

**Nicht geträgerte Radioarsenisotope:  
Ihre Herstellung, Abtrennung und Markierung  
von Proteinen**

Dissertation zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“  
im Promotionsfach Chemie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften  
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz  
vorgelegt von

**Markus Jahn**  
geboren in Mainz

Mainz 2009

Dekan:

1. Berichtstatter:

2. Berichtstatter:

Datum der mündlichen Prüfung: 05.06.09

## Zusammenfassung

Das Element Arsen besitzt eine Reihe von Isotopen, die in nahezu trägerfreier Form (nca) produziert werden können und deshalb in der Radiopharmazie für die Diagnose oder Endoradiotherapie Verwendung finden können. Bei der Positronenemissionstomographie (PET) gibt es eine gewisse Lücke bei der Versorgung mit langlebigen Positronenemittern, die zur Untersuchung von langsamen physiologischen Prozessen wie z.B. der Biodistribution und Anreicherung von Antikörpern in Tumorgewebe eingesetzt werden können. Die beiden Arsenisotope  $^{72}\text{As}$  ( $T_{1/2} = 26 \text{ h}$ , 88 %  $\beta^+$ ) und  $^{74}\text{As}$  ( $T_{1/2} = 17,8 \text{ d}$ , 29 %  $\beta^+$ ) vereinen eine lange physikalische Halbwertszeit mit einer hohen Positronenemissionsrate und sind daher geeignete Kandidaten. Da das Verhalten von radioaktivem Arsen und seine Verwendung in der molekularen Bildgebung international relativ wenig bearbeitet sind, wurde die Radiochemie des Arsens von der Isotopenproduktion an Kernreaktor und Zyklotron, über die Entwicklung von Abtrennungsmethoden für Germanium und Arsen, bis hin zur Entwicklung einer soliden Markierungsschemie für Antikörper weiterentwickelt.

Die in dieser Arbeit bearbeiteten Felder sind:

1. Die Isotopenproduktion der relevanten Arsenisotope ( $^{72/74/77}\text{As}$ ) wurde an Kernreaktor und Zyklotron durch Bestrahlung von  $\text{GeO}_2$ - und Germaniummetalltargets durchgeführt. Pro 6 h Bestrahlung von 100 mg Germanium konnten ca. 2 MBq  $^{77}\text{As}$  am TRIGA Reaktor in Mainz hergestellt werden. Am Zyklotron des DKFZ in Heidelberg konnten unter optimierten Bedingungen bei der Bestrahlung von Germaniummetall ( $E_p = 15 \text{ MeV}$ , 20  $\mu\text{A}$ , 200  $\mu\text{Ah}$ ) ca. 4 GBq  $^{72}\text{As}$  und ca. 400 MBq  $^{74}\text{As}$  produziert werden.
2. Die Entwicklung neuer Abtrennungsmethoden für nca  $^{72/74/77}\text{As}$  von makroskopischen Mengen Germanium wurde vorangetrieben. Für die Aufarbeitung von  $\text{GeO}_2$ - und Germaniummetalltargets kamen insgesamt 8 verschiedene Methoden wie Festphasenextraktion, Flüssig-Flüssig-Extraktion, Destillation, Anionenaustauschchromatographie zum Einsatz. Die erzielten Ausbeuten lagen dabei zwischen 31 und 56 %. Es wurden Abtrennungsfaktoren des Germaniums zwischen 1000 und  $1 \cdot 10^6$  erreicht. Alle erfolgreichen Abtrennungsmethoden lieferten  $^*\text{As(III)}$  in 500  $\mu\text{l}$  PBS-Puffer bei pH 7. Diese Form des Radioarsens ist für die Markierung von SH-modifizierten Molekülen, wie z.B. Antikörpern geeignet.
3. Die Entwicklung von Methoden zur Bestimmung des Oxidationszustandes von nca  $^*\text{As}$  in organischem, neutralem wässrigen, oder stark sauren Medium mittels Radio-DC und Anionenaustauschchromatographie wurde durchgeführt und führte zu einem besseren Verständnis der Redoxchemie des nca  $^*\text{As}$ .
4. SH-modifizierte Antikörper wurden mit  $^{72/74/77}\text{As(III)}$  markiert. Dabei wurden zwei Methoden (Modifizierung mit SATA und TCEP) miteinander verglichen. Während das  $^*\text{As(III)}$  bei Verwendung von TCEP in Ausbeuten  $> 90 \%$  mit dem Antikörper reagierte, wurde für SATA-modifizierte Antikörper in Abhängigkeit von der verwendeten Abtrennungsmethode eine breite Spanne von 0 % bis  $> 90 \%$  beobachtet.
5. Es wurden Phantommessungen mit  $^{18}\text{F}$ ,  $^{72}\text{As}$  und  $^{74}\text{As}$  am  $\mu$ -PET-Scanner durchgeführt, um erste Aussagen über die zu erwartende Auflösung der Arsenisotope zu erhalten. Die Auflösung von  $^{74}\text{As}$  ist mit  $^{18}\text{F}$  vergleichbar, während die von  $^{72}\text{As}$  erkennbar schlechter ist.



## Abstract

The element arsenic provides a range of isotopes, available in no carrier added form (nca) which might be suitable in radiopharmaceutical chemistry for diagnosis or endoradiotherapy. In positron emission tomography (PET) there is a lack of supply with longer living positron emitters, suitable for the investigation of slow physiological processes like biodistribution and enrichment of antibodies in tumor tissue. The two radioarsenic isotopes  $^{72}\text{As}$  ( $T_{1/2} = 26$  h, 88 %  $\beta^+$ ) and  $^{74}\text{As}$  ( $T_{1/2} = 17.8$  d, 29 %  $\beta^+$ ) combine a long physical half-life with high positron emission rate and are therefore promising candidates. The behavior of radioactive arsenic and its application in molecular imaging is not well investigated in international literature so far. Therefore the radiochemistry of arsenic was investigated from isotope production at nuclear reactor and cyclotron, over the development of new separation methods for arsenic from germanium to the setup of a stable labeling chemistry for antibodies.

The fields that have been worked on are:

1. The isotope production of the relevant nca arsenic isotopes ( $^*\text{As}$ ) was carried out by irradiation of  $\text{GeO}_2$  and germanium metal targets at nuclear reactor and cyclotron. Per 6 h irradiation of 100 mg germanium, about 2 MBq  $^{77}\text{As}$  could be produced at the TRIGA reactor in Mainz. Under optimized conditions ( $E_p = 15$  Mev, 20  $\mu\text{A}$ , 200  $\mu\text{Ah}$ ) about 4 GBq  $^{72}\text{As}$  and about 400 MBq  $^{74}\text{As}$  could be produced by irradiation of germanium metal at the cyclotron of the DKFZ in Heidelberg.
2. The development of new separation methods for nca  $^{72/74/77}\text{As}$  from macroscopic amounts of germanium was promoted. For the work-up of  $\text{GeO}_2$  and germanium metal targets, eight different methods based on solid phase extraction, liquid liquid extraction, distillation and anion exchange chromatography have been applied. The yields of radio arsenic were in the range of 31 to 56 %. Separation factors from 1000 to  $1 \cdot 10^6$  could be achieved. All successful separation methods provide  $^*\text{As(III)}$  in 500  $\mu\text{l}$  PBS-buffer at pH 7. This form of radio arsenic is suitable for the labeling of SH-modified molecules like e.g. monoclonal antibodies.
3. The development of methods for the determination of the oxidation state of nca  $^*\text{As}$  in organic, neutral aqueous, or strong acidic media using radio-TLC and anion exchange chromatography lead to a better understanding of the redox chemistry of nca  $^*\text{As}$ .
4. SH-modified antibodies were labeled with  $^*\text{As(III)}$ . Thereby two different methods (SH-modification with SATA and TCEP) have been compared. By use of TCEP the  $^*\text{As(III)}$  lead to stable labeling yields of antibodies of > 90 %. In contrast, the labeling yields of SATA-modified antibodies showed a wide range from 0 to > 90 % yield depending on the separation method of arsenic from the target, applied before.
5. The measurement of phantoms filled with  $^{18}\text{F}$ ,  $^{72}\text{As}$  and  $^{74}\text{As}$  was carried out at the  $\mu$ -PET-scanner in Mainz to achieve first prediction about the achievable resolution of the two radio arsenic isotopes. While the resolution of  $^{74}\text{As}$  is comparable to  $^{18}\text{F}$ ,  $^{72}\text{As}$  shows a worse resolution, due to its higher positron energy.



<b>1 Einleitung</b>	<b>7</b>
<b>1.1 Ein kurzer geschichtlicher Überblick</b>	<b>7</b>
<b>1.2 Arsen</b>	<b>12</b>
<b>1.3 Ionenaustauschchromatographie</b>	<b>19</b>
<b>1.4 Radioaktive Arsenisotope</b>	<b>22</b>
<b>1.5 Chemische Trennung von Germanium und Arsen</b>	<b>25</b>
<b>1.6 Monoklonale Antikörper</b>	<b>29</b>
<b>2 Problemstellung und Zielsetzung</b>	<b>31</b>
<b>3 Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>35</b>
<b>3.1 Bestrahlungen</b>	<b>35</b>
3.1.1 Wahl des Targetmaterials	35
3.1.2 Produktion von <sup>77</sup> As durch Bestrahlungen am Kernreaktor	37
3.1.3 Produktion von nca Arsenisotopen am Zyklotron	39
<b>3.2 Gammaspektroskopie der relevanten Radioisotope</b>	<b>44</b>
3.2.1 Gammaspektrum von <sup>76</sup> As	44
3.2.2 Gammaspektrum von <sup>77</sup> As	45
3.2.3 Gammaspektrum von <sup>77</sup> Ge	46
3.2.4 Gammaspektrum von <sup>74</sup> As	48
3.2.5 Gammaspektrum von <sup>72</sup> As	48
3.2.6 Gammaspektrum von <sup>71</sup> As	49
3.2.7 Gammaspektrum von <sup>67</sup> Ga	50
<b>3.3 Speziation von *As(III) und *As(V)</b>	<b>51</b>
3.3.1 Speziation von *As(III), *As(V) und Bestimmung der Markierungsausbeute mittels Radio-DC	52
3.3.2 Bestimmung des Oxidationszustandes von <sup>77</sup> As in einem am Kernreaktor bestrahlten GeO <sub>2</sub> -Target mittels Anionenaustauschchromatographie	53
<b>3.4 Modifizierung von monoklonalen Antikörpern zur Markierung mit Radioarsenisotopen</b>	<b>56</b>
3.4.1 Modifizierung eines Antikörpers mit SATA zur Einführung von zusätzlichen Thiogruppen	56
3.4.2 Modifizierung von Antikörpern mit TCEP zur Einführung von Thiogruppen	57
3.4.3 Erstellen einer Kalibrationsgeraden zur Bestimmung der Antikörperkonzentration	58
3.4.4 Bestimmung der Anzahl der SH-Gruppen pro Antikörper	59
<b>3.5 Abtrennungsmethoden für nca *As aus Germaniumtargets und Markierung des Antikörpers Bevacizumab</b>	<b>61</b>
3.5.1 Abtrennung von <sup>72/74/77</sup> As aus einem GeO <sub>2</sub> -Target mittels Festphasenextraktion (MJ01)	61
3.5.1.1 Lösen des GeO <sub>2</sub> -Targets	62
3.5.1.2 Fixierung und Reinigung des *As auf einer Festphasenextraktionskartusche	62
3.5.1.3 Elution des abgetrennten *As von der Bond Elut ENV Kartusche	63
3.5.1.4 Bestimmung des Oxidationszustands von *As	63
3.5.1.5 Zusammenfassung Abtrennungsmethode mittels Festphasenextraktion	65
3.5.1.6 Markierung von SATA-modifiziertem Bevacizumab mit <sup>77</sup> As	66
3.5.1.7 Markierungen von Bevacizumab unter Verwendung von TCEP	66
3.5.2 Abtrennung von <sup>72/74/77</sup> As aus einem GeO <sub>2</sub> -Target mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) aus HF/NaI-Medium (MJ02)	68
3.5.2.1 Allgemeines zur Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) zur Trennung von Arsen und Germanium	68
3.5.2.2 Extraktion des *As in CCl <sub>4</sub> und Rückextraktion in PBS-Puffer	69
3.5.2.3 Bestimmung des Oxidationszustandes von *As	71
3.5.2.4 Markierung von Bevacizumab mit <sup>77</sup> As aus GeO <sub>2</sub> -Targets nach Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) aus HF/NaI-Medium	72

