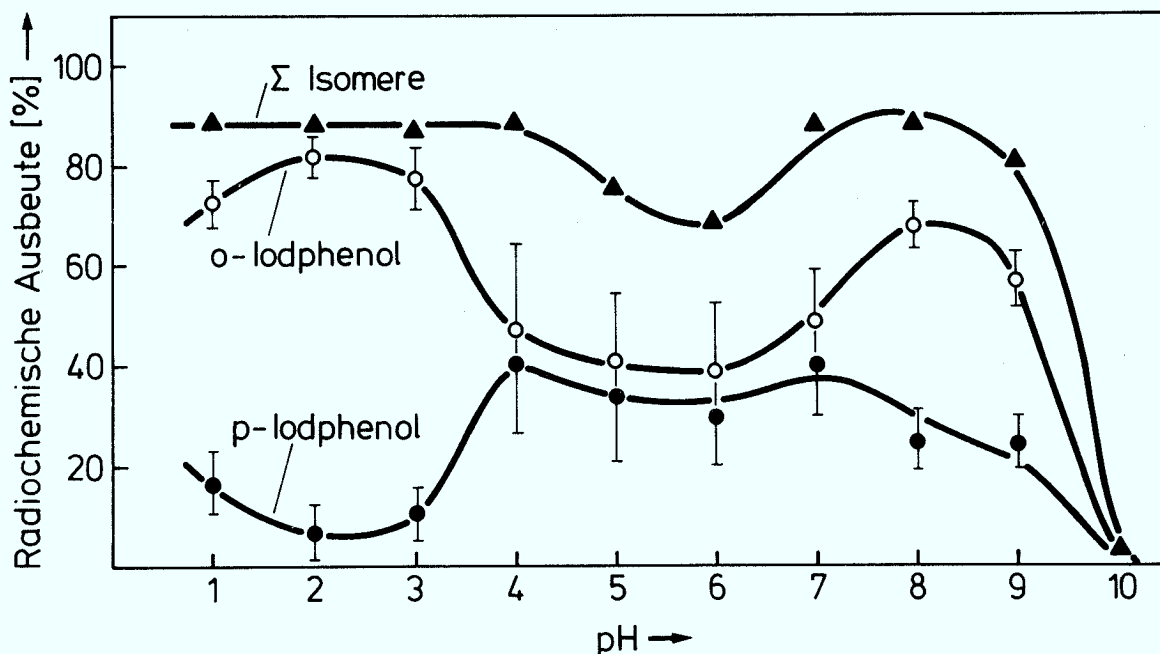


Abb. 8 Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute vom pH-Wert bei der Radioiodierung von Phenol
($4 \cdot 10^{-2}$ M Phenol, 500 μ l Lösung, 10^{-3} M CAT, 3 min, 22 °C)

Vergleicht man die Gesamtausbeutekurven in Abb. 7 und 8 mit denen der pH-Abhängigkeit der Radiohalogenierung von Tyrosin (Abb. 3), so findet man einige Ähnlichkeiten: Hohe Ausbeuten bei pH 1 und ein langsames Absinken der Ausbeute bei steigendem pH-Wert. Ebenso wie beim Tyrosin findet man nur bei der Iodierung ein weiteres Maximum im Bereich von pH 7 bis 8.

Allerdings zeigen sich auch deutliche Unterschiede zwischen Tyrosin und Phenol, sowie zwischen Bromierung und Iodierung:

- Die radiochemische Gesamtausbeute der Radiobromierung ist für Phenol trotz niedrigerer CAT-Konzentration (10^{-3} M) bei den höheren pH-Werten (pH 4-8) deutlich größer.
- Die Abnahme der radiochemischen Gesamtausbeute bei der Radioiodierung im Bereich von pH 3 bis pH 7 beim Phenol ist deutlich geringer (90 auf 70 %) als beim Tyrosin (70 auf 30 %).
- Die Radioiodierung zeigt bis pH 9 gute radiochemische Ausbeuten, die Bromierung dagegen nur bis pH 7.

Nebenreaktionen mit funktionellen Gruppen ($-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$) des Tyrosins oder eine herabgesetzte Reaktivität durch sterische Hinderung wären Erklärungen für die geringeren Ausbeuten bei der Radiohalogenierung von Tyrosin. Bei der Bromierung ist das Fehlen eines zweiten Maximums um pH 7 sowie die sinkende radiochemische Ausbeute oberhalb pH 7 offensichtlich auf die unterschiedliche Reaktivität bzw. Stabilität des Halogenierungsgens zurückzuführen. Die relative Isomerenverteilung, die für die Bromierung von Phenol in Abhängigkeit vom pH-Wert in Abb. 9 und für die Iodierung in Abb. 10 aufgetragen ist, zeigt deutlich den erwarteten Einfluß der Dissoziation der OH Gruppe; die ortho-Position des Phenolat-Ions hat eine höhere Elektronendichte, und infolge dessen steigt die ortho-Substitution deutlich an. Erstaunlich ist die Isomerenverteilung im sauren

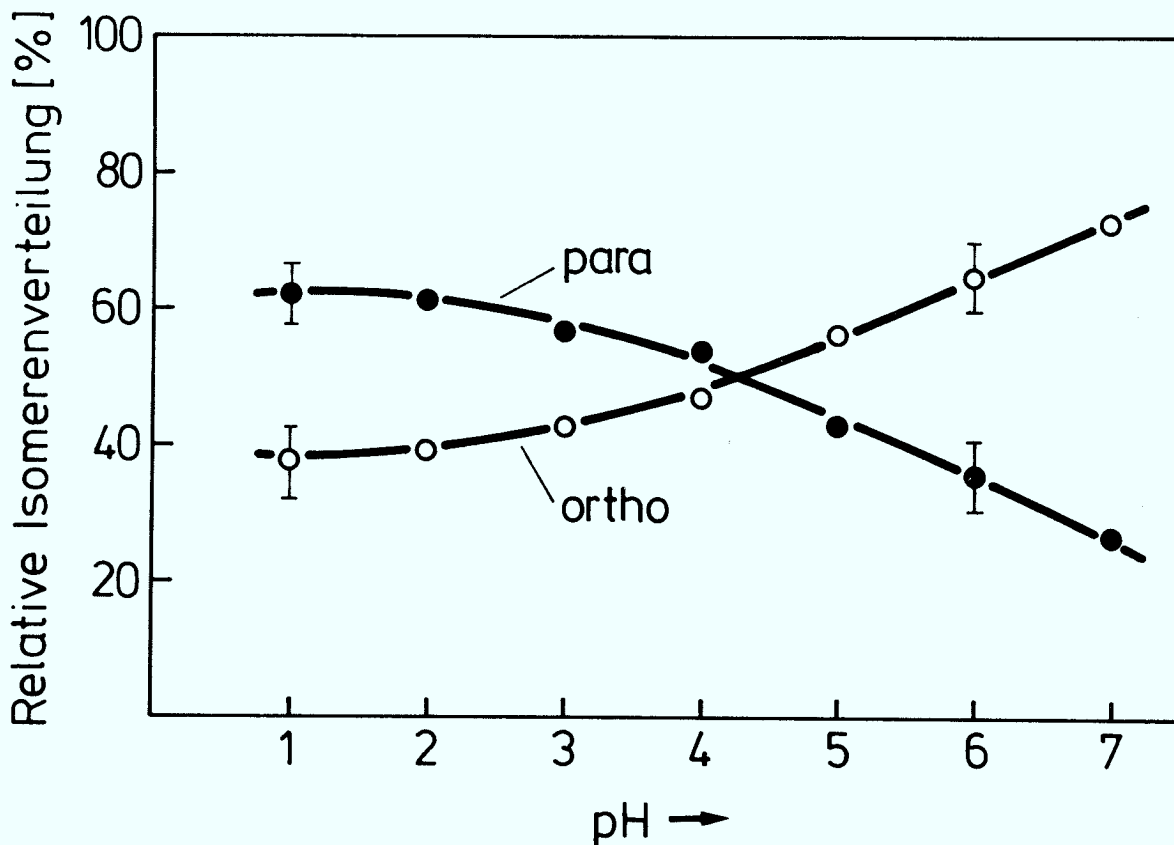


Abb. 9 Relative Isomerenverteilung in Abhängigkeit vom pH-Wert bei der Radiobromierung von Phenol

Bereich (pH 1 bis pH 3). Während bei der Bromierung eine höhere para-Substitution beobachtet wird, tritt bei der Iodierung eine extreme Bevorzugung der ortho-Position auf. Diese hohe ortho-Selektivität wurde auch bei der Iodierung von Phenol nach der Iodid-Iodat-Methode [95] und bei der Xenon-Exponiermethode [53] festgestellt. Weiterhin ist anzumerken, daß bei der Radioiodierung im Bereich von pH 4 bis pH 7 starke Schwankungen bei der Isomerenverteilung beobachtet wurden. Konzentration und Zusammensetzung des Puffers beeinflussen die Isomerenverteilung ebenso wie die nicht zu vermeidende Inhomogenität der Lösung beim Zusammengeben und Mischen der Reagenzien.

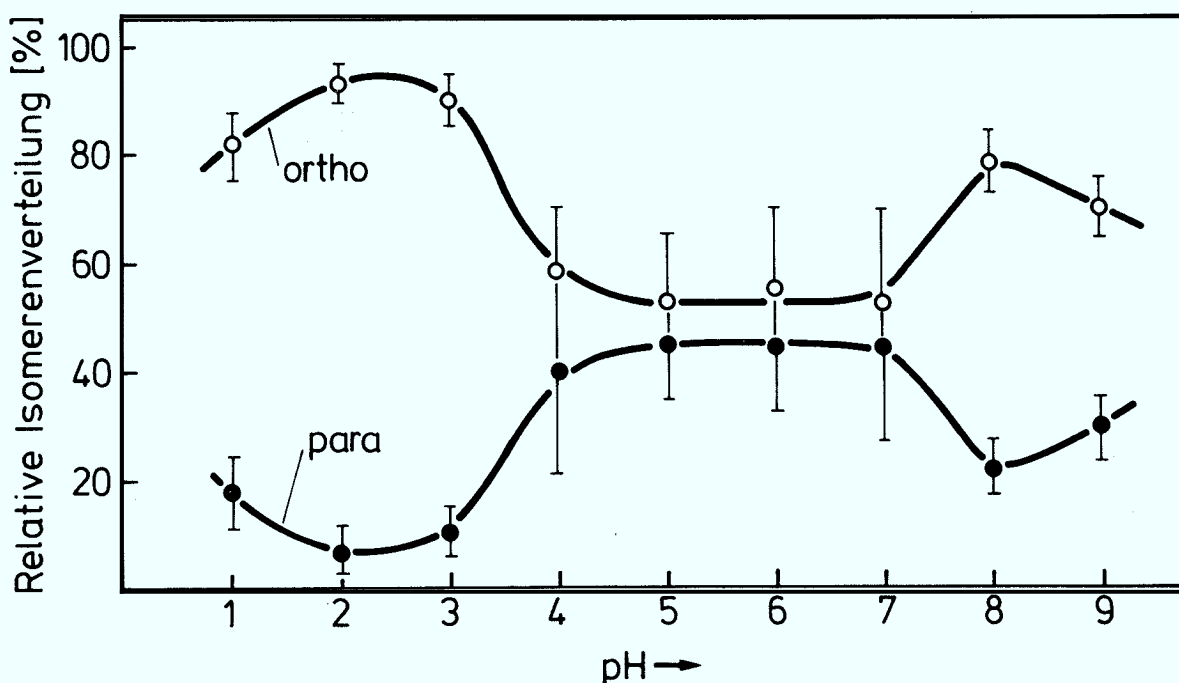


Abb. 10 Relative Isomerenverteilung der Radioiodierung von Phenol in Abhängigkeit vom pH-Wert

Als ein weiteres Molekül zum Studium der Selektivität in Abhängigkeit vom pH-Wert wurde Anilin gewählt. Die Reaktivität des Anilins gegenüber der elektrophilen Substitution wird durch Protonierung der Aminogruppe stark herabgesetzt ($pK_a = 4,7$). Unterhalb von pH 5 ist deshalb ein Absinken der radiochemischen Ausbeute zu erwarten. Die Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute vom pH-Wert ist in Abb. 11 für die Radiobromierung von Anilin und in Abb. 12 für die Radioiodierung von Anilin dargestellt.

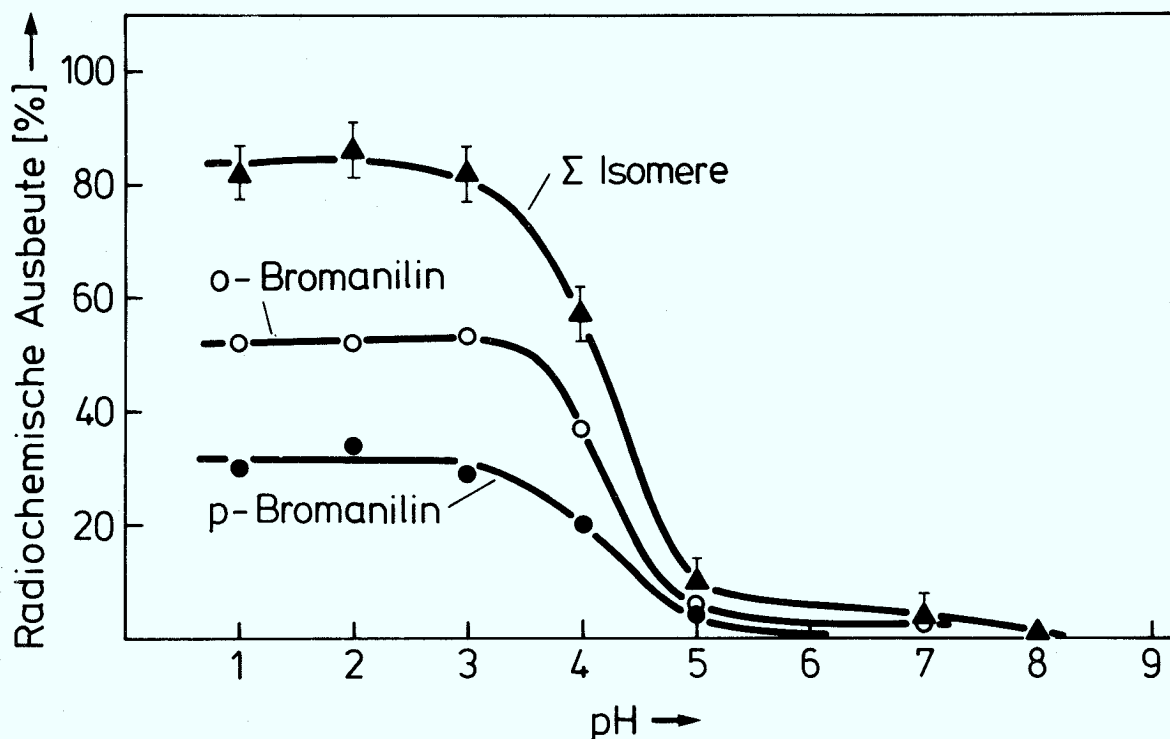


Abb. 11 Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute vom pH-Wert bei der Radiobromierung von Anilin
($4 \cdot 10^{-2}$ M Anilin, 500 μ l Lösung, 10^{-3} M CAT, 3 min, 22 °C)

Da bei beiden Reaktionen im stark sauren Bereich (pH 1-3) gute radiochemische Ausbeuten erhalten werden, scheint die Protonierung des Anilins keinen negativen Einfluß auf die Halogenierungsreaktion zu haben. Es ist allerdings zu bedenken, daß die halogenierenden Spezies in extrem geringer Konzentration vorhanden ($<10^{-12}$ mol) sind und daß ferner bei pH 1 auch nicht alle Anilinmoleküle protoniert sind. Es ist demnach vorstellbar, daß nicht protoniertes Anilin ($\sim 10^{-8}$ mol) rasch von sehr reaktiven Spezies halogeniert wird, wodurch diese hohen radiochemischen Ausbeuten erklärbar wären.

Auch im Anilin-System findet man wieder einen deutlichen Unterschied zwischen der pH-Abhängigkeit von Bromierung und Iodierung. Während bei der Iodierung bis pH 8 gute radiochemische Ausbeuten um 80 % erhalten werden, sinkt die Bromierungsausbeute bereits bei pH 4 deutlich ab. Oberhalb pH 5 werden nahezu keine Bromaniline

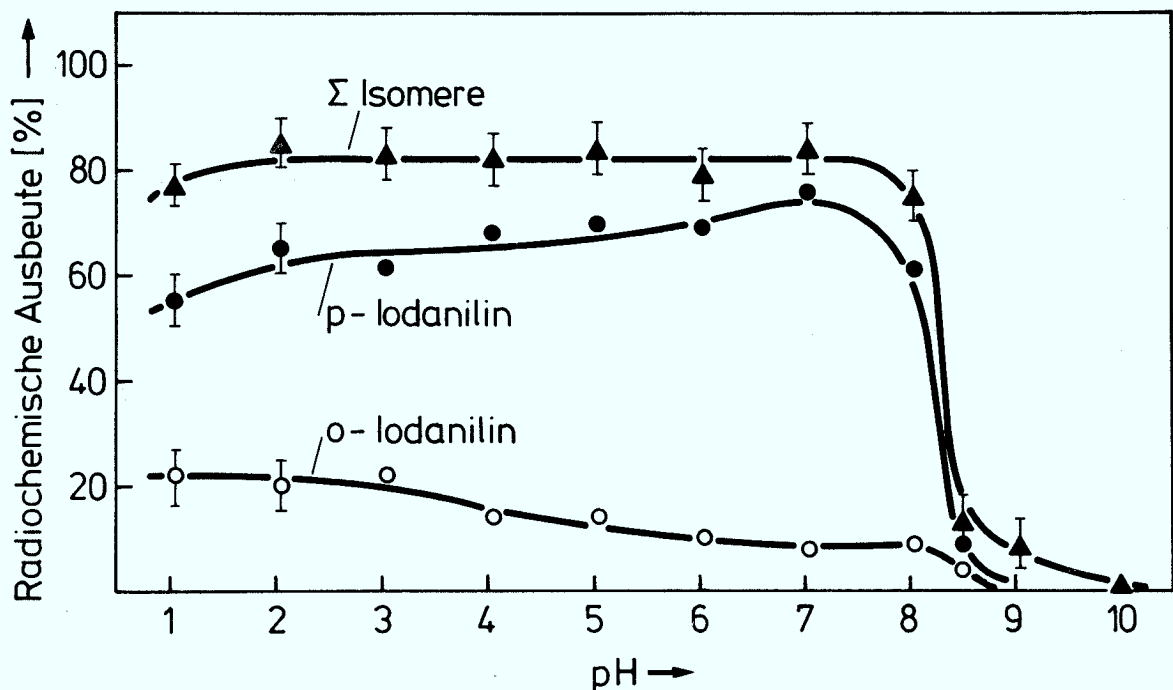


Abb. 12 Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute vom pH-Wert bei der Radioiodierung von Anilin
($4 \cdot 10^{-2}$ M Anilin, 500 μ l Lösung, 10^{-3} M CAT, 3 min, 22 °C)

gebildet. Dieses Absinken der Ausbeute ist sicherlich auf die steigende Konzentration von nicht protonierten Aminogruppen zurückzuführen, da der pK_a -Wert von Anilin ($pK_a = 4,7$) gerade in diesem pH-Bereich liegt. Dies deutet auf eine Nebenreaktion des Chloramin-T bzw. des gebildeten Bromierungsagens mit freien Aminogruppen. Erstaunlicherweise hat diese Nebenreaktion keinen Einfluß auf die Iodierungsreaktion. Da diese divergierenden Ausbeuten im oberen pH-Bereich auch bei der Radiohalogenierung von Tyrosin und Phenol auftreten, muß noch eine weitere Ursache angenommen werden. Somit ist das frühe Absinken der radiochemischen Ausbeute bei der Radiobromierung von Anilin im oberen pH-Bereich auf das Zusammenwirken mehrerer Faktoren zurückzuführen. Die relative Isomerenverteilung ist in Abb. 13 für die Bromierung und in Abb. 14 für die Iodierung von Anilin gegen den steigenden pH-Wert aufgetragen. Bei der Bromierung ist die Isomerenverteilung über den interessanten pH-Bereich konstant, mit einem statistischen o/p-Verhältnis von 2:1.

