

Silber und Platin, die zur Chlor- bzw. Kalium-Bestimmung benötigt werden. Die Silberchromat-Niederschläge und das Chlorid von der Mohrschen Titration können direkt durch eine Wasserstoff-Austauschersäule<sup>69</sup>) geschickt werden, wobei sich der Niederschlag auflöst und das Silber vom Austauscher aufgenommen wird. Die Kalium-chloro-platinat-Niederschläge und überschüssige Chlоро-platinsäure werden am besten an der Chlorid-Form eines Anionen-Austauschers adsorbiert.

Zur Bestimmung der Dissoziationskonstanten von komplexen Salzen, z. B. der Citrat-Komplexe der seltenen Erden<sup>70</sup>), kann das Austauscher-Verfahren herangezogen werden. Bekanntlich tauschen nur die Ionen aus, welche in freier Form vorliegen, und nicht die komplexgebundenen. Mit Hilfe des Massenwirkungsgesetzes läßt sich aus den Meßresultaten die Dissoziationskonstante ermitteln.

Etwas komplizierter liegen die Verhältnisse bei den Chromsalz-Komplexen, wie sie in der Gerbereitechnik verwandt werden. Hier kommt das Chrom als Kation, in ungeladenem Zustand und als Anion vor, und für den Gerber ist es wichtig, die Verhältnisse genauer zu kennen. K. A. Gustavson<sup>71</sup>) schickte die Lösung zunächst durch ein Kationenharz und anschließend durch ein Anionenharz, wobei nacheinander die kationischen und die anionischen Chrom-Ionen gebunden werden, während die ungeladenen die Säule unverändert passieren. Diese Methode ist nicht ganz exakt, da sich immer ein Gleichgewichtszustand einzustellen trachtet, durch den das entfernte Ion nachgebildet wird. Bei raschem Arbeiten erzielt man für das praktische Arbeiten hinreichend genaue Resultate.

„Destilliertes Wasser“ wird durch aufeinanderfolgende Anwendung von Kationen- und Anionen-Austauscher hergestellt, wobei eine Leitfähigkeit von  $10^{-8}$  Ohm erreicht werden kann.

In der organischen Chemie stellt der mit Wasserstoff beladene Austauscher einen für viele Reaktionen sehr wirksamen Katalysator dar<sup>72</sup>), der im Prinzip dieselbe Wirkung besitzt wie die freien Wasserstoff-Ionen. Er kann angewandt werden zu Veresterungen, Umesterungen und Esterverseifungen, zur Acetal-Synthese, Zucker-Inversion u. dgl. Der Katalysator kann durch einfache Filtration nach Beendigung der Reaktion wieder entfernt werden. Daneben erlaubt die gute Hitzebeständigkeit der Austauscher ein einfaches Abdestillieren der Reaktionsprodukte. Ein besonderer Vorteil liegt in der Anwendung auf säureempfindliche Substanzen, die bei Einwirkung freier Säure verharzen würden. So kann z. B. der Furfurylalkohol direkt mit Essigsäure verestert werden; wenn die Ausbeute auch nur 10 bis 20% beträgt, so ist doch keinerlei Harzbildung zu beobachten.

In der Alkaloid-Chemie benutzt man zur Erhöhung der Löslichkeit der freien Basen wässrig-alkoholische Lösungen

<sup>69)</sup> O. Samuelson, Ph. D. Dissert., Helsingfors, Schweden 1944.  
<sup>70)</sup> E. R. Tompkins u. S. W. Mayer, J. Amer. Chem. Soc. 69, 2859 [1947].  
<sup>71)</sup> Svensk Kem. Tid. 58, 274 [1946]; Chem. Abstr. 41, 7799 [1947].  
<sup>72)</sup> S. Sussman, Ind. Engng. Chem., Ind. Edit. 38, 1228 [1946].

(schon E. Ungerer<sup>63</sup>) hatte auf die Störungen hingewiesen, die ausgefallene Alkaloide bei seinen Versuchen mit anorganischem Austauschmaterial bewirkten). Bis zu 80% der Alkaloide Morphin, Atropin, Scopolamin gewannen N. Applezweig und S. Ronzone<sup>64</sup>) aus dem ausgesäuerten Extrakt der Rohdroge durch Ionenaustausch mit Zeokarb der Permutitkompanie.

Nach Herzog<sup>65</sup>) wird Nicotin aus Tabakrauch durch leicht oxydierte, also endständige Carboxyl-Gruppen enthaltende Cellulose gebunden.

Die organischen Ionenaustauscher haben bei der Vitamin-gewinnung und -Anreicherung häufig eine höhere Kapazität und bessere spezifische Wirkung als die anorganischer Austauscher. Aus Molke kann zunächst Laktoflavin durch Wofatit KS<sup>66</sup>) gebunden und anschließend das Vitamin B<sub>1</sub> durch basisches Harz festgehalten werden. Das amerikanische Produkt Amberlite I. R. 100 H. war ebenfalls sehr geeignet zur Trennung der Vitamine B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub>. Harzaustauscher haben außerdem gegenüber Zeolith den Vorteil, daß das Vitamin mit flüchtiger Salzsäure wieder gewonnen werden kann, die sich erheblich leichter entfernen läßt als die sonst erforderlichen Mengen Natriumchlorid-Lösung<sup>67</sup>).

Zur Gewinnung von Ascorbinsäure werden basische Harze verwendet, nachdem der rohe Citruspreßsaft zuvor mit einem Kationenaustauscher entbast wurde. Die Oxydation einer empfindlichen Säure kann vermieden werden, wenn man den Anionen-Austauscher mit SO<sub>2</sub> oder H<sub>2</sub>S vorbehandelt und ihm so eine Reduktionswirkung verleiht.