3.5.3 Abtrennung von <sup>72/74/77</sup> As aus einem GeO <sub>2</sub> -Target mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) aus HF/HBr-Medium (MJ03)	74
3.5.3.1 Extraktion des *As in CCl <sub>4</sub> und Rückextraktion in PBS-Puffer	75
3.5.3.2 Bestimmung des Oxidationszustandes von *As	76
3.5.3.3 Markierung von Bevacizumab mit <sup>77</sup> As aus GeO <sub>2</sub> -Targets nach LLE aus HF/HBr-Medium	77
3.5.4 Abtrennung von <sup>77</sup> As aus einem GeO <sub>2</sub> -Target mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) aus HF/HCl-Medium (MJ04)	79
3.5.4.1 Extraktion des <sup>77</sup> As in CCl <sub>4</sub> und Rückextraktion in PBS-Puffer	79
3.5.4.2 Bestimmung des Oxidationszustandes von *As	81
3.5.4.3 Markierung von Bevacizumab mit <sup>77</sup> As aus GeO <sub>2</sub> -Targets nach Flüssig-Flüssig-Extraktion aus HF/HCl-Medium	82
3.5.5 Abtrennung von <sup>72/74/77</sup> As aus einem Germaniummetalltarget mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) aus HF/HI-Medium (MJ05)	84
3.5.5.1 Lösen des Germaniummetalltargets	84
3.5.5.2 Zerstörung des überschüssigen H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	85
3.5.5.3 Extraktion des *As in CCl <sub>4</sub> und Rückextraktion in PBS-Puffer	86
3.5.5.4 Bestimmung des Oxidationszustandes von *As	87
3.5.5.5 Markierung von Bevacizumab mit <sup>74</sup> As aus einem Zyklotron GeO <sub>2</sub> -Target nach LLE aus HF/HI-Medium	88
3.5.6 Vorversuche zur Reduktion von As(V) zu As(III) in HCl-Medium mit geträgertem <sup>76</sup> As <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	90
3.5.6.1 Vorversuche mit NaI als Reduktionsmittel im HCl-Medium	90
3.5.6.2 Vorversuche mit CuCl als Reduktionsmittel	92
3.5.6.3 Vorversuche mit anderen Reduktionsmitteln	95
3.5.6.4 Zusammenfassung Reduktionsmittel für geträgertes <sup>76</sup> As(V) im HCl-Medium	97
3.5.7 Abtrennung von <sup>72/74/77</sup> As aus einem Germaniummetalltarget durch Destillation von GeCl <sub>4</sub> und anschließender Aufreinigung mittels Anionenaustausch (MJ06)	98
3.5.7.1 Lösen der Germaniummetalltargets	98
3.5.7.2 Abtrennung von Germanium durch Destillation von GeCl <sub>4</sub>	98
3.5.7.3 Aufreinigung der *As(V)-Fraktion nach Destillation durch Anionenaustausch	100
3.5.7.4 Reduktion mit CuCl, Extraktion in CCl <sub>4</sub> und Rückextraktion in PBS-Puffer	104
3.5.7.5 Bestimmung des Oxidationszustandes von *As	106
3.5.7.6 Markierung von Bevacizumab mit *As unter Verwendung von TCEP	107
3.5.7.7 Markierung von SATA-modifiziertem Bevacizumab mit *As	109
3.5.8 Abtrennung von <sup>72/74/77</sup> As aus einem Germaniummetalltarget mittels Anionenaustauschchromatographie im HF/HCl-Medium (MJ07)	111
3.5.8.1 Lösen des Germaniummetalltargets in HF/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	114
3.5.8.2 Zerstörung des H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	114
3.5.8.3 Trennung von Germanium und Arsen auf einer AG 1-X8 Säule	114
3.5.8.4 Reduktion mit HBr, Extraktion in CCl <sub>4</sub> und Rückextraktion in PBS-Puffer	117
3.5.8.5 Bestimmung des Oxidationszustandes von *As	118
3.5.8.6 Markierung von SATA-modifiziertem Bevacizumab mit *As	119
3.5.9 Abtrennung von <sup>72/74/77</sup> As aus einem Germaniummetalltarget mittels Anionenaustausch im HF/HCl-Medium und Festphasenextraktion (MJ08)	121
3.5.9.1 Fixierung des *As auf einer Festphasenextraktionskartusche	121
3.5.9.2 Elution des *As von der Festphasenextraktionskartusche	122
3.5.9.3 Bestimmung des Oxidationszustandes von *As	123
3.5.9.4 Markierung von SATA- und TCEP-modifiziertem Bevacizumab mit *As	124
3.5.10 Zusammenfassung Abtrennungsmethoden und Markierungen von Bevacizumab	127
3.5.10.1 Zusammenfassung Abtrennungsmethoden für GeO <sub>2</sub> -Targets und anschließende Markierung von Bevacizumab mit *As	127
3.5.10.1 Zusammenfassung Abtrennungsmethoden für Germaniummetalltargets und anschließende Markierung von Bevacizumab mit *As	128
3.5.11 Phantommessungen mit <sup>18</sup> F und <sup>72/74</sup> As am Kleintier-PET-Scanner Focus 120	131

<b>4 Experimenteller Teil</b>	<b>137</b>
<b>4.1 Bestrahlungen</b>	<b>137</b>
4.1.1 Bestrahlungen mit Neutronen am Kernreaktor TRIGA Mark II des Instituts für Kernchemie in Mainz	137
4.1.1.1 Bestrahlungen von GeO <sub>2</sub>	137
4.1.1.2 Bestrahlungen von Germaniummetall	137
4.1.1.3 Bestrahlungen von As <sub>2</sub> O <sub>5</sub> in wässriger Lösung	137
4.1.1.4 Bestrahlung von NaI	138
4.1.1.5 Bestrahlung von CuCl	138
4.1.2 Bestrahlungen mit Protonen am MC32NI Zyklotron des DKFZ in Heidelberg	138
4.1.2.1 Bestrahlungen von GeO <sub>2</sub>	138
4.1.2.2 Bestrahlungen von Germaniummetall	138
<b>4.2 Analytische Methoden</b>	<b>139</b>
4.2.1 Radio-DC-Analytik zur Bestimmung des Oxidationszustandes von *As und der Markierungsausbeute von *As-markierten Antikörpern	139
4.2.2 Bestimmung der Markierungsausbeute von Antikörpern mittels Radio-HPLC und Gelfiltration mittels HPLC	139
4.2.3 Bestimmung der radiochemischen Ausbeute und Isotopenreinheit mittels $\gamma$ -Spektroskopie	140
<b>4.3 Abtrennungsmethoden für *As aus Germaniumtargets</b>	<b>141</b>
4.3.1 Abtrennungsmethoden für *As aus GeO <sub>2</sub> -Targets	141
4.3.1.1 Abtrennung von <sup>72/74/77</sup> As aus einem GeO <sub>2</sub> -Target mittels Festphasenextraktion (MJ01)	141
4.3.1.2 Abtrennung von <sup>72/74/77</sup> As aus einem GeO <sub>2</sub> -Target mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion aus HF/NaI-Medium (MJ02)	142
4.3.1.3 Abtrennung von <sup>72/74/77</sup> As aus einem GeO <sub>2</sub> -Target mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion aus HF/HBr-Medium (MJ03)	143
4.3.1.4 Abtrennung von <sup>72/74/77</sup> As aus einem GeO <sub>2</sub> -Target mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion aus HF/HCl-Medium (MJ04)	143
4.3.1.5 Bestimmung des Oxidationszustandes von <sup>77</sup> As in GeO <sub>2</sub> nach erfolgter Bestrahlung am Kernreaktor durch Anionenaustauschchromatographie im HF/HCl-Medium	144
4.3.2 Abtrennungsmethoden für Germaniummetalltargets	145
4.3.2.1 Abtrennung von <sup>72/74/77</sup> As aus einem Germaniummetalltarget mittels Flüssig- Flüssig-Extraktion aus HF/Hi-Medium (MJ05)	145
4.3.2.2 Abtrennung von <sup>72/74/77</sup> As aus einem Germaniummetalltarget durch Destillation von GeCl <sub>4</sub> und anschließender Aufreinigung mittels Anionenaustausch (MJ06)	146
4.3.2.3 Abtrennung von <sup>72/74/77</sup> As aus einem Germaniummetalltarget mittels Anionenaustauschchromatographie im HF/HCl-Medium (MJ07)	148
4.3.2.4 Abtrennung von <sup>72/74/77</sup> As aus einem Germaniummetalltarget mittels Anionenaustausch im HF/HCl-Medium und Festphasenextraktion (MJ08)	150
<b>4.4 Vorversuche zur Reduktion von As(V) zu As(III) mit geträgertem <sup>76</sup>As<sub>2</sub>O<sub>5</sub></b>	<b>150</b>
4.4.1 Vorversuche mit NaI als Reduktionsmittel	150
4.4.2 Vorversuche mit CuCl als Reduktionsmittel	151
<b>4.5 Markierung von Antikörpern mit Arsenisotopen</b>	<b>151</b>
4.5.1 TCEP-Modifizierung von Antikörpern und Markierung mit <sup>72/74/77</sup> As	152
4.5.2 SATA-Modifizierung von Antikörpern und Markierung mit <sup>72/74/77</sup> As	152
4.5.3 Erstellen einer Kalibrationsgeraden zur Bestimmung der Antikörperkonzentration	152
4.5.4 Erstellen einer Kalibrationsgeraden zur Bestimmung der Anzahl der SH-Gruppen pro Antikörpermolekül	153
<b>4.6 Phantommessungen mit <sup>72/74</sup>As und <sup>18</sup>F am Kleintier-PET-Scanner Focus 120</b>	<b>154</b>
4.6.1 Herstellung der Plexiglasphantome	154
4.6.2 Messung des mit <sup>72</sup> As, <sup>74</sup> As und <sup>18</sup> F befüllten Bohrlochphantoms am Kleintier-PET-Scanner Focus 120	155

4.6.3 Messung des mit $^{72}\text{As}$ , $^{74}\text{As}$ und $^{18}\text{F}$ befüllten 3-Stab-Phantoms am Kleintier-PET-Scanner Focus 120	156
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>157</b>
<b>6 Ausblick</b>	<b>165</b>
<b>7 Anhang</b>	<b>167</b>
<b>7.1 Verwendete Chemikalien</b>	<b>167</b>
<b>7.2 Abbildungsverzeichnis</b>	<b>168</b>
<b>7.3 Tabellenverzeichnis</b>	<b>170</b>
<b>7.4 Literatur</b>	<b>172</b>





# 1 Einleitung

Die Radiochemie, die sich mit der Chemie der Radionuklide beschäftigt, ist eine der jüngsten Zweige der Naturwissenschaften, die 1896 mit der Entdeckung der natürlichen Radioaktivität von Uransalzen durch Antoine Henri Becquerel (1852-1908) begründet wurde. Die Radioaktivität blieb lange Zeit unentdeckt, weil sie mit keinem der menschlichen Sinne erfahrbar ist. Im Laufe der letzten 110 Jahre hat diese eng mit der Physik verzahnte Disziplin eine unglaubliche Entwicklung erfahren, welche von der Isolierung natürlich vorhandener radioaktiver Elemente durch Marie und Pierre Curie über die Entdeckung der Kernspaltung durch Otto Hahn, Fritz Straßmann und Lise Meitner bis hin zur Erzeugung künstlicher radioaktiver Isotope an Zyklotron und Kernreaktor führte. Im Laufe der letzten Jahrzehnte gelang sogar an Großbeschleunigeranlagen wie der GSI in Darmstadt die Synthese künstlicher, superschwerer Elemente, die nicht auf der Erde vorkommen. Mit Hilfe einer rasanten Entwicklung von Strahlungsdetektoren, elektronischen Bauteilen und Computern konnte auch die Messtechnik in diesem Zeitraum erheblich verbessert werden. Zu den herausragenden Neuerungen zählt sicherlich die Hochauflösende Gammaskopie mittels Germanium-Halbleiterdetektoren, welche eine exakte Identifizierung und Quantifizierung von radioaktiven Gammastrahlern ermöglichte. Im Folgenden soll die Geschichte der Radiochemie und die Anwendung von Radioaktivität in der Medizin kurz beleuchtet werden.