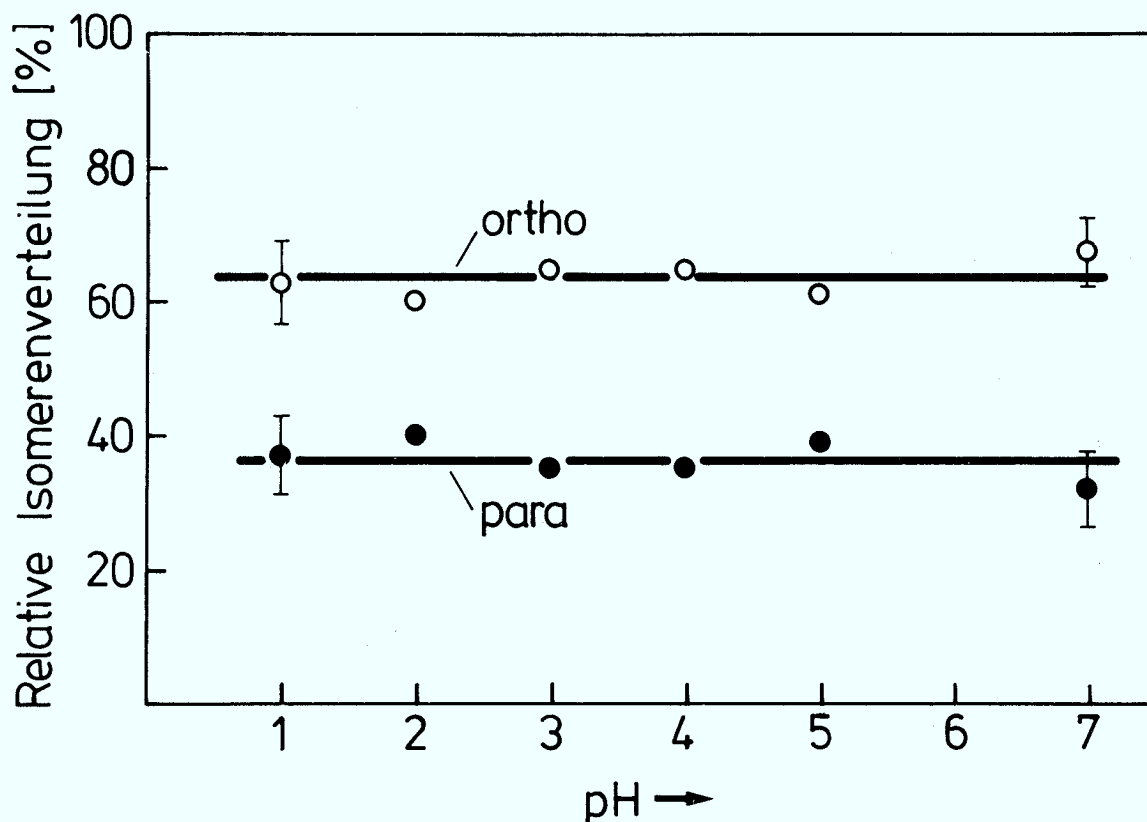


Abb. 13 Relative Isomerenverteilung der Radiobromierung von Anilin in Abhängigkeit vom pH-Wert

Bei der Iodierung wird eine hohe para-Selektivität beobachtet, die mit steigendem pH-Wert von 70 % auf über 90 % ansteigt. Auch hier wieder - wie beim Phenol - eine deutlich unterschiedliche pH-Abhängigkeit in der Isomerenverteilung von Bromierung und Iodierung. Betrachtet man die Ergebnisse dieser Studien zur Selektivität der Chloramin-T Reaktion, so wird klar, daß es kaum möglich ist, für ein beliebiges aromatisches Molekül eine Isomerenverteilung vorherzusagen. Zu viele Parameter beeinflussen die Selektivität, und die radiochemische Ausbeute wird zudem durch Nebenreaktionen teilweise erheblich reduziert. Um bessere Vorhersagen machen zu können, ist eine genaue Kenntnis des Reaktionsmechanismus notwendig.

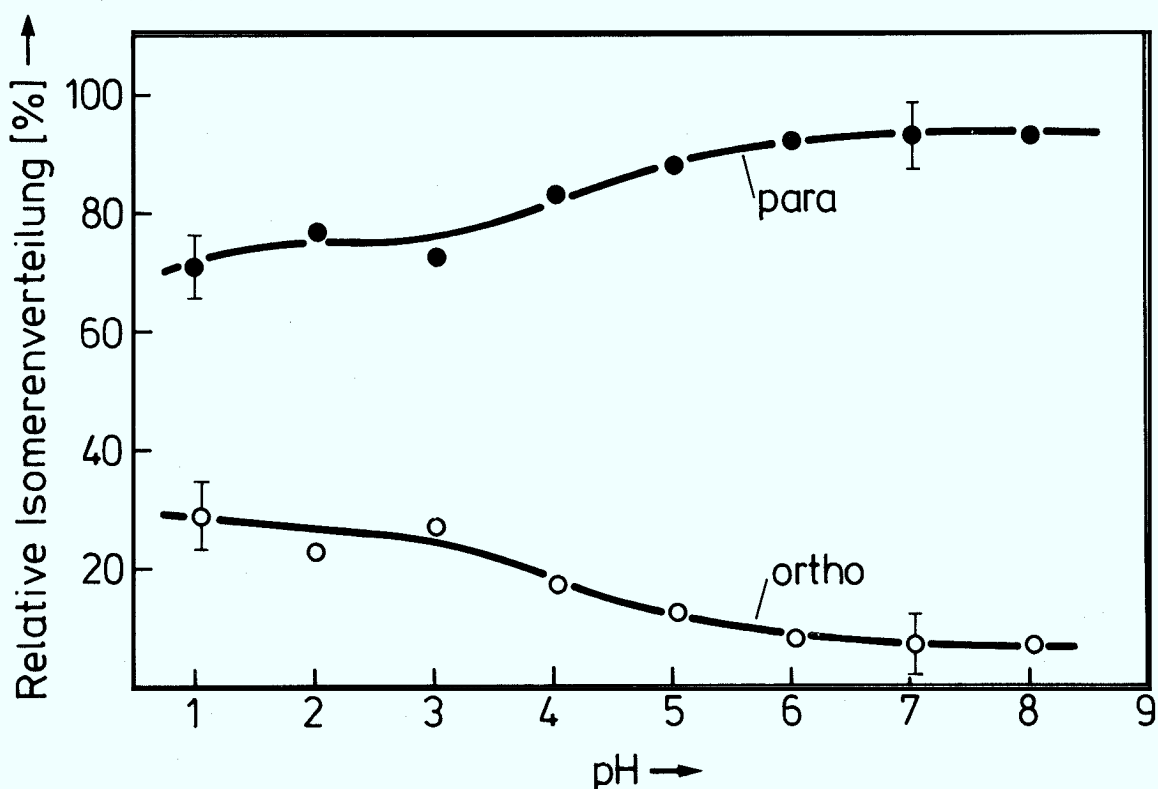


Abb. 14 Relative Isomerenverteilung in Abhängigkeit vom pH-Wert bei der Radioiodierung von Anilin

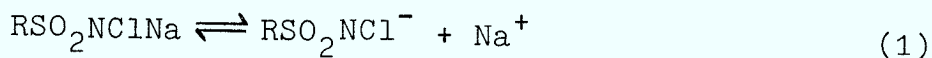
3.2. Zum Mechanismus der Chloramin-T Methode

Bisher wurden mit Chloramin-T fast ausschließlich Iodierungen untersucht; neue Hinweise auf den nach wie vor unklaren Reaktionsmechanismus waren durch die Bromierung zu erwarten, wobei der radiochemische Aspekt der Trägerfreiheit zusätzliche Informationen bieten sollte. Die Unterschiede der pH-Abhängigkeiten von Radiobromierung und -iodierung von Tyrosin, Phenol und Anilin, auf die bereits bei der Optimierung der Radiobromierung und bei den Untersuchungen zur Selektivität eingegangen wurde, geben bereits vielfältige Hinweise über den Reaktionsmechanismus. Darüber hinaus wurden zur weiteren Aufklärung zusätzliche Experimente durchgeführt. Die bisherigen Vorstellungen zum Reaktionsmechanismus, die größtenteils hypothetisch sind, sollen zunächst kurz skizziert werden.

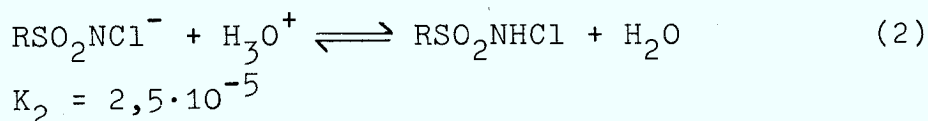
Hunter [87] postulierte die Bildung eines Komplexes zwischen Iodid und Chloramin-T, in dem das Iod positiv polarisiert ist. Dieser Komplex überträgt das Iod direkt auf das Tyrosin. Begründet wurde dies mit der nahezu 100-%igen Ausbeute beim Einsatz von äquimolaren Mengen Iodid und Chloramin-T. Die Autoren führen an, daß im Falle von I_2 als reagierende Spezies bei der heterolytischen Spaltung der Molekel nur eine maximale radiochemische Ausbeute von 50 % zu erwarten sei. Von anderen Autoren [96] wurden jedoch auch die mögliche Bildung und Reaktion von I_2 postuliert. Das bei der elektrophilen Substitution freigesetzte Iodid sollte von Chloramin-T wieder zu I_2 oxidiert werden. Hierdurch würde eine radiochemische Ausbeute >50 % möglich. Wie bereits erwähnt, erklärt Rudinger [94] das Maximum der radiochemischen Ausbeute bei pH 7 mit der beginnenden Dissoziation der phenolischen -OH Gruppe des Tyrosins. Im allgemeinen herrscht Unklarheit über die iodierenden Spezies. Es war sicher, daß aufgrund der S_E -Reaktion ein positiv polarisiertes Iodatombildet werden mußte; diese reagierenden Spezies wurden als " I^+ " umschrieben [54]. Fraglich war weiterhin, ob diese Spezies ein Komplex von Chloramin-T mit Iodid war [87], oder ob durch Hydrolyse von Chloramin-T Hypochlorit gebildet wurde, welches dann Iodid zu einer "positiven" Iod-Spezies oxidiert. Die meisten Autoren sind der Meinung, daß Iodid durch Hypochlorit oxidiert wird, welches durch quantitative Hydrolyse des Chloramin-T entsteht [54].

3.2.1. Die Hydrolyse des Chloramin-T

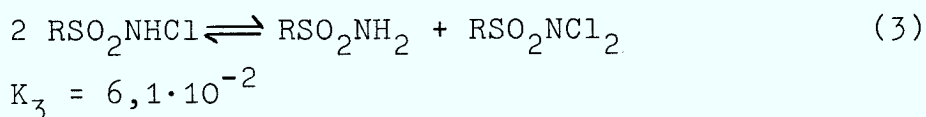
Zu Beginn der Diskussion des Mechanismus sollen zunächst die Spezies betrachtet werden, die in einer Chloramin-T Lösung in Abhängigkeit vom pH-Wert durch die Hydrolyse gebildet werden. Die Hydrolyse des Chloramin-T ist weitgehend untersucht, und für die ablaufenden Reaktionen sind die Gleichgewichtskonstanten ermittelt worden [97-100]. Chloramin-T ist ein starker Elektrolyt, der in wässriger Lösung dissoziiert ($R = CH_3-C_6H_4-$):



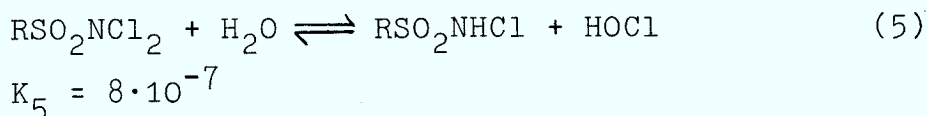
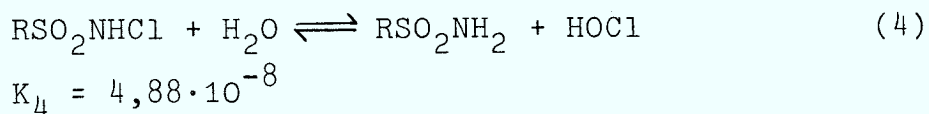
Durch Protonierung des Anions entsteht die freie Säure N-Chlor-p-toluolsulfonamid (CAT-Säure):



Diese kann gemäß Gleichung (3) disproportionieren in p-Toluolsulfonamid und Dichloramin-T (DCT):



Die N-Chlor-Verbindungen hydrolysieren gemäß Gleichungen (4) und (5):



Mit Hilfe dieser Gleichgewichtskonstanten errechnete Jennings [97] in erster Näherung die Konzentrationen der bei der Hydrolyse entstehenden Spezies. Dabei zeigte sich, daß die HOCl Konzentration über den Bereich von pH 1 bis pH 8 nahezu konstant und sehr klein (<0,01 %) ist. Dies bedeutet, daß in einer 10^{-3} M Lösung von CAT eine 10^{-7} M Lösung von HOCl vorliegt, d.h. 10^3 mal höhere Konzentration als die an Radiobromid bzw. -iodid. Die freie Säure RSO_2NHCl ist bei pH 1 das Hauptprodukt der Hydrolyse (~80 %). Mit steigendem pH-Wert dissoziiert die Säure ($\text{pK}_a = 4,6$), so daß ab pH 5 etwa 80 % des eingesetzten Chloramin-T als RSO_2NCl^- vorliegt. Elektrochemische Messungen haben gezeigt [101], daß das Oxidationspotential einer Chloramin-T Lösung im Bereich von pH 5 bis pH 8 relativ konstant ist (130 mV bei einer 10^{-3} M Lösung) und daß unterhalb pH 4 ein steiler Anstieg des Oxidationspotentials (>250 mV bei einer 10^{-3} M Lösung) beobachtet wird. Die Änderung des Redoxpotentials einer

Chloramin-T Lösung wird demnach durch die Änderung der Konzentrationen der N-chlorierten Spezies hervorgerufen. Diese Messungen bestätigen die Berechnungen von Jennings und zeigen, daß das Oxidationspotential nicht von der HOCl-Konzentration abhängig ist. Über die Hydrolyse und die Reaktionen von Chloramin-T oberhalb pH 10 ist wenig bekannt. Oxidationen sind auch in alkalischer Lösung möglich, doch mechanistische Einzelheiten sind nicht bekannt [102]. Andererseits ist dieser Bereich im vorliegenden Falle nicht relevant, da hier keine signifikanten Bromierungsausbeuten erhalten werden.

3.2.2. Reagierende Spezies

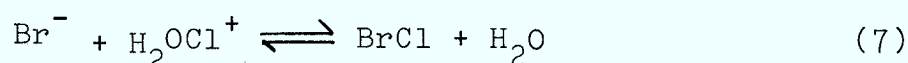
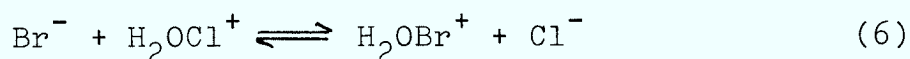
Die Untersuchungen zur Hydrolyse des Chloramin-T haben gezeigt, daß über den gesamten pH-Bereich nur geringe Konzentrationen von Hypochlorit auftreten (s.o.). Obwohl Hypochlorit die reagierende Spezies bei Oxidationen mit Chloramin-T sein könnte, so ist doch die direkte Reaktion der N-chlorierten Spezies, die in wesentlich höheren Konzentrationen vorhanden sind, wahrscheinlicher. Bestätigt wird diese These durch zahlreiche Untersuchungen zur Wirkung von Chloramin-T bzw. Hypochlorit auf Proteine und Aminosäuren [103-106]. Ein oxidativer Angriff auf Peptidbindungen, der zur Spaltung führt, ist beispielsweise nur mit Hypochlorit, aber nicht mit Chloramin-T möglich [107]. Dies zeigt, daß Chloramin-T ein milderer Oxidationsmittel ist, das nicht über die Bildung von Hypochlorit reagiert.

Chloramin-T wird zur Oxidation und zur Chlorierung eingesetzt [108-110]. Diese Untersuchungen zeigen, daß alle Spezies einer CAT-Lösung, die positiv polarisiertes Chlor enthalten, als Donor von " Cl^+ " fungieren können. Da das freie Chlorinium-Ion in wässriger Lösung nicht existiert [111], erfolgt die Übertragung des " Cl^+ ", durch Protonierung des Stickstoffs unterstützt, direkt auf einen geeigneten Akzeptor. Unabhängig von den Reaktionspartnern werden bei der Reduktion von Chloramin-T zwei Elektronen und zwei Protonen übertragen. Der erste Schritt bei Oxidationen mit Chloramin-T ist immer die Übertragung von " Cl^+ ", denn es gibt keine Hinweise auf einen radikalischen Reaktionsmechanismus.

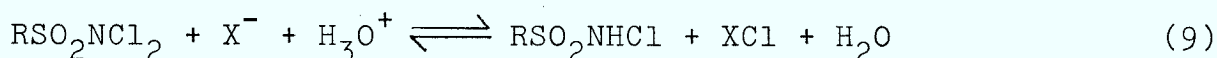
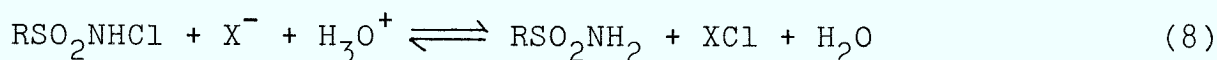
Unter Berücksichtigung der pH-Abhängigkeit der Hydrolyse des Chloramin-T soll die Diskussion der Radiohalogenierungsreaktionen für pH 1 und pH 7 getrennt betrachtet werden. Bei diesen pH-Werten treten die N-chlorierten Spezies in unterschiedlichen Konzentrationen auf, und es werden unterschiedliche Oxidationspotentiale gemessen. Auch die bisherigen Untersuchungen zur Radiohalogenierung zeigen deutliche Unterschiede bezüglich der Reaktionsbedingungen und der Reaktionsprodukte bei diesen beiden pH-Werten. Dies läßt vermuten, daß bei pH 1 und pH 7 unterschiedliche Reaktionsmechanismen ablaufen und verschiedene elektrophile Spezies auftreten. Ein direkter Nachweis der reagierenden Spezies bzw. von Übergangszuständen ist mit physikalischen, z.B. spektroskopischen Methoden, nicht möglich, da die Konzentrationen der betreffenden radioaktiven Spezies extrem gering sind. Eine Zugabe von isotopem Träger ist nicht sinnvoll, weil dadurch die Gleichgewichtsprozesse verändert werden und offensichtlich andere Spezies gebildet werden (s. Trägerabhängigkeit). Deshalb wurde mit Hilfe von Literaturdaten und einigen zusätzlichen Experimenten untersucht, welche der theoretisch möglichen Halogenierungsspezies ausgeschlossen werden können.