Vor allem in der Lebensmittelindustrie verwendet man Austauscher zur Entfernung störender Ionen. In seiner Monographie gibt R. Griessbach<sup>68</sup>) einen Überblick über die Verwendung von „Austauschabsorbentien in der Lebensmittelindustrie“, in der er auch die Rolle der organischen Austauschharze eingehend schildert und in zahlreichen Literaturangaben und Patenthinweisen auch die ausländische Literatur weitgehend berücksichtigt. Weiterhin findet man Beispiele für die Gewinnung brauchbarer Lebensmittel durch eine Austausch-Entsalzung sonst wertloser Fruchtsäfte, die sich danach zu schmackhaften Sirupen einengen lassen.

Eine Monographie über das gesamte Gebiet der Ionen-Austauscher wurde von F. C. Nachod<sup>69</sup>) herausgegeben. Die einzelnen Kapitel, die von verschiedenen Autoren abgefaßt wurden, vermitteln ein umfassendes Bild vom heutigen Stand der Ionen-Austauscher in Theorie und Praxis. Die Schrift zeigt deutlich, wie stürmisch die Ionen-Austauscher sich während der letzten Jahre entwickelten und welche Bedeutung sie gegenwärtig erlangt haben.

Eintrag am 9. Mai 1951

[A 358]

<sup>63)</sup> Kolloid-Z. 36, 228 [1925].

<sup>64)</sup> Ind. Engng. Chem., Ind. Edit. 38, 576 [1946].

<sup>65)</sup> Schwed. Pat. 250/360 v. 3. 5. 1944.

<sup>66)</sup> I. G. Wolfen u. Tropp, DRP 78593 v. 20. 11. 1944.

<sup>67)</sup> D. S. Herr, Ind. Engng. Chem., Ind. Edit. 37, 631 [1945].

<sup>68)</sup> Ion Exchange, Acad. Press New York 1949.

## Autoradiochromatographie

Von Dr. phil. H. WEIL, London, und TREVOR I. WILLIAMS, Oxford, B. A., B. Sc. Ph. D.

Papierchromatogramme, welche radioaktive Isotope enthalten, lassen sich durch ihre Wirkung auf Photoschichten sichtbar machen. Die Versuchstechnik und einige bisher erzielte Erfolge der Autoradiochromatographie werden geschildert.

### Grundlagen der Autoradiochromatographie

Die Radiochromatographie ist eine Verbindung von Chromatographie und Radiometrie. Sie scheint von R. Lindner<sup>1, 2)</sup> erstmals beschrieben worden zu sein (vgl. auch<sup>3, 4)</sup>). Als Radiometrie wird nachstehend die qualitative und quantitative Bestimmung von Substanzen durch ihre radioaktive Strahlung bezeichnet, während Chromatographie im weitesten Sinne des Wortes gebraucht wird<sup>5)</sup>.

<sup>1)</sup> R. Lindner, Z. Physik. Chem. 194, 51 [1944].

<sup>2)</sup> R. Lindner, diese Ztschr. 62, 387 [1950].

<sup>3)</sup> H. Weil, Canad. Chem. Process Ind. 33, 1036 [1949].

<sup>4)</sup> H. Weil, Atomics [London] 1, 230, 345 [1950].

<sup>5)</sup> L. Zechmeister: Progress in chromatography 1938–1947. London, 1950.

Bei radiochromatographischen Trennungen handelt es sich in der Regel um Trennungen von Substanzen, denen relativ kleine Mengen radioaktiver Indikatoren, häufig aktive Isotope, zugesetzt wurden. Dadurch wird die Bestimmung der in „Zonen“ chromatographisch angesammelten Substanzen wesentlich erleichtert. Mit ihrer Hilfe gelingt es auch unsichtbare Zonen farbloser Substanzen zu erkennen. Ob solche Bestimmungen auf Zonenfeststellungen und qualitative Identifizierung beschränkt sind oder auch auf quantitative Ermittlungen ausgedehnt werden können, ist für die Zukunft der Autoradiochromatographie ausschlaggebend.

Die Radioaktivierung der zu untersuchenden Substanzen ist, wie F. P. W. Winteringham, A. Harrison und R. G. Bridges<sup>8a)</sup> betonen, vor, aber auch nach der Herstellung des Chromatogrammes möglich. Im ersten Falle, dem meist üblichen Verfahren, geschieht die Radioaktivierung durch vorherigen Zusatz radioaktiver Substanzen, etwa durch Isotope oder durch Verwendung von mit Isotopen markierten Verbindungen. Man kann aber selbstverständlich auch noch nachträglich lokal wirksame radioaktive Substanzen aufbringen oder eine Radioaktivität des Chromatogrammes erzeugen, indem man es etwa im Atommeiler starken radioaktiven Strahlungen aussetzt und so erst sekundär radioactive Isotope schafft.

Man unterscheidet zwei Hauptgruppen der Radiochromatographie: Einmal können die von Zonen des Chromatogrammes ausgehenden Strahlen selbst registriert werden. Hierzu gehören Messungen der Radioaktivität mit entspr. konstruierten Geiger-Müller-Zählrohren, Absorptionsfiltern, Nebekammern usw.

Die zweite Gruppe beschränkt sich auf das radiochromatographische Verfahren, das wir „Autoradiochromatographie“ zu nennen vorschlagen. Hier wird die vom Chromatogramm ausgehende radioaktive Strahlung mit photographischen Hilfsmitteln festgehalten.

Man kann drei Arten der Autoradiographie unterscheiden, je nachdem wie Objekt und photographische Emulsion aufeinander wirken. Die erste Methode besteht darin, eine photographische Platte oder einen photographischen Film mit dem Objekt in Kontakt zu bringen und dann das latente Bild getrennt von dem Objekt zu entwickeln.

