

## Das Arbeiten mit Tritium in der organischen Chemie und Biochemie

Von Priv.-Doz. Dr. H. SIMON

Organisch-Chemisches Institut der Technischen Hochschule München

Tritium nimmt infolge seiner weichen Strahlung, seiner großen Isotopeneffekte und seiner relativ geringen Kosten unter den radioaktiven Isotopen eine Sonderstellung ein. Daraus ergeben sich besondere Möglichkeiten und Grenzen des Arbeitens mit Tritium. Die klassische Markierung durch chemische Synthese ist trotz der Entwicklungen auf dem Gebiet der Direktmarkierung noch von Interesse. In der Analytik tritiumhaltiger Verbindungen wurden Fortschritte erzielt. Das hohe Auflösungsvermögen bei der Autoradiographie von Tritium macht dieses Isotop vor allem auch für biochemische Untersuchungen interessant (Einblick in zelluläre und subzelluläre Räume).

### Einleitung

Obwohl dem Element Wasserstoff in allen Gebieten der Chemie eine große Bedeutung zukommt, wurde der radioaktive Wasserstoff, das Tritium ( $^3\text{H}$  oder T), bis vor relativ kurzer Zeit selten benutzt. In den letzten Jahren jedoch hat Tritium in der organischen Chemie und ganz besonders in der Biochemie große Bedeutung erlangt.

Tritium nimmt unter allen radioaktiven Nukliden eine Sonderstellung ein. Diese ist dadurch bedingt, daß die üblichen Voraussetzungen beim Arbeiten mit radioaktiven Isotopen (leichte Nachweisbarkeit; Gleichheit des chemischen Verhaltens von radioaktivem Tracer und stabilem Element) beim Tritium in beträchtlichem Maße nicht erfüllt sind:

1. Die  $\beta$ -Strahlung des Tritiums ist mit einer maximalen Energie von 0,018 MeV so gering, daß sie sich mit den einfachsten Strahlungsdetektoren, den Endfensterzählrohren, nicht nachweisen läßt. Durch methodische Fortschritte macht die genaue und empfindliche Messung von Tritium heute aber keine Schwierigkeiten mehr<sup>1-3)</sup>.

2. Durch den großen prozentualen Massenunterschied von H und T ist die Nullpunktsenergie einer X–T-Bindung wesentlich kleiner als die einer X–H-Bindung. Dies bedingt große inter- und intramolekulare Isotopeneffekte.

3. Wasserstoff und seine Isotope, die an Sauerstoff, Stickstoff oder Schwefel gebunden sind, tauschen in Lösung meist sehr rasch bis zur Gleichverteilung miteinander aus. Auch einige C–H-Bindungen sind unter gewissen Umständen nicht stabil. Hinzu kommen drei weitere Besonderheiten:

4. Tritium ist außerordentlich billig ( $^{14}\text{C}$  ist 100- bis 1000-mal teurer).

5. Auch kompliziertere organische Verbindungen lassen sich relativ leicht markieren, während die Darstellung komplizierterer  $^{14}\text{C}$ -markierter Substanzen immer einen großen Aufwand erfordert.

6. Bei der Tritium-Markierung können sehr hohe spezifische Aktivitäten erhalten werden.

Da die meisten organischen Verbindungen nur aus den Elementen C, H, O und N bestehen, kommen für ihre Markierung mit einem radioaktiven Isotop nur  $^{14}\text{C}$  oder Tritium in Frage. Die radioaktiven Nuklide des Stickstoffs und Sauerstoffs haben viel zu kurze Halbwertszeiten, und daselbe gilt für die anderen radioaktiven Isotope des Kohlenstoffs. T-markierte Substanzen zersetzen sich wesentlich weniger durch Eigenstrahlung als  $^{14}\text{C}$ -markierte Substanzen. Hat man eine im Vergleich zur Reichweite der Strahlung in der Probe große Menge an markierter Verbindung, so läßt sich die aufgenommene Dosis leicht angeben:

$$\text{Dosis} = \frac{N\bar{E} (1,6 \cdot 10^{-12} \text{ erg/eV})}{100 \cdot W} \quad [\text{rad}]$$

N = Zahl der Kernzerfälle

$\bar{E}$  = mittlere Energie der Strahlung in eV

W = Gewicht der Probe

1 rad = 100 erg/g

Während eine  $^{14}\text{C}$ -markierte Substanz mit einem mittleren G-Wert\*) von 8 und einer Aktivität von 100  $\mu\text{C}/\text{mg}$  sich zu etwa 8–10% pro Jahr zersetzt, wird dies für eine ebenso aktive T-markierte Substanz nur zu etwa 1% der Fall sein<sup>3a)</sup>.

Bei der Messung von  $^{14}\text{C}$  und Tritium in Proportionalgaszählrohren verhalten sich die Zählausbeuten  $^{14}\text{C}$ :T etwa wie 1,4:1. Bei T-markierten Substanzen hat man im Vergleich zu solchen mit  $^{14}\text{C}$ -Markierung eine 7-fach höhere spezifische Zählrate bei gleicher Strahlenbelastung.

\*) G-Wert = Zahl der pro 100 eV absorbierten Energie umgesetzten Teilchen.

3a) B. M. Tolbert, *Nucleonics* 18, 8, 74 [1960].

1) H. Simon, H. Daniel u. J. F. Klebe, *Angew. Chem.* 71, 303 [1959].

2) H. W. Scharpenseel, *Angew. Chem.* 71, 640 [1959].

3) W. G. Verly: Tritium: Dosage, Préparation de Molécules Marquées et Applications Biologiques, Review Series No. 2, International Atomic Energy Agency, Wien 1960.

## Die Gewinnung T-markierter Substanzen

Die Methoden zur Darstellung T-markierter Verbindungen können in drei Gruppen eingeteilt werden:

### 1. Austauschreaktionen<sup>3-9)</sup>

Hier wie bei den chemischen Synthesen besteht kein Unterschied zwischen Tritium und Deuterium. Daher ist in diesem Fall die Literatur ab 1933 zu berücksichtigen<sup>4)</sup>. Hinsichtlich der Austauschbarkeit von D oder T gegen Wasserstoff können in Abwesenheit von Katalysatoren drei H-Atome-Typen unterschieden werden:

a) Labile Wasserstoff-Atome (an O, N oder S gebunden). Solche H-Atome werden als „auswaschbar“ bezeichnet.

b) Semilabile Wasserstoffatome. Solche liegen z. B. in enolisierbaren Carbonyl-Verbindungen vor.

c) Stabile Wasserstoffatome. Dies sind an C gebundene H-Atome, die nicht in Nachbarschaft zu aktivierenden Gruppen stehen.

Unter dem Einfluß von Katalysatoren, wie Säuren, Basen oder Metallen und Metallverbindungen (Friedel-Crafts-Katalysatoren), können bei erhöhter Temperatur viele Verbindungen mit Wasserstoffisotopen durch Austausch markiert werden. Das Isotop tritt entweder an definierter Stelle in das Molekül ein oder verteilt über das ganze Molekül. Beispielsweise tauscht Benzol mit Schwefelsäure<sup>9)</sup>, Salzsäure-Aluminiumchlorid<sup>10)</sup> sowie mit Wasser und einem Nickelkatalysator<sup>11)</sup> seine H-Atome aus. Auch mit Perchlorsäure wurden in einigen aromatischen Verbindungen H-Atome ausgetauscht<sup>12)</sup>. Da die Austauschreaktionen am Benzol elektrophilen Substitutionen entsprechen, reagieren z. B. Anilin oder Phenole besonders leicht. Unter energiereichen Bedingungen tauscht jedoch z. B. auch p-Nitrobenzoesäure H-Atome aus<sup>12a)</sup>. Es gibt mehrere Arbeiten über den Mechanismus dieser Austauschreaktionen<sup>13-15a)</sup>.

Besonders wichtig und elegant sind die Austauschverfahren in T-haltigem Wasser oder Essigsäure mit Platin- oder Palladium-Katalysatoren oder unter sonstigen Bedingungen. So wurden beispielsweise Kohlenwasserstoffe<sup>16)</sup>, Aminosäuren<sup>7)</sup>, Steroide<sup>17-21)</sup>, Gallensäuren<sup>21)</sup>, Purine, Pyrimidine<sup>22)</sup>, Nucleoside<sup>23-25)</sup>, Fette<sup>26)</sup>, Phenole<sup>27)</sup>, Indol und Indolderivate wie Tryptophan<sup>28)</sup> markiert. Eine allgemein anwendbare Methode zur Darstellung aliphatischer Nitrile mit H-Markierung in  $\alpha$ -Stellung hat Leitch<sup>29)</sup> angegeben. Austauschreaktionen spielen auch in Kombination mit chemischen Reaktionen zur Gewinnung markierter Verbindungen eine große Rolle (siehe nächsten Abschnitt).