Reagierende Spezies bei pH 1

Bei pH 1 entstehen durch Protonierung des CAT-Anions und durch Disproportionierung als Hauptprodukte die CAT-Säure RSO_2NHCl und Dichloramin-T RSO_2NCl_2 [97]. Durch Hydrolyse dieser Substanzen sind bei pH 1 auch stets geringe Konzentrationen von H_2OCl^+ vorhanden [112,113]. Wenngleich dieses Elektrophil aufgrund der Gleichgewichtskonstanten der Reaktionen in sehr geringer Konzentration vorliegt, sind dennoch die folgenden Reaktionen möglich [89]:

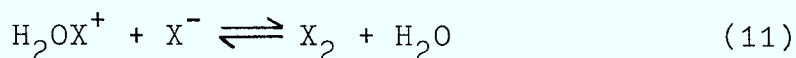
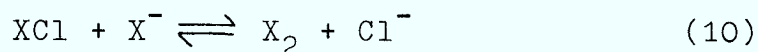


Die Reaktionen mit I^- lassen sich analog formulieren. Die durch die Reaktion (6) entstehenden Spezies H_2OBr^+ bzw. analog H_2OI^+ sind sehr reaktive elektrophile Spezies [114,115], die möglicherweise gebildet werden und über eine S_E -Reaktion mit einem Aromaten zu den brom- bzw. iodmarkierten Produkten führen. Aufgrund der Konzentrationsverhältnisse bei trägerfreiem Halogenid (ca. 10^{-9} M) werden die Reaktionen nach Gleichungen (6) und (7), wenn überhaupt, nur eine untergeordnete Rolle spielen. Die Bildung der Interhalogene XCl ($X = Br, I$) durch direkte Reaktion von CAT-Säure bzw. Dichloramin-T mit Halogenid ist favorisiert:



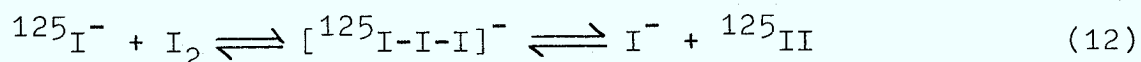
Die Bildung von XCl aus CAT und Halogenid ist in stark saurer Lösung quantitativ und dient beispielsweise zur titrimetrischen Bestimmung von Iodid [102,116]. Diese Reaktion verläuft äußerst schnell und die gebildeten Interhalogene werden in saurer Lösung durch reversible Komplexbildung, z.B. als XCl_2^- , stabilisiert [114,117-120]. Die Interhalogene $BrCl$ und ICl , in denen das Brom- bzw. Iodatomb positiv polarisiert ist, sind sehr reaktive elektrophile Spezies, die mit aktivierten Aromaten schnell und mit hohen Ausbeuten über eine S_E -Reaktion die entsprechenden Halogenverbindungen bilden.

Durch Komproportionierung könnten aus den Interhalogenen bzw. den Hypohaliten und Halogenid nach folgenden Gleichungen prinzipiell auch Br_2^- bzw. I_2 -Moleküle gebildet werden ($X = Br, I$):



Die molekularen Halogene könnten ebenfalls als halogenierende Spezies an der Reaktion beteiligt sein. Bei der Radioiodierung bzw. -bromierung wird das Halogenid jedoch ohne Trägerzusatz (ca. 10^{-9} M) eingesetzt, und Chloramin-T ist in großem Überschuß vorhanden. Angesichts der beobachteten sehr kurzen

Reaktionszeit und der Konzentrationsverhältnisse ist deshalb die Bildung von X_2 unwahrscheinlich. Es ist bekannt, daß Tyrosin bei pH 1 mit molekularem Iod nicht reagiert [121,122]. Um sicherzustellen, daß I_2 als reagierende Spezies auch in mikromolaren Mengen unter den angewendeten Bedingungen auszuschließen ist, wurde darüber hinaus ein Tracer-Experiment gemacht. Eine gesättigte wässrige Lösung von I_2 wurde mit ^{125}I -Iodid versetzt und 10 Minuten gerührt. Dabei findet ein schneller Isotopenaustausch statt:

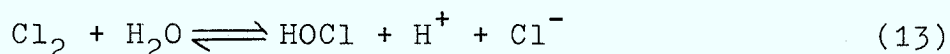


Einige Mikroliter dieser Lösung wurden zu einer Tyrosinlösung von pH 1 bzw. pH 7 gegeben. Aus statistischen Gründen würde die maximale radiochemische Ausbeute bei einer Iodierung über ^{125}II bei 50 % liegen. Das Experiment zeigte nach einer Reaktionszeit von 5 Minuten bei pH 7 etwa 20 % ^{125}I -Tyrosin, dagegen bei pH 1 weniger als 0,1 %. Somit kann I_2 als reagierende Spezies bei pH 1 ausgeschlossen werden.

Unter Berücksichtigung dieser Aspekte läßt sich zusammenfassend sagen, daß die halogenierenden Spezies bei pH 1 mit großer Wahrscheinlichkeit $BrCl$ bzw. ICl sind; H_2OBr^+ und H_2OI^+ spielen bei diesem pH-Wert eine untergeordnete Rolle, da sie nur in sehr geringer Konzentration auftreten können.

Reagierende Spezies bei pH 7

Wie bereits erwähnt, entstehen bei pH 7 durch die Hydrolyse des Chloramin-T nur geringe Mengen von Hypochlorit. Da bekannt ist, daß die Oxidation von Bromid bzw. Iodid mit Hypochlorit eine extrem schnelle Reaktion ist [123], kann man nicht ausschließen, daß die ebenfalls sehr geringen Mengen Radiohalogenid quantitativ zu Hypobromit bzw. Hypiodit oxidiert werden. Um dies zu überprüfen, wurde die Radiobromierung von Tyrosin mit Hypochlorit als Oxidationsmittel näher untersucht. Es wurde die Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute von der Hypochloritkonzentration im Bereich von 10^{-4} bis 10^{-2} M ermittelt. Löst man Chlorgas in Wasser, so bildet sich durch Disproportionierung Hypochlorit und Chlorid:



Bei Cl_2 -Konzentrationen unter 10^{-2} M ist die Hydrolyse nahezu quantitativ; über 99 % des eingesetzten Chlors liegt als Hypochlorit vor. Aus diesem Grund konnten für die Radiobromierung Cl_2 -Lösungen verwendet werden, deren Hypochloritgehalt titrimetrisch bestimmt wurde. In Abbildung 15 ist die radiochemische Ausbeute der Radiobromierung von Tyrosin mit Hypochlorit als Oxidationsmittel in Abhängigkeit von der HOCl -Konzentration aufgetragen. Eine maximale radiochemische Ausbeute von etwa 25 % wird bei einer HOCl -Konzentration von ca. $5 \cdot 10^{-3}$ M erhalten. Mit Chloramin-T erhält man eine maximale Ausbeute von 65 % bei einer CAT-Konzentration von 10^{-2} M. Eine 10^{-2} M CAT-Lösung ist aber nur etwa 10^{-7} M an Hypochlorit und bei dieser geringen HOCl -Konzentration liegt die radiochemische Ausbeute, wie aus Abb. 15 zu ersehen ist, wohl unter 1 %. Daraus läßt sich schließen, daß die Hypohalite HOX ($\text{X} = \text{Br}, \text{I}$), die durch die Oxidation von X^- durch Hypochlorit entstehen, nicht die halogenierenden Spezies bei pH 7 sind, sondern daß die N-chlorierten Spezies in der Chloramin-T Lösung offensichtlich an der Reaktion beteiligt sind. Weiterhin zeigt die Abb. 15, daß HOCl ein aggressiveres Oxidationsmittel ist als Chloramin-T, denn das rasche Absinken der radiochemischen Ausbeute bei steigender HOCl -Konzentration ist auf die Bildung zahlreicher Nebenprodukte zurückzuführen, die schon bei vergleichsweise geringeren Konzentrationen auftreten, als im Falle von Chloramin-T.

Die Reaktionen von Chloramin-T mit Iodid sind von pH 1 bis pH 9 untersucht worden, und es ist bekannt, daß I^- bei pH 7 zu I_2 oxidiert werden kann [102]. Die Oxidation von Bromid ist nicht speziell untersucht worden, doch eigene Untersuchungen haben gezeigt, daß unter den gegebenen Bedingungen bei pH 7 aus Bromid Br_2 gebildet werden kann, wenngleich die Reaktion nicht quantitativ ist. Aufgrund der Konzentrationsverhältnisse bei der Radiohalogenierung mit Chloramin-T bei pH 7 ($\text{CAT} : \text{X}^- = 10^6 : 1$) ist die Bildung von molekularem Halogen unwahrscheinlich.

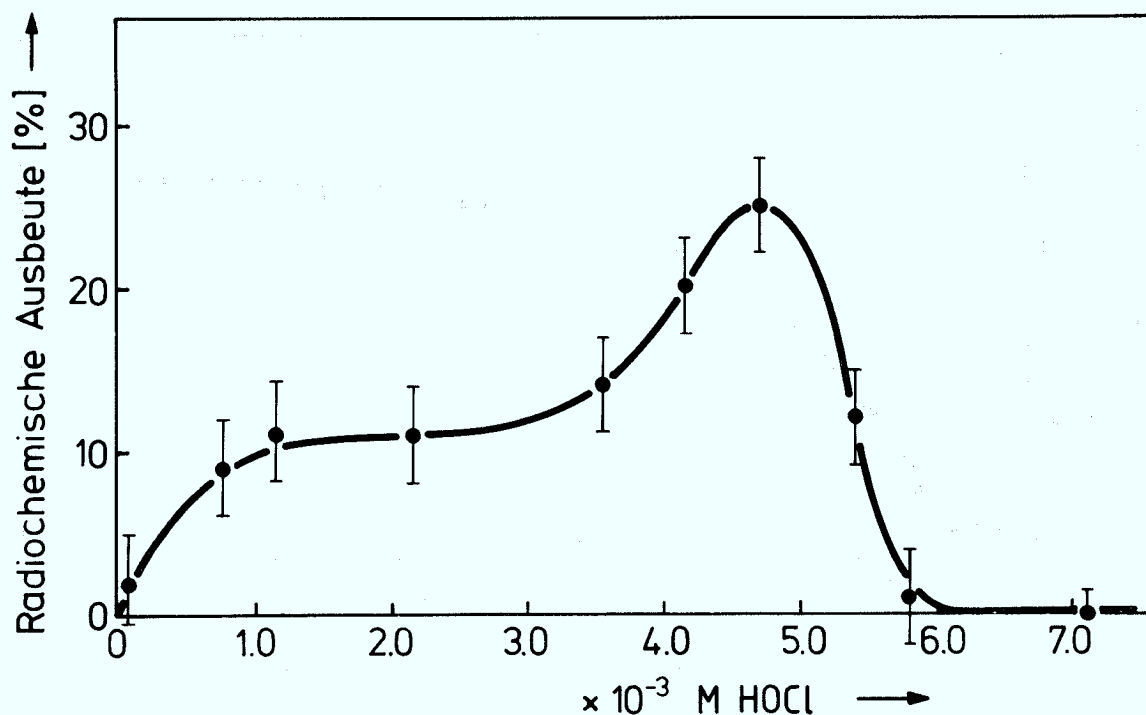
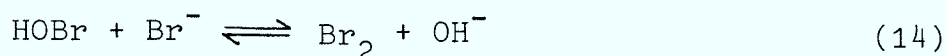


Abb. 15 Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute bei der Radiobromierung von Tyrosin von der HOCl-Konzentration bei pH 7
($2,6 \cdot 10^{-3}$ M Tyr, 500 μ l Lösung, 3 min, pH 7, 22 °C)

Ein weiteres Argument gegen X_2 als halogenierende Spezies ist die Trägerabhängigkeit. In Abbildung 16 ist die radiochemische Ausbeute der Radiobromierung von Tyrosin bei pH 7 in Abhängigkeit vom Logarithmus des Konzentrationsverhältnisses CAT/Br^- aufgetragen. Je höher die Bromidkonzentration bei konstanter Chloramin-T Konzentration, d.h. je kleiner der $\log \frac{[CAT]}{[Br^-]}$, desto geringer ist die radiochemische Ausbeute.

Der Verlauf der Kurve deutet an, daß bei etwa gleichen Konzentrationen von Chloramin-T und Bromid die radiochemische Ausbeute gegen Null geht. Ähnliche Ergebnisse zur Trägerabhängigkeit wurden bei der Radioiodierung von Chloroquinen und Uracilen mit Chloramin-T erhalten [75,124]. Bei höheren Bromidkonzentrationen wird offensichtlich durch Komproportionierung Br_2 gebildet:



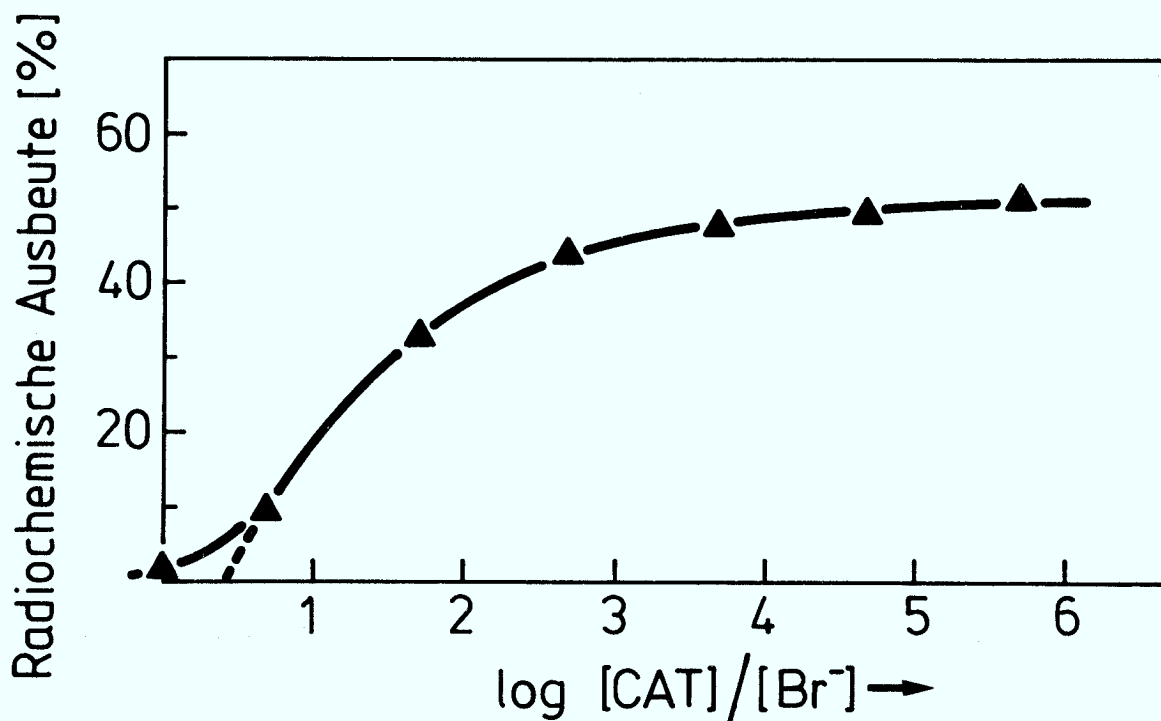


Abb. 16 Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute bei der Radiobromierung von Tyrosin mit Chloramin-T vom Konzentrationsverhältnis CAT/Br^- bei pH 7
($2,6 \cdot 10^{-3}$ M Tyr, 500 μl Lösung, 10^{-2} M CAT, 2 min, pH 7, 22 °C)

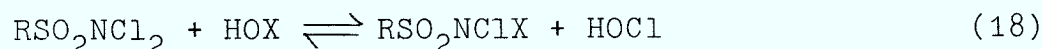
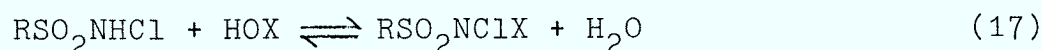
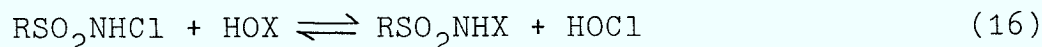
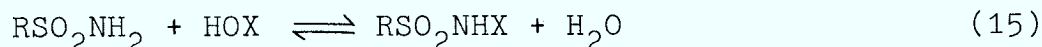
Dies läßt sich bereits an der Färbung der Reaktionslösung erkennen. Das gebildete Brom reagiert bei pH 7 aber nicht mit dem aromatischen System des Tyrosins, sondern bevorzugt mit der Amino-Gruppe unter Bildung von N-Bromtyrosin [125]. Aus dieser instabilen Verbindung könnten durch Folgereaktionen zahlreiche nicht identifizierte Nebenprodukte gebildet werden, wodurch eine geringe Ausbeute an 3-Bromtyrosin erhalten wird. Da bei der Radioiodierung mit Chloramin-T wahrscheinlich ebenfalls erst bei höheren Iodidkonzentrationen molekulares Iod gebildet wird, kann man die molekularen Halogene als reagierende Spezies zumindest bei der Bildung des 3-Halogentirosin bei pH 7 ausschließen.

Die bisherigen Untersuchungen haben gezeigt, daß man die meist diskutierten Spezies ausschließen kann. Es kommen deshalb als reagierende Spezies offensichtlich nur noch

N-Halogenverbindungen in Frage. Kinetische und thermodynamische Untersuchungen von Chlorierungsreaktionen mit Chloramin-T haben gezeigt, daß bei pH 7 als Chlorierungsmittel nur die N-Chlorverbindung RSO_2NHCl an der Reaktion beteiligt ist [109]. Bromierungen mit Bromamin-B (N-Brom-Benzolsulfonamid Natriumsalz) zeigten ebenfalls, daß die bromierende Spezies die N-Halogenverbindung RSO_2NHBr und nicht HOBr ist [126].

Die in dieser Arbeit [126] diskutierten Spezies treten wahrscheinlich im alkalischen sowie im neutralen Bereich ($>\text{pH } 6$) auf. Der Grund, daß wir bei höherem pH ($>\text{pH } 8$) keine radiochemische Ausbeute finden, muß dann an den "trägerfreien" Konzentrationsverhältnissen liegen. Alles HOX wird unter unseren Reaktionsbedingungen in OX^- überführt, damit ist die Bildung der N-X Spezies nicht mehr möglich.

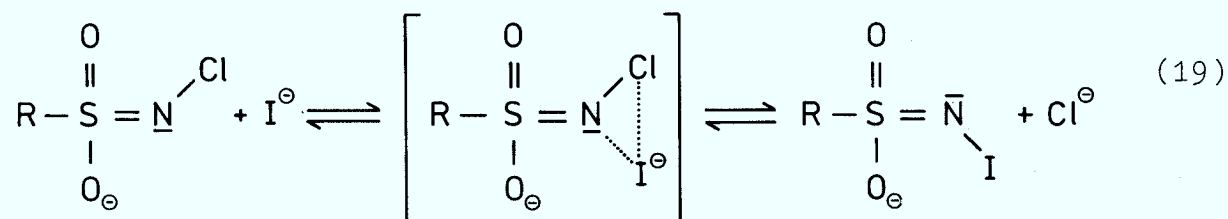
Die Bildung der N-Halogenverbindungen läßt sich folgendermaßen formulieren ($\text{X} = \text{Br}, \text{I}$):



Als erster Schritt der Reaktion wird dabei die schnelle Oxidation von X^- durch HOCl zu HOX vorausgesetzt. Nach Gleichungen (15) und (16) entstehen die Monohalogenverbindungen N-Brom-p-toluolsulfonamid bzw. N-Iod-p-toluolsulfonamid. Auch die Bildung der gemischten N-Dihalogenverbindungen nach Gleichungen (17) und (18) ist vorstellbar, doch dürften diese Reaktionen aufgrund der geringeren Konzentration von Dichloramin-T und der geringen Bildungswahrscheinlichkeit der N-Dihalogenderivate bei diesem pH-Wert (vgl. Gl. 2 und 3) nur eine untergeordnete Rolle spielen. Diese Reaktionen würden auch erklären, warum die Radioiodierungen bis etwa pH 10 möglich sind, die Radiobromierungen dagegen nur bis etwa pH 8 (vgl. S. 31). Die Bildung der N-Halogenverbindungen erfolgt aus hypobromiger Säure ($\text{pK}_a = 8,7$ [127]) und hypoiodiger Säure ($\text{pK}_a = 10,6$ [127]); wenn diese zu den Hypohalit-Anionen dissoziieren, ist die Bildung der N-Halogenspezies nicht mehr

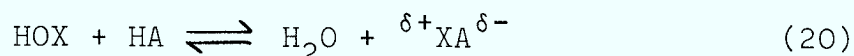
möglich, da die Anionen keine elektrophilen Reaktionen eingehen [128,129].