## 1.1 Ein kurzer geschichtlicher Überblick

Ende des 19. Jahrhunderts waren es zunächst zwei Wissenschaftler, die mit ihren Entdeckungen die Anwendung von elektromagnetischer Strahlung und Radioaktivität in den Lebenswissenschaften erst ermöglichten. Großes öffentliches Interesse erzielte zunächst Wilhelm Conrad Röntgen (1845-1923), der 1895 eine neue Art von Strahlung entdeckte, die er aufgrund ihrer unbekanntenen Natur als X-Strahlen bezeichnete [1]. Diese Strahlung kann optisch undurchsichtige Materie bis zu einer gewissen Dicke problemlos durchdringen und eine hinter dem Körper positionierte Photoplatte belichten. Als Röntgen versuchte, die Eigenschaften der Strahlen genauer zu untersuchen, gelang es ihm nicht, die vom Licht bekannten Eigenschaften beim Durchgang durch optische Medien auch bei seinen X-Strahlen nachzuweisen. Obwohl die Natur der Strahlen zunächst unbekannt blieb, fand sich sehr schnell eine praktische Anwendung seiner Entdeckung. Röntgen hatte mit Hilfe seiner Strahlen ein Foto der Hand seiner Frau gemacht, auf dem ihre Knochen eindeutig zu erkennen waren [2]. Dieses Foto wurde über die Presse sehr schnell in ganz Europa bekannt und verhalf ihm und seiner Entdeckung zu großer Popularität. Mit Hilfe seiner Strahlen war es auf einmal möglich, einen zerstörungsfreien Blick in das Innere des Körpers zu werfen. Das große diagnostische Potential für die Medizin wurde sofort erkannt und mehrere Firmen begannen

direkt mit der Produktion von Röntgenapparaten. Erste Modelle waren bereits 1896, nur ein Jahr nach der Entdeckung der X-Strahlen, verfügbar [3]. Seit damals ist in Deutschland der Name Röntgen ein Synonym für den Vorgang des Röntgens und auch für die Strahlung selbst, während man im englischsprachigen Raum weiterhin von X-Strahlen redet.

Nicht so stark von der Öffentlichkeit beachtet wurde hingegen die Entdeckung der natürlichen Radioaktivität von Uran durch Antoine Henri Becquerel (1852-1908) im März des Jahres 1896 [2]. Er untersuchte die Phosphoreszenz von Uranverbindungen, wie z.B. Kaliumuranyl-sulfat. Der experimentelle Aufbau war recht einfach. Eine Photoplatte wurde in dickes schwarzes Papier lichtdicht eingepackt und zusammen mit der zu untersuchenden Uranverbindung in die Sonne gelegt. Er beobachtete, dass die Uranphosphoreszenz sowohl eine dünne Aluminiumfolie als auch das Papier der Photoplatte mühelos durchdringen konnte. Beim Entwickeln der Platte konnte man an den Stellen, wo die Uranverbindung vorher gelegen hatte, eine deutliche Schwärzung der Platte erkennen [4]. Die Strahlung wies in ihren Materie durchdringenden Eigenschaften eine gewisse Ähnlichkeit zu den Röntgenstrahlen auf. Zu diesem Zeitpunkt war noch nicht klar, dass es sich bei der gefundenen, durchdringenden Strahlung nicht um eine Begleiterscheinung der Phosphoreszenz handelte. Becquerel wollte Ende Februar 1896 ein weiteres Experiment durchführen und präparierte wiederum seine Uranverbindung und legte sie auf eine neue Photoplatte. Da jedoch der Himmel an diesem Tag sehr bedeckt war, brach er den Versuch ab und ließ das Uran in der dunklen Schublade auf der Photoplatte liegen. Als er die Photoplatte nach zwei Tagen trotzdem entwickelte, konnte er auch auf dieser Photoplatte dunkle Stellen nachweisen. Da das Uran vorher nicht bestrahlt worden war, konnte es sich also nicht um eine Folge von Phosphoreszenz handeln. Mit diesem unscheinbaren Experiment konnte Becquerel beweisen, dass die Aussendung der Strahlung, die die Schwärzung der Photoplatte bewirkte eine, Eigenschaft des Urans selbst war [5]. Somit entdeckte er die natürliche Radioaktivität. Im Gegensatz zur Entdeckung der Röntgenstrahlung blieb seine Entdeckung jedoch eine Randnotiz der Geschichte, die nur in der Fachpresse zur Kenntnis genommen wurde. Die Entdeckung wurde zunächst nicht als der große Durchbruch erkannt, als der er sich später noch herausstellen sollte. Sogar Becquerel selbst widmete sich bald wieder anderen Themen.

Dies änderte sich erst zwei Jahre später, als Gerhardt Schmidt [6] und Marie Curie (1867-1937) [7] unabhängig voneinander bei Thorium eine ähnliche Strahlung wie die von Becquerel bei Uran beschriebene nachweisen konnten. Somit war dieser Effekt bereits bei zwei Elementen nachgewiesen worden. Interessanterweise entdeckte Schmidt in Erlangen diesen Effekt ein paar Monate vor Marie und Pierre Curie. Im Gegensatz zu ihnen veröffentlichte er jedoch auf diesem Gebiet keine Artikel mehr [8]. Marie und Pierre Curie begannen nun, das Uran und seine Strahlung systematisch zu untersuchen. Eines der Hauptprobleme bestand damals in der Messung der Radioaktivität. Es war bekannt, dass die Strahlung in der Lage ist eine Photoplatte zu schwärzen. Dies war für quantitative Messungen

der Strahlung jedoch keine brauchbare Methode. Auch hatte Becquerel selbst herausgefunden, dass die Strahlung auf Luft ionisierend wirkt und ein Elektroskop entladen kann. Diese Messungen waren jedoch sehr unzuverlässig. Pierre Curie (1859-1906) hatte im Jahre 1882 zusammen mit seinem Bruder Jacques den Piezoelektrischen Effekt entdeckt und konstruierte für Marie Curie ein neuartige Messgerät, mit dem sich die Aktivität einer Probe quantifizieren lies [9]. Mit dieser ersten Ionisationskammer konnten Ströme im pA-Bereich gemessen werden. Als das Gerät zur Verfügung stand, begann Marie Curie mit der Vermessung einer ganzen Reihe von Mineralien und Verbindungen. Man hatte ganz natürlich angenommen, dass Uranmetall im Gegensatz zu seinen Verbindungen die höchste Aktivität aufweisen würde, da es hier am höchsten „konzentriert“ ist. Marie Curie konnte jedoch in dem Mineral Pechblende eine bis zu vier Mal höhere Strahlung messen als in Uranmetall, was bis dahin die Referenz gewesen war. Daraus schloss sie, dass sich in der Pechblende ein weiteres radioaktives Element befinden müsse. Weder Marie noch Pierre Curie waren Chemiker. Bei der Suche nach dem neuen Element benötigten sie Hilfe und fanden sie im Chemiker Gustave Bémont (1867-1932). Die Analyse der Pechblende wurde keineswegs neu erfunden. Man verfolgte einen bereits von Fresenius etablierten Trennungsgang und wusste also bereits, welche der bekannten Elemente man in welcher Fraktion zu erwarten hatte. Neu war nur, dass sie nun die einzelnen Fraktionen mit dem neuen Messgerät vermessen konnten und so herausfanden, wie sich das neue Element chemisch verhält. Die Versuche führten schlussendlich zur Entdeckung von zwei neuen Elementen. 1898 wurde zuerst das Polonium [10] entdeckt. Es wurde nach dem seit 1795 nicht mehr als eigener Staat existierenden Heimatland von Marie Curie benannt. Chemisch verhält sich das Polonium ähnlich wie Wismut. Im selben Jahr folgte noch die Entdeckung des Radiums, welches ähnliche chemische Eigenschaften wie Barium aufweist [11]. Der heute gebräuchliche Begriff der Radioaktivität geht ebenfalls auf das Ehepaar Curie zurück. Neu war zu dieser Zeit auch, dass man das neue Element zunächst nicht in wägbaren Mengen erhalten konnte. Das Funkenspektrum von Polonium konnte erst 12 Jahre nach dessen Entdeckung an ca. 100 µg Substanz gemessen werden. Um diese geringe Menge an Polonium zu erhalten mussten, von Marie Curie mehrere Tonnen Uranerz aufgearbeitet werden [9]. Die Leistungen auf dem Gebiet der Erforschung der Radioaktivität wurden einige Jahre später gewürdigt. So teilten sich Becquerel, Marie und Pierre Curie 1903 den Nobelpreis für Physik für die Entdeckung der Radioaktivität und ihrer weiteren Erforschung. Den ersten Nobelpreis für Physik hatte 1901 Wilhelm Conrad Röntgen für die Entdeckung der X-Strahlen erhalten. 1911 erhielt Marie Curie alleine ihren zweiten Nobelpreis in Chemie für die Entdeckung und Isolierung von Polonium und Radium. Man muss sich vor Augen halten, dass zum damaligen Zeitpunkt eigentlich nichts über die Natur der von den radioaktiven Elementen emittierten Strahlung bekannt war. Mit den spektakulären Entdeckungen von Marie und Pierre Curie begann jedoch die Erforschung dieser Phänomene in größerem Umfang, nicht zuletzt, weil nun stärkere radioaktive Quellen als die natürlichen Uranerze zur Verfügung standen. So entdeckte Ernest Rutherford 1899 bei der Untersuchung der vom Uran ausgehenden ionisierenden Strahlung

sowohl die Alphastrahlung als auch die Betastrahlung. Während die Alphastrahlung für den größten Teil der Ionisierung verantwortlich war und bereits von einem Blatt Papier aufgehalten wurde, konnte die Betastrahlung noch dünne Schichten von Aluminium oder Kupfer durchdringen. Ein Jahr später entdeckte Paul Villard bei der Untersuchung von Radium die Gammastrahlung, die selbst 20 cm dicke Eisenplatten mühelos durchdringen konnte [12]. 1906 postulierte Rutherford, dass die Alphastrahlung aus positiv geladenem Helium besteht. Die Einheit der Radioaktivität ging auf die Zahl der Alphazerfälle von 1 g Radium zurück, was etwa  $3,72 \cdot 10^{10}$  Zerfällen pro Sekunde entspricht und bekam den Namen Curie. Im Jahre 1950 wurde das Curie mit  $3,7 \cdot 10^{10}$  Zerfällen pro Sekunde neu definiert. Die SI-Einheit ist jedoch das Becquerel [Bq], das als 1 Zerfall pro Sekunde definiert ist.

Weitere Meilenstein der Frühphase der Kernchemie waren zweifelsohne die Entwicklung der Zerfallstheorie durch Rutherford und Soddy 1903, die Postulierung eines positiv geladenen Atomkerns durch Rutherford 1911, der fast die gesamte Masse des Atoms enthält und die Entdeckung der natürlichen Zerfallsreihen [12]. Die Entdeckung des Neutrons durch Chadwick [13] 1932 machte das Atommodell komplett.

1934 wurde dann die erste künstlich erzeugte Radioaktivität von Irène Curie und Frédéric Joliot entdeckt [14, 15]. Sie bestrahlten eine Aluminiumfolie mit den Alphastrahlen einer 100 mCi Poloniumquelle und konnten selbst nach dem Entfernen der Quelle noch Positronen messen. Sie erkannten, dass es sich bei der erzeugten 3,4 min Aktivität um  $^{30}\text{P}$  handeln musste, dass über die  $^{27}\text{Al}(\alpha, n)^{30}\text{P}$  Kernreaktion gebildet wurde und unter Aussendung eines Positrons zu  $^{30}\text{Si}$  zerfällt. Sie bestrahlten noch andere leichte Elemente und fanden für Bor ( $^{10}\text{B}(\alpha, n)^{13}\text{N}$ ) und Magnesium ( $^{24}\text{Mg}(\alpha, n)^{27}\text{Si}$ ) ebenfalls nach dem Entfernen der Poloniumquelle messbare Aktivitäten. In weiteren Experimenten konnte die Bildung von  $^{30}\text{P}$  und  $^{13}\text{N}$  auch chemisch nachgewiesen werden. Am 12. Dezember 1935 bekamen Irène Curie und Frédéric Joliot für ihre Entdeckung der künstlichen Aktivität den Nobelpreis für Chemie [16]. Sie waren es auch, die das Konzept der Radioisotope vorschlugen.