Die durch Austausch gewonnenen Verbindungen dürfen nicht kritiklos angewandt werden. Sie müssen sorgfältig gereinigt werden, wozu auch die Entfernung des „auswaschbaren“ Wasserstoffs gehört. Sie dürfen nicht unter Bedingungen verwendet werden, unter denen es zu einem unspezifischen Rücktausch der Markierung kommen kann. Mitunter ist es nötig festzustellen, an welchen Stellen die Markierung eingetreten ist. So wurde kürzlich gefunden, daß im häufig verwendeten T-markierten Thymidin beträchtliche Teile der Tritiumaktivität nicht im Thyminteil lokalisiert sind<sup>30)</sup>. Selbst wenn in einer Verbindung alle H-Atome austauschen, tun sie dies meist in unterschiedlichem Maße. Die durch Austausch erreichbaren Aktivitäten hängen von der Aktivität des Austauschmediums, vom Verhältnis der austauschbaren H-Atome im Austauschmedium und in der austauschenden Verbindung sowie von den Gleichgewichts-Isotopeneffekten ab.

### 2. Chemische Synthese

Trotz der Möglichkeit, durch Austausch und Direktmarkierung (s. nächsten Abschnitt) in viele Verbindungen schnell Tritium einzuführen, kommt der chemischen Synthese T-markierter Verbindungen immer noch Bedeutung zu. Man erhält hohe spezifische Aktivitäten in definierten Positionen, die Reinigung der Produkte ist meist relativ einfach. Häufig wird die chemische Synthese mit Austauschreaktionen kombiniert. Die folgenden Beispiele zeigen, wie einfach markierte Verbindungen erhalten werden können. Die Beispiele gelten für Deuterium und Tritium. HOT bedeutet tritium-haltiges Wasser.

Bei der Hydrierung mit Edelmetall-Katalysatoren besteht häufig die Möglichkeit, daß auch stabile C-H-Bindungen austauschen. Dies wurde beispielsweise bei der Hydrierung von Elaidinsäure

<sup>4)</sup> Es existiert eine umfassende Zusammenstellung der Literatur aller mit Deuterium bis 1945 ausgeführten chemischen und physikalischen Untersuchungen: A. H. Kimball: Bibliography of Research on Heavy Hydrogen Compounds. McGraw-Hill, New York-Toronto-London, 1949. Für die folgenden Jahre wurden Bibliographien vom National Bureau of Standards, Washington, veröffentlicht: L. M. Brown, A. S. Friedman u. C. W. Beckett: A Review of the Properties of Deuterium and Tritium Compounds. NBS-C-562 für die Zeit 1945-52.

<sup>4a)</sup> Proc. Symposium on Tritium in Tracer Applications, sponsored by New England Nuclear Corp., Atomic Associates, Inc., Packard Instrument Co., Inc., New York 1957.

<sup>4b)</sup> Proc. Symposium on Advances in Tracer Applications of Tritium, sponsored by New England Nuclear Corp., Atomic Associates, Inc., Packard Instrument Co., Inc., New York 1958.

<sup>5)</sup> F. Weygand u. H. Simon in Houben-Weyl: Methoden der Organischen Chemie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1955, Bd. IV/2, S. 679-692.

<sup>6)</sup> A. Murray III. u. D. L. Williams: Organic Syntheses with Isotopes. Interscience Publishers, New York, London 1958, Teil II, S. 1259.

<sup>7)</sup> E. H. Graul u. H. Hundeshagen, Atompraxis 5, 154 [1959].

<sup>8)</sup> Y. Sato u. T. Meshi, Annual Report of Tanabe Seiyaku 5, 1 [1960].

<sup>9)</sup> C. K. Ingold, C. G. Raison u. C. L. Wilson, J. chem. Soc. [London] 1936, 915.

<sup>10)</sup> A. Klit u. A. Langseth, Z. physik. Chem. Abt. A 176, 65 [1936].

<sup>11)</sup> P. I. Bowman, W. S. Benedict u. H. S. Taylor, J. Amer. chem. Soc. 57, 960 [1935].

<sup>12)</sup> B. Aliprandi u. F. Cacace, Ann. Chimica 49, 2011 [1959]; 50, 931 [1960].

<sup>12a)</sup> J. E. S. Bradley, Nature [London] 178, 1193 [1956].

<sup>13)</sup> V. Gold, R. W. Lambert u. D. P. N. Satchell, Chem. and Ind. 42, 1312 [1959].

<sup>14)</sup> V. Gold, R. W. Lambert u. D. P. N. Satchell, J. chem. Soc. [London] 1960, 2461; dort auch weitere Literatur.

<sup>15)</sup> A. I. Shatenshtein, J. physik. Chem. (russ.) 34, 594 [1960]; Nucl. Sci. Abstr. 14, 13681 [1960].

<sup>15a)</sup> S. Olsson, Ark. Kemi 14, 85 [1959].

<sup>16)</sup> G. R. Clements u. W. T. Hill, Science [Washington] 125, 603 [1957].

<sup>17)</sup> D. K. Fukushima u. T. F. Gallagher, J. biol. Chemistry 198, 861, 871 [1952].

<sup>18)</sup> D. K. Fukushima, T. H. Kritchevsky, M. L. Eidinoff u. T. F. Gallagher, J. Amer. chem. Soc. 74, 487 [1952].

<sup>19)</sup> E. J. Corey u. G. A. Gregoriou, J. Amer. chem. Soc. 81, 3127 [1959].

<sup>20)</sup> B. Samuelson, J. biol. Chemistry 235, 361 [1960].

<sup>21)</sup> H. Werblin, I. L. Chaikoff u. E. E. Jones, J. biol. Chemistry 234, 282 [1959].

<sup>22)</sup> M. L. Eidinoff u. J. E. Knoll, J. Amer. chem. Soc. 75, 1992 [1953].

<sup>23)</sup> W. L. Hughes: 2. U. N. Int. Conf. on the Peaceful Uses of Atomic Energy, Genf 1958. Verlag United Nations, Genf 1958, Bd. 25, S. 203; W. L. Hughes<sup>4a)</sup>.

<sup>24)</sup> W. G. Verly u. G. Hunnebell, Bull. Soc. chim. Belgique 66, 640 [1957].

<sup>25)</sup> M. L. Eidinoff, L. Cheong u. M. A. Rich, Science [Washington] 129, 1550 [1959].

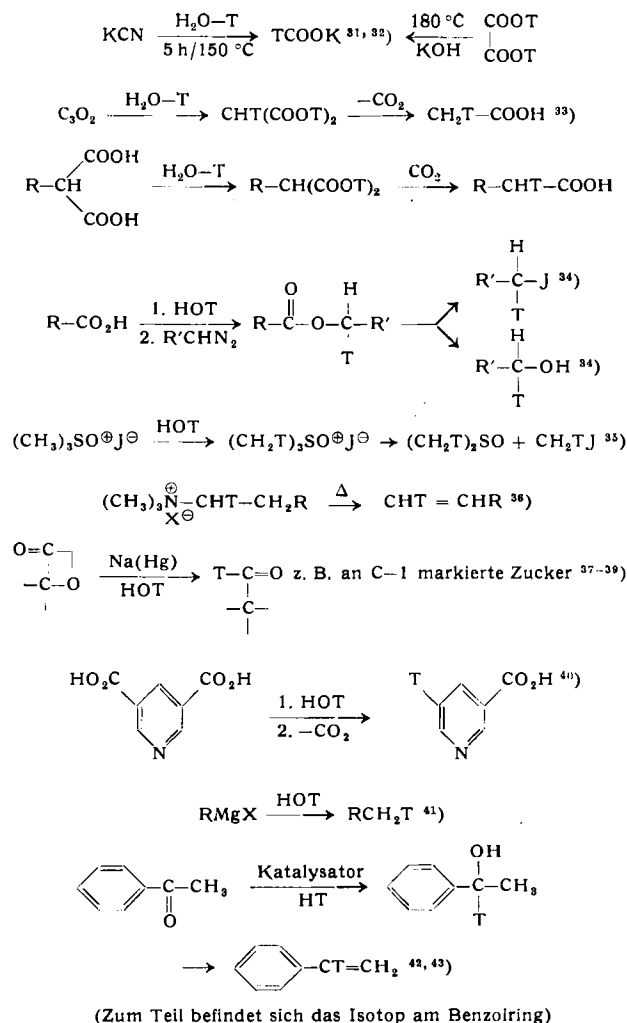
<sup>26)</sup> D. Kritchevsky, R. F. J. McCandless, J. E. Knoll u. M. L. Eidinoff J. Amer. chem. Soc. 77, 6655 [1955].

<sup>27)</sup> H. Schildknecht u. F. Schlegelmilch: IAEA Conference on the Use of Radioisotopes, Kopenhagen 1960. Ref.: Internat. J. appl. Radiat. Isotopes 9, 166 [1960].

<sup>28)</sup> Unveröffentlicht.

<sup>29)</sup> L. C. Leitch, Canad. J. Chem. 35, 345 [1957].

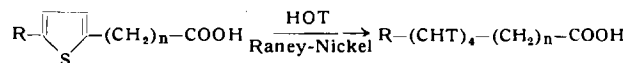
<sup>30)</sup> D. G. Crowter, E. A. Evans u. R. W. Lambert, Chem. and Ind. 1960, 899.