Eine weitere Möglichkeit der Bildung der N-Halogenverbindungen ist der oxidative Austausch der Halogene, wie er in Gleichung (19) für Iodid dargestellt ist, wobei man den Übergangskomplex als ICl_2^- Analog verstehen kann:



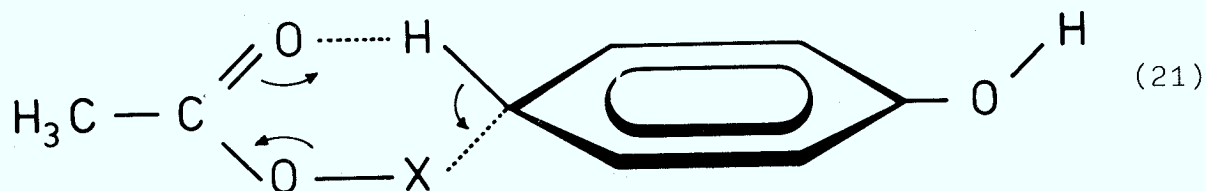
Die Bildung der N-Bromverbindung könnte analog verlaufen. Der formulierte Übergangszustand wird bei pH 1 zwar ähnlich aussehen, aber durch die hohe H^+ -Konzentration wird die Protonierung des Komplexes unter Abspaltung von XCl bevorzugt ablaufen. Die betrachteten N-halogenierten Spezies reagieren offensichtlich nur mit aktivierten Aromaten.

Im Bereich zwischen pH 1 und pH 7 findet ein kontinuierlicher Übergang von einem Reaktionsmechanismus zum anderen statt, bedingt durch die Verschiebung komplexer Gleichgewichtsprozesse. Weiterhin muß noch auf die vielfältigen katalytischen Effekte hingewiesen werden, die auf die Anionen der verwendeten Pufferlösungen zurückzuführen sind. Sie sind möglicherweise die Ursache für die stark schwankende Isomerenverteilung bei der Radioiodierung von Phenol im Bereich von pH 3 bis pH 6. Praktisch alle anionischen Substanzen, die in der Reaktionslösung vorhanden sind, können als "Halogeniumträger" am Mechanismus beteiligt sein. Dies soll anhand der folgenden Gleichung erläutert werden:



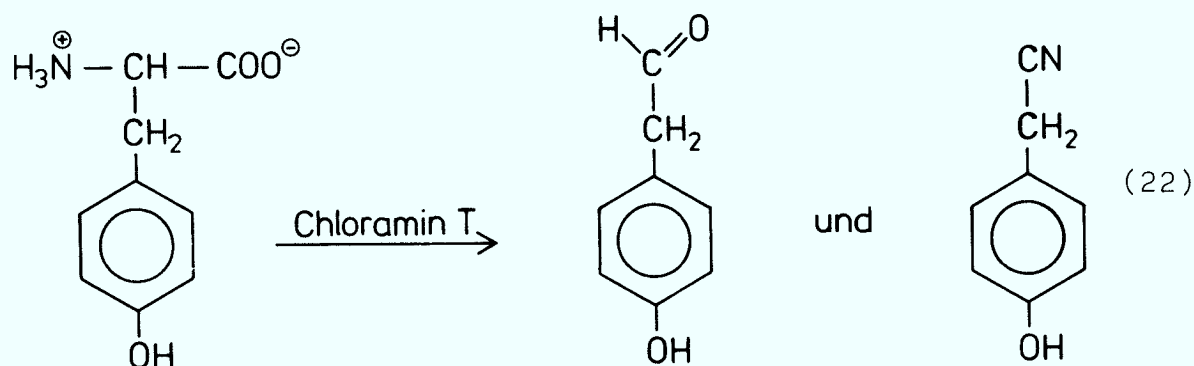
X ist das positiv polarisierte Halogen, A ein Anion und HA die konjugate Säure. Die Eigenschaften des Anions sind maßgebend für die Stabilität und Reaktivität der Verbindung XA [128,130]. Somit können verschiedene elektrophile Spezies auftreten, die sich in ihrer Reaktivität und Selektivität deutlich unterscheiden.

Ein weiterer katalytischer Effekt von Anionen beruht auf ihrer Unterstützung der Abspaltung eines Protons aus dem aromatischen σ -Komplex, der durch Angriff des Elektrophils auf den Aromaten entsteht. Möglich ist auch eine synchrone Reaktion, bei der X^+ übertragen und gleichzeitig H^+ abstrahiert wird. Für das Acetat-Anion wird der Übergangszustand dieser Reaktion folgendermaßen formuliert [131]:

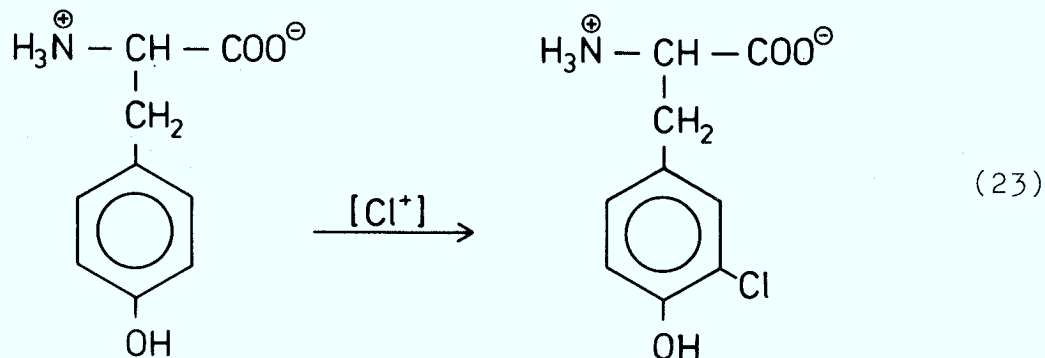


3.2.3. Wichtige Nebenreaktionen

Um das Reaktionsschema der Chloramin-T Reaktion klarer darstellen zu können, sollen zunächst noch einige wichtige Nebenreaktionen beschrieben werden. Die Optimierung der Chloramin-T Methode für Radiobromierungen wurde an Tyrosin als Modellsubstanz durchgeführt. Es war zu erwarten, daß bei höheren Chloramin-T Konzentrationen oxidative Nebenreaktionen auftreten, da die Oxidationswirkung auf Proteine und Aminosäuren bekannt sind [100,103-107]. Aminosäuren werden von Chloramin-T in neutraler wässriger Lösung zu Aldehyden oder Nitrilen abgebaut. Bei der Radiohalogenierung von Tyrosin mit Chloramin-T können demnach u.a. folgende Nebenreaktionen auftreten:



Dieser oxidative Abbau beginnt formal mit der Übertragung von "Cl⁺" auf die NH₂-Gruppe der Aminosäure [103,104]. Die entstehenden N-Chlor-Derivate sind instabil und werden in wässriger Lösung durch Abspaltung von CO₂, NH₄Cl und HCl zersetzt. Außerdem tritt als Nebenprodukt 3-Chlortyrosin auf, da das aromatische System im Tyrosin durch die phenolische OH-Gruppe bezüglich elektrophiler Substitution aktiviert ist:



Das Elektrophil ist je nach pH-Wert RSO₂NHCl oder eine andere Spezies, in der das Chloratom positiv polarisiert ist. Die Oxidationsreaktionen verlaufen nur bei höherer Temperatur quantitativ und im allgemeinen sehr langsam [107]. Durch diese Nebenreaktionen entstehen jedoch keine halogenmarkierten Produkte, so daß die radiochemische Ausbeute nicht beeinflußt wird, wenn das Substrat, in diesem Fall das Tyrosin, in ausreichend hoher Konzentration vorhanden ist.

Bei der Proteinmarkierung wird die Radioiodierungsreaktion üblicherweise durch Zugabe von Natriumbisulfitlösung beendet. Dieses Reduktionsmittel soll das überschüssige Chloramin-T abbauen und eventuell gebildetes molekulares Iod zu Iodid reduzieren [55]. Es sollte deshalb der Einfluß von Bisulfit auf die radiochemische Ausbeute geklärt werden. Bei der Radioiodierung von Tyrosin wurde kein Einfluß auf die radiochemische Ausbeute festgestellt. Einen deutlichen Einfluß hatte die Bisulfitzugabe jedoch bei der Radiobromierung von Tyrosin bei pH 7, nicht aber bei pH 1. Wird die Reaktion unter optimalen Bedingungen durchgeführt, so erhält man mit Bisulfitzugabe eine radiochemische Ausbeute von ca. 65 % Bromtyrosin.

Ohne Bisulfitzugabe werden, unter sonst gleichen Reaktionsbedingungen, nur 1 bis 2 % Bromtyrosin gebildet. In Abbildung 17 sind die Chromatogramme der HPLC-Trennung für die beiden Produktlösungen mit und ohne $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ dargestellt. Ohne Bisulfit findet man nach einer Reaktionszeit von 3 Minuten 2 bis 3 %

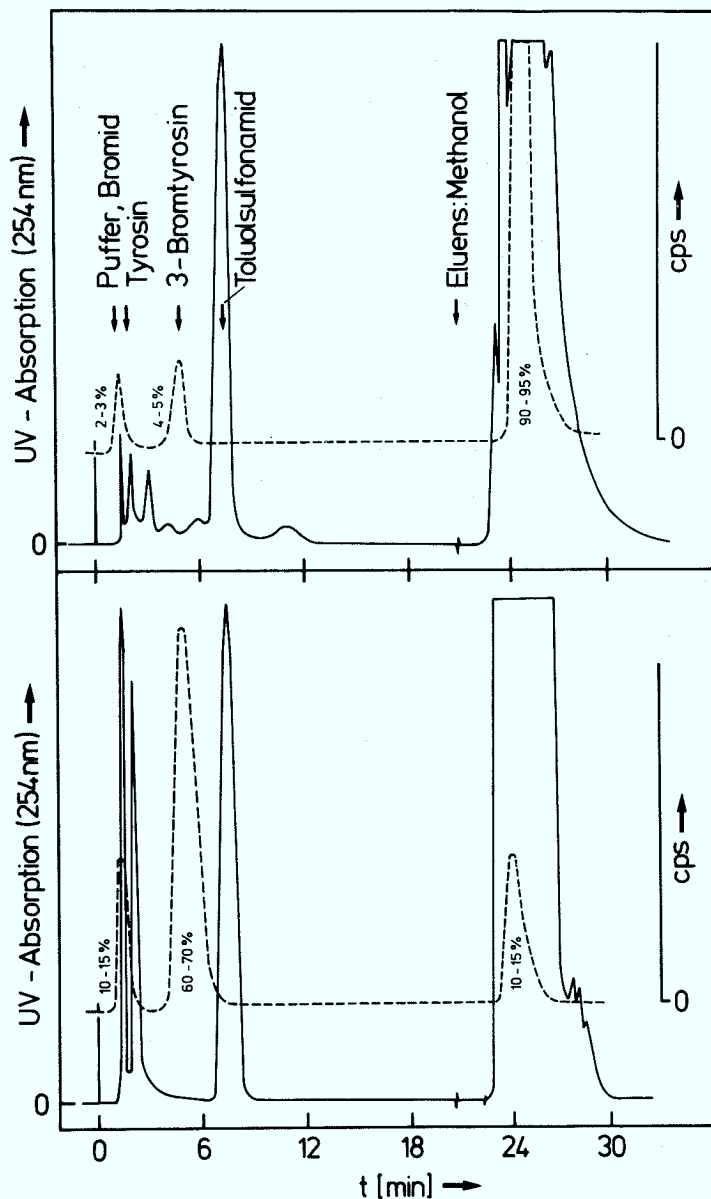


Abb. 17 Chromatogramme (UV-Absorption und Radioaktivität) der HPLC-Trennung für die Radiobromierung von Tyrosin bei pH 7 ohne (oben) und mit Bisulfitzugabe (unten)
 $(2,6 \cdot 10^{-3} \text{ M Tyr, } 500 \mu\text{l Lösung, } 10^{-2} \text{ M CAT, } 3 \text{ min, } 22^\circ\text{C})$

Radiobromid, 1 bis 2 % 3-[⁷⁷Br]-Bromtyrosin und nur 10 bis 20 % des eingesetzten inaktiven Tyrosins (UV-Absorption). Beim Wechsel des Eluens auf Methanol werden die restlichen 90 bis 95 % der eingesetzten Radioaktivität eluiert. Das zweite Chromatogramm zeigt die Analyse der Reaktionslösung, der nach 3 Minuten Bisulfit zugesetzt wurde. In dieser Lösung findet man 10 bis 15 % Radiobromid, 60 bis 65 % 3-[⁷⁷Br]-Bromtyrosin und erstaunlicherweise 90 bis 95 % des eingesetzten inaktiven Tyrosins. Bei der Oxidation von Tyrosin findet wahrscheinlich der Austausch von "Cl⁺" zwischen der Aminogruppe des Sulfonamids und der Aminogruppe des Tyrosins in einem zyklischen Übergangszustand statt, wie er für die Halogenübertragung zwischen Aminen beschrieben ist [109]. Dieser Komplex wird durch die Bisulfitzugabe zerstört, und das Tyrosin wird wieder freigesetzt. Da die N-Bromspezies wahrscheinlich auch bevorzugt in dieser Weise reagieren, wird nur wenig 3-Bromtyrosin gebildet. Nur wenn zum richtigen Zeitpunkt (2,5 min, s. Abb. 5) Bisulfit zugegeben wird, erhält man die maximale radiochemische Ausbeute von 65 % 3-[⁷⁷Br]-Bromtyrosin. Unerklärlich bleibt jedoch die Wirkungsweise des Bisulfits; wie kann durch Zugabe eines Reduktionsmittels eine elektrophile Reaktion ausgelöst werden? Im Falle der Iodierung reagiert möglicherweise die N-Iodverbindung aufgrund der leichteren Polarisierbarkeit des Iods - eventuell in einer intramolekularen Reaktion - mit dem aromatischen System des Tyrosins; dies wäre eine Erklärung dafür, daß hier die Bisulfitzugabe entbehrlich ist.

Um den Einfluß von freien Aminogruppen näher zu untersuchen, wurden noch zwei weitere Experimente durchgeführt. Bei einer Radiobromierung von Phenol bei pH 7 wurde der Reaktionslösung eine dem Phenol äquimolare Menge Glycin zugesetzt. Auf diese Weise enthält die Reaktionslösung die gleichen funktionellen Gruppen wie die Tyrosinlösung, nur sind sie diesmal auf zwei Moleküle (intermolekulares Konkurrenzexperiment) verteilt. Die radiochemische Ausbeute der Bromphenole sank durch die Glycinzugabe von ca. 65 % auf 1 bis 2 %. Weiterhin wurde eine Radiobromierung von N-Formyltyrosin bei pH 7 durchgeführt. Durch die Formylierung sollte die störende Nebenreaktion nicht mehr möglich sein. Es wurde bei pH 7 selbst bei einer CAT-Konzentration

von nur 10^{-3} M und ohne Bisulfitzugabe über 60 % 3-[^{77}Br]-N-Formyl-3-bromtyrosin gebildet. Dies verdeutlicht die störende Nebenreaktion mit freien Aminogruppen, die auch die Ursache sein wird für das Absinken der radiochemischen Ausbeute oberhalb pH 5 bei der Radiobromierung von Anilin.

3.2.4. Reaktionsschema in wässriger Lösung

Durch Zusammenfassung der Informationen über den Mechanismus der zum Monohalogenderivat führenden Reaktionen (ohne Berücksichtigung von Nebenreaktionen) ergibt sich für die Radiobromierung bzw. -iodierung von Tyrosin mit Chloramin-T bei pH 1 ein Reaktionsschema, das in Abb. 18 dargestellt ist.

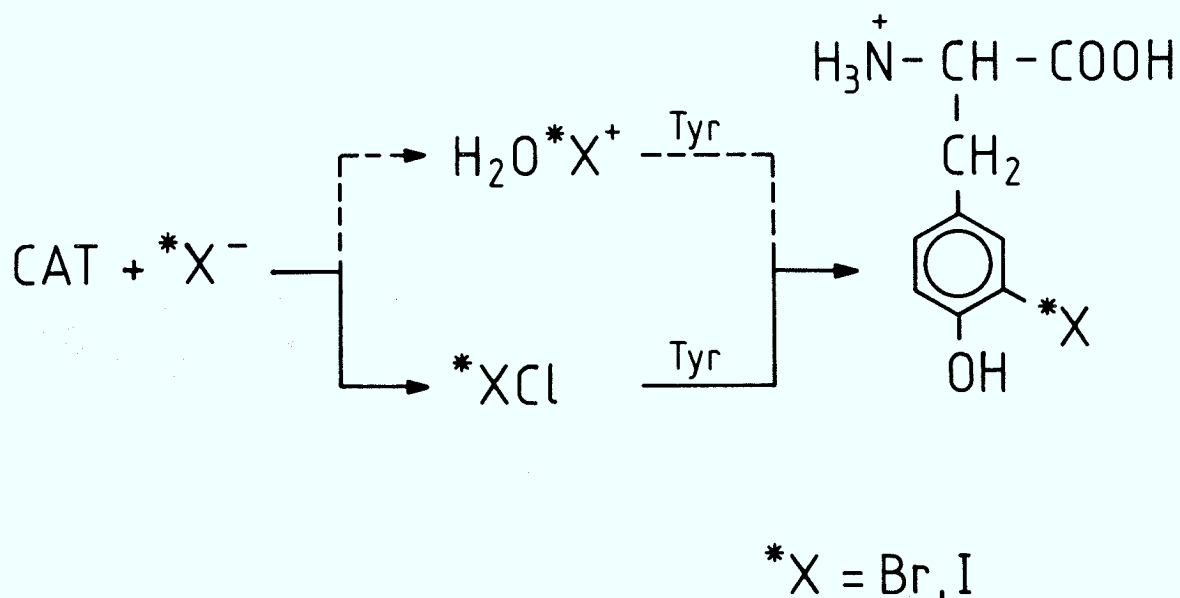


Abb. 18 Reaktionsschema für die Radiohalogenierung von Tyrosin mit Chloramin-T bei pH 1

Bei pH 1 handelt es sich bei den reagierenden Spezies mit großer Wahrscheinlichkeit um BrCl bzw. ICl . H_2OBr^+ und H_2OI^+ spielen nur eine untergeordnete Rolle. BrCl und ICl , in denen das Brom- bzw. Iodatome positiv polarisiert ist, sind reaktive elektrophile Spezies, die mit aktivierten Aromaten in einer elektrophilen Substitution die entsprechenden Halogenverbindungen bilden. Da BrCl ein besseres elektrophiles Agens ist als ICl , erhält man

bei der Radiobromierung etwas höhere Ausbeuten. Untersuchungen zur präparativen Halogenierung von Aromaten haben gezeigt, daß nur aktivierte Aromaten, wie z.B. Phenole, mit Interhalogenen bromiert bzw. iodiert werden können [118,132,133]. Dies erklärt die geringen radiochemischen Ausbeuten bei der Radiobromierung von z.B. Phenylalanin.

Die mit steigendem pH-Wert geringer werdenden radiochemischen Ausbeuten bei der Radiohalogenierung mit Chloramin-T, insbesondere beim Tyrosin, deuten darauf hin, daß die Bildung der genannten reagierenden Spezies abnimmt und andere, weniger reaktive Spezies gebildet werden.

Bei pH 7 wird die Reaktion, wie bereits bei der Diskussion der reagierenden Spezies demonstriert, über die Bildung der N-halogenierten Spezies verlaufen. Das Reaktionsschema für pH 7 am Beispiel von Phenol, ohne Berücksichtigung von Nebenreaktionen, ist in Abb. 19 dargestellt.