In der Folge ihrer Experimente entwickelte sich jedoch das Neutron zum favorisierten Teilchen zur Durchführung von Kernreaktionen. Dies liegt unter anderem daran, dass das Neutron ein ungeladenes Elementarteilchen ist und somit den Coulombwall einfach überwinden kann. Im Jahre 1937 waren bereits 200 verschiedene künstlich erzeugte Radionuklide bekannt. Das Neutron war auch das entscheidende Projektil auf dem Weg zur Entdeckung der Kernspaltung. Enrico Fermi bestrahlte seit 1934 Uran mit Neutronen auf der Suche nach Transuranelementen. Es war bereits bekannt, dass Neutronen leicht mit stabilen Kernen reagieren und so  $\beta^-$ -strahlende Kerne erzeugen. Beim  $\beta^-$ -Zerfall wird dann ein Element mit einer um eins erhöhten Ordnungszahl gebildet. Dies wollte er auch beim Uran erreichen und hoffte so, Element 93 oder sogar Element 94 zu erzeugen [17]. Da es jedoch Schwierigkeiten bei der chemischen Aufarbeitung der gefundenen Aktivitäten gab, wurden

diese Experimente von Fermi nicht weiter verfolgt. Otto Hahn und Fritz Straßmann setzten Fermis Experimente fort und konnten dann in einer mit langsamen Neutronen bestrahlten Uranprobe auf chemischem Weg nachweisen, dass sich unter den gebildeten Radionukliden ein Isotop des Bariums befand. Dies war der chemische Beweis für die Kernspaltung. Es passte jedoch nicht in das damalige Weltbild, dass Kerne einfach in kleinere Teile zerplatzen können, da man bis dahin nur beobachtet hatte, dass bei Kernreaktionen Elemente entstehen, die in relativer Nachbarschaft zu den als Target verwendeten Elementen standen. Die erste Veröffentlichung zur Entdeckung der Kernspaltung von Hahn und Straßmann war noch sehr zurückhaltend formuliert [18]. Erst in einer späteren Veröffentlichung [19] konnten sie sich zu dem Wort „Uranspaltung“ im Titel durchringen. Die Ergebnisse der Gruppe um Hahn waren mit den Physikern Lise Meitner und Otto Frisch diskutiert worden, die schnell die Kernspaltung mit dem damals bereits bekannten Tröpfchenmodell erklären konnten [20]. Im Laufe des Jahres 1939 wurde die Experimente überall auf der Welt wiederholt und die Entdeckung der Kernspaltung bestätigt.

Fermi gelang in den USA bereits 1942 die erste kontrollierte Kettenreaktion in einem Kernreaktor und bis 1945 wurden die ersten Atomwaffen entwickelt. Im Zuge all dieser Entwicklungen wurden dann schließlich nicht nur die Transuran-Elemente 93 (Neptunium) und 94 (Plutonium) entdeckt, sondern im Laufe der Jahrzehnte danach noch einige weitere der so genannten Superschweren Elemente [21].

Bereits seit den Anfängen der Kernforschung wurde immer wieder versucht, die natürlich Radioaktivität auch zu medizinischen Zwecken einzusetzen. So wurden Radium- und Thoriumverbindungen eingesetzt, um z.B. Hautkrankheiten, Lungentuberkulose oder Syphilis zu behandeln [3]. Ähnliches galt für die Behandlung von Krebs. Allerdings wurden die Gefahren der neuen Strahlung allgemein unterschätzt. So wurden eine ganze Reihe von aus heutiger Sicht unsinnigen oder sogar gefährlichen Produkten wie radiumhaltige Schokolade, radioaktive Zahnpasta oder Kosmetika zum Kauf angeboten. Man wusste bereits, dass Bakterien und Kleintiere unter der Einwirkung der Strahlung starben, setzte jedoch große Hoffnung in ihre therapeutische Wirkung. Dies war sicherlich auch darauf zurückzuführen, dass in der Literatur in der Regel nur erfolgreiche Studien veröffentlicht wurden. Die neu entdeckte künstliche Radioaktivität fand jedoch in der entstehenden Fachrichtung der Radiopharmazie dann endgültig einen festen Platz in den Lebenswissenschaften. Heutzutage sind die radiopharmazeutische Chemie und die Nuklearmedizin feste Bestandteile in der Diagnostik und Therapie einer Vielzahl von Krankheiten. Einer der Pioniere der ernsthaften Anwendung von Radioaktivität in den Lebenswissenschaften war der ungarische Chemiker George de Hevesy (1885-1966). Sein Tracerkonzept sieht vor, Radioaktivität als Sonde für biologische Vorgänge einzusetzen. Der „Trick“ dabei ist, dass die Radioaktivität dabei in so kleinen Mengen eingesetzt werden kann, dass sie nicht toxisch ist und den normalen Ablauf im Metabolismus nicht beeinflusst. Erst mit der Zeit wurden trägerfreie Isotope von in

biologisch wichtigen Elementen verfügbar, was die Entwicklung von mit radioaktiven Isotopen markierten Verbindungen ermöglichte. Hevesy studierte als erster das Verhalten von radioaktiven Isotopen in lebenden Organismen [22]. So bestimmte er in den 20er Jahren des vorigen Jahrhunderts u. a. die Verteilung von  $^{212}\text{Pb}$  in Pflanzen und von  $^{212}\text{Bi}$  in Hasen. Die dafür verwendeten Isotope stammten aus den natürlichen Zerfallsreihen. Mit dem Aufkommen der Neutronenquellen wurden auch radioaktive Isotope leichter Kerne wie z.B.  $^{32}\text{P}$  verfügbar, dessen *in vivo*-Verteilung in Ratten erstmals von ihm 1935 bestimmt wurde [23]. Seit 1946 sind am Reaktor produzierte Radioisotope kommerziell verfügbar.

Die Erfindung des Zyklotrons durch E. O. Lawrence machte die Produktion der benötigten Isotope von z.B.  $^{32}\text{P}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{15}\text{O}$  und  $^{18}\text{F}$  in größerem Maßstab möglich, was auch der Entwicklung von markierten Substanzen zugute kam. Eine Anekdote besagt, dass Hevesy sein  $^{32}\text{P}$  von Lawrence mit der normalen Post zugeschickt bekam [22].

In den letzten 60 Jahren wurden eine ganze Reihe von sowohl diagnostischen Isotopen für die SPECT und PET als auch therapeutischen Isotopen für die Endoradiotherapie verfügbar. Neben den kurzlebigen, am Zyklotron produzierten Positronenemittern der Nichtmetalle gibt es eine sehr große Zahl von Radioisotopen anderer Elemente mit interessanten Zerfallseigenschaften. Hierbei erlangten vor allem die mit  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  markierten Verbindungen aufgrund der hohen Verfügbarkeit als  $^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$ -Radionuklidgenerator eine breite Anwendung [24]. Radioisotope anderer Elemente, wie beispielsweise des Arsens sind hingegen innerhalb der letzten Jahrzehnte nur sehr wenig untersucht worden. Allerdings wurde bereits in den 50er Jahren  $^{74}\text{As}$  zur Detektion von Hirntumoren verwendet [25]. Das Radioarsen wurde hier jedoch in einer anorganischen und geträgerten Form als  $\text{Na}_3^{74}\text{AsO}_4$  eingesetzt.

## 1.2 Arsen

Das Element Arsen hat über die Jahrtausende hinweg eine breite Anwendung auf den verschiedensten Gebieten wie Medizin, Kosmetik, Landwirtschaft und Industrie gefunden. Gleichzeitig wurde seine Verwendung immer wieder von seiner Giftigkeit überschattet. Ein trauriger Höhepunkt in der Entwicklung von Arsenverbindungen war das Giftgas Lewisit, das im ersten Weltkrieg als Massenvernichtungswaffe eingesetzt wurde. Dies hat dazu geführt, dass man heutzutage das Element Arsen mit Gift gleichsetzt. Einen guten Überblick über die Verwendung von Arsen über die Jahrtausende hinweg gibt das Buch „Is Arsenic an Aphrodisiac? The Sociochemistry of Arsenic“ von W. R. Cullen [26].

Arsen rangiert in der Liste der am Häufigsten in der Erdkruste vorkommenden Elemente auf dem 20. Platz. Es ist ubiquitär verteilt, man findet es jedoch oft in sulfidischen Erzen. Die

bekanntesten arsenhaltigen Mineralien sind rotes Arsen (Realgar,  $\text{As}_4\text{S}_4$ ), gelbes Arsen (Orpiment,  $\text{As}_2\text{S}_3$ ) und weißes Arsen (Arsentrioxid,  $\text{As}_2\text{O}_3$ ) [27]. Der Eintrag von Arsen in die Atmosphäre setzt sich sowohl aus natürlichen Faktoren wie Vulkanausbrüchen und Verwitterung von arsenhaltigem Gestein, als auch aus anthropogenen Faktoren wie der Verhüttung von Metallen und Verbrennung von fossilen Rohstoffen zusammen. Aus der Atmosphäre wird das Arsen durch Niederschläge wieder auf der Erde verteilt. Arsen kann auch durch Lösen in Wasser mobilisiert werden, was zu lokal hohen Belastungen des Oberflächenwassers führen kann. Das Verhältnis des Eintrags von Arsen durch natürliche und anthropogene Faktoren in die Atmosphäre liegt bei 60 : 40. Trotzdem findet man weltweit eine sehr große Varianz in der Verteilung von Arsen auf der Erdoberfläche, die von 0,1 bis zu mehreren hundert ppm betragen kann [28]. Wegen seiner Toxizität wird versucht, seinen industriellen Einsatz zu minimieren. Seine Verwendung als Legierungsbestandteil in Bleimunition ist eingeschränkt, die Verwendung als Balsamierungsmittel verboten. Es wird heutzutage nicht mehr zur Unkrautvernichtung angewendet und auch Farben auf Arsenpigmentbasis sind nicht mehr verfügbar.

Arsen wird heute dennoch in vielen Bereichen eingesetzt. Es ist immer noch ein Legierungsbestandteil von Bleibatterien, ein Bestandteil von Holzschutzmitteln, ein Zusatz bei der Glasherstellung und wird zur Dotierung von Germanium und Siliziumhalbleitern verwendet. Gallium- und Indiumarsenid werden bei der Produktion von Dioden, Lasern und Transistoren verwendet. Ein weiteres Anwendungsgebiet von Arsenverbindungen findet sich in der Landwirtschaft. Hier kommt es sowohl in Herbiziden als auch als Zusatzstoff für Futtermittel zum Einsatz. In der Schweine- und Geflügelmast werden Arsenverbindungen zum Entwurmen und gegen Parasiten angewendet [29].