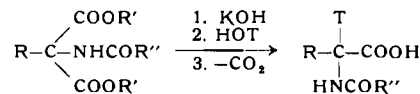
beobachtet<sup>44)</sup>. Hydrierungen eignen sich für Arbeiten im Mikromaßstab<sup>46)</sup>. So wurde zur Darstellung von Hexöstrin ein Apparat benutzt, in dem sich noch 50 µMol hydrieren lassen<sup>46)</sup>. Relativ komplizierte, biochemisch interessante Verbindungen, wie Steroide, sind auf diese Weise leicht zu gewinnen<sup>47-51a)</sup>. Bei der Darstellung von Progesteron und dem daraus biochemisch gewonnenen Corticosteron, Aldosteron und Cortisol wurden spezifische Aktivitäten von 0,76–2,6 mCi/mg erreicht<sup>48)</sup>. Vorteilhaft sind Reduk-

tionen mit T-markierten Metallhydriden<sup>51b-53)</sup>, da es hierbei nicht zu Austauschreaktionen kommt. Kürzlich wurde die Synthese von Glucose-(6-T) und vieler anderer Zucker und Zuckeralkohole durch Reduktion eines Glucuronsäure-Derivates mit T-markiertem Natriumborhydrid beschrieben<sup>54-56)</sup>. Durch Addition von Dialkylaluminiumhydrid bzw. -deuterid an CC-Dreifach- bzw. -Doppelbindungen und Hydrolyse bzw. Deuterolyse der entstehenden Aluminium-organischen Verbindungen werden Kohlenwasserstoffe hergestellt, die an bestimmten C-Atomen durch Wasserstoff-Isotope substituiert sind<sup>56)</sup>.

Koller und Zollinger<sup>56)</sup> beschrieben die Darstellung deuterierter Naphthalin-Derivate. T-markierte höhere Fettsäuren können bequem aus Thiophen-carbonsäuren mit Raney-Nickel in tritiumhaltigem Wasser erhalten werden<sup>57, 58)</sup>:



Dabei kann auch R = H und n = 0 sein. Geht man von β-(2-Thienyl)-acrylsäuren aus, so erhält man Fettsäuren, die an acht C-Atomen markiert sind. Eine allgemeine Methode zur Darstellung T-markierter Aminosäuren dürfte die für Tyrosin, 3,5-Dijodtyrosin, Thyrosin<sup>59)</sup> und Valin<sup>59a)</sup> angegebene Azlacton-Methode sein. Dabei wird das Kondensationsprodukt aus N-Acylglycin und einem Aldehyd hydriert. Eine andere Möglichkeit, zu T-markierten Aminosäuren zu kommen, besteht in der Hydrierung der Oxime der entsprechenden Ketosäuren, wie beim D-L-Alanin gezeigt wurde<sup>60)</sup>. Ein elegantes Verfahren hat Arnstein angegeben<sup>60a)</sup>: bei vielen Aminosäure-Synthesen ist ein substituierter Acylaminomalonesther Zwischenprodukt. Auf folgende Weise kann man von dort zu einer T-haltigen Aminosäure kommen:



Die reversible Addition von Sulfid an CC-Doppelbindungen in Gegenwart von HOT sollte viele Verbindungen, die T an der Doppelbindung tragen, zugänglich machen. Dieser Weg scheint bis jetzt nur bei der Darstellung von Methyl-naphthochinon-(3-T)<sup>61)</sup> und tritierter Zimtsäure<sup>62)</sup> beschritten worden zu sein.

### 3. Direktmarkierung nach Wilzbach und durch Rückstoßtritionen

Bei den Methoden der Direktmarkierung organischer Substanzen mit Tritium, kann man drei Gruppen unterscheiden<sup>63)</sup>:

1. Markierung mit beschleunigten Ionen,
2. Markierung durch Ionisierung und sonstige Anregung und
3. Markierung durch Anregung allein.

<sup>51b)</sup> W. G. Brown, L. Kaplan u. K. E. Wilzbach, J. Amer. chem. Soc. 74, 1343 [1952]; K. E. Wilzbach u. L. Kaplan, ebenda 72, 5795 [1950].

<sup>52)</sup> L. Kaplan, J. Amer. chem. Soc. 77, 5469 [1955].

<sup>53)</sup> H. S. Isbell u. J. D. Moyer, J. Res. nat. Bur. Standards 63A, 177 [1959].

<sup>54)</sup> G. Moss, Arch. Biochem. Biophysics 90, 111 [1960].

<sup>55a)</sup> H. S. Isbell, H. L. Frush u. J. D. Moyer, J. Res. Nat. Bur. Standards 64A, 359 [1960].

<sup>55b)</sup> H. S. Isbell, H. L. Frush u. N. B. Holt, J. Res. Nat. Bur. Standards 64A, 363 [1960].

<sup>56)</sup> H. L. Frush, H. S. Isbell u. A. J. Fatiadi, J. Res. Nat. Bur. Standards 64A, 433 [1960].

<sup>57)</sup> G. Wilke u. H. Müller, Liebigs Ann. Chem. 618, 267 [1958].

<sup>58)</sup> E. J. Koller u. H. Zollinger, Helv. chim. Acta 39, 1610 [1956].

<sup>59)</sup> N. P. Buu-Hoi, Nature [London] 180, 385 [1957].

<sup>59a)</sup> N. P. Buu-Hoi u. N. D. Xuong: 2. U. N. Int. Conf. on the Peaceful Uses of Atomic Energy, Genf 1958. United Nations, Genf 1958, Bd. 25, S. 223.

<sup>60)</sup> J. R. Tata u. A. D. Brownstone, Nature [London] 185, 34 [1960].

<sup>60a)</sup> J. C. Crawhall u. D. G. Smyth, Biochem. J. 69, 280 [1958].

<sup>61)</sup> Y. Sato, T. Meshi, T. Takahashi u. N. Sugimoto, J. Pharm. Chem. [Japan] 32, 317 [1959].

<sup>62)</sup> H. R. V. Arnstein u. J. C. Crawhall, Biochem. J. 67, 180 [1957].

<sup>63)</sup> D. H. Murrian, J. chem. Soc. [London] 1957, 499.

<sup>64)</sup> H. Simon, unveröffentlicht.

<sup>65)</sup> N. A. Ghanem u. T. Westermarck: IAEA Conference on the Use of Radioisotopes Kopenhagen, Sept. 1960. Ref.: Internat. J. appl. Radiat. Isotopes 9, 181 [1960].

<sup>31)</sup> R. C. Herman u. V. Z. Williams, J. chem. Physics 8, 447 [1940]; J. R. Rachele, E. J. Kuchinskas, J. E. Knoll u. M. L. Eidinoff, Arch. Biochem. Biophys. 81, 55 [1959].

<sup>32)</sup> Analog: D. G. Grant u. H. S. Turner, Nature [London] 165, 153 [1950].

<sup>33)</sup> C. L. Wilson, J. chem. Soc. [London] 1935, 492.

<sup>34)</sup> H. Simon u. D. Palm, Chem. Ber. 92, 2701 [1959].

<sup>35)</sup> F. A. Cotton, J. H. Fassnacht, W. D. Horrocks u. N. A. Nelson, J. chem. Soc. [London] 1959, 4138.

<sup>36)</sup> F. Weygand, H. Daniel u. H. Simon, Chem. Ber. 91, 1691 [1958]; H. Simon u. G. Mühlhofer, unveröffentlicht.

<sup>37)</sup> F. Weygand, H. Simon u. J. F. Klebe, Chem. Ber. 91, 1567 [1958].

<sup>38)</sup> M. Stacey, R. H. Moore, S. A. Barker, H. Weigel, E. J. Bourne u. D. H. Whiffen: 2. U. N. Int. Conf. on the Peaceful Uses of Atomic Energy, Genf 1958. United Nations, Genf 1958, Bd. 20, S. 251.

<sup>39)</sup> H. S. Isbell, H. L. Frush, N. B. Holt u. J. D. Moyer, J. Res. nat. Bur. Standards 64A, 177 [1960].

<sup>40)</sup> H. Simon u. K. D. Keil, unveröffentlicht.

<sup>41)</sup> J. Turkevich, L. Friedmann, E. Solomon u. F. M. Wrightson, J. Amer. chem. Soc. 70, 2638 [1948].

<sup>42)</sup> I. A. Bernstein, W. Bennett u. M. Fields, J. Amer. chem. Soc. 74, 5763 [1952].

<sup>43)</sup> W. H. Pearlman, Biochem. J. 66, 17 [1957]; 70, 230 [1958].

<sup>44)</sup> R. F. Glascock u. L. R. Reins, Biochem. J. 62, 529 [1955].

<sup>45)</sup> S. Bergström u. S. Lindstedt, Acta chem. scand. 11, 1275 [1957].

<sup>46)</sup> R. F. Glascock u. G. S. Pope, Biochem. J. 75, 328 [1960].

<sup>47)</sup> I. D. Frantz jr., A. G. Davidson, E. Dulit u. M. L. Mobberley, J. biol. Chemistry 234, 2290 [1959].

<sup>48)</sup> P. J. Ayres, W. H. Pearlman, J. F. Tait u. S. A. S. Tait, Biochem. J. 70, 230 [1958].

<sup>49)</sup> R. F. Glascock u. W. G. Hoekstra, Biochem. J. 72, 673 [1959].

<sup>50)</sup> W. H. Pearlman, Biochem. J. 66, 17 [1957].