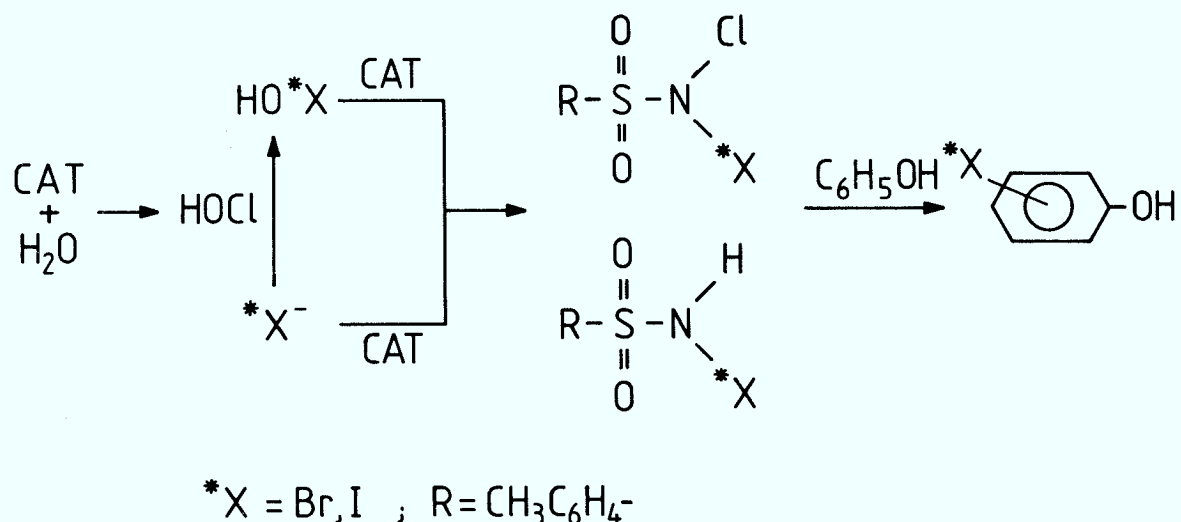
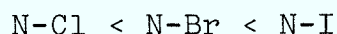
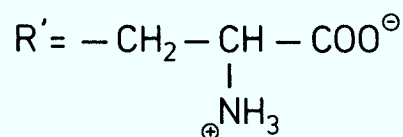
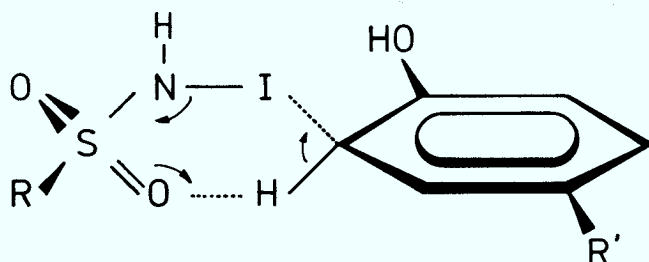


Abb. 19 Reaktionsschema für die Radiohalogenierung mit Chloramin-T bei pH 7 am Beispiel von Phenol

N-Halogenverbindungen werden durch oxidativen Halogenaustausch oder über die Hypohalite gebildet und reagieren dann mit dem Substrat in einer S_E -Reaktion zu den entsprechenden Halogenverbindungen. Aufgrund der Polarisierung der N-X Bindung kann man folgende Reaktivitätsabstufung ableiten:



Die N-Iodverbindung hat das kleinste Dipolmoment, weil Iod in der Reihe der betrachteten Halogene die geringste Elektronegativität aufweist. Dadurch ist die Elektronendichte des Halogens beim Iod am geringsten und I^+ kann am leichtesten übertragen werden. Dies zeigt sich auch bei den durchgeführten radiochemischen Untersuchungen. Bei der Radioiodierung werden (bei pH 7) die höchsten Ausbeuten von über 90 % erhalten, bei der Bromierung sind es nur ca. 65 %, und Untersuchungen zur Radiochlorierung haben gezeigt, daß nur etwa 20 % chlormarkierte Produkte erhalten werden [75]. Trotz hoher Chloramin-T Konzentrationen wird deshalb nur wenig 3-Chlortyrosin als Nebenprodukt bei der Radiohalogenierung von Tyrosin gebildet. Für die N-Brom- bzw. N-Iodverbindung ließe sich ein Übergangszustand formulieren, bei dem die X^+ Übertragung auf den Aromaten und H^+ Abstraktion synchron ablaufen, wie für das Acetat-Ion (s. S. 49) beschrieben wurde:



Weitere mechanistische Betrachtungen, insbesondere die Diskussion, ob bei der Halogenierung von Phenol und Anilin zunächst die O-Halogen- bzw. N-Halogenverbindungen entstehen [109,138], sowie die Diskussion, ob die Reaktion über einen π -Komplex oder einen σ -Komplex verläuft, sollen hier nicht behandelt werden, da dies allgemeine Probleme der Aromatensubstitution sind [130].

Die Bildung der Interhalogenverbindungen in-situ, ausgehend von Halogenid, hat mittlerweile auch in der präparativen "kalten" organischen Synthese Bedeutung erlangt [135,136], doch der Vorteil dieser Reaktion zeigt sich besonders bei Synthesen mit trägerfreiem Radiobromid bzw. -iodid, da die Halogenide hier praktisch quantitativ zu elektrophilen Spezies oxidiert werden. Dadurch können im Gegensatz zur Oxidation zu X_2 ($X = \text{Br}, \text{I}$) radiochemische Ausbeuten weit über 50 % als praktisch trägerfreie Produkte erhalten werden [36,56,137].

Während die Reaktion bei pH 1 auch bei Zusatz von Halogenid-Träger über die Interhalogenverbindung verlaufen sollte [102], ist die Reaktion bei pH 7 ein Sonderfall. Die Bromierung von Aromaten mit geeigneten N-Bromsulfonamiden (z.B. Bromamin-B) ist eine bekannte Reaktion [126], die auch im alkalischen Bereich bis pH 12 abläuft. Die in-situ Erzeugung der N-Brom- bzw. N-Iodverbindung, ausgehend von Halogenid und Chloramin-T, läßt sich jedoch nur mit mikromolaren Mengen an Halogenid und nur bis pH 8 durchführen. Somit ist diese in-situ Oxidation nur für radiochemische Synthesen ohne Trägerzusatz und nur im neutralen und schwach alkalischen Bereich geeignet.

3.3. Radiobromierung von Peptiden und Proteinen

Die Radioiodierung von Proteinen wird seit über 20 Jahren praktiziert. Iodmarkierte Proteine werden aufgrund der erreichbaren hohen spezifischen Aktivität für viele biochemische, pharmakologische und medizinische Untersuchungen eingesetzt. Eines der bekanntesten Anwendungsgebiete sind die Radioimmunoassays für Antigen-Antikörper Systeme [54,134,139] und Hapten-Antikörper Systeme [54,140,141], mit deren Hilfe geringste Konzentrationen bestimmter Substanzen im Organismus erfaßt werden können.

Weiterhin sind viele Proteine markiert worden, um deren Metabolismus in Organen [142], Gewebekomposition [143] und in Zellkulturen [144] zu untersuchen. Auch bei der Erforschung der Peptidhormone wurden iodmarkierte Moleküle erfolgreich eingesetzt. In letzter Zeit konzentriert sich dabei das Interesse auf die Bindung der Hormone an Zellmembranen (Rezeptorstudien), das Eindringen in die Zelle und den anschließenden Katabolismus [145-147].

Für die Iodmarkierung von Proteinen stehen mehrere Methoden zur Verfügung, von denen die Chloramin-T Methode, die Iodmonochlorid Methode, die enzymatische Iodierung und die elektrochemische Iodierung die wichtigsten, routinemäßig angewendeten Direktmarkierungsverfahren sind. Allerdings werden bei der Anwendung dieser Methoden die zu markierenden Proteine bzw. Peptide durch Nebenreaktionen mit den zugesetzten Reagentien häufig so stark in ihren spezifischen biochemischen Eigenschaften verändert, daß die markierten Produkte für die vorgesehenen Untersuchungen unbrauchbar sind [148-154]. Dies führte zur Entwicklung zahlreicher Konjugationsmethoden, bei denen zunächst ein kleineres Molekül markiert wird, welches dann in einem weiteren Reaktionsschritt, unter wesentlich mildereren Reaktionsbedingungen, an das Protein angekoppelt wird [155-158]. Im Laufe der Zeit entwickelte sich die Proteinmarkierung somit zu einem Spezialgebiet der Halogenmarkierung, denn die Konjugationsmethoden können praktisch nur bei Proteinen angewendet werden, da die Einführung eines großen Restes nur bei makromolekularen Substanzen zu einer vernachlässigbar kleinen Änderung der physikalischen und chemischen Eigenschaften führt. Es gibt jedoch keine Radioiodierungsmethode,

die für alle Proteine geeignet ist. Da die spezifischen biochemischen Eigenschaften eines Proteins auf unterschiedliche funktionelle Gruppen von Aminosäuren und deren Anordnung im Molekül zurückzuführen sind, können bei jedem Protein andere Nebenreaktionen zum Verlust der biologischen Aktivität führen. Es hängt von der Art der durchzuführenden Untersuchung ab, wie wichtig die speziellen biochemischen Eigenschaften markierter Proteine sind. Um sicher zu sein, daß das markierte Protein durch die Reaktionsbedingungen bei der Markierung und durch die Einführung des Isotops bzw. eines radioaktiv markierten Moleküls (Konjugation) funktionell nicht beeinflußt wurde, untersucht man die markierten Proteine auf ihre Bindungsspezifität, ihre biochemische Aktivität, z.B. Enzymaktivität, oder ihre immunologische Reaktivität. Werden durch diese Tests keine Änderungen im biochemischen Verhalten festgestellt, so ist die Eignung dieser Substanzen für biochemische Untersuchungen sichergestellt. Doch selbst, wenn die biologische Aktivität vollständig erhalten bleibt, läßt sich daraus nicht ableiten, daß sich das markierte Protein in-vivo genauso verhält wie das unmarkierte Molekül. Bei dem Protein Vitellogenin, das nach der Chloramin-T Methode radioiodiert worden war, fand man beispielsweise, daß die spezifische Bindung an die Zellmembran und der Transport durch diese Membran völlig mit dem Verhalten des unmarkierten Proteins übereinstimmte (Erhalt der biologischen Aktivität). Dennoch war die intrazelluläre Abbaurate des markierten Proteins wesentlich höher als die des unmarkierten Proteins [147]. Wichtig ist demnach, das Protein nach der Markierung auf die biologischen Eigenschaften zu testen, die für die durchzuführenden Untersuchungen entscheidend sind. Wenn wichtige Eigenschaften des Proteins verlorengegangen sind, so bringt oft das Ausweichen auf eine andere Methode den gewünschten Erfolg. Es ist deshalb vorteilhaft, daß möglichst viele verschiedene Markierungsmethoden zur Verfügung stehen.

Während für in vitro Untersuchungen praktisch nur iodmarkierte Proteine eingesetzt werden, ist es für in-vivo Untersuchungen, insbesondere für Studien im menschlichen Organismus, oft vorteilhaft, brommarkierte Verbindungen zu verwenden. Auf die Vorteile radiobromierter Biomoleküle ist bereits in der Einleitung

hingewiesen worden. Für die Entwicklung von Radiobromierungsmethoden sind die bekannten Iodierungsmethoden brauchbare Ansatzpunkte. Wie bereits erwähnt, treten bei der Adaption dieser Methoden für Radiobromierungen jedoch häufig Schwierigkeiten auf, die eine Modifizierung der Methoden erfordern.

Die Untersuchungen zur Radiobromierung aromatischer Moleküle mit Chloramin-T haben gezeigt, daß viele Moleküle, die für Konjugationsmethoden verwendet werden, mit hohen radiochemischen Ausbeuten und mit hoher spezifischer Aktivität dargestellt werden könnten. Als Beispiele seien hier genannt das Bolton-Hunter-Reagenz [155] und Anilin [157], zwei Kopplungsreagenzien, die sehr gut mit Chloramin-T radiobromiert werden können. Da direkte Methoden den Vorteil der einfacheren Durchführung haben, sollte auch untersucht werden, inwieweit die Chloramin-T Methode für die direkte Radiobromierung von Proteinen geeignet ist. Für diese Untersuchungen wurden zunächst kleinere Peptide radiobromiert, um chemische Aspekte der Reaktion zu studieren. Anschließend wurde die Radiobromierung von Proteinen durchgeführt, wobei auch der Erhalt der biologischen Aktivität überprüft wurde.

3.3.1. Markierung von Peptiden mit Radiobrom

Im Hinblick auf Proteinmarkierung ist bekannt, daß bei der Radioiodierung vor allem Tyrosinreste markiert werden [159]. In kleinerem Ausmaß werden aber auch Histidin [160], Phenylalanin [159] und Tryptophan [161] radioiodiert. Es wurde deshalb untersucht, inwieweit sich Oligopeptide, die diese potentiell halogenierbaren Aminosäuren enthalten, radiobromieren lassen. Ausgewählt wurden die Peptide Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly und Gly-His-Gly. Es wurden Peptide verwendet, weil sie bessere Modellsubstanzen für Proteine als Aminosäuren sind, und Unterschiede bei der Reaktion von freien Aminosäuren und proteingebundenen Aminosäuren auftreten [162]. Aus diesem Grunde und zur besseren Übersicht sind auch 3 Peptide, die Tyrosin enthalten, in diese Arbeit noch einmal mit einbezogen worden, obwohl wir über die Ergebnisse bereits berichtet hatten [89]. Die Radiobromierung

wurde bei pH 1 und pH 7 durchgeführt. In Tabelle 5 sind die radiochemischen Ausbeuten für die verschiedenen Peptide bei pH 1 und pH 7 aufgeführt.

Tabelle 5: Trägerfreie Radiobromierung von Peptiden nach der Chloramin-T Methode* [89]

Peptid	% radiochemische Ausbeute	
	pH 1	pH 7
Gly-Tyr-Gly	85 $\pm$ 5	65 $\pm$ 3
Ala-Tyr-Ala	78 $\pm$ 5	64 $\pm$ 4
Pro-His-Tyr	80 $\pm$ 5	65 $\pm$ 3
Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly	0	0
Gly-His-Gly	0	0

*) $2,4 \cdot 10^{-3}$ M Peptid in 500 μ l Puffer;
22 °C; pH 1: 10^{-3} M CAT, 2 min; pH 7: 10^{-2} M
CAT, 5 min.

Neben Tyrosin wurde in dieser Untersuchung keine andere Aminosäure markiert. Die radiochemischen Ausbeuten sind innerhalb der Fehlergrenzen für alle Peptide etwa gleich groß, wie aufgrund der Radiobromierung von Tyrosin zu erwarten ist. Eine Radiobromierung von Proteinen sollte also nach dieser Methode prinzipiell möglich sein und zu einer Tyrosin-spezifischen Markierung führen.

3.3.2. Untersuchungen zur trägerfreien Radiobromierung von Albumin und Urokinase nach der Chloramin-T Methode

Die radiochemischen Ausbeuten bei der Peptidmarkierung lassen sich prinzipiell nicht auf Proteinmarkierungen übertragen. Proteine bieten durch ihre zahlreichen funktionellen Gruppen viele Möglichkeiten zu Nebenreaktionen [148-154]. Leicht oxidierbare Gruppen sind zum Beispiel -SH in Cystein, -SCH₃ in Methionin, Disulfidbrücken und die Aminosäure Tryptophan. Diese oxidativen Nebenreaktionen führen zu einer Verringerung der Chloramin-T Konzentration in der Reaktionslösung, was den Einsatz einer

höheren Chloramin-T Menge erforderlich macht. Durch die intermediäre Bildung von instabilen Markierungsprodukten, wie z.B. -S-X Verbindungen (X = Br, I) aus Cysteinresten, die durch die Zugabe von Bisulfit das Radiohalogenid wieder abspalten, wird die radiochemische Ausbeute verringert. Auch sind nicht alle Tyrosinreste eines Proteinmoleküls für das Markierungsreagenz sterisch zugänglich, was ebenfalls zu einer geringen radiochemischen Ausbeute führen kann [163]. Die oxidativen Nebenreaktionen führen vor allem zu Änderungen der biochemischen Eigenschaften. In der Literatur sind Modifizierungen der Chloramin-T Methode beschrieben, die in der Regel auch dazu beitragen, die biologische Aktivität des zu markierenden Proteins zu erhalten [164-166].

Um die Eignung der Chloramin-T Methode für die Radiobromierung von Proteinen zu testen, sind als Beispiele die Proteine Albumin (HSA) und Urokinase bei pH 7 unter den in Abschnitt 3.1.1. optimierten Bedingungen radiobromiert worden. In Tabelle 6 sind die radiochemischen Ausbeuten der Markierung und zum Vergleich auch die bekannten Radioiodierungsausbeuten angegeben.

Tabelle 6: Trägerfreie Radiohalogenierung von Proteinen nach der Chloramin-T Methode* (% radiochemische Ausbeute)

Protein	Bromierung	Iodierung
Albumin	35 $\pm$ 5	60 [167]
Urokinase	18 $\pm$ 8	30 [168]

*) 10^{-5} M Protein, 1 ml Puffer,
 10^{-2} M CAT, 2 min, 22 °C.

Bei der markierten Urokinase ist in diesem Institut eine Untersuchung der enzymatischen Aktivität durchgeführt worden [168]. Es zeigte sich, daß bei den gewählten Reaktionsbedingungen ein nahezu vollständiger Verlust der biologischen Aktivität eingetreten war. Untersuchungen zur Abhängigkeit der biologischen Aktivität des markierten Proteins von der eingesetzten Menge an Chloramin-T haben gezeigt, daß bereits bei einer CAT-Konzentration

von $2,5 \cdot 10^{-3}$ M etwa 90 % der biologischen Aktivität des Proteins zerstört waren [168]. Mit diesen geringen CAT-Konzentrationen ist eine Radiobromierung bei pH 7 nicht mehr durchführbar (radiochemische Ausbeute 1-2 %). Offensichtlich ist die sonst sehr stabile Urokinase sehr empfindlich gegenüber Oxidationsmitteln. Durch Ausweichen auf eine Konjugationsmethode ließe sich diese oxidative Zerstörung des Proteins vermeiden.

Erwartungsgemäß sind die radiochemischen Ausbeuten bei der Radiobromierung etwas niedriger als bei der Iodierung. Dennoch kann man aufgrund der Beispiele sagen, daß die Chloramin-T Methode grundsätzlich auch für die Einführung von Radiobrom in Proteine geeignet ist. Bezüglich des Erhalts der biologischen Aktivität treten größere Probleme auf, als sie hinlänglich für die Radioiodierung von Proteinen mit Chloramin-T bekannt sind. Bei der Radiobromierung werden jedoch höhere CAT-Konzentrationen benötigt, so daß Nebenreaktionen eher auftreten können. Somit ist bei der Optimierung der Reaktionsparameter CAT-Konzentration, pH-Wert und Reaktionszeit nicht nur eine möglichst hohe radiochemische Ausbeute von Bedeutung sondern auch die Erhaltung der biologischen Aktivität der markierten Substanz. Vergleicht man die Reaktionsbedingungen der Radiobromierung mit denen der Radioiodierung, so kann man zusammenfassend feststellen, daß die Iodierung unter milderer Bedingungen durchgeführt werden kann. Ob die Chloramin-T Methode für die Radiobromierung von Proteinen ähnliche Bedeutung erlangt, ist nicht allein eine Frage der erreichbaren spezifischen Aktivitäten, sondern es hängt auch davon ab, welche alternativen Radiobromierungsmethoden zur Verfügung stehen. Die Darstellung radiobromierter Kopplungsreagenzien für die Proteinmarkierung, die mit Chloramin-T schnell und mit hohen spezifischen Aktivitäten durchführbar ist, ist eine brauchbare Alternative zu den direkten Radiobromierungsmethoden.