Ein Beispiel zum allzu sorglosen Umgang mit giftigen Arsenverbindungen im beginnenden Industriezeitalter stellt die Produktion und der Verkauf von arsenhaltigen Farbpigmenten wie dem „Schweinfurter Grün“ dar [30]. Die erste arsenhaltige Kupferfarbe wurde bereits 1778 von C.W. Scheele hergestellt. Er stellte es als einen besonderen Vorteil heraus, dass die Verwendung der Farbe in Wohnungen dazu führt, dass Ungeziefer abgehalten wird. Diese Wirkung ist wohl auf die Giftigkeit der Farbe zurückzuführen. Weltweiten Ruhm erlangte das von Wilhelm Sattler ab 1814 in großen Mengen produzierte Schweinfurter Grün. Dabei handelte es sich um eine Kupfer(II)acetatarsent-Verbindung, die sich durch einen besonders schönen Grünton auszeichnete und besonders haltbar sein sollte und zu einer der beliebtesten Farben des beginnenden 19. Jahrhunderts avancierte. Mit der Farbe wurden Ballkleider, Teppiche, Vorhänge, Kerzen, sogar Backwaren und Bonbons eingefärbt. Besonders beliebt war die Farbe bei der Produktion der damals gerade aufkommenden Tapeten, die durch die Industrialisierung auch außerhalb der Adelshäuser Einzug hielten. Es gab zunächst nur bei der Verwendung der Farbe in Süßigkeiten Bedenken, was ihre Giftigkeit anbelangte, da man nur hier direkt mit ihr in Berührung kam. Zwar war bekannt, dass es bei dem Herstellungsprozess zu einer Arsenexposition der Arbeiter durch Aufnahme über den Mund oder die Haut kam,

jedoch konnte man sich nicht vorstellen, dass es nach der Verarbeitung der Farbe zu einer weiteren Arsenexposition kommen konnte. 1839 kam es zu ersten Warnungen über die Verwendung der Farbe in feuchten Räumen, da die Entstehung einer flüchtigen Arsenverbindung durch Zersetzungsprozesse der Tapeten vermutet wurde, welche Vergiftungserscheinungen hervorrufen kann. Auch wurde ein knoblauchartiger Geruch bemerkt, der von dem gasförmigen  $\text{AsH}_3$  bekannt war. Es kam zwar immer wieder zu Meldungen über Vergiftungserscheinungen in mit grüner Farbe gestrichenen, feuchten und schlecht belüfteten Zimmern, jedoch konnte kein eindeutiger Nachweis erbracht werden, dass das in der Farbe enthaltene Arsen dafür verantwortlich war. Man konnte sich einfach nicht erklären, wie das Arsen in die Atemluft gelangen sollte. 1872 wurde in Versuchen erstmals die Bildung von Schimmelpilzen auf arsenhaltiger Farbe im Labor beobachtet, die beim Zersetzen der Farbe flüchtige organische Arsenverbindungen freisetzen. Das freigesetzte Gas wurde erst 1933 eindeutig als Trimethylarsin identifiziert [31]. Die Bildung des Trimethylarsins durch den Pilz *Penicillium brevicaulis* wurde in der Folge noch weiter untersucht [32]. Erst im Jahre 1887 wurde das Arsen als Inhaltsstoff von Farben für Innenanstriche und Tapeten endgültig verboten. Es wurden noch lange Zeit weitere Fälle von Arsenvergiftung bekannt, da die bereits verarbeitete Farbe weiterhin vorhanden war. Die nun erwiesene giftige Wirkung des Schweinfurter Grüns eröffnete jedoch gleichzeitig neue Anwendungen zur Bekämpfung des Kartoffelkäfers, als Spritzmittel im Weinbau oder als Anstrich für Schiffsrümpfe, um den Algenbewuchs zu verhindern.

Napoleon Bonaparte starb am 05. Mai 1821 auf der Insel St. Helena. Obwohl als offizielle Todesursache Magenkrebs angegeben wurde, hielten sich über die Jahrhunderte die Gerüchte, dass er in Wirklichkeit an einer Arsenvergiftung starb. Die offizielle Todesursache erscheint plausibel, denn Napoleon war durch seine Familiengeschichte vorbelastet - sowohl sein Vater, als auch sein Großvater starben an dieser Art von Krebs [33, 34]. In den 60er Jahren wurde zum ersten Mal ein erhöhter Arsengehalt in Napoleons Haaren mittels Neutronenaktivierungsanalyse nachgewiesen, der auf eine chronische Arsenaufnahme hindeutet [35, 36]. Dies heizte die Debatte um eine Vergiftung Napoleons weiter an. Zwar konnte dieser Befund auch in neueren Untersuchungen bestätigt werden [37], jedoch gibt es auch andere Erklärungen für diesen hohen Arsengehalt als eine absichtliche Vergiftung. Es gab damals viele arsenhaltige Kosmetika, die er angewendet haben könnte. Auch waren arsenhaltige Medikamente wie „Fowler's Lösung“ damals durchaus in Gebrauch, so dass die erhöhten Arsenwerte in seinen Haaren auch darauf zurückzuführen sein könnten. Es gibt auch Vermutungen, wonach Napoleon zu den Arsenessern gehört haben könnte, um etwaigen Vergiftungsversuchen vorzubeugen. Eine mögliche Erklärung wäre ebenfalls eine erhöhte Arsenkonzentration in der Atemluft seines Zimmers, das mit arsenhaltiger grüner Farbe angestrichen war [29].

Ein weltweites Problem stellt auch heutzutage noch mit Arsen belastetes Trinkwasser dar. So findet man z.B. in den USA, China, Chile, Bangladesch, Argentinien, Japan und Indien zum

Teil stark erhöhte Arsenkonzentrationen im Trinkwasser. Der von der WHO vorgeschlagene Grenzwert liegt bei 10 ppb (10 µg/L). In den Industrieländern ist es kein Problem, diese Grenzwerte durch Einsatz von technischen Hilfsmitteln einzuhalten, während in nicht vollständig industrialisierten Ländern wie Bangladesch und Indien große Teile der Bevölkerung mit sehr viel stärker kontaminiertem Wasser leben müssen [38]. Die Langzeitexposition mit belastetem Wasser kann verschiedene Arten von Krebs auslösen und chronische Arsenvergiftungserscheinungen hervorrufen.

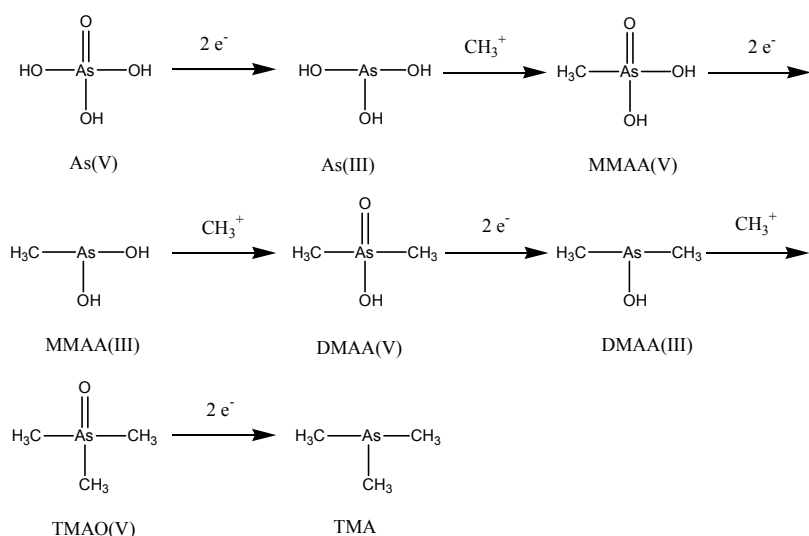
Arsen war durch die Jahrhunderte hindurch immer ein beliebtes Gift. Seine breite Anwendung als Rattengift machte es leicht verfügbar [29]. Aus der Geschichte bekannt sind z.B. die Borgias, die im 15. Jahrhundert Mord als Mittel der Politik einsetzen und dabei wahrscheinlich auch auf Arsen zurückgriffen. Aus der Sicht des Giftmischers ist Arsen eine gute Wahl, weil Arsentrioxid geruchs-, farb- und geschmacklos ist, und somit das Opfer im Vorfeld nicht misstrauisch macht. Auch gab es lange Zeit keine Möglichkeit, das Arsen sicher nachzuweisen, was seinem Einsatz als Gift sehr entgegenkam. Gerade seine häufige Verwendung in der Krimiliteratur (fast ein Viertel der Geschichten von Agatha Christie hat einen Bezug zu Arsen) mag zu seinem schlechten „Image“ beigetragen haben.

Akute Arsenvergiftungen treten heutzutage hauptsächlich in suizidaler Absicht oder in Folge von Unfällen auf [39]. Dank verfügbaren Antidoten wie BAL (British Anti Lewisit) oder DMPS (Dimercaptopropansulfonsäure) können heutzutage sogar mehrfach letale Dosen von Arsen bei sofortiger intensivmedizinischer Betreuung überlebt werden [40].

Fast genauso lang wie die Giftwirkung einer Überdosis von Arsen ist seine heilende Wirkung in der Medizin bekannt. So wurde es bereits vor über 2000 Jahren in Griechenland und China unabhängig voneinander zur Behandlung einer ganzen Reihe von Krankheiten wie Hautgeschwüren und periodischen Fiebern (z.B. Malaria) eingesetzt [27]. Im 15. Jahrhundert wurde die heilende Wirkung von Arsen in Europa langsam wieder entdeckt. Im 18. Jahrhundert entwickelte Thomas Fowler die nach ihm benannte „Fowler’s Lösung“, eine 1 %ige  $\text{As}_2\text{O}_3$ -Lösung in Kaliumbikarbonat [41]. Sie kam bei einer breiten Masse von Symptomen zum Einsatz [29]. 1878 wurde im Boston City Hospital erstmals beobachtet, dass die Arsenlösung die Zahl der weißen Blutkörperchen absenkt und somit zur Behandlung von Leukämie geeignet ist [42]. Mit dem Aufkommen der Radiotherapie und der Entwicklung moderner Chemotherapeutika geriet diese Verwendung jedoch in Vergessenheit. 1910 wurde das arsenhaltige Medikament Salvarsan von Paul Ehrlich als Mittel gegen Tuberkulose und Syphilis auf den Markt gebracht. Seit 1940 ist eine weitere Arsenverbindung, das Melarsoprol auf dem Markt. Es wirkt gegen die afrikanische Schlafkrankheit und überwindet im Gegensatz zu anderen Medikamenten auch die Blut-Hirn-Schranke [29]. In den 1990er Jahren wurde in China beobachtet, dass Arsentrioxid bei einer bestimmten Form der Leukämie (APL) sehr effektiv als Therapeutikum sowohl bei Neuerkrankungen, als auch bei Patienten

nach einer Chemotherapie eingesetzt werden konnte [43-46]. Seit einigen Jahren ist Arsentrioxid als zugelassenes Medikament Trisenox<sup>®</sup> auf dem Markt [47]. Da der Wirkungsmechanismus des Arsentrioxid nicht vollständig bekannt ist, könnte sich hier ein zukünftiges Einsatzgebiet für radioaktive Arsenisotope auftun, um z.B. die *in vivo*-Verteilung des Arsens bestimmen zu können.

Allgemein ist der Arsen-Metabolismus im Menschen bis heute noch nicht restlos aufgeklärt. Es ist jedoch bekannt, dass von den anorganischen Spezies As(III) eine höhere Toxizität als As(V) aufweist, wobei beide Spezies jedoch krebserregend sein können. Im Gegensatz dazu gelten einige organische Arsenverbindungen wie das Arsenobetain als ungiftig [48].



**Abbildung 1: Metabolismus des Arsens im Menschen [48]**

Im menschlichen Organismus werden sowohl As(V) als auch As(III) durch S-Adenosylmethionin zu Monomethylarsonsäure MMAA(V) und Dimethylarsonsäure DMAA(V) methyliert. Die Methylierung kann nur stattfinden, wenn das Arsen als As(III) vorliegt. Aus diesem Grund muss das As(V) immer zuerst durch Glutathion reduziert werden. MMAA(V) und DMAA(V) können renal ausgeschieden werden. Die dreiwertigen Intermediate MMAA(III) und DMAA(III) können im Urin nicht nachgewiesen werden, da sie wegen ihrer hohen Affinität zu Thiolen fest an Proteine gebunden vorliegen. Dies gilt auch für anorganisches As(III) und ist der Grund, warum diese Spezies besonders toxisch ist.