<sup>51)</sup> V. J. O'Donnell u. W. Pearlman, Biochem. J. 69, 38p [1958].

<sup>51a)</sup> M. Gut u. M. Uskoković, Naturwissenschaften 47, 40 [1960].

Insbesondere die Markierungsmethode nach *Wilzbach*<sup>64)</sup> hat inzwischen eine weitverbreitete Anwendung gefunden. Da in dieser Zeitschrift bereits über ihr Prinzip berichtet wurde<sup>2, 65, 66)</sup>, sollen hier nur die neueste Entwicklung erwähnt und die Anwendungsmöglichkeiten sowie Erfahrungen mit Reinigungsmethoden und Reinheitskriterien besprochen werden.

Die Tritierung nach *Wilzbach* war bislang dadurch eingeschränkt, daß Curiemengen von Tritium notwendig waren, um in vernünftiger Zeit befriedigende spezifische Aktivitäten zu erhalten. Man mußte also über eine besondere Ausrüstung verfügen, um so hohe Aktivitäten sicher handhaben zu können.

Das Bestreben war, die hohen Tritiumaktivitäten zu verkleinern, indem man dem Ansatz aus Tritium und der zu markierenden Substanz zusätzliche Energie zuführte<sup>63, 66 a)</sup>. Die ersten Versuche stammten von *Lemmon* und Mitarbeitern<sup>66 b)</sup>. Später berichteten *Dorfman* und *Wilzbach*<sup>66 c)</sup> und andere<sup>67)</sup> über die erfolgreiche Anwendung von elektrischen Entladungen bei einem Tritiumdruck von 5 bis 20 Torr. Die Entladungen wurden mit einer einfachen Teslaspule erzeugt, wie sie verwendet wird, um Undichtigkeiten in Vakuumsystemen aufzufinden. Unter diesen Bedingungen braucht man wesentlich weniger Tritium, und die Einwirkungszeit des Tritiums wird von Tagen auf Minuten reduziert. Allerdings scheinen Nebenprodukte in höherem Maße zu entstehen<sup>64)</sup>. Besonders versprechend sind systematische Versuche von *Westermarck* und Mitarbeitern<sup>63, 68)</sup> mit verschiedenen Energieformen. Dabei wird nicht die zu markierende Substanz, sondern nur das Tritium ins Energiefeld gebracht, um die Bildung von Zersetzungsprodukten zu vermeiden. Es wurde auch über den günstigen Effekt von Edelgasbeimischungen zum Tritium berichtet<sup>69)</sup>.

Die nachfolgende Aufzählung von Verbindungen, die nach *Wilzbach* markiert wurden, soll zeigen, daß diese Methode für fast alle Substanzklassen der organischen Chemie und besonders für komplizierte Systeme von biochemischem Interesse brauchbar ist. Häufig erfordert allerdings die Reinigung der Produkte einen beträchtlichen Arbeitsaufwand.

Nach *Wilzbach* wurden u. a. markiert: Methan<sup>70)</sup>, n-Hexan<sup>69)</sup>, n-Heptan, Benzol<sup>65)</sup>, Toluol<sup>68, 71)</sup>, Naphthalin<sup>64)</sup>, Mineralöl<sup>67)</sup>, p-Dichlorbenzol<sup>64)</sup>, Benzoesäure<sup>64, 71)</sup>, Anisol, Nitrobenzol<sup>72)</sup>, p-Amino-salicylsäure<sup>73)</sup>, Purine und Pyrimidine<sup>74)</sup>, trans-Stilben<sup>75)</sup>, Palmitinsäure<sup>67)</sup>, Gibberellinsäure<sup>76)</sup>, Vitamin B<sub>12</sub><sup>76, 77)</sup>, Rohrzucker<sup>71)</sup>, Tetraacetyl-D-ribose<sup>78)</sup>, Cholesterin<sup>64, 71, 79)</sup>, 17- $\alpha$ -Hy-

droxy-pregnenolon<sup>80)</sup>,  $\beta$ -Sitosterin<sup>81)</sup>, Triamecinolon (ein fluor-haltiges synthetisches Corticosteroid)<sup>82)</sup>, Morphin<sup>83)</sup>, Proteine und Enzyme<sup>63, 84–86a)</sup>, Dextran<sup>87)</sup>, Polyäthylenglykol<sup>63)</sup>, Polystyrol<sup>63)</sup>, Desoxyribonucleinsäure<sup>88)</sup>.

Die erhaltenen spezifischen Aktivitäten schwanken in weiten Grenzen. Der durchschnittliche Wert dürfte bei 0,5–5 in C/g liegen. Die in der Literatur angegebenen Werte müssen teilweise mit großer Vorsicht betrachtet werden, wenn nicht jeweils mehrere Reinigungsoperationen angewendet wurden. Chemische Reinheitskriterien wie Schmelz- oder Siedepunkte bzw. Elementaranalysen sind ohne Beweiskraft, da winzige Substanzmengen beträchtliche Anteile der Gesamtradioaktivität ausmachen können. Bei der *Wilzbach*-Markierung von Morphin waren 65–70% der Gesamtradioaktivität in einer zu weniger als 1% vorhandenen Verunreinigung enthalten. Es handelte sich um Dihydromorphin, dessen papierchromatographische Abtrennung nur unter speziellen Bedingungen gelang<sup>83)</sup>. Auch bei der Darstellung von  $\beta$ -Sitosterin ergaben sich ähnliche Verhältnisse. Dagegen trat bei der Markierung durch katalysierten Austausch nur eine vernachlässigbare Reduktion der Doppelbindung ein<sup>81)</sup>.

Besonders kritisch ist die Addition von T an CC-Doppelbindungen: Ölsäure, Linol- und Linolensäure sowie Vitamin-A-acetat lieferten nur Additionsprodukte<sup>89, 90)</sup>. Bei der Markierung von Cyclohexen wurden 84% Addition und 16% Substitution festgestellt<sup>89)</sup>. Beim Cholesterin waren die entsprechenden Zahlen 45% und 55%<sup>89)</sup>. Neben der Addition von H bzw. T kann es zu Isomerisierungen, Polymerisationen, Dehydrogenierungen u. a. kommen. Die so entstehenden Verunreinigungen unterscheiden sich in ihren physikalischen und chemischen Eigenschaften häufig nur wenig vom Hauptprodukt. Wird z. B. n-Hexan nach *Wilzbach* markiert, so werden fast alle möglichen Kohlenwasserstoffe bis C<sub>8</sub> gebildet<sup>71)</sup>. Zwar hat man schon sehr viele Substanzen nach *Wilzbach* markiert, aber die vollständige Beschreibung von Reinigungsoperationen ist relativ selten. Welcher Aufwand für die Reinigung notwendig sein kann, zeigen Arbeiten von *Florini*<sup>82)</sup>, *Solomon* und Mitarbeiter<sup>80)</sup>, v. *Holt*<sup>86)</sup>, sowie *Jackson* und Mitarbeiter<sup>67)</sup>. Während für die Reinheitsprüfung bzw. Reinigung flüchtiger Substanzen die Gaschromatographie<sup>71, 90–92)</sup> geeignet ist, müssen für nichtflüchtige Substanzen papier- oder säulenchromatographische Verfahren herangezogen werden. Die Nachweisempfindlichkeit T-markierter Substanzen auf Papierchromatogrammen ist nicht besonders groß (s. unten). Als Reinheitskriterium ist besonders der einfach auszuführende Test auf konstante Löslichkeit empfehlenswert<sup>67, 93, 94)</sup>.

<sup>80)</sup> S. Solomon, A. C. Carten u. S. Lieberman, J. biol. Chemistry 235, 351 [1960].

<sup>81)</sup> H. Werblin, I. L. Chaikoff u. M. R. Imada, Arch. Biochem. Biophysics 89, 213 [1960].

<sup>82)</sup> J. R. Florini, J. biol. Chemistry 235, 367 [1960].

<sup>83)</sup> A. L. Misra u. L. A. Woods, Nature [London] 185, 304 [1960].

<sup>84)</sup> J. Pany, Naturwissenschaften 46, 515 [1959].

<sup>85)</sup> D. Steinberg, M. Vaughan, C. B. Anfinsen u. J. Gorry, Science [Washington] 126, 447 [1957].

<sup>86)</sup> C. v. Holt, J. Voelker u. L. v. Holt, Biochim. biophysica Acta 38, 88 [1960]; vgl. Angew. Chem. 72, 356 [1960].

<sup>86a)</sup> C. T. O. Fong, J. L. Schwartz, E. A. Ppoenoe, L. Silver u. M. A. Schoessler, J. Amer. chem. Soc. 81, 2592 [1959].

<sup>87)</sup> A. Hanngren, E. Hansson, S. Ullberg u. B. Åberg, Nature [London] 184, 373 [1959].

<sup>88)</sup> E. Bosenfreund, H. S. Rosenkranz u. A. Bendich, J. mol. Biol. 1, 195 [1959].

<sup>89)</sup> H. J. Dutton u. R. F. Nystrom<sup>4b)</sup>.

<sup>90)</sup> E. P. Jones, L. H. Mason, H. J. Dutton u. R. F. Nystrom, J. org. Chemistry 25, 1413 [1960].