3.4. Dichloramin-T zur Radiobromierung und -iodierung in organischen Lösungsmitteln

3.4.1. Vorversuche zur Auswahl des organischen Lösungsmittels

Aus Radiohalogenid und Chloramin-T bilden sich in saurer wässriger Lösung die Interhalogene XCl ($X = Br, I$), die auch zur Markierung von wasserunlöslichen Molekülen in organischer Phase verwendet werden könnten. Da Chloramin-T in den meisten organischen Lösungsmitteln unlöslich ist, müßte man die Reaktion in einem Zwei-Phasen-System durchführen. Die Interhalogene entstehen offensichtlich durch die Übertragung von " Cl^+ " auf X^- , deshalb sollte die Bildung von XCl auch aus Radiohalogenid und Dichloramin-T (N,N-dichlor-p-toluolsulfonamid) in einem organischen Lösungsmittel möglich sein. Eine weitere Möglichkeit der Bildung von radiohalogenierenden Spezies ist der direkte oxidative Halogenaustausch am Stickstoff, der zu den gemischten N-Dihalogenderivaten führt (vgl. Abschnitt 3.2.2.). Dichloramin-T (DCT), eine wasserunlösliche Verbindung, ist in den meisten organischen Lösungsmitteln löslich und bietet sich deshalb für diese Untersuchung an. Es läßt sich einfach durch Chlorierung von Toluolsulfonamid darstellen [85].

In ersten Vorversuchen mit DCT in Chloroform konnten bei der Radiobromierung von Phenol sehr gute radiochemische Ausbeuten von über 80 % erhalten werden. Das in wässriger Lösung vorliegende Radiobromid wurde im Reaktionsgefäß getrocknet, eine Lösung von Phenol in Chloroform (500 μ l) zugegeben und die Reaktion durch Zugabe einer Lösung von DCT in Chloroform gestartet. Nach einer Reaktionszeit von 1 min wurde das Reaktionsgemisch durch HPLC analysiert und die radiochemische Ausbeute bestimmt. Der anfangs befürchtete Verlust des trägerfreien Radiobromids durch Adsorption an der Gefäßwand und durch die geringe Löslichkeit von Bromid in organischen Lösungsmitteln konnte durch entsprechende Vorkehrungen weitgehend vermieden werden, indem die Temperatur beim Trocknen der wässrigen Bromidlösung möglichst niedrig gewählt wurde ($<60^\circ C$) und nach der Zugabe des organischen Lösungsmittels einige Minuten gerührt wurde.

Die Radiobromierung von Phenol mit DCT wurde in mehreren organischen Lösungsmitteln getestet. Dabei wurde das DCT stets in Methylenchlorid gelöst zugegeben, um eine Zersetzung von DCT in den untersuchten Lösungsmitteln schon vor der Reaktion zu vermeiden.

Für die Radiobromierung von Phenol mit DCT waren die folgenden Lösungsmittel geeignet:

Eisessig, Dichlormethan, Chloroform, Tetrachlormethan, Hexan und Dimethylformamid.

Ungeeignet waren aufgrund der Bildung von zahlreichen nicht identifizierten radioaktiven Nebenprodukten und/oder wegen geringer Ausbeuten (<10 %) folgende Lösungsmittel:

Acetonitril, Dimethylsulfoxid, Aceton und HMPT.

Bei der Verwendung von unpolaren Lösungsmitteln (Hexan, CCl_4) war die radiochemische Ausbeute sehr unterschiedlich, was wahrscheinlich auf die schlechte Löslichkeit von Bromid zurückzuführen war. Durch Zusatz von Tetrabutylammoniumchlorid (10^{-4} M) als Phasen-Transfer-Katalysator wurden gleichmäßig hohe radiochemische Ausbeuten erhalten.

Bei der Suche nach geeigneten Lösungsmitteln zeigte sich, daß prinzipiell alle Lösungsmittel, die oxidierbare funktionelle Gruppen haben, wie z.B. $-\text{OH}$, $\text{C} = \text{O}$, $\text{S} = \text{O}$, $-\text{NH}_2$, nicht oder nur bedingt zur Durchführung der Reaktion geeignet sind. Dies ist darauf zurückzuführen, daß das oxidierte, elektrophile Radiohalogen potentiell auf Lösungsmittelmoleküle übertragen werden kann, die freie Elektronenpaare haben und nukleophile Eigenschaften besitzen. Durch ähnliche nukleophile Nebenreaktionen tritt auch die Zersetzung des DCT in diesen Lösungsmitteln ein, und es wurden hier nur kleine radiochemische Ausbeuten radiobromierter Phenole erhalten.

Die hohen radiochemischen Ausbeuten bei relativ geringer Konzentration des zugesetzten Oxidationsmittels (10^{-3} M), die kurze (1 min) Reaktionszeit und das breite Spektrum geeigneter Lösungsmittel waren entscheidende Gründe für weiterführende Untersuchungen mit Dichloramin-T.

3.4.2. Einfluß des Lösungsmittels auf die Selektivität

Für weitere Untersuchungen wurden drei representative Lösungsmittel ausgewählt: Eisessig (protisch, polar), Dichlormethan (aprotisch, polar) und Tetrachlormethan (aprotisch, unpolar). In diesen Lösungsmitteln sollte bei den aktivierten Aromaten Phenol und Anilin der Einfluß des Lösungsmittels auf die Selektivität der Radiohalogenierungsreaktion studiert werden. Da mit Dichloramin-T auch Radioiodierungen in organischen Lösungsmitteln möglich sein sollten, wurde sowohl die Radiobromierung als auch die Radioiodierung durchgeführt. In Tabelle 7 sind die radiochemischen Ausbeuten und die absoluten und relativen Isomerenverteilungen der Radiobromierung von Phenol in Abhängigkeit vom Lösungsmittel aufgeführt. Tabelle 8 enthält die entsprechenden Werte für die Radioiodierung.

Tabelle 7: Trägerfreie Radiobromierung von Phenol*

Solvens	% radiochemische Ausbeute		% relative Isomerenverteilung	
	Σ H-Subst.	ortho	para	ortho para
AcOH	72 $\pm$ 4	17	55	24 76
CH ₂ Cl ₂	82 $\pm$ 6	38	44	46 54
CCl ₄	64 $\pm$ 5	23	41	36 64

*) $2 \cdot 10^{-5}$ Mol Phenol in 500 μ l Solvent; 10^{-3} M DCT; 1 min; 22 °C.

Tabelle 8: Trägerfreie Radioiodierung von Phenol*

Solvens	% radiochemische Ausbeute		% relative Isomerenverteilung	
	Σ H-Subst.	ortho	para	ortho para
AcOH	37 $\pm$ 8	27	10	73 27
CH ₂ Cl ₂	73 $\pm$ 7	33	40	45 55
CCl ₄	80 $\pm$ 8	34	46	42 58

*) $2 \cdot 10^{-5}$ Mol Phenol in 500 μ l Solvent; 10^{-3} M DCT; 1 min; 22 °C.

In allen Lösungsmitteln wurden gute radiochemische Ausbeuten erhalten. Die relative Isomerenverteilung zeigt, daß ein deutlicher, aber nicht sehr großer Einfluß des Lösungsmittels auf die Selektivität vorhanden ist. Die Erhöhung der absoluten ortho-Substitutionsausbeuten von 17 auf 38 % beim Wechsel von AcOH auf CH_2Cl_2 ist von präparativem Nutzen, wenn von zwei möglichen Substitutionsprodukten nur eines gewünscht wird. Die relativen Isomerenverteilungen der Bromierung und Iodierung in Dichlormethan und Tetrachlormethan sind sehr ähnlich mit einem o/p-Verhältnis von $0,8 \pm 0,1$. In Eisessig tritt erstaunlicherweise ein deutlicher Unterschied auf zwischen Bromierung (o/p = 1/3) und Iodierung (o/p = 3/1). In Tabelle 9 sind die radiochemischen Ausbeuten und die absoluten und relativen Isomerenverteilungen der Radiobromierung von Anilin in Abhängigkeit vom Lösungsmittel aufgeführt. Tabelle 10 enthält die entsprechenden Werte für die Radioiodierung von Anilin.

Tabelle 9: Trägerfreie Radiobromierung von Anilin*

Solvens	% radiochemische Ausbeute Σ H-Subst.	% relative Isomerenverteilung			
		ortho	para	ortho	para
AcOH	76 ± 5	22	54	29	71
CH_2Cl_2	76 ± 3	14	62	18	82
CCl_4	81 ± 4	12	69	15	85

*) $2 \cdot 10^{-5}$ Mol Anilin in 500 μl Solvent; 10^{-3} M DCT; 1 min; 22 °C.

Tabelle 10: Trägerfreie Radioiodierung von Anilin*

Solvens	% radiochemische Ausbeute Σ H-Subst.	% relative Isomerenverteilung			
		ortho	para	ortho	para
AcOH	77 ± 7	12	65	16	84
CH_2Cl_2	70 ± 7	8	62	12	88
CCl_4	60 ± 8	19	41	31	69

*) $2 \cdot 10^{-5}$ Mol Anilin in 500 μl Solvent; 10^{-3} M DCT; 1 min; 22 °C.

Bei der Radiohalogenierung von Anilin liegt der Einfluß des Lösungsmittels auf die Selektivität in etwa der gleichen Größenordnung wie bei der Radiohalogenierung von Phenol. Leichte Unterschiede zwischen Bromierung und Iodierung lassen sich bei der relativen Isomerenverteilung in AcOH und CCl_4 erkennen. Bei der Betrachtung aller Ergebnisse erkennt man, daß in fast allen Systemen eine deutlich höhere para-Selektivität auftritt. Bei der präparativen Halogenierung wird im allgemeinen eine hohe ortho-Selektivität beobachtet, was auf der intermediären Bildung von N- bzw. O-halogenderivaten beruht, die in einer intramolekularen Folgereaktion die ortho-Substitutionsprodukte bilden [109,138]. Möglicherweise ist die hier beobachtete hohe para-Selektivität auf sterische Hinderung zurückzuführen; das würde bedeuten, daß die halogenierenden Spezies sehr groß sein müßten, bzw. sich Komplexe unter Beteiligung der Solventmoleküle bilden.

Eine Vorhersage der Isomerenverteilung für die Radiohalogenierung beliebiger Moleküle ist nach den vorliegenden Ergebnissen nicht möglich, da sich keine Gesetzmäßigkeiten erkennen lassen. Es ist auf jeden Fall ratsam, auch andere Lösungsmittel zu testen, um eine gewünschte Isomerenverteilung zu erreichen. Durch die hohen radiochemischen Ausbeuten bei aktivierten Aromaten ist diese schnelle und einfache Direktmarkierungsmethode auch bei ungünstiger Isomerenverteilung den regiospezifischen Markierungsmethoden mit relativ niedrigen Ausbeuten [36,81-83] häufig überlegen, zumal sich bei kleinen Molekülen die Isomeren durch HPLC leicht auftrennen lassen.

3.4.3. Untersuchungen zur Reaktivität

Die radiochemischen Ausbeuten bei der Radiobromierung und -iodierung von aktivierten Aromaten, wie Phenol und Anilin, sind in der organischen Phase ähnlich hoch, wie in der wässrigen Phase bei pH 1. Für weniger aktivierte Aromaten ist nach den bisherigen Erfahrungen eine Abnahme der radiochemischen Ausbeute zu erwarten. Bei der Radiobromierung von Anisol in AcOH, CH_2Cl_2 und CCl_4 mit DCT wurden nur geringe Ausbeuten erhalten (2-10 %),

obwohl Anisol noch zu den aktivierten Aromaten zählt. Durch Trägerzugabe oder durch Verwendung von Trifluoressigsäure (TFA) als Lösungsmittel stieg die radiochemische Ausbeute auf ca. 80 %. Die Reaktionsbedingungen und die radiochemische Ausbeute der Radiobromierung und -iodierung sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 11: Trägerfreie Radiohalogenierung von Anisol*

Reaktionsbedingungen	% radiochemische Ausbeute	
	Bromierung	Iodierung
AcOH, 10^{-3} M DCT	9+3	10+5
AcOH, 10^{-3} M DCT, 10^{-4} M Träger	80+5	74+4
TFA, 10^{-3} M DCT	79+5	75+6

*) $2 \cdot 10^{-5}$ Mol Anisol in 500 μ l Solvent; 1 min; 22 °C.

Die Steigerung der radiochemischen Ausbeute durch Trägerzugabe ist ein häufig beobachteter Effekt in der Radiochemie, doch erstaunlich ist hier die hohe Ausbeute ohne Trägerzusatz bei Verwendung von Trifluoressigsäure als Lösungsmittel. Die besondere Eignung von TFA als Lösungsmittel für Radiohalogenierungen wurde bereits demonstriert [33,66], doch eine umfassende Erklärung dieses Phänomens ist bisher nicht bekannt. Für weitere Untersuchungen zur Reaktivität wurde die Radiohalogenierung von weniger aktivierten Aromaten ohne Trägerzusatz in TFA als Lösungsmittel durchgeführt. Tabelle 12 zeigt die radiochemischen Ausbeuten der Radiobromierung und -iodierung von Anisol, Toluol und Benzol.

Die Ausbeuten der Radiobromierung und -iodierung sind innerhalb der Fehlergrenzen etwa gleich groß. Die drastische Abnahme der Substitutionsausbeuten mit abnehmender Aktivierung des aromatischen Kerns entsprechen einer elektrophilen Substitutionsreaktion. Diese Untersuchungen haben gezeigt, daß auch bei weniger aktivierten Aromaten durch Zusatz von Träger oder durch Verwendung von TFA als Lösungsmittel gute radiochemische

Tabelle 12: Radiohalogenierung von Aromaten mit DCT in TFA*

Substrat	% radiochemische Ausbeute	
	Bromierung	Iodierung
Anisol	79 $\pm$ 6	75 $\pm$ 8
Toluol	48 $\pm$ 8	49 $\pm$ 8
Benzol	4 $\pm$ 2	3 $\pm$ 2

*) $2 \cdot 10^{-5}$ Mol Substrat in 500 μ l TFA; $5 \cdot 10^{-3}$ M DCT; 2 min; 22 °C.

Ausbeuten bei der Radiohalogenierung mit Dichloramin-T erhalten werden können.

Beim Arbeiten in TFA ist das Trocknen der Radiohalogenidlösung nicht notwendig, denn bei der Radiohalogenierung von Anisol wurde kein Einfluß auf die radiochemische Ausbeute festgestellt, wenn der Reaktionslösung bis zu 10 % Wasser zugesetzt wurden. In diesem Fall ist deshalb auch die Verwendung einer wässrigen Chloramin-T Lösung anstelle einer DCT-Lösung möglich.

3.4.4. Versuche mit Dichloramin-N

Bei der Radiohalogenierung von weniger aktivierten Aromaten wurde bei der chromatographischen Analyse der Reaktionslösung neben dem erwarteten markierten Produkt nur wenig Radiohalogenid gefunden und bis zu 50 % nicht identifizierte radioaktive Nebenprodukte. Da auch in Arbeiten über die Radiohalogenierung mit Chloramin-T über die Selbstmarkierung des Reagenzes berichtet wurde [96], handelt es sich bei den gefunden Nebenprodukten möglicherweise um kernhalogenierte Substitutionsprodukte des DCT. Durch Substitution der Methylgruppe des DCT durch eine Nitrogruppe wird das aromatische System des DCT bezüglich elektrophiler Substitution stark deaktiviert und somit eine Kernhalogenierung weitgehend verhindert. Ausgehend von p-Nitrobenzolsulfonamid wurde durch Chlorierung das N,N-dichlor-p-nitrobenzolsulfonamid (Dichloramin-N,DCN) dargestellt [85].

Bei den Untersuchungen zur Radiohalogenierung von Toluol und Benzol mit Dichloramin-N konnten jedoch keine Unterschiede zum DCT festgestellt werden. Die radiochemischen Ausbeuten waren innerhalb der Fehlergrenzen gleich, und auch die Bildung von markierten Nebenprodukten war unverändert. Die Radiohalogenierung des aromatischen Kerns ist demnach nicht der Grund für die Bildung von markierten Nebenprodukten; eine Selbstmarkierung von Chloramin-T bzw. Dichloramin-T ist somit unwahrscheinlich. Möglicherweise wurden die Nebenprodukte durch die Markierung von Verunreinigungen im Reaktionsansatz gebildet, da die Menge und die Art der Nebenprodukte sehr unterschiedlich war.

3.4.5. Vergleich von Chloramin-T und Dichloramin-T mit anderen N-Halogenderivaten zur elektrophilen Radiohalogenierung

In den letzten Jahren sind einige Radiohalogenierungsmethoden für die organische Phase entwickelt worden. N-Chlortetrafluorsuccinimid (NCTFS) wurde in diesem Institut zur Radiobromierung und -iodierung von aromatischen Biomolekülen eingesetzt [33,68,70]. N-Chlorsuccinimid (NCS) ist ebenfalls für die Radiobromierung und -iodierung ohne Trägerzusatz geeignet [66,69]. Diese Reagenzien sind, wie Chloramin-T und Dichloramin-T, N-Chlorverbindungen, die als Oxidationsmittel in organischen Lösungsmitteln mit Radiobromid bzw. -iodid elektrophile Radiohalogenspezies erzeugen. Ein Vergleich dieser N-Halogenverbindungen sollte die Einsatzmöglichkeiten und die Grenzen der einzelnen Reagenzien aufzeigen. Für diese Untersuchung wurde Anisol als Substrat gewählt und Trifluoressigsäureanhydrid (TFAA) als Lösungsmittel. Es wurde nur die Radioiodierung untersucht, da N-Bromsuccinimid (NBS) ebenfalls als Oxidationsmittel eingesetzt werden sollte. Unter Berücksichtigung von Literaturdaten und eigenen Ergebnissen wurden für die verschiedenen Reagenzien unterschiedliche Reagenzkonzentrationen und Reaktionszeiten gewählt, um die optimalen Reaktionsbedingungen für jedes Reagenz zu erreichen. Tabelle 13 zeigt die radiochemischen Ausbeuten und die Isomerenverteilungen, die bei der Radioiodierung von

Anisol mit NCTFS, NCS, NBS, CAT und DCT erhalten wurden.

Tabelle 13: Trägerfreie Radioiodierung von Anisol in TFAA mit verschiedenen N-Halogenderivaten als Oxidationsmittel*

Reagenz	% radiochem. Ausbeute	% rel. Isomerenverteilung	
NCTFS	68 ± 5	o-	25
		m-	-
		p-	75
NCS	72 ± 4	o-	21
		m-	-
		p-	79
NBS	15 ± 3	o-	26
		m-	-
		p-	73
CAT	75 ± 8	o-	21
		m-	-
		p-	79
DCT	74 ± 4	o-	22
		m-	-
		p-	78

*) $2 \cdot 10^{-5}$ Mol Anisol in 500 μ l TFAA; 22 °C
NCTFS: 10^{-2} M; 4 h
NCS,NBS: $5 \cdot 10^{-3}$ M; 2 h
CAT,DCT: 10^{-3} M; 0,5 h

Die radiochemischen Ausbeuten und die Isomerenverteilungen sind innerhalb der Fehlergrenzen gleich, wenn man die N-Chlorverbindungen berücksichtigt. Die niedrigere Ausbeute im Fall von NBS beruht wahrscheinlich auf Bromierungsnebenreaktionen, denn in diesem System wurden die meisten Nebenprodukte gebildet.

NBS ist demnach nicht für Radioiodierungen geeignet. Im Gegensatz zu dieser Untersuchung waren bei den Hypohaliten $\text{CF}_3\text{SO}_3\text{X}$ und $\text{CF}_3\text{CO}_2\text{X}$ ($\text{X} = \text{Br}, \text{Cl}$) die Hypobromite ebenso gut wie die Hypochlorite für Radioiodierungen geeignet [70]. Wie erwartet, wird für die Reagenzien CAT und DCT kein Unterschied in der Radioiodierung festgestellt.

Weiterhin wurde mit den Reagenzien NCTFS, NCS und CAT eine Radioiodierung weniger reaktiver Aromaten durchgeführt. Tabelle 14 zeigt die radiochemischen Ausbeuten der Radioiodierung von Anisol, Toluol und Benzol.

Tabelle 14: Trägerfreie Radioiodierung von Aromaten* mit NCTFS, NCS und CAT in TFAA (% radiochemische Ausbeute)

Substrat	NCTFS (4 h)	NCS (4 h)	CAT (10 min)
Anisol	68 ± 5	72 ± 4	75 ± 8
Toluol	47 ± 8	30 ± 6	49 ± 8
Benzol	~ 4	~ 1	~ 3

*) $2 \cdot 10^{-5}$ Mol Substrat in 500 μl TFAA; 2 mg Oxidationsmittel; 22 °C.