## Radioarsen in der Medizin

Das Element Arsen bietet eine ganze Reihe von potentiell in der Radiopharmazie einsetzbaren Radioisotopen. Trotzdem gibt es bis heute keine Verwendung für eine Routineanwendung. In den Anfängen der Positronenemissionstomographie (1950 - 1970) wurde von der Verwendung von geträgertem  $Na_3^{74}AsO_4$  zur Untersuchung von Läsionen und Tumoren des

menschlichen Gehirns berichtet [25, 49-51]. Seine Verwendung beruht im Wesentlichen darauf, dass im gesunden Gehirn eine Aktivitätsanreicherung von unter 1 % beobachtet wurde, während die Aufnahme des radioaktiven Arsens bei einem Gehirntumor jedoch drastisch erhöht ist [52]. Es sind leider nur wenige Daten über die Produktion und Aufarbeitung der Zyklotrontargets aus dieser Zeit verfügbar. Ein nahe liegender Gedanke wäre auch, die Endoradiotherapie mit  $^{76}\text{As}_2\text{O}_3$  bei Leukämie einzusetzen, da das Arsentrioxid hier bereits als nicht radioaktive Verbindung therapeutisch im Einsatz ist. Dies wurde wohl nur in Einzelfällen versucht, da die Verwendung des bekannteren  $^{32}\text{P}$  hier ähnliche bis bessere Therapieerfolge brachte [53]. Diese Daten sind allerdings schon sehr alt und wurden nicht mit heutzutage aktuellen Methoden erhalten. In Tierstudien wurde eine Reihe von Untersuchungen zur Verteilung von anorganischen Arsenspezies durchgeführt. Dabei wurden sowohl der Positronenemitter  $^{74}\text{As}$  als auch der Augerelektronenemitter  $^{73}\text{As}$  in geträgerter Form eingesetzt. Eine Studie beschäftigte mit der Detektion von subduralen Hämatomen in Hundehirnen mittels  $^{74}\text{As(V)}$  und mit  $^{131}\text{I}$ -markiertem humanen Serumalbumin [54]. Andere Studien befassten sich mit der prinzipiellen Verteilung der anorganischen Arsenspezies im Tiermodell. So untersuchten Bencko et al. [55] die Umwandlung von mit  $^{74}\text{As}$  markiertem Arsenit zu Arsenat im Urin von Mäusen. Einer Gruppe von Tieren war vorher eine toxische Arsenitkonzentration über das Trinkwasser verabreicht worden, während einer Kontrollgruppe nur das radioaktive Arsenit injiziert wurde. Einen ähnlichen Aufbau weist das Experiment von Hughes et al. auf [56]. Hier wurde einer Kontrollgruppe von Mäusen eine Einzeldosis  $^{73}\text{As}$ -Arsenat gespritzt, während eine andere Gruppe bis zu neun Einzeldosen bekamen. Hierbei wurden der zeitliche Verlauf der Metabolisierung und die chemische Form der Ausscheidungen untersucht. In einer anderen Studie untersuchten Brunet et al. [57] die Verteilung von mit  $^{73}\text{As}$  markiertem Arsentrioxid in schwangeren Mäusen mittels Autoradiographie. Ebenfalls autoradiographisch untersuchten Lindgren et al. [58] die Verteilung von mit  $^{74}\text{As}$  markiertem Arsenit und Arsenat in Mäusen und Hamstern. Der Metabolismus von trägerfreiem  $^{74}\text{As(V)}$  in Hasen wurde mit dem Ziel untersucht, Aufschlüsse über den Arsenmetabolismus im Menschen zu erhalten [59].

Es gibt auch Berichte über die Anwendung und *in vivo*-Verteilung von organischen Arsenverbindungen. So untersuchten Mego et al. [60] die Verteilung von mit  $^{74}\text{As}$  markiertem Albumin in tumortragenden Mäusen. Goetz et al. [61] synthetisierten sowohl  $^{73}\text{As}$ -markiertes Arsenobetain und Arsenocholin und deren Verteilung in Ratten. Leider wurden beide Studien mit geträgerten Arsenisotopen durchgeführt, so dass eine Übertragung der Synthesestrategie auf die dem Tracerkonzept entsprechende ungeträgerte Arsenchemie schwierig bis unmöglich erscheint.

Einen komplett anderen Ansatz verfolgte Anghileri [62]. Er suchte ein radioaktives Isotop, mit dem man Chromverbindungen markieren kann. Aufgrund der Zerfallseigenschaften wurde  $^{74}\text{As}$  ausgewählt. Die Markierung beruht darauf, dass das  $^{74}\text{As}$ -Arsenat zunächst an das

$\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$  bindet, indem es einige Wassermoleküle verdrängt. Danach kann das Chrom mit anderen Molekülen reagieren, trägt aber eine radioaktive Markierung. Auf diese Art wurde sowohl kolloidales  $^{74}\text{AsCrPO}_4$  als auch  $^{74}\text{AsCr}$ -Albumin und  $^{74}\text{AsCr}$ - $\beta$ -Glycerophosphat hergestellt. Die Verbindungen wurden in Mäusen evaluiert und ähnliches Verhalten wie mit  $^{51}\text{Cr}$ -markierten Verbindungen erhalten. Das  $^{74}\text{AsCr}$ - $\beta$ -Glycerophosphat wurde ebenfalls in Mäusen mit transplantierten Hirntumoren evaluiert und eine ähnliche Verteilung wie mit der reinen Chromverbindung erhalten [63]. Zwar wurde auch hier das Radioarsen in geträgerter Form eingesetzt, jedoch erscheint eine Überprüfung der Kompatibilität der in dieser Arbeit erarbeiteten Abtrennungsmethoden für nca Arsenisotope durchaus sinnvoll und möglich.

Einen weiteren Ansatz zur Verwendung von Arsenisotopen in der Medizin verfolgten Hosain und Emran et al. [64, 65]. Bei ihren Studien wurde am Reaktor durch Bestrahlung von  $\text{As}_2\text{O}_3$  mit Neutronen hergestelltes  $^{76}\text{As}$  verwendet. Als Markierungssynthone wird hier in einer zeitaufwändigen Prozedur nach einer Destillation bei  $355\text{ }^\circ\text{C}$  zunächst Dimethylarsinchlorid hergestellt. Dieses kann dann mit in einem zweiten Schritt mit Molekülen, die über freie SH-Gruppen verfügen, umgesetzt werden [64]. Auf diese Art wurden mit Arsen markierte Verbindungen von Mercaptoethanol und Penicillamin erhalten. Deren *in vivo*-Verhalten wurde ebenfalls im Mausmodell evaluiert [65]. Eine Übertragung der Ergebnisse auf die nca Arsenchemie erscheint jedoch fragwürdig, da die Autoren für die am Zyklotron produzierten nca Arsenisotope eine Zugabe von Arsen-Träger vorschlagen [64].

Zusammenfassend kann man sagen, dass zwar viele Ansätze zur Verwendung von Radioarsenisotopen als *in vivo*-Tracer existieren, jedoch kein Konzept restlos überzeugen kann, was in den meisten Fällen an der Zugabe von inaktivem isotonen Arsen-Träger liegt.

Der neueste Ansatz zur Verwendung der trägerfreien Arsenisotope wurde 2008 veröffentlicht. Jennewein et al. [66] berichten über die Markierung des Antikörpers Bavituximab mit nca  $^{74}\text{As}$  und anschließendem *in vivo*-imaging mittels PET. Hierbei wird die hohe Affinität des Arsens zu SH-Gruppen als Markierungsstrategie verwendet. Es werden zunächst zusätzliche SH-Gruppen in den Antikörper eingeführt, die dann mit dem  $^{74}\text{As}$  direkt reagieren. Der Antikörper richtet sich gegen Phosphatidylserin, welches auf der Oberfläche von Endothelzellen der Blutgefäße von Tumoren überexprimiert wird. Er kann somit sowohl therapeutisch als auch radioaktiv markiert als molekulare Sonde zur Tumordetektion eingesetzt werden. Das Konzept war erfolgreich und zeigte sowohl eine gute Affinität des markierten Antikörpers zum Tumor als auch eine hohe Stabilität der markierten Verbindung *in vivo*. Die vorliegende Arbeit baut in Teilen auf diesem Konzept auf, wenn auch viele Änderungen auf der kernchemischen Seite nötig waren.

### 1.3 Ionenaustauschchromatographie

Man kann die Ionenaustauschchromatographie grob in zwei Bereiche einteilen: Kationen- und Anionenaustausch. Beim Kationenaustausch werden Kationen in einer Lösung gegen auf dem Ionenaustauscherharz gebundenen Kationen ausgetauscht (z.B.  $H^+$ ). Beim Anionenaustauscherharz funktioniert dies genauso, nur dass Anionen aus der Lösung absorbiert werden und gegen zuvor gebundene Anionen ausgetauscht (z.B.  $Cl^-$ ). Der Prozess des Ionenaustauschs war lange bekannt, bevor seine Natur verstanden war. So soll schon Moses im alten Testament ein Stück Holz in einen bitteren Brunnen geworfen haben, um das Wasser wieder genießbar zu machen (Exodus 15, 23). Heute weiß man, dass verrottete Zellulose  $Mg^{2+}$  Ionen binden kann. Der Kationenaustausch ist der Wissenschaft seit Mitte des 19. Jahrhunderts bekannt [67]. Die ersten bekannten Materialien waren Tonerden oder Mineralien wie die Alumosilikate (Zeolithe). Diese kommen in der Natur vor und wurden zum Beispiel zur Enthärtung von Wasser eingesetzt. Dabei werden die Zeolithe zuerst mit NaCl-Lösung konditioniert. Die so konditionierten Zeolithe können dann die  $Ca^{2+}$ - und  $Mg^{2+}$ -Ionen aus dem Wasser binden und gegen  $Na^+$ -Ionen austauschen. Das Material kann durch Spülen mit einer konzentrierten NaCl-Lösung wieder regeneriert werden. Diese Methode wird mit moderneren Materialien heute z.B. in Geschirrspülern oder Hauswasserenthärtungsanlagen eingesetzt. Zu Beginn des 20. Jahrhunderts gelang dann die Synthese von künstlichen Zeolithen. Trotzdem wurde das Potential der Ionenaustauscher für die analytische Chemie zunächst nicht erkannt. Dies lag in der Anfangszeit sicherlich auch daran, dass keine alternativen Materialien zur Verfügung standen. Zeolithe sind nur in einem relativ engen pH-Bereich stabil, was eine quantitative Elution der absorbierten Kationen schwierig bis unmöglich macht. Eine interessante Anwendung von Ionenaustauschern ist die Lösung von schwer löslichen Verbindungen. So kann man z.B. einen Bariumsulfatniederschlag auflösen, indem man ihn mit Wasser und einem Kationentauscher schüttelt [68]. Das wenige in Lösung befindliche Barium wird kontinuierlich auf dem Ionentauscher gebunden und somit aus dem Gleichgewicht entfernt. Nach einiger Zeit ist der Niederschlag dann aufgelöst und man kann durch Titration der entstandenen Schwefelsäure den ursprünglichen Bariumgehalt errechnen. In den 1930er Jahren kamen die ersten organischen Ionenaustauschmaterialien auf wie z.B. Zellulose, die mit Sulfongruppen modifiziert war. Die Sulfonsäuregruppen besitzen einen stark sauren Charakter und können ihre Protonen gegen andere Kationen austauschen. Die ersten technisch eingesetzten Kationenaustauscher bestanden aus mit Sulfongruppen modifizierter Kohle. Heutzutage besteht das unlösliche Trägermaterial der aktiven Gruppen aus dreidimensional vernetzten Polystyrol-Divinylbenzol-Polymeren, um die Lösung des Materials in wässrigem Medium zu verhindern. Stattdessen kann das Material aufquellen. Die Eigenschaften der Harze hängen von der Struktur der aktiven Gruppen ab.