Die zweite Art besteht im Aufbringen der Emulsion, etwa durch Aufpinseln derselben in flüssigem Zustand, direkt auf das Objekt und in Entwickeln und Fixieren ohne vorherige Trennung. Neuerdings wird oft eine dritte Methode bevorzugt, die man als „Abziehtechnik“ bezeichnen kann. Das Objekt wird auf die photographische Platte aufgebracht, aber in der Regel durch eine Zwischenschicht getrennt, die eine Beschädigung des Objektes beim Entwickeln und Fixieren und chemische Reaktionen zwischen Objekt und photographischer Emulsion unmöglich machen soll.

Die Autoradiochromatographie ist bisher auf die Papierchromatographie beschränkt geblieben, obwohl eine sinnmäßige Anwendung auch in der sonst üblichen Chromatographie denkbar ist.

Die analytische Brauchbarkeit eines radioautographisch hergestellten Bildes hängt wesentlich von Trennschärfe und Trennweite der papierchromatographischen Methode ab.

Nach Dent<sup>6b)</sup> dürfte die zweidimensionale Chromatographie in der Regel vorteilhafter sein, wenn eine aus einer größeren Zahl teilweise unbekannter Substanzen bestehende Mischung in ihre Bestandteile zerlegt werden soll. Die eindimensionale Papierchromatographie kann andererseits vorzüglich zur Auflösung eines Gemisches von wenigen, bekannten Bestandteilen benutzt werden. Die Radioaktivität in den Konzentrationszonen kann hierbei überdies durch verschiedene Kunstgriffe (z. B. Sperrschnitte aus Paraffin) wesentlich erhöht werden, was ein spezifischer Vorteil der eindimensionalen chromatographischen Methode ist<sup>7)</sup>. Auch die quantitative Auswertung wird einfacher möglich sein. Zur Trennung biologischer Materialien und dergl. wird aber die zweidimensionale Papierchromatographie häufig vorzuziehen sein.

Die Verwendung radioaktiver Indikatoren als Nachweismethode braucht hier nicht diskutiert werden, da das bereits Fleischmann<sup>8)</sup>, Weygand<sup>9)</sup>, Schacht<sup>10)</sup> und andere in dieser Zeitschrift getan haben. Einige wenige, bei der Verwendung radioaktiver Substanzen besonders wesentliche Punkte werden aber noch erwähnt werden.

### Anwendungen der Autoradiochromatographie

Die Hauptaufgabe der Autoradiographie ist gegenwärtig die Lage von Zonen eines Papierchromatogrammes festzustellen, während quantitative und qualitative Untersuchungen in der Regel mit nicht photographischen und klassischen chemischen Methoden ausgeführt werden. Vereinzelt ist aber bereits versucht worden, chromatographisch getrennte Bestandteile einer

<sup>8a)</sup> F. P. W. Winteringham: Radiochemical techniques in analysis, Nature [London], 168, 153 [1951].

<sup>8)</sup> C. E. Dent, „A study of the behaviour of some sixty amino acids and other ninhydrin reacting substances on phenolcollidine filter paper“. Biochemic. J. 43, 169 [1948].

<sup>7)</sup> H. Weil, Canad. Chem. Process Ind. 33, 956 [1949]; Chimie et Ind. 64, 432 [1950]; C. G. Lynam u. H. Weil, Manufact. Chemist 21, 195, 288 [1950]; Canad. Chem. Process Eng. 35, 47 [1951].

<sup>8)</sup> Diese Ztschr. 61, 253 [1949].

<sup>9)</sup> Eben a 61, 285 [1949]. <sup>10)</sup> Ebenda 61, 465 [1949].

Mischung photographisch zu bestimmen, was erst eine volle Ausnützung der Möglichkeiten der autoradiochromatographischen Methode bedeutet. Zur Bestimmung der Lage der Zonen eines Chromatogrammes, etwa solcher, die nicht ohne weiteres sichtbare Bestandteile enthalten, benötigt man photographische Emulsionen, an die keine besonders hohen Ansprüche gestellt werden müssen. Auch die anzuwendende photographische Technik ist relativ einfach. Soll aber die Zusammensetzung einer Zone photographisch ermittelt werden, so benötigt man, um befriedigende Ergebnisse erzielen zu können, Spezialemulsionen und eine komplizierte Technik. Von einigen Ausnahmen abgesehen, sind bisher in der Autoradiochromatographie nur einzelne radioaktive Isotope als Indikatoren verwendet worden. Es wurden aber vereinzelt auch Mischungen untersucht, in der alle Bestandteile radioaktiv waren, oder Verbindungen geprüft, in denen eine radioaktive Substanz mit einer oder mehreren Substanzen chemisch gebunden waren.  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Strahler wie z. B.  $^{131}\text{J}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{36}\text{S}$ ,  $^{32}\text{P}$  und  $^{46}\text{Ca}$  wurden benutzt. Die ersten autoradiochromatographischen Experimente wurden mit  $^{131}\text{J}$  unternommen. Es ergab sich sowohl bei ein- wie bei zweidimensionalen Papierverteilungschromatogrammen von  $^{131}\text{J}$  enthaltenden Schilddrüseninhalten, daß eine photographisch registrierbare Verteilung des radioaktiven Jodes zwischen den Zonen des Chromatogrammes eintrat.

C. E. Dent<sup>6, 11)</sup> entwickelte 1946–1948 eine besondere papierchromatographische Technik, zunächst zur Feststellung von Aminosäuren und Peptiden in menschlichen Ausscheidungen, die auch eine ungefähre quantitative Schätzung der Bestandteile zuließ. Er hat in der Folge seine papierchromatographische Methode mit der Autoradiographie zur Prüfung von Urin usw. kombiniert.