Ebenso wie bei der Radiohalogenierung mit Dichloramin-T sinken die radiochemischen Ausbeuten mit abnehmender Aktivierung des aromatischen Systems. Die etwa gleich großen Ausbeuten zeigen, daß die eingesetzten Oxidationsmittel NCTFS, NCS und CAT/DCT gleich gut für die Radioiodierung ohne Trägerzusatz geeignet sind. Die radiochemischen Ausbeuten bei weniger aktivierten Aromaten lassen sich durch Trägerzugabe bei allen hier untersuchten Reagenzien, außer NBS, steigern, d.h. die Nebenreaktionen der radioaktiven Spezies werden kompetitiv unterdrückt. Bei den sehr reaktiven Substraten ist die Substitutionsreaktion so schnell, daß ein Zusatz von Träger keine zusätzliche Ausbeutesteigerung mehr bringt.

Vergleicht man die Ergebnisse dieser Radioiodierung von einfachen Aromaten in TFAA, so ergeben sich für CAT/DCT Vorteile bezüglich

der Reagenzkonzentration, der Reaktionszeit und der einfacheren Handhabung. Bei der Radioiodierung und -bromierung von komplizierteren Molekülen könnten durchaus Unterschiede auftreten, insbesondere im Hinblick auf mögliche Nebenreaktionen. Darum ist für jedes System eine Optimierung der Reaktionsparameter erforderlich.

3.5. Weitere Anwendungen von Chloramin-T und Dichloramin-T (elektrophile Addition an Doppelbindungen)

Die in situ Erzeugung von elektrophilen Radiobrom- bzw. Radioiodspezies aus Halogenid und CAT oder DCT wird bisher praktisch nur zur Einführung von Radiohalogenen in aromatische Systeme über eine S_E -Reaktion genutzt. Mit elektrophilen Spezies ist jedoch neben der S_E -Reaktion auch eine elektrophile Addition an Doppelbindungen möglich, deren Endprodukte aliphatische Halogenverbindungen sind.

Im allgemeinen verläuft die elektrophile Addition von elektrophilen Brom- bzw. Iodspezies über die primäre Bildung der entsprechenden Bromonium- bzw. Iodoniumionen [114]. Diese reagieren dann in einem weiteren Reaktionsschritt mit einem Nukleophil zu einer gesättigten aliphatischen Verbindung. Enthält die ungesättigte Verbindung weitere Doppelbindungen oder bestimmte funktionelle Gruppen, so können auch Umlagerung stattfinden, oder die Doppelbindung wird unter Austritt einer funktionellen Gruppe rückgebildet.

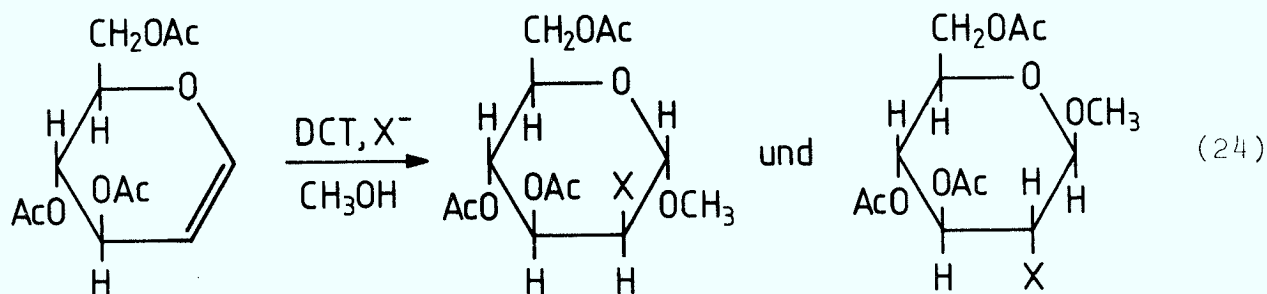
Die Diskussion des Reaktionsmechanismus legt nahe, daß bei der Reaktion von Halogenid und CAT die Interhalogene XCl oder die N-Halogenverbindungen RSO_2NHX ($X = Br, I$) entstehen. Diese Spezies werden wahrscheinlich auch bei der Reaktion von DCT mit Halogenid in organischen Lösungsmitteln gebildet. Durch Reaktion dieser elektrophilen Spezies mit einer Doppelbindung werden zunächst die Halogenoniumionen gebildet. Es ist zu erwarten, daß im Fall von XCl das Chloridion als Nukleophil angreift, so daß letztlich eine Addition von XCl an die Doppelbindung resultiert. Bei der Reaktion der N-Halogenverbindungen RSO_2NHX mit einem Olefin könnte im zweiten Reaktionsschritt das Anion

RSO_2NH^- als Nukleophil addiert werden, denn bei präparativen Arbeiten zur Reaktion von Olefinen mit N-Halogenverbindungen wurde dies beobachtet [169,170]. Bei beiden Reaktionen werden jedoch nur dann die genannten Additionsprodukte in größeren Mengen gebildet, wenn keine anderen Nukleophile im Reaktionsmedium vorhanden sind, die mit den entsprechenden Anionen konkurrieren.

Die Eignung von Dichloramin-T zur Radiobromierung und -iodierung von Olefinen wurde an zwei Modellsubstanzen untersucht. An Cyclohexen sollte eine Addition von XCl durchgeführt werden, und an Tri-O-acetyl-D-glucal sollte eine Addition von X/OCH_3 durchgeführt werden, um zu zeigen, daß das primär gebildete Halogenonium auch mit einem anderen Nukleophil, in diesem Falle das Lösungsmittel Methanol, reagieren kann.

Die Radiobromierung und -iodierung von Cyclohexen wurde mit DCT und Radiohalogenid in Methylenchlorid als Lösungsmittel durchgeführt. Es wurden die erwarteten XCl Additionsprodukte, d.h. 1-[^{77}Br]-1-Brom-2-chlorcyclohexan und 2-[^{131}I]-1-Chlor-2-iodcyclohexan, mit radiochemischen Ausbeuten von 70-80 % gebildet.

Die Radiohalogenierung von Tri-O-acetyl-D-glucal wurde auch im Hinblick auf eine nuklearmedizinische Anwendung durchgeführt, mit dem Ziel, die radiohalogenierte 2-Halogen-2-deoxy-D-glucose ohne Trägerzusatz darzustellen [171]. Die Radiobromierung und -iodierung wurde mit DCT und Radiohalogenid in absolutem Methanol durchgeführt (1 min, RT). Die erwarteten Additionsprodukte (X/OCH_3) wurden mit etwa 70 bis 75 % radiochemischer Ausbeute gebildet.



X = Br: 30 ± 5%

X = I: 30 ± 5%

X = Br: 43 ± 5%

X = I: 43 ± 5%

Wie bereits für die Iodierung von Tri-O-acetyl-D-glucal beschrieben [114,172], wurde nahezu ausschließlich eine trans-Addition beobachtet, die zur Bildung von 1-O-methyl-2-halogen-3,4,6-tri-O-acetylglucopyranosid (rel. 60 %) und 1-O-methyl-2-halogen-3,4,6-tri-O-acetyl-mannopyranosid (rel. 40 %) führte. Die radiochemischen Gesamtausbeuten und das Verhältnis der Isomeren ($\sim 3:2$) war bei Bromierung und Iodierung etwa gleich.

Diese ersten Versuche mit DCT haben gezeigt, daß die Radio-bromierung und -iodierung von Olefinen durch elektrophile Addition möglich ist und zu recht guten Ergebnissen führt. Auch Chloramin-T sollte für diese Reaktion geeignet sein und könnte beispielsweise zur Darstellung radiohalogenmarkierter Halogenhydrine in wässriger Lösung eingesetzt werden. Es sind jedoch weiterführende Arbeiten nötig, um zu sehen, inwieweit sich die umfangreichen Erfahrungen und Gesetzmäßigkeiten der elektrophilen Addition auf die radiochemische Arbeitsweise mit nanomolaren Mengen elektrophiler Spezies übertragen lassen.

4. ZUSAMMENFASSUNG

Im Hinblick auf die Bedeutung von Halogenanalogen für die nuklearmedizinische in-vivo Funktionsdiagnostik wurden, ausgehend von trägerfreiem Radiohalogenid, einige grundlegende Untersuchungen über die Radioiodierung und insbesondere Radiobromierung im nanomolaren Bereich durchgeführt. Hierbei wurden als in situ Oxidationsmittel N-Halogenverbindungen, insbesondere Chloramin-T (CAT) und Dichloramin-T (DCT), sowie in geringerem Umfang halogenierte Succinimide in wässriger Lösung und/oder in verschiedenen organischen Lösungsmitteln eingesetzt. Es war das Hauptziel dieser Arbeit, geeignete Verfahren für die trägerfreie Bromierung von Aromaten zu entwickeln und im Hinblick auf ihren weiteren Einsatz die zugrunde liegenden Reaktionsmechanismen zu untersuchen.

Als Markierungsnuklide wurden außer dem nuklearmedizinisch interessanten Positronenstrahler ^{75}Br ($T = 1,6 \text{ h}$) und dem "Photonstrahler" ^{123}I ($T = 13,3 \text{ h}$), die am Jülicher Kompaktzyklotron über den $^{75}\text{As}(^3\text{He},^3\text{n})^{75}\text{Br}$ - bzw. $^{124}\text{Te}(p,2n)^{123}\text{I}$ -Prozeß erzeugt und ohne Trägerzusatz abgetrennt werden konnten, auch die längerlebigen Radioisotope ^{77}Br ($T = 56 \text{ h}$) und ^{131}I ($T = 8 \text{ d}$) eingesetzt. Zur Identifizierung und Qualitätskontrolle wurde insbesondere die Hochdruckflüssigkeitschromatographie in Verbindung mit Radioaktivitätsmessung eingesetzt. Hierzu wurden geeignete Trennbedingungen erarbeitet.

Mit Tyrosin als Modellsubstanz wurde die Abhängigkeit der radiochemischen Ausbeute vom pH-Wert, von der Konzentration an Chloramin-T, der Reaktionszeit und vom Zusatz der Bromid-Trägermenge bestimmt. Die Untersuchung der pH-Abhängigkeit zeigt einen deutlichen Unterschied zwischen Radiobromierung und -iodierung. Bei der Iodierung von Tyrosin tritt ein scharfes Maximum der radiochemischen Ausbeute bei pH 7 ($\sim 80 \%$) und ein weiterer Bereich hoher radiochemischer Ausbeute ($\sim 60 \%$) bei pH 1 bis pH 2 auf. Dagegen zeigt die Bromierung unter gleichen Reaktionsbedingungen eine maximale radiochemische Ausbeute von über 80 % bei pH 1, die mit steigendem pH-Wert stetig bis auf Null abnimmt.

Bei pH 1 wird bei einer Reaktionszeit von nur 10 Sekunden und einer sehr niedrigen Chloramin-T Konzentration von 10^{-3} M eine radiochemische Ausbeute von über 80 % 3-[^{77}Br]-Tyrosin erhalten. Die Optimierung der Reaktion bei pH 7 zeigt eine optimale Reagenzkonzentration von 10^{-2} M und eine optimale Reaktionszeit von 2,5 Minuten. Unter diesen Reaktionsbedingungen treten nur geringfügig Nebenreaktionen (<5 %) auf, und die radiochemische Ausbeute beträgt etwa 65 %. Der Zusatz von 10^{-7} bis 10^{-2} M Bromid-Träger führt zu einer beachtlichen Abnahme der radiochemischen Ausbeute von 65 auf 10 %. Dies Beispiel verdeutlicht, daß trägerfreie radiochemische Reaktionen hier zu anderen Produkten führen als im makroskopischen Bereich, wo in vorliegendem Fall (CAT) eine Bromierung nicht möglich ist. Besonders hohe radiochemische Ausbeuten werden bei der Radiobromierung von Aminosäuren und Nukleobasen bei pH 1 und pH 7 erhalten.

Bei Tyrosin-Peptiden als Modellsubstanzen für die Proteinbromierung werden radiochemische Ausbeuten von 75 bis 85 % bei pH 1 und 60 bis 65 % bei pH 7 erreicht. An Peptiden, die andere aromatische Aminosäuren, aber kein Tyrosin, enthalten, wie z.B. Gly-His-Gly und Glu-His-Phe-Arg-Trp-Gly, kann eine Radiobromierung nicht beobachtet werden. Die Radiobromierung der Proteine Albumin und Urokinase bei pH 7 mit radiochemischen Ausbeuten von 35 bzw. 18 % zeigt, daß die Chloramin-T Methode grundsätzlich für die Radiobromierung von Proteinen geeignet ist. Bei den erforderlichen Reaktionsbedingungen treten jedoch Nebenreaktionen auf, die zur Änderung der Eigenschaften der Proteine führen.

Im Zusammenhang mit der Untersuchung des Reaktionsmechanismus zeigt die Selektivitätsstudie der Radiobromierung und -iodierung von Phenol und Anilin in Abhängigkeit vom pH-Wert deutlich, daß bei pH 1 und pH 7 unterschiedliche Reaktionswege vorherrschen. Aufgrund dieser Ergebnisse und einiger zusätzlicher Experimente zur Klärung von Nebenreaktionen konnten Informationen über den Reaktionsmechanismus der Chloramin-T Methode erhalten werden. Bei pH 1 werden aus Chloramin-T und Radiohalogenid die Interhalogene BrCl und ICl gebildet, H_2OBr^+ und H_2OI^+ sollten nur eine untergeordnete Rolle spielen. Bei pH 7 erscheint es wahrscheinlich, daß die N-Halogenverbindungen $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{NHBr}$ und

$\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{NHI}$ als halogenierende Spezies auftreten.

Die Bildung der Interhalogene in situ, ausgehend von Halogenid, ist besonders vorteilhaft bei Synthesen mit praktisch trägerfreiem Radiobromid bzw. -iodid im nanomolaren Bereich, weil die Halogene hier nahezu quantitativ zu elektrophilen Spezies oxidiert werden. Dadurch können im Gegensatz zur Verwendung von X_2 ($\text{X} = \text{Br}, \text{I}$) radiochemische Ausbeuten von weit über 50 % als praktisch trägerfreie Produkte erhalten werden. Während bei pH 1 auch bei Zusatz von Halogenidträger die Interhalogene gebildet werden, stellt die Reaktion bei pH 7 einen Sonderfall dar: die in situ Erzeugung der N-Brom- bzw. N-Iodverbindungen, ausgehend von Halogenid und Chloramin-T, läßt sich nur mit nanomolaren Mengen, d.h. praktisch trägerfreiem Halogenid durchführen. Somit ist diese in situ Oxidation nur für radiochemische Synthesen ohne Trägerzusatz geeignet.

Durch die Aufklärung des Reaktionsmechanismus wurden Hinweise zur Modifizierung der Methode erhalten, die zur Entwicklung einer neuen Radiohalogenierungsmethode für die organische Phase führten. Dichloramin-T (DCT), erweist sich als geeignetes Reagenz zur Radiobromierung und -iodierung von Aromaten in organischen Lösungsmitteln. Hohe radiochemische Ausbeuten (Phenol, Anilin, Anisol $\sim 80\%$), niedrige Konzentration des Oxidationsmittels DCT (10^{-3} M), kurze Reaktionszeit (1 min) und ein breites Spektrum geeigneter Lösungsmittel sind die Vorteile dieser Direktmarkierungsmethode für die Radiohalogenierung ohne Trägerzusatz. Bei einem Vergleich mit anderen N-Halogen-derivaten zur Radiohalogenierung von einfachen Aromaten in Tri-fluoressigsäureanhydrid bieten die CAT- und DCT-Methode insbesondere den Vorteil kleiner Reagenzkonzentration und kurzer Reaktionszeit.

Untersuchungen zur Radiohalogenierung von Olefinen zeigten, daß mit Dichloramin-T und trägerfreiem Radiohalogenid auch elektrophile Additionen an Doppelbindungen möglich sind. An Cyclohexen erfolgte, ausgehend von Radiobromid bzw. -iodid, mit DCT in Dichlormethan eine Addition von $^{77}\text{BrCl}$ bzw. ^{123}ICl ohne Trägerzusatz mit radiochemischen Ausbeuten von 70 bis 75 %. Bei der Radiobromierung bzw. -iodierung von Tri-O-acetyl-D-glucal mit DCT und Radiohalogenid

in Methanol wurde eine Addition von X/OCH_3 ($X = {}^{77}\text{Br}, {}^{131}\text{I}$) an die Doppelbindung beobachtet. Auch hier wurden radiochemische Ausbeuten von 70 bis 75 % erhalten. Das Verhältnis der beiden Isomeren (gluco/manno) der trans-Addition betrug etwa 3:2.

5. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] G. Stöcklin, G. Kloster, Metabolic analogue tracers in computed emission tomography, Hrsg. Ell & Holman, Oxford University Press 1982
- [2] R.G. Evans, R.W. Gunton, R.G. Baker, D.S. Beanlands, J.C. Spears, *Circ.Res.* 16, 1 (1965)
- [3] N.D. Poe, G.D. Robinson, N.S. Mc Donald, *Proc.Soc.Exp. Biol.Med.* 148, 215 (1975)
- [4] H.-J. Machulla, G. Stöcklin, Ch. Kupfernagel, Ch. Freundlieb, A. Höck, K. Vyska, L.E. Feinendegen, *J.Nucl.Med.* 19, 298 (1978)
- [5] H.H. Coenen, M.-F. Harmand, G. Kloster, G. Stöcklin, *J.Nucl.Med.* 22, 891 (1981)
- [6] G. Kloster, C. Müller-Platz, P. Laufer, *J.Lab.Comp.Radiopharm.* 18, 855 (1981)
- [7] K. Vyska, C. Freundlieb, A. Höck, V. Becker, L.E. Feinendegen, G. Kloster, G. Stöcklin, H. Traupe, W.-D. Heiss, *J.Cereb.Blood Flow Metabol.* 1, 42 (1981)
- [8] T. Ido, C.-N. Wan, V. Casella, J.S. Fowler, A.P. Wolf, M. Reivich, D.E. Kuhl, *J.Lab.Comp.Radiopharm.* 14, 175 (1978)
- [9] M. Reivich, D. Kuhl, A.P. Wolf, J. Greenberg, M. Phelps, T. Ido, V. Casella, J. Fowler, E. Hoffman, A. Alavi, P. Som, L. Sokoloff, *Circ.Res.* 44, 127 (1979)
- [10] H. Bockslaff, G. Kloster, N. Safi, P. Blanquet, *Radioaktive Isotope in Klinik und Forschung* 14, 171 (1980)
- [11] H. Bockslaff, G. Kloster, D. Dausch, K. Schad, H. Hundeshagen, G. Stöcklin, *Nucl.Med.Supp.* 18, 840 (1981)
- [12] D.M. Goldenberg, *Cancer Res.* 40, 2953 (1980)
- [13] A.P. Wolf, *J.Lab.Comp.Radiopharm.* 18, 1 (1981)
- [14] D. Comar, G. Berger, C. Crouzel, J.M. Godot, M. Maziere, G. Mestelan, *J.Lab.Comp.Radiopharm.* 18, 3 (1981)
- [15] G. Stöcklin, *Int.J.appl.Radiat.Isotopes* 28, 131 (1977)
- [16] M.B. Chenoweth, L.P. Mc Carty, *Pharmacol.Rev.* 15, 673 (1963)
- [17] T. Nozaki, M. Muramoto, T. Ido, *Int.J.appl.Radiat.Isotopes* 25, 393 (1974)
- [18] J. Fitschen, R. Beckmann, U. Holm, H. Neuert, *Int.J.appl. Radiat.Isotopes* 28, 781 (1977)
- [19] R. Weinreich, S.M. Qaim, G. Stöcklin, in *Nuklearmedizin, Stand und Zukunft*, Schattauer Verlag 1978, S. 226