<sup>91)</sup> R. Wolfgang u. F. S. Rowland, Analytic. Chem. 30, 903 [1958].

<sup>92)</sup> F. Cacace u. Inam-Ul-Haq, Science [Washington] 131, 732 [1960].

<sup>93)</sup> H. R. Gutman u. J. L. Wood, Science [Washington] 110, 662 [1949].

<sup>94)</sup> F. Weygand u. H. Simon<sup>5)</sup>, S. 546.

<sup>64)</sup> K. E. Wilzbach, J. Amer. chem. Soc. 79, 1013 [1957].

<sup>65)</sup> A. Wacker u. L. Träger, Angew. Chem. 72, 168 [1960].

<sup>66)</sup> A. P. Wolf, Angew. Chem. 71, 237 [1959].

<sup>66a)</sup> K. E. Wilzbach u. L. M. Dorfman: IAEA Conference on the Use of Radioisotopes Kopenhagen, Sept. 1960. Ref.: Internat. J. appl. Radiat. Isotopes 9, 172 [1960].

<sup>66b)</sup> R. M. Lemmon, B. M. Tolbert, W. Strohmeier u. I. M. Whittemore, Science [Washington] 129, 1740 [1959].

<sup>66c)</sup> L. M. Dorfman u. K. E. Wilzbach, J. phys. Chem. 63, 799 [1959].

<sup>67)</sup> F. L. Jackson, G. W. Kittinger u. F. P. Krause, Nucleonics 18, 8, 102 [1960].

<sup>68)</sup> N. A. Ghanem u. T. Westermarck, J. Amer. chem. Soc. 82, 4432 [1960].

<sup>69)</sup> A. Y. Mottlau, J. phys. Chem. 64, 931 [1960].

<sup>70)</sup> R. W. Ahrens, M. C. Sauer jr., J. E. Willard, J. Amer. chem. Soc. 79, 3285 [1957].

<sup>71)</sup> K. E. Wilzbach<sup>4a)</sup>.

<sup>72)</sup> F. Cacace, A. Guarino, G. Montefinale u. E. Possagno, Internat. J. Appl. Radiation Isotopes 8, 82 [1960].

<sup>73)</sup> J. Rydberg u. A. Hanngren, Acta chem. scand. 12, 332 [1958].

<sup>74)</sup> A. Wacker, S. Kirschfeld u. D. Weinblum, J. mol. Biol. 2, 72 [1960];

<sup>75)</sup> A. Wacker, S. Kirschfeld u. L. Träger, ebenda 2, 241 [1960].

<sup>76)</sup> G. G. Cameron, N. Grassie u. S. J. Thomson, J. chem. Soc. [London] 1960, 1411.

<sup>76a)</sup> Ch. Rosenblum u. H. T. Meriwether<sup>4b)</sup>.

<sup>77)</sup> L. Träger, Dissertation, Techn. Universität Berlin-Charlottenburg 1960.

<sup>78)</sup> M. P. Gordon, O. M. Intrieri u. G. B. Brown, J. Amer. chem. Soc. 80, 5161 [1958].

<sup>79)</sup> J. Avigan, J. biol. Chemistry 234, 787 [1959].

Über die Verteilung des Tritiums auf die C-Atome eines Moleküls liegen bisher nur relativ wenige Untersuchungen vor<sup>71, 72</sup>). Das gleiche gilt für den Mechanismus<sup>68, 69, 95</sup>) der Markierungsreaktion.

Die Direktmarkierung mit Rückstoßtritonien, die aus den Kernreaktionen  ${}^6\text{Li}(n, \alpha){}^3\text{H}$  oder  ${}^3\text{He}(n, p)\text{T}$  stammen, wird im Vergleich zur *Wilzbach*-Markierung wenig verwendet. *Rowland* und Mitarbeiter markierten einige Verbindungen und waren dabei hauptsächlich am Mechanismus der Reaktionen interessiert<sup>96-99</sup>). Es ist bemerkenswert, daß bei der Markierung von L-Alanin die L-Konfiguration erhalten bleibt<sup>97</sup>). In Übereinstimmung damit findet man bei der Bestrahlung von Glucose praktisch keine Galaktose<sup>98</sup>). Die C-Atome sind sehr unterschiedlich markiert. Die Erhaltung der optischen Aktivität bzw. die Bevorzugung einiger C-H-Bindungen wurde auch in anderen Fällen gefunden<sup>100, 101</sup>). Die Bestrahlung von DL-Threonin liefert Glycin und allo-Threonin<sup>102</sup>).

#### 4. Biosynthetische Gewinnung T-markierter Substanzen

Von den hier vorhandenen Möglichkeiten wurde bisher noch nicht häufig Gebrauch gemacht, obwohl seit 1952 bekannt ist, daß Hefe aus tritiumhaltigen Wasser bzw. T-markiertem Acetat beträchtliche Mengen Tritium in ihre Nucleinsäuren einbaut. Die durch Hydrolyse gewonnenen Pyrimidine, Purine und Nucleoside enthalten etwa  $1/10$  der spezifischen Aktivität, die in den Nährlösungen angeboten wurde<sup>103</sup>). Aus Progesteron-(16-T) wurde biochemisch Corticosteron, Aldosteron und Cortisol gewonnen<sup>48</sup>). Mit Valin-( $\alpha$ , $\beta$ -T) erhielt man T-markierte Antikörper in Ratten<sup>104</sup>). *Moses* und *Calvin*<sup>105</sup>) zeigten, daß bei der Photosynthese von Algen in Gegenwart von HOT alle Produkte, die nach kurzer Zeit  ${}^{14}\text{C}$ -Aktivität zeigen, auch große Mengen stabil gebundenes Tritium enthalten. Je nach photosynthetisierendem System werden für 1 Atom  ${}^{14}\text{C}$  1,5 bis 5 Atome T stabil in Glucose und andere Zucker eingebaut<sup>106, 107</sup>).

#### Analyse T-markierter Substanzen

Da schon mehrfach zusammenfassend über Analysemethoden berichtet wurde<sup>1, 2, 7, 108</sup>), soll hier nur die neueste Entwicklung kurz angegeben werden.

Es wurden Methoden beschrieben, um Tritium auch in festen Verbindungen mit Durchflußzählrohren genau zu bestimmen<sup>109-111</sup>). Besonders die Arbeit von *Isbell* und

Mitarbeitern<sup>109</sup>) zeichnet sich durch große Genauigkeit aus. Bei diesen Verfahren ist jedoch zu beachten, daß bei Schichtdicken von 0,7 mg/cm<sup>2</sup> (unendlich dicke Schicht) nur noch Zählausbeuten von 4% erhalten werden.

Von besonderem Interesse ist der Nachweis von Tritium auf Papierchromatogrammen. Um die geringe Empfindlichkeit der Autoradiographie zu steigern, wurden drei Wege beschriften:

1. Tränken des Papierchromatogramms mit einem Szintillator bevor es auf den Film gelegt wird<sup>112, 113</sup>). Man taucht das Papierchromatogramm kurz in eine benzolische Lösung von Anthracen. Aktivitäten von 0,4  $\mu\text{C}/\text{cm}^2$  sind nach 2 Wochen deutlich zu sehen<sup>113</sup>).

2. Verwendung hochempfindlicher Filme ohne Schutzschicht<sup>114</sup>). Dadurch wird die Empfindlichkeit um 1-2 Zehnerpotenzen gesteigert, und es können noch  $10^{-5}$   $\mu\text{C}/\text{cm}^2$  nach 10 Tagen erkannt werden.

3. Tränken des Papierchromatogramms mit Filmemulsion<sup>114a</sup>).

Zum direkten Zählen von Papierchromatogrammen mit einem Szintillationszähler wird das Papier mit einer benzolischen Anthracenlösung besprüht<sup>115</sup>), wobei die Zählausbeuten 0,8-1,5% betragen. Man belädt das Papier mit ca. 0,3 mg Anthracen/cm<sup>2</sup>. Unter Verwendung eines speziellen Zählrohrs mit zwei Drähten ist auch die kontinuierliche Messung von Papierstreifen bis herunter zu 3 m $\mu\text{C}/\text{cm}^2$  möglich<sup>116</sup>). *Wenzel* erhielt dabei eine Zählausbeute von 2%<sup>116a</sup>).

Um biologisches Material in flüssigen Szintillatoren zu messen, wird die Verbrennung in Bombenrohren empfohlen. Das entstehende Wasser gibt man mit Alkohol zum Szintillator. Die Zählausbeuten betragen 12-14%<sup>117</sup>).

In letzter Zeit wird häufig diskutiert, ob die Szintillationszählung oder die Gaszählung von Tritium besser sei. Die Antwort hängt im wesentlichen von der Art der zu analysierenden Probe ab. Die Szintillationszählung eignet sich besonders für Routineanalysen, wenn zahlreiche, chemisch gleiche oder ähnliche Proben gemessen werden sollen. Bei chemisch verschiedenen Proben müssen häufig zunächst Versuche zur Löslichkeit angestellt werden. Außerdem kann die Zählausbeute von Probe zu Probe stark variieren und muß gesondert bestimmt werden. Dadurch geht die Schnelligkeit der Szintillationszählung verloren. Die Gaszählung ist dann mindestens ebenso schnell, erfordert weniger Aufwand und ist genauer.