1947 hat Dent<sup>12)</sup> chromatographische Trennungen auf Papier erstmals mit photographischen Nachweismethoden verbunden. Dabei wurden Hydrolysate von Rattenschilddrüsen untersucht. Dent und Mitarbb. verwendeten  $^{131}\text{J}$  (Halbwertszeit etwa 8 Tage), das relativ weiche  $\beta$ -Strahlen (0,6 MeV) aussendet. Diese Indikatoren-Methode kann als Isotopen-Verdünnungs-Methode aufgefaßt werden.

Das Radiochromatogramm wurde mit einem gewöhnlichen Röntgenfilm, der nachträglich wie üblich entwickelt wurde, in Kontakt gebracht, wobei ein Cellophan-Blatt als Zwischenschicht eingeschoben wurde. Die Exponierungszeit betrug bis zu sieben Tagen. Die in verschiedenen Zonen ein- und zweidimensionaler Papierradiochromatogramme angesammelten Aminosäuren und Jodverbindungen wurden mit geeigneten chemischen Reagentien sichtbar gemacht. Die Zonen des Autoradiochromatogrammes konnten durch Aufeinanderlegen des chemisch behandelten Chromatogrammes und des entwickelten Filmes identifiziert werden, wodurch die Zuverlässigkeit der Methode kontrolliert werden konnte.

Taurog und Chaikoff<sup>13)</sup> hatten bereits 1947 bei der Frage, ob Dijodtyrosin der Vorläufer von Thyroxin im Umsatzprozeß der Schilddrüse ist, unter Benutzung von radioaktivem Jod den experimentellen Beweis hierfür erbracht und bei späteren Experimenten<sup>14)</sup> autoradiochromatographische Methoden verwendet. Auch gelang es ihnen nachzuweisen, daß Monoiodtyrosin einen erheblichen Teil der gesamten Jod-Menge im Hydrolysat bildet. Autoradiochromatogramme wurden auch hier benutzt, um die Verteilung radioaktiver Substanzen in verschiedenen Zonen des Chromatogrammes zu bestimmen. Eine Thyroxin-Zone konnte allerdings bei diesen Versuchen nicht gefunden werden. Tiskoff und Mitarbb.<sup>15)</sup> verwendeten zur Untersuchung des Schilddrüsenumsatzes  $\text{Na}^{131}\text{J}$  und stellten Autoradiochromatogramme her, die

<sup>11)</sup> C. E. Dent, Lancet, CCI 11, 367 [1946]; Biochemical J. 40, XI, IV [1946], 41, 240 [1947]; C. E. Dent u. J. A. Schilling, ebenda 42, XXIX [1948].

<sup>12)</sup> R. M. Fink, C. E. Dent u. K. Fink, „Application of filter paper partition chromatography to radioactive tracer studies“, Nature [London] 169, 801 [1947]. Vgl. hierzu auch: W. Mann, C. P. Leblond, u. S. L. Warren, „Iodine metabolism of the thyroid gland“. J. biol. Chemistry 142, 905 [1942]; D. Rittenberg u. G. S. Foster, „A new procedure for quantitative analysis by isotope dilution, with application to the determination of amino acids and fatty acids. J. biol. Chemistry 133, 737 [1940]; K. Fink u. R. M. Fink, „Formation of monoiodotyrosine in the thyroid of rat and man“. Science [New York] 108, 358 [1948]; F. J. Hirsh u. V. M. Trikojus, „Paper partition chromatography with thyroxine and analogues“. Australian J. Sci. 10, 185 [1948]; R. M. Fink u. K. Fink, „Radiocarbon and filterpaper chromatography“. Science [New York] 107, 185 [1948].

<sup>13)</sup> A. Taurog u. I. L. Chaikoff, J. biol. Chemistry 169, 49 [1947].

<sup>14)</sup> A. Taurog, I. L. Chaikoff u. W. Tong, J. biol. Chemistry 178, 997 [1949]; A. Taurog, W. Tong u. I. L. Chaikoff, Nature [London] 164, 181 [1949].

<sup>15)</sup> G. N. Tiskoff, R. Bennett, V. Bennett u. L. L. Miller, „Radioiodine and paperchromatography. Techniques in the study of thyroid metabolism“. Science [New York] 110, 452 [1949].

48 h nach der Injektion in das Versuchstier beendet waren.  $\text{Na}^{131}\text{J}$  wurde gewählt, um unerwünschte Nebenreaktionen zwischen dem radioaktiven Jod und dem verwendeten Lösungsmittel zu vermeiden, wodurch eindeutigere Resultate erwartet wurden.

Auch von Lemmon und Mitarb.<sup>16)</sup> wurde  $^{131}\text{J}$  als radioaktiver Indikator bei ähnlichen Arbeiten verwendet. Es wurde die Verteilung von Aminosäuren im Verteilungschromatogramm wie autoradiographisch üblich vermittelt. Nach Herstellung eines zweidimensionalen Chromatogrammes von Mono- und Diiodotyrosin mit geeigneten Lösungsmittelpaaren wurde ein Autoradiochromatogramm in der Weise bereitet, daß ein Röntgenfilm (Eastman Kodak Co., „No Screen“, 14×17 Zoll) direkt, und zwar nur für 1 min mit dem Autoradiochromatogramm in Kontakt in einer Dunkelkammer gebracht und dann wie üblich entwickelt wurde.

R. Tomarelli und K. Florey<sup>17)</sup> setzten Dents Versuche fort und entwickelten eine halbautomatische, standardisierte Methode und eine mit einem Geiger-Müller-Zählrohr kombinierte Zähleinrichtung zur fortlaufenden Feststellung der Radioaktivität in verschiedenen Zonen des Chromatogrammes. Ihre Apparatur bedeutet einen gewissen Fortschritt gegenüber den von Bourns<sup>18)</sup> und Hummel und Lindberg<sup>19)</sup> und anderen für Geiger-Müller-Zählrohre bei Verwendung in der Papierchromatographie vorgeschlagenen Apparaturen.