- [20] S.L. Waters, A.D. Nunn, M.L. Thakur, J.Inorg.Nucl.Chem. 35, 3413 (1973)
- [21] Z.B. Alfassi, R. Weinreich, Int.J.appl.Radiat.Isotopes, im Druck
- [22] G. Blessing, R. Weinreich, S.M. Qaim, G. Stöcklin, Int.J. appl.Radiat.Isotopes 33, 333 (1982)
- [23] A.M.J. Paans, J. Welleweerd, W. Vaalburg, S. Reiffers, M.G. Woldring, Int.J.appl.Radiat.Isotopes 31, 267 (1980)
- [24] S.M. Qaim, G. Stöcklin, R. Weinreich, Int.J.appl.Radiat. Isotopes 28, 947 (1977)
- [25] K. Kondo, R.M. Lambrecht, A.P. Wolf, Int.J.appl.Radiat. Isotopes 28, 395 (1977)
- [26] S.R. Wilkins, S.T. Shimose, H.H. Hines, J.A. Jungermann, F. Hegedus, G.L. DeNardo, Int.J.appl.Radiat.Isotopes 26, 279 (1975)
- [27] M.M. Ter-Pogossian, M.E. Phelps, E.J. Hoffman, N.A. Mullani, C.S. Higgins, C.M. Currie, Radiology 114, 89 (1975)
- [28] D.E. Kuhl, R.Q. Edwards, A.R. Ricci, R.J. Yakob, T.J. Mich, A. Alavi, Radiology 121, 405 (1976)
- [29] G.D. Robinson, A.W. Lee, J.Nucl.Med. 16, 17 (1975)
- [30] H.-J. Machulla, G. Stöcklin, Ch. Kupfernagel, Ch. Freundlieb, A. Höck, K. Vyska, L.E. Feinendegen, J.Nucl.Med. 19, 298 (1978)
- [31] P. Laufer, H.-J. Machulla, H. Michael, H.H. Coenen, A.S. El-Wetery, G. Kloster, G. Stöcklin, J.Lab.Comp.Radiopharm. 18, 1205 (1981)
- [32] G.D. Robinson, Int.J.appl.Radiat.Isotopes 28, 149 (1977)
- [33] H.H. Coenen, Dissertation, Universität zu Köln, Berichte der Kernforschungsanlage Jülich, Jül-1590 (1979)
- [34] M. Argentini, M. Zahner, P.A. Schubinger, J.Radioanal.Chem. 65, 131 (1981)
- [35] G.W. Kabalka, E.E. Gooch, Ch. Otto, J.Radioanal.Chem. 65, 115 (1981)
- [36] G.W. Kabalka, E.E. Gooch, K.A.R. Sastry, J.Nucl.Med. 22, 908 (1981)
- [37] B.E. Abreu, G.A. Emerson, Univ.Calif.Publ.Pharmacol. 1, 313 (1940)
- [38] J.P. Nicholson, J.F. Zilva, Clin.Sci. 19, 391 (1980)

- [39] G. Stöcklin, H.H. Coenen, M.-F. Harmand, G. Kloster, R. Weinreich, L.E. Feinendegen, K. Vyska, A. Höck, Ch. Freundlieb, J.Nucl.Med. 21, P58 (1980)
- [40] H.-J. Machulla, M. Marsman, K. Dutschka, Eur.J.Nucl.Med. 5, 171 (1980)
- [41] P. Georgi, N. Hartmann, Hoppe-Seyler's Zeitschr.f.Naturf. 325, 173 (1961)
- [42] F.C. Greenwood, W.M. Hunter, Biochem.J. 89, 114 (1963)
- [43] W.M. Hunter, F.C. Greenwood, Nature 194, 495 (1962)
- [44] A.S. Mc Farlane, Nature 182, 53 (1958)
- [45] J.S. Glover, D.N. Salter, B.P. Shepherd, Biochem.J. 103, 120 (1967)
- [46] J.J. Marchalonis, Biochem.J. 113, 299 (1969)
- [47] K.D. Mc Elvany, M.J. Welch, J.Nucl.Med. 20, 663 (1979)
- [48] C.N.M. Bakker, F.M. Kaspersen, Int.J.appl.Radiat.Isotopes 30, 320 (1979)
- [49] U. Rosa, G.A. Scasselatti, F. Pennisi, Biochim.Biophys. Acta 86, 519 (1964)
- [50] F.W. Teare, R.A. Rosenberg, Int.J.appl.Radiat.Isotopes 29, 567 (1978)
- [51] J.F. Harwig, E. Coleman, S.S.L. Harwig, L.A. Sherman, B.A. Siegel, M.J. Welch, J.Nucl.Med. 16, 756 (1975)
- [52] M.J. Welch, J.Amer.Chem.Soc. 92, 408 (1970)
- [53] H.-J. Machulla, A. Shanshal, G. Stöcklin, Radiochim.Acta 24, 42 (1977)
- [54] L.R. Chervu, D.R.K. Murty, in Radioimmunoassay, Hrsg. Freeman & Blaufox, New York, Grune & Stratton, 1975
- [55] P.C. Ganguli, W.M. Hunter, Radioimmunoassay methods, Hrsg. Kirkham & Hunter, Edinburgh, Churchill Livingstone, 1971, S. 54
- [56] G. Petzold, H.H. Coenen, J.Lab.Comp.Radiopharm. 18, 1319 (1981)
- [57] U.A.M. Hadi, D.J. Malcolm-Lawes, G. Oldham, Int.J.appl. Radiat.Isotopes 30, 709 (1979)
- [58] R.M. Lambrecht, C. Mantescu, C.S. Redvanly, A.P. Wolf, J.Nucl.Med. 13, 266 (1972)
- [59] H. Lundqvist, P. Malmborg, B. Langström, S.N. Chiengmai, Int.J.appl.Radiat.Isotopes 30, 39 (1979)

- [60] D.J. Malcolme-Lawes, S. Massey, J. Radioanal. Chem. 64, 281 (1981)
- [61] D.J. Malcolme-Lawes, S. Massey, J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1980, 221
- [62] R.K. Donabedian, R.A. Levine, D. Seligson, Clin. Chim. Acta 36, 517 (1972)
- [63] G.S. David, R.A. Reisfeld, Biochemistry 13, 1014 (1974)
- [64] K.A. Krohn, M.J. Welch, Int. J. appl. Radiat. Isotopes 25, 315 (1974)
- [65] K.D. Mc Elvany, L.C. Knight, M.J. Welch, J.F. Siuda, R.F. Theiler, L.P. Hager, in Marine algae in pharmaceutical science, Hrsg. H.A. Hoppe, T. Levring, Y. Tanaka, W. de Gruyter, Berlin, 1979, S. 429
- [66] He Youfeng, H.H. Coenen, G. Petzold, G. Stöcklin, J. Lab. Comp. Radiopharm. 19, 807 (1982)
- [67] H.H. Coenen, H.-J. Machulla, G. Stöcklin, J. Lab. Comp. Radiopharm. 16, 891 (1979)
- [68] H.H. Coenen, J. Lab. Comp. Radiopharm. 18, 739 (1981)
- [69] D.S. Wilbur, G.E. Bentley, H.A. O'Brien, J. Lab. Comp. Radiopharm. 18, 1693 (1981)
- [70] H.H. Coenen, A.S. El-Wetery, G. Stöcklin, J. Lab. Comp. Radiopharm. 18, 114 (1981)
- [71] R.M. Lambrecht, A.P. Wolf, Proc. Symp. New Develop. Radiopharm. Lab. Comp., Copenhagen, Vol. 1, 275, IAEA, Vienna (1973)
- [72] E.J. Knust, A. Halpern, G. Stöcklin, J. Amer. Chem. Soc. 96, 3733 (1974)
- [73] M. El-Garhy, G. Stöcklin, Radiochem. Radioanal. Letters 18, 281 (1974)
- [74] H. Gutman, M. Lewin, J. Phys. Chem. 72, 3671 (1968)
- [75] C.N.M. Bakker, F.M. Kaspersen, A. van Langefelde, J.A. Oosterhuis, E.K.J. Pauwels, J. Lab. Comp. Radiopharm. 17, 667 (1980)
- [76] C.F. Bearer, R.D. Knapp, A.J. Kaumann, T.L. Swartz, I. Birnbaumer, Molekular Pharmacol. 17, 328 (1980)
- [77] J.K. Mazaitis, B.E. Francis, W.C. Eckelman, R.E. Gibson, R.C. Reba, J.W. Barnes, G.E. Bentley, P.M. Grant, H.A. O'Brien, Jr., J. Lab. Comp. Radiopharm. 18, 1033 (1981)

- [78] S.P. Markey, R.W. Colburn, I.J. Kopin, J.Lab.Comp.Radiopharm. 12, 627 (1976)
- [79] T. Sargent, D.A. Kalbhen, A.T. Shulgin, G. Braun, H. Stauffer, N. Kusubov, Neuropharmacology 14, 165 (1975)
- [80] J.S. Fowler, R.R. Mac Gregor, A.P. Wolf, J.Med.Chem. 19, 356 (1976)
- [81] N.I. Foster, R. Dannals, H.D. Burns, N.D. Heindel, J.Radioanal.Chem. 65, 95 (1981)
- [82] H. Scholl, G. Kloster, G. Stöcklin, 4th Int.Symp.Radiopharm. Chem., Jülich, 1982, Abstract, im Druck
- [83] M.J. Adams, T.J. Ruth, P.D. Pate, L.D. Hall, 4th Int.Symp. Radiopharm.Chem., Jülich, 1982, Abstract, im Druck
- [84] F.D. Chattaway, J.Chem.Soc. 87, 145 (1905)
- [85] Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie, Band IX, S. 642 (1955)
- [86] G. Gomori, in Methods in Enzymology, Vol. 1, Hrsg. Colowick & Kaplan, Academic Press, New York, 1955, S. 138
- [87] W.M. Hunter, Proc.Symp. Oak Ridge, USAEC, 1966, S. 245
- [88] A.E. Freedlender, Protein and Polypeptide Hormones, Hrsg. Margoulies, Amsterdam, 1969, S. 608-12
- [89] G. Petzold, Diplomarbeit, Universität zu Köln, 1980
- [90] K.A. Krohn, L. Sherman, M.J. Welch, Biochim.Biophys.Acta 285, 404 (1972)
- [91] G. Kloster, H.H. Coenen, Z. Szabo, F. Ritzl, G. Stöcklin, in Progress in radiopharmacology, 3, Ed. P.H. Cox (1982)
- [92] W.W. Binkley, J.Amer.Chem.Soc. 70, 2010 (1948)
- [93] Shik Yi Wang, J.Org.Chem. 24, 11 (1959)
- [94] J. Rudinger, Radioimmunoassay methods, Hrsg. Kirkham & Hunter, Edinburgh, Churchill Livingstone, 1971, S. 104
- [95] S. Dushman, J.Phys.Chem. 8, 453 (1904)
- [96] E. Hallaba, J. Drouet, Int.J.appl.Radiat.Isotopes 22, 49 (1971)
- [97] E. Bishop, V.J. Jennings, Talanta 1, 197 (1958)
- [98] M.A. Koupparis, T.P. Hadjiioannou, Microchem.J. 23, 178 (1978)
- [99] J.C. Morris, J.A. Salazar, M.A. Wineman, J.Amer.Chem.Soc. 70, 2036 (1948)

- [100] R. Dietzel, K. Täufel, Apotheker Zeitg. 44, 990 (1929)
- [101] M.A. Koupparis, T.P. Hadjiioannou, Anal.Chim.Acta 94, 367 (1977)
- [102] V.J. Jennings, CRC: Crit.Rev.Anal.Chem. 3, 407 (1974)
- [103] H.D. Dakin, Biochem.J. 10, 319 (1916)
- [104] H.D. Dakin, Biochem.J. 11, 79 (1917)
- [105] H.D. Dakin, J.B. Cohen, M. Daufresne, J. Kenyou, Proc. Royal Soc. London 89, Ser. B, 232 (1917)
- [106] K. Langheld, Chem.Ber. 42, 2360 (1909)
- [107] N.O. Engfeldt, Hoppe-Seyler's Zeitschr.f.Physiol.Chem. 126, 11 (1923)
- [108] H.M.K. Naidu, D.S. Mahadevappa, Monatsh.f.Chemie 109, 269 (1978)
- [109] V.M. Sadagopa Ramanujam, N.M. Trieff, J.Chem.Soc. Perkin II, 1977, 1275
- [110] T. Higuchi, A. Hussain, J.Chem.Soc. (B), 1967, 546
- [111] C.G. Swain, R.C. deLanson, J.Amer.Chem.Soc. 94, 3195 (1972)
- [112] D.S. Mahadevappa, H.M.K. Naidu, Aust.J.Chem. 28, 899 (1975)
- [113] D.S. Mahadevappa, H.M.K. Naidu, Indian J.Chem. 14(A), 808 (1976)
- [114] P.B.D. de la Mare, Electrophilic halogenation, Cambridge University Press, Cambridge, 1976
- [115] R.P. Bell, E. Gelles, J.Chem.Soc., 1951, 2734
- [116] E. Bishop, V.J. Jennings, Talanta 8, 697 (1961)
- [117] J. Arotsky, M.C.R. Symons, Quart.Rev. 16, 282 (1962)
- [118] E. Schulek, K. Burger, Talanta 1, 219 (1958)
- [119] E. Pungor, K. Burger, E. Schulek, J.Inorg.Nucl.Chem. 11, 56 (1959)
- [120] J. Shamir, Struct.Bonding 37, 141 (1979)
- [121] C.H. Li, J.Amer.Chem.Soc. 67, 1065 (1945)
- [122] M.L. Anson, J.Gen.Physiol. 23, 321 (1940)
- [123] J.A. Sweetman, M.S. Simmons, Water Res. 14, 287 (1980)
- [124] C.N.M. Bakker, F.M. Kaspersen, J.appl.Radiat.Isotopes 32, 176 (1981)
- [125] R. Zeynek, Hoppe-Seyler's Zeitschr.f.Physiol.Chem. 144, 246 (1925)
- [126] F.E. Hardy, J.P. Johnston, J.Chem.Soc. Perkin II, 1973, 742

- [127] Holleman, Wiberg, Lehrbuch der anorganischen Chemie, W. de Gruyter, Berlin, 1971
- [128] M. Anbar, D. Ginsburg, Chem.Rev. 54, 925 (1954)
- [129] E. Berliner, J.Chem.Educ. 43, 124 (1966)
- [130] F. Effenberger, Chemie in unserer Zeit 13, 87 (1979)
- [131] E. Grovenstein, Jr., S.A. Nazar, J.B. Coleman, N.S. Gnanapragasam, D.C. Kilby, J.M. Mc Kelvey, R.J. Sullivan, J.Amer.Chem.Soc. 95, 4261 (1973)
- [132] E. Schulek, K. Burger, Talanta 1, 147 (1958)
- [133] E. Schulek, K. Burger, Talanta 1, 224 (1958)
- [134] W.M. Hunter, Radioimmunoassay, Kap. 17, in Handbook of experimental immunology, Hrsg. D.M. Weir, Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1973
- [135] G.W. Kabalka, K. Sastry, H. Hsu, J.Org.Chem. 46, 3113 (1981)
- [136] D. Wilbur, K. Anderson, J.Org.Chem. 47, 358 (1982)
- [137] G.W. Kabalka, E.E. Gooch, C.A. Otto, J.Radioanalyt.Chem. 65, 115 (1981)
- [138] V. Balasubramanian, V. Thigarajan, Int.J.Chem.Kinet. 7, 605 (1975)
- [139] H.N. Eisen, A.S. Keston, J.Immun. 63, 71 (1949)
- [140] D. Pressman, O. Roholt, Proc.natn.Acad.Sci. USA 47, 1606 (1961)
- [141] E.H.D. Cameron, S.E. Morris, J.J. Scarisbrick, S.G. Hillier, Biochem.Soc.Trans. 1, 1115 (1973)
- [142] G. Sigurdsson, S.-P. Noel, R.J. Havel, J.Lipid Res. 19, 628 (1978)
- [143] Y. Stein, V. Ebin, H. Bar-on, O. Stein, Biochim.Biophys. Acta 486, 286 (1977)
- [144] T.E. Caren, M.J. Chapman, S. Goldstein, D. Steinberg, Biochim.Biophys.Acta 529, 171 (1978)
- [145] P. Gorden, J.-L. Carpentier, P. Freychet, A. Le Cam, L. Orci, Science 200, 782 (1978)
- [146] H. Haigler, J.F. Ash, S.J. Singer, S. Cohen, Proc.Natl. Acad.Sci. USA 75, 3317 (1978)
- [147] L. OpreSCO, H.S. Wiley, R.A. Wallace, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 77, 1556 (1980)
- [148] M.R. Redshaw, S.S. Lynch, J.Endocrin. 60, 527 (1974)
- [149] L.A. Sherman, S. Harwig, O.A. Hayne, Int.J.appl.Radiat. Isotopes 25, 81 (1974)

- [150] J.M. Chesworth, Anal.Biochem. 80, 31 (1977)
- [151] F.F. Bolander, R.E. Fellows, Biochemistry 14, 2938 (1975)
- [152] V.S. Fang, H.W. Cho, H.Y. Maltzer, Biochem.Biophys.Res. Commun. 65, 413 (1975)
- [153] A. Fattoum, R. Kassab, L.A. Pradel, Eur.J.Biochem. 22, 445 (1971)
- [154] A.E. Bolton, C.A. Ludlam, D.S. Pepper, S. Moore, J.D. Cash, Thromb.Res. 8, 51 (1976)
- [155] A.E. Bolton, W.M. Hunter, J.Endocrin. 55, 30 (1972)
- [156] F.T. Wood, M.M. Wu, J.C. Gerhart, Anal.Biochem. 69, 339 (1975)
- [157] C.E. Hayes, I.J. Goldstein, Anal.Biochem. 67, 580 (1975)
- [158] J.L. Morgan, C.R. Holladay, B.S. Spooner, FEBS Letters 93, 141 (1978)
- [159] K.A. Krohn, L.C. Knight, J.F. Harwig, M.J. Welch, Biochim. Biophys.Acta 490, 497 (1977)
- [160] I. Covelli, J. Wolff, J.Biol.Chem. 241, 4444 (1966)
- [161] M.E. Koshland, F.M. Engelberger, S.M. Gaddone, J.Biol. Chem. 238, 1349 (1963)
- [162] G.E. Means, R.E. Feeney, Chemical modification of proteins, Holden Day, San Francisco, 1971, S. 176
- [163] J. Wolff, I. Covelli, Biochemistry 5, 867 (1966)
- [164] W.R. Butt, J.Endocrin. 55, 453 (1972)
- [165] A. Eberle, W. Hübscher, Helv.Chim.Acta 62, 2460 (1979)
- [166] K. Shima, N. Sawazaki, R. Tanaka, S. Tarui, M. Nishikawa, Endocrinology 96, 1254 (1975)
- [167] D.W. Miles, C.E. Mogensen, H.J. Gundersen, Scand.J.Clin. Lab.Invest. 26, 5 (1970)
- [168] C.M. Müller-Platz, Dissertation, Universität zu Köln, Report Jül-1775, 1982
- [169] T.P. Seden, R.W. Turner, J.Chem.Soc. (C), 1968, 876
- [170] A. Hassner, L.A. Levy, J.Amer.Chem.Soc. 87, 4203 (1965)
- [171] G. Kloster, P. Laufer, G. Stöcklin, J.Lab.Comp.Radiopharm., im Druck
- [172] L.D. Hall, J.F. Manvilla, Can.J.Chem. 47, 361 (1969)

Herrn Prof.Dr. G. Stöcklin danke ich für die Themenstellung, für die vielfältigen Anregungen sowie die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Bei Dr. H.H. Coenen bedanke ich mich für die Betreuung der Arbeit und die ausführlichen Diskussionen.

Mein Dank gilt auch den Mitarbeitern des ICH-1 und der Bestrahlungsgruppe am Kompaktzyklotron CV 28 der Kernforschungsanlage Jülich, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Auch bei meinen Kondoktoranden bedanke ich mich für die ausführlichen Diskussionen.