Man unterscheidet:

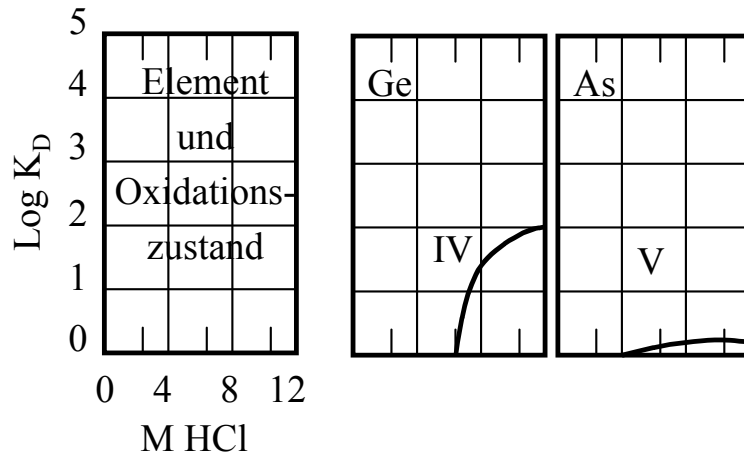
Starke Kationentauscher:	Sulfonsäuregruppen
Schwache Kationentauscher:	Carboxyl- oder Phosphonatgruppen
Starke Anionentauscher:	Quartäre Ammoniumgruppen
Schwache Anionentauscher:	Tertiäre Ammoniumgruppen

Eine wichtige Kenngröße bei der Anwendung von Ionenchromatographie zur Trennung von Elementen ist der Verteilungskoeffizient  $K_D$ . Er ist definiert als:

$$K_D = \frac{\text{Menge absorbierte Komponente/Gramm trockenes Harz}}{\text{Menge Komponente/Milliliter in flüssiger Phase}}$$

**Formel 1: Definition Verteilungskoeffizient  $K_D$**

Der Verteilungskoeffizient ist eine Maß für die Stärke der Wechselwirkung der Ionen in der Lösung mit dem Harz. Je größer der Verteilungskoeffizient für eine Ionenspezies ist, desto stärker ist auch die Wechselwirkung mit dem Harz. Will man Elemente quantitativ durch Ionenaustausch voneinander trennen, so gelingt dies in der Regel nur, wenn man die Trennung über eine Säule durchführt. Hierbei wird eine leere Chromatographiesäule mit dem gequollenen Harz befüllt und die zu trennende Probe aufgegeben. Durch fraktionierte Elution mit einem geeigneten Elutionsmittel wandern die zu trennenden Ionen langsam über die Säule. Da sich das Gleichgewicht zwischen Ionen in der Lösung und Harz immer wieder neu einstellt, können so selbst geringe Unterschiede in den Verteilungskoeffizienten dazu führen dass die Ionen in unterschiedlichen Fraktionen von der Säule eluiert und somit getrennt werden. Natürlich ist die zu erzielende Trennwirkung auf derselben Säule umso größer, je größer die Unterschiede in den Verteilungskoeffizienten sind. Die Literaturdaten liegen entweder in Form von Tabellen, oder Diagrammen vor. Hier kann man auf einen Blick den Verlauf von  $K_D$  auf einem Harz bei verschiedenen Elektrolytkonzentrationen, z.B. HCl, erkennen.



**Abbildung 2: Qualitative Darstellung des Verteilungskoeffizienten von Ge(IV) und As(V) auf dem Anionenaustauscherharz Dowex 1-X10 [69] in HCl-Lösungen**

Als Beispiel sind in Abbildung 2 die Absorptionskoeffizienten von Ge(IV) und As(V) auf dem starken Anionenaustauscher Dowex-1 X10 gegen die HCl-Konzentration aufgetragen. Will man beide Spezies gut voneinander trennen, so benötigt man Bedingungen, unter denen sich die Koeffizienten stark unterscheiden. Eine gute Trennung wäre z.B. zu erwarten, wenn man ein Gemisch beider Spezies in ca. 10 M HCl auf die Säule aufgibt und mit 10 M HCl eluiert. Dabei sollte das As(V) ohne große Wechselwirkung auf der Säule in den ersten Fraktionen eluiert werden, während das Ge(IV) unter diesen Bedingungen stark absorbiert wird. Auch wenn nur ähnliche Harze (z.B. von einer anderen Firma) verwendet werden, geben die bereits in der Literatur veröffentlichten Daten gute Anhaltspunkte für das Verhalten der Elemente auf den Säulen und die Entwicklung von neuen Trennungsstrategien.

## 1.4 Radioaktive Arsenisotope

Das Element Arsen besitzt mit  $^{75}\text{As}$  nur ein einziges stabiles Isotop und zählt damit zu den sogenannten Reinelementen. Es bietet jedoch eine ganze Reihe von radioaktiven Isotopen, die durch Bestrahlung von Germanium am Kernreaktor und Zyklotron oder über andere Kernreaktionen einfach in nicht geträgerten (nca = no carrier added) Mengen erzeugt werden können. Nca bedeutet in diesem Zusammenhang, dass kein zusätzlicher inaktiver Träger zugegeben wird. Da jedoch in allen verwendeten Chemikalien Spuren von Arsen vorhanden sind, kann korrekter Weise nicht von trägerfreien Arsenisotopen gesprochen werden. Diese Isotope bieten teilweise interessante Zerfallseigenschaften für die molekulare Bildgebung ( $^{70}\text{As}$ ,  $^{71}\text{As}$ ,  $^{72}\text{As}$ ,  $^{74}\text{As}$ ) oder die Endoradiotherapie ( $^{76}\text{As}$ ,  $^{77}\text{As}$ ). Die Halbwertszeiten (HWZ) liegen zwischen 53 Minuten und 17,8 Tagen. Durch die Wahl des geeigneten Isotops (siehe Abbildung 3) kann man die HWZ der markierten Verbindung der HWZ des zu untersuchenden biologischen Vorganges anpassen.

<b><math>^{71}\text{Se}</math></b> 4,7 min	<b><math>^{72}\text{Se}</math></b> 8,5 d	<b><math>^{73}\text{Se}</math></b> 7,1 h	<b><math>^{74}\text{Se}</math></b> 0,9	<b><math>^{75}\text{Se}</math></b> 120 d	<b><math>^{76}\text{Se}</math></b> 9,4	<b><math>^{77}\text{Se}</math></b> 7,6	<b><math>^{78}\text{Se}</math></b> 23,8	
<b><math>^{70}\text{As}</math></b> 53 min	<b><math>^{71}\text{As}</math></b> 64 h	<b><math>^{72}\text{As}</math></b> 26 h	<b><math>^{73}\text{As}</math></b> 80,3 d	<b><math>^{74}\text{As}</math></b> 17,8 d	<b><math>^{75}\text{As}</math></b> 100	<b><math>^{76}\text{As}</math></b> 26,4 h	<b><math>^{77}\text{As}</math></b> 38,8 h	<b><math>^{78}\text{As}</math></b> 1,5 h
<b><math>^{69}\text{Ge}</math></b> 39,0 h	<b><math>^{70}\text{Ge}</math></b> 21,2	<b><math>^{71}\text{Ge}</math></b> 11,2 d	<b><math>^{72}\text{Ge}</math></b> 27,6	<b><math>^{73}\text{Ge}</math></b> 7,7	<b><math>^{74}\text{Ge}</math></b> 36	<b><math>^{75}\text{Ge}</math></b> 83 min	<b><math>^{76}\text{Ge}</math></b> $\sigma$ 0,15 7,8	<b><math>^{77}\text{Ge}</math></b> 11,3 h

Abbildung 3: Ausschnitt aus der Karlsruher Nuklidkarte mit allen relevanten Arsenisotopen

Tabelle 1: Zerfallseigenschaften von Arsenisotopen [72, 73]

	$^{70}\text{As}$	$^{71}\text{As}$	$^{72}\text{As}$	$^{73}\text{As}$	$^{74}\text{As}$	$^{76}\text{As}$	$^{77}\text{As}$
$T_{1/2}$ [d]	0,0365	2,7	1,1	80,3	17,8	1,1	1,6
Kernreaktion	$^{70}\text{Ge}(p,n)^{70}\text{As}$	$^{72}\text{Ge}(p,2n)^{71}\text{As}$	$^{72}\text{Ge}(p,n)^{72}\text{As}$	$^{73}\text{Ge}(p,n)^{73}\text{As}$	$^{74}\text{Ge}(p,n)^{74}\text{As}$	$^{76}\text{Ge}(p,n)^{76}\text{As}$ $^{75}\text{As}(n,\gamma)^{76}\text{As}$	
Zerfallsart	100 % EC $\beta^+$ (91 %)	100 % EC $\beta^+$ (30 %)	100 % EC $\beta^+$ (87,8 %)	100 % EC	66 % EC $\beta^+$ (29,0 %)	100 % $\beta^-$	100 % $\beta^-$
Wichtigste $\gamma$ -Linien [keV]	949 (35,6 %) 955 (31,9 %)	175,0 (82,0 %)	834,0 (79,5 %) 629,9 (7,9 %)	53,4 (10,0 %)	595,8 (59,0 %) 634,8 (15,4 %)	559,1 (45,0 %) 657,1 (6,2 %)	239,0 (1,6 %) 520,6 (0,5 %)
Mittlere $\beta^{+-}$ -Energie [keV]	980	350	1117 1024 [73]		440 128 [73]	1070	226

$^{70}\text{As}$  ( $T_{1/2} = 52,6$  min) ist mit einer Positronenemissionsrate von 91 % ideal für PET-Untersuchungen geeignet. Es wird durch die  $^{70}\text{Ge}(p,n)^{70}\text{As}$ -Reaktion am Zyklotron produziert. Durch die kurze HWZ von 53 min kann mit diesem Isotop jedoch nur gearbeitet werden, wenn ein Zyklotron vor Ort vorhanden ist.

$^{72}\text{As}$  ( $T_{1/2} = 26,0$  h) nimmt unter den potentiell für die PET einsetzbaren Radioisotopen eine Sonderstellung ein. Es ist eines der wenigen Isotope, welches eine lange HWZ mit einer hohen Positronenemissionsrate (88 %) kombiniert. Damit ist es ideal zur Untersuchung von physiologischen Prozessen mit langer biologischer HWZ geeignet. Das Nuklid kann direkt über die Kernreaktionen  $^{72}\text{Ge}(p,n)^{72}\text{As}$  oder  $^{72}\text{Ge}(d,2n)^{72}\text{As}$  hergestellt werden. Man erhält dieses Isotop jedoch nur dann in ausreichender Isotopenreinheit, wenn man hoch angereichertes  $^{72}\text{Ge}$  als Targetmaterial verwendet. Alternativ bietet sich die Möglichkeit,  $^{72}\text{Se}$  mittels der Kernreaktionen  $^{\text{nat}}\text{Ge}(^3\text{He},3n)^{72}\text{Se}$  oder  $^{70}\text{Ge}(\alpha,2n)^{72}\text{Se}$  herzustellen.  $^{72}\text{Se}$  ( $T_{1/2} = 8,5$  d) zerfällt in  $^{72}\text{As}$ , wodurch das System als Radionuklidgenerator genutzt werden kann [74-78]. Alternativ ist es möglich,  $^{\text{nat}}\text{Germanium}$ targets zu bestrahlen und diese direkt am Tag nach der Bestrahlung zu verwenden. Dann ist  $^{72}\text{As}$  für mehrere Tage das dominante Isotop, da es im Vergleich zu  $^{74}\text{As}$  ca. 10-mal mehr produziert wird.

$^{73}\text{As}$  ( $T_{1/2} = 80,3$  d,  $\epsilon$  (100 %)) emittiert nur Augerelektronen und niederenergetische  $\gamma$ -Strahlung bei 53 keV. Es wird über die  $^{73}\text{Ge}(p,n)^{73}\text{As}$  oder die  $^{74}\text{Ge}(p,2n)^{73}\text{As}$ -Reaktion am Zyklotron hergestellt.  $^{73}\text{As}$  findet hauptsächlich in der Umweltchemie und in der Autoradiographie Verwendung [61, 79]. Bei der Bestrahlung von  $^{\text{nat}}\text{Germanium}$ targets am Zyklotron tritt es immer als Kontamination auf, die aber die PET-Messung nicht beeinflusst.

$^{74}\text{As}$  ( $T_{1/2} = 17,8$  d) ist für die Untersuchung von sehr langsamen physiologischen Prozessen mittels PET geeignet. Die Positronenemissionsrate von 29 % ist für PET-Untersuchungen sogar günstiger als bei dem sonst eingesetzten  $^{124}\text{I}$  ( $T_{1/2} = 4,17$  d,  $\beta^+$  (22,8 %)). Für dessen Produktion müssen außerdem sehr teure, hoch angereicherte  $^{124}\text{Te}$ -Targets eingesetzt werden. Parallel zur Positronenemission wird beim  $^{74}\text{As}$  34 %  $\beta^-$ -Strahlung emittiert. Dies erscheint zunächst als Nachteil, ist jedoch bei einem anderen oft verwendeten Nuklid, dem  $^{64}\text{Cu}$  ( $T_{1/2} = 12,7$  h,  $\beta^+$  (17,4 %),  $\beta^-$  (39 %)) ebenfalls der Fall.  $^{74}\text{As}$  kann durch (p,n)-Reaktion an natürlichem Germanium in hoher Isotopenreinheit hergestellt werden, da alle kurzlebigen Nebenprodukte ( $^{70}\text{As}$ ,  $^{72}\text{As}$ ,  $^{76}\text{As}$ ) innerhalb einer Woche zerfallen.