R. M. Fink und K. Fink dehnten ihre Versuche auf  $^{14}\text{C}$  aus, ein Isotop, das eine weichere Strahlung als  $^{131}\text{J}$  gibt. Um die Bildung verschiedener Produkte bei der Photosynthese verfolgen zu können, wurde einer Alge (*Chlorella*)  $^{14}\text{CO}_2$  angeboten. Von den Extrakten wurden zweidimensionale Papier-Autoradiochromatogramme angefertigt, indem die Chromatogramme (anscheinend ungeschützt gegen evtl. chemische Nebenreaktionen) unmittelbar gegen einen Eastman Kodak „No screen“ Röntgenfilm für drei Tage gepreßt wurden. Fink und Fink glauben, daß bei ihren Versuchen kein wesentlicher Prozentsatz der radioaktiven Strahlung durch Absorption im Filterpapier verloren ging. Sie kamen zu dem Schluß, daß radiometrische Bestimmungsverfahren eine vielfach schärfere Empfindlichkeit besitzen als etwa kolorimetrische Methoden und daß nach Lokalisierung geringfügiger Konzentrationen im Chromatogramm auch die Identifizierung kleinsten Mengen sich mit üblichen Methoden ausführen läßt. Es mag hierfür auch auf eine von Tordai<sup>20)</sup> veröffentlichte Arbeit, die dieses Problem auf breiterer Basis behandelt, hingewiesen werden.

Es sei hier auch auf eine Übersicht von Cramer<sup>21)</sup> über Papierchromatographie der Zucker hingewiesen, in der nicht nur allgemein auf die Bedeutung der Indizierung mit radioaktiven Isotopen bei papierchromatographischen Trennungen von Zuckern verwiesen wurde, sondern auch einige Experimente mit  $^{14}\text{C}$  erwähnt sind, bei denen die Autoradiochromatographie verwendet wurde.

Von den Kohlenstoff-Isotopen eignet sich besonders gut  $^{14}\text{C}$ , das langsame Elektronen abgibt und eine Halbwertszeit von 5000 Jahren hat, zur Indizierung von Kohlenstoffverbindungen, die autoradiochromatographisch untersucht werden sollen. Die von Calvin und Mitarb.<sup>22)</sup> angewandte Methode ist prinzipiell gleich der von Dent, Fink und Fink entwickelten Methode. Es wurden in bestimmten Zeitabständen Autoradiochromatogramme von aus photosynthetisierenden Pflanzen hergestellten Extrakten angefertigt. Man kann so die Bildung neuer Substanzen in der Pflanze zeitlich feststellen und die Verteilung des radioakti-

ven Kohlenstoffes verfolgen. Auf diese Weise läßt sich ein Bild der Entwicklung der verschiedenen Umwandlungsprodukte gewinnen.

Eine gleichfalls 1949 im Auftrage der amerikanischen „Atomic Energy Commission“ vorgenommene Untersuchung<sup>23)</sup> behandelt die Identifizierung und die zeitliche Folge der bei der Rohrzucker-Synthese entstehenden Zwischenprodukte. Einzelheiten der verwendeten Technik finden sich in einer 1950 von Benson, Bassham, Calvin und Mitarb.<sup>24)</sup> veröffentlichten Arbeit.

Folgende autoradiographische Technik wurde angewandt: Das getrocknete Radiochromatogramm wird für die Exponierung so gefaltet, daß es den üblichen Eastman Kodak Röntgenfilm deckt, und zwar mit dem Ausgangspunkt der getrennten Mischung in einer Ecke des Chromatogrammes. Ein oder zwei Filme werden, wie nachstehend beschrieben, danach in einem lichtsicheren „Eastman Kodak Röntgenfilm Exponierungshalter“ der Einwirkung des Radiochromatogrammes ausgesetzt, wobei sie mit einem mit Sand gefüllten Karton gleichmäßig gegen dieses gepreßt werden können. Falls das Radiochromatogramm gleichzeitig  $^{14}\text{C}$  und  $^{32}\text{P}$  enthält, wird entweder ein Film verwendet, der auf beiden Seiten mit einer Emulsion versehen ist, oder es werden zwei gewöhnliche Filme hintereinander gepackt, und zwar mit der reaktionsfähigen Seite gegen die Strahlenquelle gerichtet und an das Chromatogramm angepreßt.  $^{14}\text{C}$  bewirkt bei dieser Packung nur ein latentes Bild in der unmittelbar benachbarten photographischen Emulsion, während  $^{32}\text{P}$  ein entwicklungsfähiges Bild in beiden Emulsionen erzeugt. Man erhält also auf diese Weise in der entfernteren Emulsion ein latentes Bild, das nur auf die Entwicklung von  $^{32}\text{P}$  zurückzuführen ist.

Bei diesen Versuchen betrug die vom Whatman No. 1 Filtrerpapier ausgehende Radioaktivität 30% derjenigen, die registriert wird, wenn man die Radioaktivität der Probe in einem dünnen Film auf einer Glas- oder Metallunterlage getrocknet direkt mißt. Die für das Exponieren des Röntgenfilmes erforderliche Zeit ist eine Funktion der vom Papier ausgehenden Strahlung. 15000 Zerfälle je Minute pro  $\text{cm}^2$  geben nach Calvin ein befriedigendes latentes Bild in drei bis sechs Tagen.