#### Die Anwendung von Tritium\*)<sup>117a, b)</sup>

Tritium wird, besonders in der Meteorologie, als Tracer für Wasser verwendet<sup>118-120</sup>). Auch in der Technik gibt es zahlreiche Anwendungen<sup>121, 122</sup>). Relaiseinheiten wurden mit tritiumhaltigem Wasser auf Dichtigkeit geprüft. Die Methode soll Undichtigkeiten aufzeigen, die so gering sind, daß sie den Betrieb des Relais erst nach 20 Jahren stören würden<sup>123</sup>). Auch Diffusionsprobleme wurden mit

<sup>95</sup>) T. H. Pratt u. R. Wolfgang: IAEA Conference on the Use of Radiolabels, Kopenhagen, Sept. 1960. Ref.: Internat. J. appl. Radiat. Isotopes 9, 168 [1960].

<sup>96</sup>) H. Keller u. F. S. Rowland, J. physic. Chem. 62, 1373 [1958].

<sup>97</sup>) J. G. Kay, R. P. Malsan u. F. S. Rowland, J. Amer. chem. Soc. 81, 5050 [1959].

<sup>98</sup>) J. K. Lee, B. Musgrave u. F. S. Rowland, J. Amer. chem. Soc. 81, 3803 [1959]; 82, 3545 [1960]; J. chem. Physics 32, 1266 [1960]; Canad. J. Chem. 38, 1756 [1960].

<sup>99</sup>) R. M. White u. F. S. Rowland, J. Amer. chem. Soc. 82, 5345, 4713 [1960].

<sup>100</sup>) H. L. Bradlow, D. K. Fukushima u. M. Tsutsui, Chem. and Ind. 1959, 1124.

<sup>101</sup>) W. G. Brown u. J. L. Garnett: Australian Atomic Energy Symposium, S. 575.

<sup>102</sup>) Y. Sato, T. Meshi u. T. Takahashi, Bull. chem. Soc. Japan 33, 1146 [1960].

<sup>103</sup>) M. L. Eidinoff, H. C. Reilly, J. E. Knoll u. D. H. Marrian, J. biol. Chemistry 199, 511 [1952].

<sup>104</sup>) J. C. Crawhall, J. D. Hawkins u. D. G. Smyth, Biochem. J. 69, 286 [1958].

<sup>105</sup>) V. Moses u. M. Calvin, Biochim. biophysica Acta 33, 297 [1959].

<sup>106</sup>) H. Simon u. A. Trebst, Z. Naturforsch., im Druck.

<sup>107</sup>) H. Simon, A. Trebst u. H. J. Dorrer, unveröffentlicht.

<sup>108</sup>) E. H. Graul u. H. Hundeshagen, Strahlentherapie 108, 524 [1959].

<sup>109</sup>) H. S. Isbell, H. L. Frush u. R. A. Peterson, J. Res. nat. Bur. Standards 63A, 171 [1959].

<sup>110</sup>) M. Muramatsu u. T. Sasaki, Science [Washington] 131, 302 [1960].

<sup>111</sup>) J. Rydberg, Acta chem. scand. 12, 399 [1958].

<sup>112</sup>) A. T. Wilson, Nature [London] 182, 524 [1958].

<sup>113</sup>) E. V. Parups, I. Hoffman u. H. R. Jackson, Talanta 5, 75 [1960].

<sup>114</sup>) A. Narath u. D. Gundlach, Angew. Chem. 72, 707 [1960].

<sup>114a</sup>) A. W. Rogers, Nature [London] 184, 721 [1959].

<sup>115</sup>) H. H. Seliger u. B. W. Agranoff, Analytic. Chem. 31, 1607 [1959].

<sup>116</sup>) P. A. Osinski, Internat. J. appl. Radiation Isotopes 8, 306 [1960].

<sup>116a</sup>) M. Wenzel, Atompraxis, im Druck.

<sup>117</sup>) H. I. Jacobson, G. N. Gupta, C. Fernandez, S. Hennix u. E. V. Jensen, Arch. Biochem. Biophysics 86, 89 [1960].

<sup>117a</sup>) F. M. Sinex, Nucleonics 16, 3, 15 [1958].

<sup>117b</sup>) Ch. Rosenblum, Nucleonics 17, 12, 80 [1959].

<sup>118</sup>) B. Bolin: 2. U. N. Int. Conf. on the Peaceful Uses of Atomic Energy, Genf 1958, United Nations, Genf 1958, Bd. 18, 336.

<sup>119</sup>) H. von Buttlar u. J. Wendt: ebenda Bd. 18, S. 591.

<sup>120</sup>) E. Schumacher, Helv. chim. Acta 43, 1019 [1960].

<sup>121</sup>) Vgl. z. B. E. Broda u. T. Schönfeld: Die technischen Anwendungen der Radioaktivität. Porta-Verlag, München 1956.

<sup>122</sup>) V. P. Guinn<sup>4b</sup>).

<sup>123</sup>) Engineering 180, 292 [1955].

Tritium bearbeitet<sup>123a)</sup>. Der Ölverbrauch von Motoren läßt sich mit T-markiertem Öl rasch bis herunter zu 0,1 ml/km bestimmen<sup>123b)</sup>. Das US National Bureau of Standards schlägt für die Anwendung von Tritium in der Cellulose-technik und Polysaccharidchemie 17 Möglichkeiten vor<sup>123c)</sup>.

## 1. Tritium als analytisches Hilfsmittel

Hier ist vor allem die Verdünnungsanalyse zu nennen, die mit Tritium oft einen geringeren Aufwand erfordert als mit <sup>14</sup>C. Auf diese Weise kann die Aufarbeitung einer Substanz überprüft werden (Gibberelline<sup>117 b, 127</sup>). Als weiteres Beispiel sei die Bestimmung von Steroiden in biologischen Systemen erwähnt, wobei Tritium als zweites Isotop für die meist notwendige Doppelmarkierung dient<sup>128, 129</sup>. Auch für die Bestimmung geringer Löslichkeiten, z. B. der Löslichkeit von Paraffin in Milch<sup>130</sup>, oder zur Bestimmung geringer Dampfdrucke wurden T-markierte Substanzen verwendet<sup>130 a)</sup>.

Wenig gebraucht wurden bisher T-markierte analytische Reagentien. Werden z. B. funktionelle Gruppen mit T-haltigem Diazoäthan, Benzoylchlorid, Acetanhydrid oder p-Tolylhydrazin umgesetzt, so braucht man keine Äthoxy-, Benzoyl-, Acetyl- oder Stickstoff-Analyse, sondern es genügt eine Tritium-Analyse. Durch Verdünnungsanalyse kann das nicht umgesetzte Reagens bestimmt werden. Als Beispiele seien die Bestimmung aktiver H-Atome<sup>130 b)</sup> oder die Kupfer-Bestimmung mit T-Anthranilsäure erwähnt<sup>131</sup>.

Als Tracer für Wasserstoff spielt Tritium in der organischen Chemie keine große Rolle, da viele Probleme bereits mit Deuterium bearbeitet wurden. Als Beispiele seien jedoch Arbeiten über den Hofmann-Abbau quartärer Basen<sup>36, 132</sup>, den Mechanismus der Osazonbildung<sup>37, 133</sup> und die aromatische Substitution<sup>134</sup> angeführt. Das Arbeiten mit Tritium hat auch hier Vorteile, da T-Analysen rascher als Deuterium-Analysen ausgeführt werden können und meist geringere Substanzmengen benötigen. Deuterium bietet u. a. den Vorteil, daß man die Stellung des Isotops im Molekül IR-spektroskopisch feststellen kann.

## 2. Isotopeneffekte

Der Messung von Isotopeneffekten kommt aus verschiedenen Gründen Bedeutung zu<sup>124–126, 135, 136</sup>. Da der Massenunterschied zwischen H und T größer ist als zwischen H und D sind die Isotopeneffekte für Tritium größer. Der intramolekulare Isotopeneffekt  $k_H:k_T$  liegt häufig zwischen 5 und 20. Der kinetische oder intermolekulare häufig zwischen 1,5 und 2. Das Dampfdruckverhältnis von HOT und

H<sub>2</sub>O ist bei 25,70 °C 0,77 und bei 75,60 °C 0,89<sup>137</sup>. Zwischen den Isotopeneffekten für Deuterium und Tritium besteht die Beziehung  $(k_H:k_D)^{1,44} \cong (k_H:k_T)^{138}$ . T-markierte Substanzen eignen sich besonders dann zur Bestimmung von Isotopeneffekten, wenn man nach der kompetitiven Methode arbeiten kann<sup>139, 140</sup>.

Auch biochemische Reaktionen lassen sich an Hand von Isotopeneffekten klären<sup>141–143</sup>.

Während es eine befriedigende Theorie zur Erklärung der Größe und Richtung der primären Isotopeneffekte gibt<sup>135</sup>, ist dies für sekundäre Isotopeneffekte nicht der Fall. Sekundäre Isotopeneffekte treten bei Reaktionen auf, bei denen nicht die Bindung zum Isotop gelöst oder geknüpft wird, sondern Veränderungen in der Nachbarschaft des Isotops vor sich gehen<sup>126, 144–149</sup>.