Die exakte photographische Reproduktion von Autoradiochromatogrammen ist bisher mit Schwierigkeiten verbunden. Bilder sehr schwacher Konzentrationsstellen lassen sich evtl. mit von weißem Hintergrund reflektiertem Licht studieren. Um ein Autoradiochromatogramm nach der Entwicklung und ein chemisch behandeltes Radiochromatogramm vergleichen zu können, wird die Markierung zweier einander gegenüberliegender Ecken des letzteren mit radioaktiver Druckfarbe empfohlen. Hierfür kann beispielsweise gewöhnliche Stempelkissenfarbe, die eine nicht flüchtige mit  $^{14}\text{C}$  indizierte Substanz enthält, verwendet werden.

Aus den Experimenten Calvins und Mitarb. ging hervor, daß die Autoradiochromatographie ein brauchbares Hilfsmittel bei der chemischen Synthese ist.

In zwei Arbeiten von Udenfriend und Mitarb. wurden autoradiochromatographische Methoden benutzt. So wurde<sup>25)</sup> die Gewinnung von mit  $^{14}\text{C}$  gleichmäßig indizierter Fruktose durch Photosynthese und Papierchromatographie beschrieben. Partridge u. a. glückte es, Fruktose papierchromatographisch zu isolieren. Udenfriend trennte ein Gemisch von Glucose und Fruktose papierchromatographisch. 75 Radiochromatogramme wurden auf Whatman No. 1 Filtrerpapier in Streifen von 14×1.5 Zoll angefertigt. Sie enthielten 0.1–0.3 mg Zucker je Einheit. Nach dem üblichen Entwickeln mit Phenol wurden die Streifen luftgetrocknet und auf „Eastman-Röntgenplatten K“ gelegt. Da sich die Konzentrationszonen der Chromatogramme nicht immer genau an der gleichen Stelle befanden, mußte ein Autoradiogramm von jedem einzelnen Streifen angefertigt werden. Die Bilder traten bereits nach ungefähr zwei Stunden genügend deutlich heraus, um die Umrisse der Konzentrationszonen erkennbar zu machen. Die Zonen, die Fruktose enthielten, wurden ausgeschnitten. Das Gesamtgewicht der so angesammelten Segmente mit Fruktose betrug ungefähr 2 g, woraus etwa 10 mg stark aktive Fruktose von hoher Reinheit gewonnen werden konnten.

A. S. Keston, S. Udenfriend und M. Levy<sup>26)</sup> haben ferner durch Kombination von  $^{131}\text{J}$  und  $^{35}\text{S}$  Aminosäuren bestimmt. Die Aminosäuren, z. B. in Eiweißhydrolysaten wurden in  $^{131}\text{J}$  enthaltende p-Jodbenzolsulfonyl-Derivate übergeführt. Darauf wur-

<sup>16)</sup> R. M. Lemmon, W. Tarpey u. K. G. Scott, „Paper chromatography in synthetic organic chemistry. Microgram scale synthesis of labeled monoiodotyrosine, diiodotyrosine, and thyroxine“. *J. Amer. Chem. Soc.* 72, 758 [1950].

<sup>17)</sup> R. M. Tomarelli u. K. Florey, „Use of papergrams in the study of the urinary excretion of radioactive S compounds“. *Science [New York]* 107, 630 [1948].

<sup>18)</sup> J. C. Bourns, „A radioactivity „scanning“ device for paperchromatograms using  $^{32}\text{P}$ -phosphorus“. *Nature [London]* 165, 399 [1950].

<sup>19)</sup> J. P. Hummel u. O. Lindberg, „Studies of the mechanism of aerobic phosphorylation“. *J. biol. Chemistry* 180, 1 [1949]; O. Lindberg u. J. P. Hummel, „The measurement of radioactivity from paper chromatograms“. *Arkiv för Kemi I*, 17 [1949].

<sup>20)</sup> L. Tordai, „Radiochemical methods in inorganic analysis“. *Atomsics [London]* 1, 104 [1949].

<sup>21)</sup> F. Cramer, diese *Ztschr.* 62, 73 [1950].

<sup>22)</sup> M. Calvin, C. Heidelberger, J. C. Reid, B. M. Talbert u. P. C. Yankwich: „Isotopic carbon“, New York und London, 1949.

<sup>23)</sup> M. Calvin u. A. A. Benson, „The path of carbon in photosynthesis. II. The identity and sequence of the intermediates in sucrose synthesis“. *Science [New York]* 108, 140 [1949].

<sup>24)</sup> A. A. Benson, J. A. Bassham, M. Calvin, T. C. Goodale, V. A. Haas u. W. Stepka, „The path of carbon in photosynthesis. V. Paperchromatography and radioautography of the products“, *J. Amer. Chem. Soc.* 72, 1710 [1950]; s. a. W. Stepka, A. A. Benson u. M. Calvin, „The path of carbon in photosynthesis. II. Amino acids“. *Science [New York]* 108, 304 [1948].

<sup>25)</sup> S. Udenfriend u. M. Gibbs, „Preparation of C 14 uniformly labeled fructose by means of photosynthesis and paper chromatography“. *Science [New York]* 110, 708 [1949].

<sup>26)</sup> A. S. Keston, S. Udenfriend u. M. Levy, „Determination of organic compounds as isotopic derivatives. II. Amino acids by paperchromatography and indicator techniques“. *J. Amer. Chem. Soc.* 72, 748 [1950]; „I. Estimation of amino acids by the carrier technique“, ebenda 71, 249 [1949].

den  $^{35}\text{S}$ -haltige p-Jodbenzilsulfonyl-Derivate bekannter Aminosäuren zugesetzt. Nach papierchromatographischer Trennung wurden unter Verwendung von  $^{35}\text{S}$ -Strahlung-absorbierenden Filtern zwei Radioautogramme aufgenommen und die Intensität und das Isotopenverhältnis der lokalisierten Chromatogrammbanden bestimmt.