## 3. Biochemische Anwendungen<sup>3, 4a, 4b)</sup>

Die Verwendung von Tritium als Tracer für Wasserstoff ist nicht allzu häufig, da auch hier viele Fragen schon mit Deuterium geklärt wurden. T-markierte Verbindungen haben den Vorteil, daß sie um 7–10 Größenordnungen stärker verdünnt werden können als D-markierte. Außerdem braucht man für die Analyse sehr wenig Substanz. Häufig genügt das Eluat eines Papierchromatogramms. Zwei Arbeiten über den Mechanismus der vom condensing enzyme katalysierten Reaktion sind kennzeichnend<sup>150, 151</sup>: Bei der Markierung mit T genügt papierchromatographisch isolierte Citronensäure, während mit D das Arbeiten im mMol-Maßstab notwendig war. Typische Beispiele für die Verwendung von T als Tracer für Wasserstoff sind ferner die Arbeiten von Rose und Rieder<sup>152</sup> sowie von Vishniac<sup>153</sup> über den Mechanismus der Triosephosphat-Isomerisierung bzw. die Rolle des Chlorophylls bei der Photosynthese. Eine Arbeit über die Biogenese des Nicotins<sup>157</sup> ist sehr instruktiv, da durch Verwendung von Nicotinsäure-6-T auf ein spezielles Zwischenprodukt geschlossen werden konnte, was mit <sup>14</sup>C-Markierung nicht möglich wäre. Die auch in biologischen Systemen wichtigen Wasserstoffbrücken lassen sich ebenfalls mit Tritium untersuchen<sup>153 a)</sup>. Die Verwendung von Tritiumwasser beim Studium der Photosynthese wurde bereits erwähnt<sup>105–107</sup>.

Tritium zur Markierung ganzer Moleküle wird vor allem dann verwendet, wenn die tritierten Moleküle im biochemischen System innerhalb der Versuchsdauer keine oder nur überschaubare chemische Veränderungen erleiden.

<sup>123 a)</sup> E. E. Finkel: UNESCO Conference on Radioisotopes in Scientific Research, Paris 1957. Pergamon Press, London-New York-Paris-Los Angeles 1958, Bd. 2, 463.

<sup>123 b)</sup> V. P. Guinn u. R. A. Coit, Nucleonics 17, 12, 112 [1959].

<sup>123 c)</sup> H. S. Isbell, H. L. Frush u. J. D. Moyer, Technical Association of the Pulp and Paper Industry 40, 739 [1957].

<sup>124</sup> Übersicht: K. B. Wiberg, Chem. Reviews 55, 713 [1955].

<sup>125</sup> J. G. Burr: Tracer Applications for the Study of Organic Reactions, Interscience Publishers, New York, London 1957.

<sup>126</sup> D. Palm, Dissertation, Techn. Hochschule München, 1960.

<sup>127</sup> W. E. Baumgartner<sup>4b)</sup>.

<sup>128</sup> R. E. Peterson<sup>4b)</sup>.

<sup>129</sup> R. Ködding, W. Lamprecht, H. P. Wolf, J. Karl u. K. H. R. Koczorek, Z. analyt. Chem., im Druck.

<sup>130</sup> H. Simon, unveröffentlicht.

<sup>130 a)</sup> A. S. Carson, R. Cooper u. D. R. Stranks: IAEA Conference on the Use of Radioisotopes, Kopenhagen, Sept. 1960. Ref.: Internat. J. appl. Radiat. Isotopes 9, 151 [1960].

<sup>130 b)</sup> D. J. Chieck, F. J. Broussides, W. Sullivan u. C. A. Zeigler, Internat. J. Appl. Radiation Isotopes 7, 182 [1960].

<sup>131</sup> G. H. Aylward, J. L. Garnett, J. W. Hayes u. S. W. Law, Chem. and Ind. 1960, 560.

<sup>132</sup> E. M. Hodnett, J. J. Flynn jr., J. Amer. chem. Soc. 79, 2301 [1957].

<sup>133</sup> F. Weygand, H. Simon u. K. D. Keil, unveröffentlicht.

<sup>134</sup> L. Melander, Ark. Kemi 2, 213 [1950]; 3, 525 [1951].

<sup>135</sup> H. Zollinger, Angew. Chem. 70, 204 [1958].

<sup>136</sup> L. Melander: The Use of Nuclides in the Determination of Organic Reaction Mechanisms. University of Notre Dame Press, Notre Dame, Indiana, USA 1955. Isotope Effects on Reaction Rates, The Ronald Press Comp., New York 1960.

<sup>137</sup> A. H. Price, Nature [London] 181, 262 [1958]; s. auch J. D. Simpson, J. R. Greening, Nature [London] 186, 467 [1960].

<sup>138</sup> C. G. Swain, E. C. Stivers, J. F. Reuwer jr. u. L. J. Schaad, J. Amer. chem. Soc. 80, 5885 [1958].

<sup>139</sup> G. A. Ropp, J. Amer. chem. Soc. 82, 842 [1960].

<sup>140</sup> C. J. Collins, M. H. Lietzke, J. Amer. chem. Soc. 81, 5379 [1959].

<sup>141</sup> R. H. Abeles, W. R. Frisell u. C. G. Mackenzie, J. biol. Chemistry 235, 853 [1960].

<sup>142</sup> J. R. Rachele u. H. Aebi, Arch. Biochem. Biophysics 81, 63 [1959].

<sup>143</sup> M. B. Thorn, Biochem. J. 49, 602 [1951].

<sup>144</sup> H. Simon u. D. Palm, Chem. Ber. 92, 2701 [1959]; 93, 1289 [1960].

<sup>145</sup> H. Simon u. D. Palm: IAEA Conference on the Use of Radioisotopes, Kopenhagen, Sept. 1960. Ref.: Internat. J. appl. Radiat. Isotopes 9, 165 [1960].

<sup>146</sup> K. T. Leffek, J. A. Llewellyn u. R. E. Robertson, Canad. J. Chem. 38, 2171 [1960].

<sup>147</sup> V. J. Shiner jr., Tetrahedron 5, 243 [1959].

<sup>148</sup> E. A. Halevi, Internat. J. Appl. Radiation Isotopes 7, 192 [1960].

<sup>149</sup> R. E. Weston jr., Tetrahedron 6, 31 [1959].

<sup>150</sup> J. Bové, R. O. Martin, L. I. Ingraham u. P. K. Stumpf, J. biol. Chemistry 234, 999 [1959].

<sup>151</sup> S. Englard, J. biol. Chemistry 234, 1004 [1959].

<sup>152</sup> S. V. Rieder u. I. R. Rose, J. biol. Chemistry 234, 1007 [1959].

<sup>153</sup> W. Vishniac: Internat. Botanical Congress, Montreal, August 1959. Abstracts. University of Toronto Press, Toronto 1959, Bd. II, S. 417.

<sup>153 a)</sup> W. Lobunez u. F. Karush, J. Amer. chem. Soc. 81, 795 [1959].

Hier sind es insbesondere Untersuchungen über Vorstufen<sup>74, 154–158</sup>), die Verteilung<sup>87, 159</sup>), den Transport oder die Absorption bzw. Ausscheidung von Molekülen oder Teilen davon, die mit Tritium bearbeitet werden können. Die Markierung mit Tritium hat Untersuchungen mit Steroiden ermöglicht, ohne daß man diese überdosieren mußte, wie es bei <sup>14</sup>C-markierten Steroiden notwendig war<sup>49</sup>). Welche Bedeutung Tritium für die Biochemie der Steroide in jüngster Zeit gewonnen hat, zeigen die zitierten Arbeiten<sup>43, 47–49, 51, 154–166</sup>). Um das Schicksal von Nucleosiden zu untersuchen, wurde deren Kern mit <sup>14</sup>C, der Zucker mit Tritium markiert<sup>78</sup>). Die Methode der Doppelmarkierung ist hauptsächlich dann von Interesse, wenn einem biologischen System gleichzeitig zwei mögliche Vorstufen angeboten werden sollen. Aus dem Vergleich der spezifischen Aktivitäten im Produkt lassen sich Informationen über Stoffwechselwege erhalten. Bekannt sind hier die Arbeiten von *Du Vigneaud*<sup>167, 168</sup>) und anderen Forschern<sup>142</sup>) über das Schicksal der Methylgruppe als C<sub>1</sub>-Baustein im biologischen Geschehen.