1950 diskutierten *Udenfriend* und Mitarbb.<sup>26)</sup> die Prinzipien ihres Isotopenverfahrens. Insbes. verglichen sie es mit der Isotopen-Verdünnungsmethode und beschrieben die qualitative und quantitative Bestimmung einzelner Aminosäuren und die hierbei verwendete Indikatorentechnik. Die Autoradiochromatographie wurde im wesentlichen zur Zonenbestimmung benutzt. Die Papierchromatographie wurde zur Trennung der mit  $^{131}\text{J}$  indizierten Derivate von Proteinhydrolysaten benutzt. Die Radioautographie wurde aber auch benutzt, um zu kontrollieren, ob das Verteilungsverhältnis von  $^{131}\text{J}$  und  $^{35}\text{S}$  in den aufeinander folgenden Zonen eines Chromatogrammes konstant ist, was für die Reinheitsermittlung wesentlich ist.

Für derartige Feststellungen der Isotopenverteilung wurde ein „Sandwich“ zusammengestellt. Er besteht aus zwei empfindlichen Filmen, einem geeigneten Strahlenfilter und dem Radiochromatogramm. Das Filter wurde auf einer Seite des Chromatogrammes angelegt, um vom  $^{35}\text{S}$  ausgehende Strahlen zu absorbieren, während es von  $^{131}\text{J}$  ausgehende Strahlen im wesentlichen durchließ. Zeigt nun, um ein Beispiel zu geben, eine Zone des unmittelbar an das Radiochromatogramm gelegten Filmes keine Einwirkung von  $^{131}\text{J}$ , so kann man annehmen, daß  $^{131}\text{J}$  in dieser Zone gar nicht vorhanden ist. Es wurde der autoradiographische Effekt der einzelnen Strahlenarten auf durch Filter geschützte und auf ungeschützte Emulsionen gezeigt und erklärt, wie solche autoradiographischen Reaktionen zur qualitativen Bestimmung einzelner Aminosäuren benutzt werden können. Soweit photographische Emulsionen in Frage kommen, mag noch bemerkt werden, daß entweder Eastman Kodak „Industrial X-Ray Film K“ verwendet wurde, mit dem sich je nach dem Alter der  $^{131}\text{J}$ - und  $^{35}\text{S}$ -Produkte brauchbare Bilder mit einer Exponierung von 1 bis 4 h erzielen ließen, oder es wurde Eastman Kodak „Blue Brand X-Ray Film“ gewählt, falls keine so kurze Exponierungszeit notwendig war.

Da *Udenfriend* und Mitarbb. die Autoradiographie aber im wesentlichen zur Zonenfeststellung und nur bei Benutzung von Strahlenfiltern zu qualitativen Bestimmungen benutztten, spielen die Eigenschaften der Emulsionen keine sehr wesentliche Rolle, und die Exponierungszeiten schwanken stark.

*Th. Wieland*<sup>27)</sup> hat ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von  $\alpha$ -Aminosäuren in Papierchromatogrammen und Ionopherogrammen entwickelt, die radioaktives Kupfer enthalten. Die verhältnismäßig kurze Halbwert von nur 12,8 Stunden des im Cyclotron hergestellten radioaktiven Kupfers scheint die Herstellung scharfer Autoradiogramme mit den üblichen Röntgenfilmen zu erschweren, und ein besser geeignetes Material wäre hierfür wohl erwünscht.

Radiometrische Messungen eines Penicillin-Chromatogrammes beschrieben *E. Lester Smith* und *D. Allison*<sup>27a)</sup>. Ein Gemisch aus verschiedenen Penicillinen wurde papierchromatographisch nach der Methode von *Goodall* und *Levi* zerlegt, und die Lage der mit  $^{35}\text{S}$  indizierten Penicillin-Konzentrate im Chromatogramm in üblicher Weise autoradiochromatographisch auf Röntgenfilmen festgestellt. Die Ergebnisse stimmten gut mit biologischen Feststellungen überein.

### Autoradiochromatographie sehr weicher Strahlung

Ein Hauptproblem der Autoradiographie sind sehr weiche Strahlen, die die Herstellung eines engen Kontaktes zwischen Strahlenquelle und photographischer Emulsion erfordern. Schon ein geringfügiger Luftzwischenraum vermag in solchen Fällen einen erheblichen Verlust an Strahlen zu verursachen, so daß selbst die Ermittlung von Konzentrationszonen im Chromatogramm unmöglich werden kann. Andererseits muß eine mechanische Schädigung eines latenten Bildes durch unsachgemäßes Zusammenpressen vermieden werden. Ferner sind unerwünschte chemische Reaktionen zwischen Objekt und Emulsion zu verhindern. Chemische Reaktionen lassen sich evtl. durch Auflegen eines photographischen Schutzlackes, etwa wie im britischen Patent No. 548391<sup>28)</sup> beschrieben, aber ohne Zusatz von Zink-

<sup>27)</sup> *T. Wieland, K. Schmeisser, E. Fischer u. H. Maier-Leibnitz*, Naturwiss. 36, 280 [1949].

<sup>27a)</sup> *P. W. Winteringham*: Radiochemical techniques in analysis, Nature [London] 168, 153 [1951].

<sup>28)</sup> *R. Müller u. H. Weil*, „Verbesserte Lacke“. Brit. P. 548391.

stearat, verhindern. Man kann auch eine geeignete Zwischenschicht einlegen, die aber nicht die Strahlen merklich schwächen darf. Kontaktprozesse ermöglichen ein photographisches Entwickeln des latenten Bildes ohne vorherige Trennung des abzubildenden Gegenstandes und der photographischen Emulsion. Es werden aber auch Verfahren ausgearbeitet, die eine nachträgliche Wiedertrennung gestatten, etwa um chemische Teste zu Vergleichszwecken durchführen zu können. Keines dieser Verfahren scheint aber bisher in der autoradiochromatographischen Praxis Anwendung gefunden zu haben. Dies ist u. a. wohl darauf zurückzuführen, daß Autoradiochromatographie, wie oben gezeigt, im wesentlichen nur zur Feststellung der Lage von Zonen des Chromatogrammes angewendet wurde, wozu einfache photographische Hilfsmittel ausreichen.

Abgesehen von Fortschritten, in der Verbesserung des Kontaktes ist die Einführung von Kernemulsionen und ihre Auswertung als quantitative Zählmethode zu erwähnen.

Nach dem Entwickeln einer exponierten Emulsionsschicht liegt ein Bild wechselnder Schwärzung vor, das mehr oder weniger zutreffende quantitative Schätzungen der radioaktiven Substanzen zuläßt. Die Silberkörner lassen sich unter dem Mikroskop zählen<sup>29)</sup>, aber die gewöhnlich eintretende Verschleierung des Hintergrundes erschwert die quantitative Auswertung. So weit Versuche zu mengenmäßigen Bestimmungen in der Autoradiochromatographie bisher unternommen wurden, beschränkten sie sich auf photometrische Intensitätsbestimmungen, die nur eine verhältnismäßig willkürliche Schätzung des Grades der Konzentration radioaktiver Substanzen in den betreffenden Zonen des Chromatogrammes zuließen.

Einen aussichtsreicheren Weg scheint die Kernspurbahn-Bestimmungsmethode zu bieten. Die dabei benutzten Emulsionen sind besonders feinkörnig und werden in einer dickeren Schicht als bei Röntgenfilmen und -Platten aufgetragen. Ihre Empfindlichkeit ist sehr groß. Hinsichtlich der Einzelheiten solcher Kernemulsionen und ihrer Anwendung muß auf Arbeiten von *Aitchison*<sup>30)</sup>, *Herz*<sup>31)</sup>, *Schopper*<sup>32)</sup> und *P. Meyer*<sup>33)</sup> hingewiesen werden. Abgesehen von der Möglichkeit der Bahnspurzählung ermöglicht die Verwendung einer geeigneten Kernemulsion, wie sie heute standardisiert erhältlich sind, die Exponierungszeit denkbar kurz zu halten. Einzelheiten über die Verwendung zur Autoradiographie s.<sup>34)</sup>. Der Haupteinwand gegen eine Verwendung der Bahnspurmethode in der Autoradiochromatographie besteht darin, daß nur eine relativ niedrige Zahl von Bahnspuren je Emulsionseinheit, die ihrerseits wieder stark von den Einzelheiten des im einzelnen Falle verwendeten Verfahrens abhängt, mit Sicherheit identifiziert und gezählt werden kann. Wenn auch die Radioaktivität innerhalb der Zonen des Radiochromatogrammes niedrig gehalten werden kann, wäre doch eine nicht zu niedrige Radioaktivität im Interesse der Exaktheit der quantitativen Zählung zu begründen. Eine prinzipielle Änderung der photographischen Technik, die zur Zeit erwogen und über die an anderer Stelle berichtet werden wird, mag eine gewisse Erhöhung der Zahl der je Emulsionseinheit erfaßbaren Bahnspuren ermöglichen. Jedenfalls erscheint die quantitative Ermittlung mittels Spurbahnzählungen in der Autoradiochromatographie aussichtsreich.

Eingeg. am 12. Mai 1951

[A 375]

<sup>29)</sup> *I. Doniach u. S. R. Pelc*, „Autoradiograph technique“. Brit. J. Radiology 23, 184 [1950].

<sup>30)</sup> *P. M. Aitchison*, „The photographic emulsion technique in nuclear research“, Australian J. Sci. 12, 57 [1949].

<sup>31)</sup> *R. M. Herz*, Med. Radiography Photography 26, 46, 51, 84 [1950]; Physic. Rev. 75, 478 [1949]; Nature [London] 161, 928 [1948].

<sup>32)</sup> *E. Schopper*, Physikal. Blätter, 6, 112 [1950].

<sup>33)</sup> *P. Meyer*, Naturwiss. 12, 369 [1948].

<sup>34)</sup> *G. A. Boyd u. H. Levi*, „Carbon Beta track autoradiography“. Science [New York] 111, 58 [1950]; *G. Hevesey u. H. Levi*, „The action of neutrons on the rare earth elements“. Kgl. Danske Videnskab Math. Fysik. Meddelse 14, 5, 15 [1936]; *G. A. Boyd u. A. I. Williams*, „Striping film technique for histological autoradiographs“. Exper. Biol. Med. 69, 225 [1948]; *G. A. Boyd, G. W. Cassaret, K. I. Altman, T. R. Noonan u. K. I. Solomon*, „Autoradiography of 14 C incorporated in individual blood cells“. Science [New York] 108, 529 [1948]; *G. A. Boyd u. F. A. Board*, „A preliminary report on histochromography“. Science [New York] 110, 586 [1949]; *J. Harris, J. F. Sloane u. D. T. King*, „New techniques in autoradiography“. Nature [London] 166, 25 [1950]; *D. T. King, J. E. Harris u. S. Tkaczyk*, „Liquid emulsion methods in electron track radiography“. Nature [London] 167, 273 [1951]; *D. Campbell*, „Track autoradiography with iron<sup>59</sup> and sulphur<sup>35</sup> with quantitative evaluation“. Nature [London] 167, 274 [1951]; *M. Blundell u. J. Rotblatt*, „Use of liquid nuclear research emulsion in track autoradiography“. Nature [London] 167, 645 [1951].