Wertvolle Ergebnisse erhält man in Kombination mit der Autoradiographie. Die energiereichsten  $\beta$ -Teilchen des Tritiums haben in Wasser und Geweben nur eine Reichweite von 6  $\mu$ , in einer Filmemulsion eine solche von 2  $\mu$ . Da jedoch die meisten  $\beta$ -Teilchen eine wesentlich geringere Energie als die Maximalenergie haben, liegen im wesentlichen alle aktivierten Silberkörner innerhalb 1  $\mu$ . Um einen Schwärzungspunkt innerhalb eines Monats zu erhalten, müssen sich etwa 10<sup>6</sup> Moleküle mit einer spezifischen Aktivität von 560 mC/mMol an einem Ort befinden. Da in einem Säugetierzellkern 6·10<sup>-12</sup> g Desoxyribonucleinsäure (DNS) mit 3·10<sup>8</sup> Thymineinheiten vorhanden sind, kann ein solcher Kern mit T-Thymidin markiert werden<sup>169</sup>). Werden Hela-Zellen 24 Stunden mit 2,5  $\mu$ C/ml Thymidin (1,25  $\mu$ g/ml) inkubiert, so erhält man bei der Autoradiographie bereits nach 24 Stunden von jedem Zellkern ca. 100 Silberkörner<sup>169a</sup>). Von diesen Möglichkeiten wurde z. B. bei Arbeiten über den Reproduktionsmechanismus von Chromosomen Gebrauch gemacht<sup>23</sup>). *Verly* und Mitarbeiter

veröffentlichten Studien über die DNS-Synthese in Gewebekulturen, wobei ebenfalls T-Thymidin verwendet wurde<sup>24, 170</sup>). Seither sind viele Arbeiten über die Bildung von DNS und RNS sowie deren Duplikationsmechanismen in verschiedenen Organismen und Zellen, z. B. auch Krebszellen, erschienen<sup>171–180 b</sup>). Auch die Lokalisation unnatürlicher Pyrimidine und Purine in Nucleinsäuren wurde auf diese Weise studiert<sup>74, 181</sup>). T-Thymidin wurde außerdem als Hilfsmittel zur Selektion von Bakterienmutanten benutzt<sup>182</sup>). Inzwischen wurden die autoradiographischen Verfahren methodisch weiter entwickelt<sup>183, 184</sup>). Mehrere Autoren untersuchten den Einfluß von Strahlung auf Nucleinsäuren mit T-markierten DNS- oder RNS-Bausteinen<sup>185–191</sup>). Allerdings müssen die Befunde mit spezifisch hochradioaktivem T-Thymidin zumindest in quantitativer Hinsicht sehr kritisch interpretiert werden. Da das Thymidin in die Chromosomen eingebaut wird und seine Strahlung auf Grund der geringen Energie ein sehr hohes spezifisches Ionisationsvermögen besitzt, kommt es zu beträchtlichen Schädigungen innerhalb des genetischen Materials<sup>169 a, 192–197</sup>). Danach würde Tritium im Thymidin eine 170-fach stärkere Strahlenbelastung darstellen, als andere T-markierte Substanzen<sup>193, 198</sup>). Es wird diskutiert, ob auf dieser Basis Chemotherapeutica gegen Krebszellen entwickelt werden können<sup>3</sup>).

Eingegangen am 11. Januar 1961 [A 130]

- <sup>154</sup>) J. A. Winstaed u. R. J. Sudahnolnik, J. Amer. chem. Soc. 82, 1644 [1960].
- <sup>155</sup>) D. Gröger, K. Mothes, H. Simon, H. G. Floss u. F. Weygand, Z. Naturforsch. 15b, 141 [1960].
- <sup>156</sup>) M. L. Eidinoff, L. Cheong u. M. A. Rich, Science [Washington] 129, 1550 [1959].
- <sup>157</sup>) R. F. Dawson, D. R. Christman, A. D'Adamo, M. L. Solt u. A. P. Wolf, J. Amer. chem. Soc. 82, 2628 [1960].
- <sup>158</sup>) B. W. Agranoff, R. M. Bradley u. R. O. Brady, J. biol. Chemistry 233, 1077 [1958].
- <sup>159</sup>) G. Schäfer, W. Lamprecht u. K. Stuhlfaut, Z. analyt. Chem., im Druck.
- <sup>160</sup>) S. F. Contractor u. W. H. Pearlman, Biochem. J. 76, 36 [1960].
- <sup>161</sup>) B. Samuelsson, J. biol. Chemistry 234, 2852 [1959].
- <sup>162</sup>) J. Avigan, J. biol. Chemistry 234, 787 [1959].
- <sup>163</sup>) M. Hayano, M. Gut, R. I. Dorfman, O. K. Sebeck, D. H. Peterson, J. Amer. chem. Soc. 80, 2336 [1958].
- <sup>164</sup>) S. Bergström, S. Lindstedt, B. Samuelson, E. J. Corey u. G. A. Gregoriou, J. Amer. chem. Soc. 80, 2337 [1958].
- <sup>165</sup>) J. Burgos-Gonzalez u. R. Glascock, Biochem. J. 74, 33p [1960].
- <sup>166</sup>) J. C. DePaape, Nature [London] 185, 264 [1960].
- <sup>167</sup>) W. G. Verly, J. R. Rachele, V. DuVigneaud, M. L. Eidinoff u. J. E. Knoll, J. Amer. chem. Soc. 74, 5941 [1952].
- <sup>168</sup>) V. DuVigneaud, W. G. Verly, J. E. Wilson, J. R. Rachele, C. Ressler u. J. M. Kinney, J. Amer. chem. Soc. 73, 2782 [1951].
- <sup>169</sup>) R. B. Painter, F. Forro jr. u. W. L. Hughes, Nature [London] 181, 328 [1958].
- <sup>169a</sup>) R. B. Painter, R. M. Drew u. W. L. Hughes, Science [Washington] 127, 1244 [1959].

- <sup>170</sup>) W. G. Verly, H. Firket u. G. Hunebelle: 2. U. N. Int. Conf. on the Peaceful Uses of Atomic Energy, Genf 1958. United Nations, Genf 1958, Bd. 25, S. 181.
- <sup>171</sup>) E. Bosenfreund, H. S. Rosenkranz u. A. Bendich: The Kinetics of Cellular Proliferation. Grune u. Stratton, New York 1959; dort auch weitere Literatur; Nuclear Sci. Abstr. 14, 454, Nr. 3503 [1959].
- <sup>172</sup>) W. B. Looney, Proc. nat. Acad. Sci. USA 46, 690 [1960].
- <sup>173</sup>) R. C. King u. R. G. Burnett, Science [Washington] 129, 1674 [1959].
- <sup>174</sup>) P. S. Woods, Nucl. Sci. Abstr. 14, 4996 [1960].
- <sup>175</sup>) J. R. Rubini, E. P. Cronkite, V. P. Bond u. T. M. Fliedner, J. clin. Invest. 39, 909 [1960]; Nucl. Sci. Abstr. 16, 15504 [1960].
- <sup>176</sup>) H. Harris, Biochem. J. 72, 54 [1959].
- <sup>177</sup>) R. B. Painter u. R. M. Drew, Lab. Invest. 8, 278 [1959].
- <sup>178</sup>) E. P. Cronkite, V. P. Bond, T. M. Fliedner u. J. R. Rubini, Lab. Invest. 8, 263 [1959] (dort auch weitere Literatur).
- <sup>179</sup>) N. Bieliavsky u. R. Tencer, Nature [London] 185, 401 [1960].
- <sup>180</sup>) A. R. Crathorn u. K. V. Shooter, Nature [London] 187, 614 [1960].
- <sup>180a</sup>) C. Pelling, Nature [London] 184, 655 [1959].
- <sup>180b</sup>) R. Okazaki, T. Okazaki u. Y. Kuriki, Biochim. biophysica Acta 33, 289 [1959].
- <sup>181</sup>) M. L. Eidinoff, L. Cheong u. M. A. Rich, Science [Washington] 129, 1550 [1959].
- <sup>182</sup>) M. Lubin, Science [Washington] 129, 838 [1959].
- <sup>183</sup>) H. Levi u. A. Nielsen, Lab. Invest. 8, 82 [1959].
- <sup>184</sup>) R. Pelc, Lab. Invest. 8, 127 [1959].
- <sup>185</sup>) B. R. Nebel, C. J. Murphy u. J. Lindner, Radiation Research 13, 126 [1960].
- <sup>186</sup>) R. B. Painter u. J. S. Robertson, Radiation Research 11, 206 [1959].
- <sup>187</sup>) R. B. Painter, Radiation Research 13, 726 [1960].
- <sup>188</sup>) J. L. van Lancker, Biochim. biophysica Acta 33, 587 [1959].
- <sup>189</sup>) S. Okada, Nature [London] 185, 193 [1960].
- <sup>190</sup>) W. B. Looney, R. C. Campbell u. B. E. Holmes, Proc. nat. Acad. Sci. USA 46, 698 [1960].
- <sup>191</sup>) F. M. Defilippes u. W. R. Guild, Radiation Research 11, 38 [1959].
- <sup>192</sup>) D. E. Wimber, Proc. nat. Acad. Sci. USA 45, 839 [1959].
- <sup>193</sup>) R. Oliver u. L. G. Lajtha, Nature [London] 186, 91 [1960].
- <sup>194</sup>) R. M. Drew u. R. B. Painter, Radiation Research 11, 535 [1959].
- <sup>195</sup>) M. Krause u. W. Plaut, Nature [London] 188, 511 [1960].
- <sup>196</sup>) E. Hell, R. J. Berry u. L. G. Lajtha, Nature [London] 185, 47 [1960].
- <sup>197</sup>) H. A. Johnson u. E. P. Cronkite, Radiation Research 11, 825 [1959].
- <sup>198</sup>) International Commission on Radiological Protection Recommendations, Pergamon Press, London-New York-Paris-Los Angeles 1960.