$^{76}\text{As}$  ( $T_{1/2} = 26,4$  h,  $\beta^-$  (100 %)) kann in geträgerter Form an Kernreaktoren durch Aktivierung von Arsen mit Neutronen hergestellt werden. Die natürliche Häufigkeit des  $^{75}\text{As}$  von 100 % und der relativ hohe Einfangquerschnitt von 4,3 barn resultieren in guten Produktionsraten.  $^{76}\text{As}$  hat eine mittlere  $\beta^-$ -Energie von 1 MeV und eine mittlere Reichweite im Gewebe von 5000  $\mu\text{m}$ , was es als „long range“ Nuklid für die ERT interessant macht [80]. Da es allerdings

bei einer Produktion am Reaktor immer in geträgerter Form vorliegt, ist seine Verwendung für medizinische Zwecke stark eingeschränkt. Prinzipiell kann es in nca-Form auch am Zyklotron durch Bestrahlung von angereichertem  $^{76}\text{Ge}$  über die Kernreaktion  $^{76}\text{Ge}(p,n)^{76}\text{As}$  hergestellt werden. Bei der Bestrahlung von  $^{\text{nat}}\text{Germanium}$ targets am Zyklotron entsteht es immer als Verunreinigung. Die Produktionsraten liegen jedoch unter der von  $^{72}\text{As}$ .

$^{77}\text{As}$  ( $T_{1/2} = 38,8 \text{ h}$ ,  $\beta^-$  (100 %)) ist ein weiterer  $\beta^-$ -Emitter. Es kann nur indirekt über den Zerfall von  $^{77}\text{Ge}$  ( $T_{1/2} = 11,3 \text{ h}$ ,  $\beta^-$  (100 %)) nach Bestrahlung von Germanium am Kernreaktor mit Neutronen hergestellt werden. Seine mittlere  $\beta^-$ -Energie liegt bei 226 keV und im Gewebe hat das Elektron eine mittlere Reichweite von 1200  $\mu\text{m}$ , weshalb es zu den „medium range“  $\beta^-$ -Emittern gezählt wird [80]. Prinzipiell ist es möglich, mit  $^{77}\text{As}$  markierte Verbindungen wie z.B. Antikörper für die Endoradiotherapie einzusetzen.  $^{77}\text{As}$  kann aus einem bestrahlten  $^{\text{nat}}\text{GeO}_2$ - oder  $^{\text{nat}}\text{Germanium}$ metalltarget in nca-Form abgetrennt werden. Das System  $^{77}\text{Ge}/^{77}\text{As}$  bietet den großen Vorteil, dass hier radioaktive Germanium- und Arsenisotope nebeneinander vorliegen. Es ist somit möglich, den Abtrennungsfaktor des Germaniums vom Arsen zu bestimmen. Neben der Bestimmung dieses Abtrennungsfaktors wurde das  $^{77}\text{As}$  in der vorliegenden Arbeit für alle chemischen Optimierungen eingesetzt, da es täglich über den Forschungsreaktor TRIGA Mark II des Instituts für Kernchemie der Johannes Gutenberg-Universität zur Verfügung stand.

## 1.5 Chemische Trennung von Germanium und Arsen

Aus der Literatur ist eine Vielzahl von verschiedenen Methoden zur Trennung von Germanium und Arsen bekannt. Die meisten Methoden beschränken sich jedoch auf die reine Trennung der beiden Elemente. Will man das abgetrennte Arsen jedoch z.B. zur Markierung von empfindlichen Molekülen wie Proteinen einsetzen, müssen noch weitere Randbedingungen wie z.B. eine wässrige Lösung bei neutralem pH-Wert gegeben sein. Dies erfordert weitere Reaktionsschritte, die in der Regel über eine reine Isotopentrennung hinausgehen und so nicht beschrieben sind. Erste Review-Artikel über die radiochemisch relevanten Eigenschaften von Germanium und Arsen finden sich in [81-83]. Eine Standard-Methode ist die Destillation von  $\text{GeCl}_4$ , während das  $^* \text{As}$  ( $^* \text{As}$  steht allgemein für radioaktives Arsen) durch Zugabe von Oxidationsmitteln im nicht flüchtigen Oxidationszustand  $+(V)$  gehalten wird. Im Anschluss lässt sich das  $^* \text{As}$  nach Zugabe von Reduktionsmitteln als  $\text{AsCl}_3$  abdestillieren. Auch Methoden, bei denen das  $^* \text{As}$  zuerst aus der Lösung als  $\text{As}_2\text{S}_3$  ausgefällt und nach Verdampfen von  $\text{GeCl}_4$  und Zugabe von  $\text{HI}_{\text{konz}}$  in  $\text{CHCl}_3$  extrahiert wurde, sind beschrieben. Für die Aufarbeitung von Spaltprodukten wurde auch die Reduktion zu flüchtigem  $\text{AsH}_3$  durchgeführt, um es so von anderen Elementen zu trennen. Spaltprodukte wurden auch nach Trägerzugabe direkt durch Ausschütteln von  $^* \text{As(III)}$  in  $\text{CCl}_4$  aus 10 N  $\text{HCl}$ , Rückextraktion in Wasser und Ausfällen als  $\text{As(0)}$  mittels  $\text{NaH}_2\text{PO}_2$  durchgeführt [84]. Nach Beard et al. kann  $\text{AsCl}_3$  durch Extraktion aus  $> 6 \text{ M HCl}$ -Lösung in Benzol extrahiert werden [85]. Brink et al. [86] untersuchten systematisch die Extraktion von  $\text{As(III)}$  und  $\text{Ge(IV)}$  in verschiedene Lösungsmittel aus  $\text{HCl}$ - und  $\text{HI}$ -Lösungen. Fischer et al. [87] untersuchten das Extraktionsverhalten von  $\text{As(III)}$ ,  $\text{As(V)}$ ,  $\text{Ge(IV)}$  und anderen Elementen in  $\text{CCl}_4$  aus  $\text{HCl}$ -Lösungen verschiedener Konzentrationen. Auch hier wird nur von einem Übergang des  $\text{As(III)}$  in die organische Phase berichtet. Morrison [88] berichtet über eine Trennmethode, bei der das Germanium zunächst aus  $\text{HCl}$  in Benzol extrahiert wird, während das Arsen mit Wasserstoffperoxid zu  $\text{As(V)}$  oxidiert wird und somit nicht in die organische Phase übergeht. Im Anschluss wird das  $\text{As(V)}$  mit  $\text{HBr}$  zu  $\text{As(III)}$  reduziert und in Benzol extrahiert. Das Arsen kann dann mit Hydrazin in die wässrige Phase überführt werden.

Ein Großteil der in diesen Artikeln beschriebenen Methoden basiert auf der Zugabe von inaktivem Arsen-Träger. Dies bedeutet, dass solche Methoden nicht zur Aufreinigung von nca-Arsenisotopen eingesetzt werden können. Dennoch kann man viele der verwendeten Techniken wie Destillation und Extraktion prinzipiell auf das nca-System übertragen. Die aktuellste Zusammenfassung der Radiochemie von Germanium, die Mirzadeh und Lambrecht 1996 verfassten, findet sich in [89]. Hier sind auch einige Trennungsmöglichkeiten von Arsenisotopen resümiert. Es wurden mehrere Trennungen von Germanium und Arsen mittels Destillation von  $\text{GeCl}_4$  auch ohne Trägerzusatz beschrieben [90-93]. Im Anschluss an die Destillation wurde das  $^* \text{As}$  dann entweder als  $\text{AsCl}_3$  destilliert, über eine

Ionenaustauschchromatographiesäule gereinigt oder aber nasschemisch aufgearbeitet. Auch sind mehrere Methoden zur Flüssig-Flüssig-Extraktion in organische Lösungsmittel bekannt. So berichtet Byrne eine einfache Methode, um  $^{77}\text{As}$  aus  $\text{GeO}_2$ -Targets in Toluol zu extrahieren [94]. Dabei wird das Target zunächst in  $\text{NaOH}$  gelöst und nach dem Ansäuern mit Schwefelsäure und Zugabe von  $\text{NaI}$  extrahiert. Eine ähnliche Prozedur wird von Chattopadhyay et al. [95] vorgeschlagen. Hier wird jedoch zum Ansäuern  $\text{HCl}$  verwendet, was den Umweg über eine Oxidation von  $^{77}\text{As}$  zur Reinigung von Germanium notwendig macht. Im Anschluss wird das  $^{77}\text{As}$  dann mit  $\text{HBr}$  reduziert und in Benzol extrahiert. Byrne et al. [96] untersuchten auch die Extraktion von Arsen und 16 weiteren Elementen systematisch bei verschiedenen  $\text{NaI-H}_2\text{SO}_4$ -Konzentrationen. Billinghurst et al. [97] verwendeten eine leicht modifizierte Methode, wie sie von Morrison [88] vorgeschlagen wurde. Allerdings wird hier am Zyklotron bestrahltes  $\text{GeO}_2$  eingesetzt, um  $^{74}\text{As}$  aus dem Target abzutrennen. Eine Trennung von Radio-Arsen und Radio-Selen nach einer  $^{59}\text{Co}(^{16}\text{O},\text{xn})^{70-73}\text{Br}$ -Reaktion wurde mit Hilfe von flüssigen Ionenaustauschern von Mukhopadhyay et al. realisiert [98].

Eine sehr wichtige und höchst selektive Methode um mehrere Elemente voneinander zu trennen ist die Ionenchromatographie. In den Lehrbüchern von Korkisch [71], Marhol [70] und Samuelson [67] findet man, dass sowohl Germanium als auch Arsen in beiden Oxidationszuständen keine oder nur sehr geringe Absorption auf Kationenaustauscherharzen zeigt. Deshalb sollte man diese Elemente auch so nicht voneinander trennen können. Es ist jedoch möglich, durch Kationenaustausch andere Elemente von Germanium und Arsen abzutrennen. Nelson et al. bestimmten für viele Elemente die Verteilungskoeffizienten in  $\text{HBr}$  [99] und  $\text{HCl}$  bzw.  $\text{HClO}_4$  [100] auf dem Kationenaustauscher Dowex 50-X4. Sie beobachteten in  $\text{HBr}$ -Lösungen eine geringe Absorption von  $\text{As(III)}$ , während Germanium etwas stärker absorbiert wurde. In  $\text{HCl}$  und  $\text{HClO}_4$ -Lösungen wurde jedoch keine Absorption beobachtet. Strelow et al. [101] konnten in  $\text{HCl/Aceton}$  Gemischen einen Verteilungskoeffizienten für  $\text{As(V)}$  von bis zu 9,7 auf dem Kationenaustauscher AG 50W-X8 messen.

Erfolgversprechender scheint jedoch die Verwendung von Anionenaustauschern, um die Elemente Germanium und Arsen zu trennen. Hier ist eine ganze Reihe von experimentellen Daten für die Absorption auf dem starken Anionentauscher AG 1-X8 in verschiedenen Medien bestimmt wurden. Auch liegen hier schon Daten zur Trennung von Germanium und Arsen aus der Literatur vor. Nelson et al. [102] haben sowohl die Absorptionskoeffizienten von  $\text{As(III)}$ ,  $\text{As(V)}$  und  $\text{Ge(IV)}$  in  $\text{HCl}$ -Lösungen auf AG 1-X8 bestimmt als auch einen Vorschlag für die Trennung von  $\text{As(V)}$  und  $\text{Ge(IV)}$  gemacht. Nach Yoshino [103] verhalten sich die Elemente in  $\text{HCl}$ -Lösungen ähnlich auf dem Austauschharz Dowex 2. Eine Übersicht über das Verhalten von Arsen, Germanium und anderen Elementen auf dem Anionenaustauscher AG 1-X8 findet sich für  $\text{HCl}$ -Medium in [69, 104] und für Gemische aus  $\text{HF/HCl}$  in [105]. Peters et al. bestimmten die Verteilungskoeffizienten von vielen Elementen

im HCl/Wasser/Aceton Gemisch auf AG 1-X8 [106]. Das Verhalten von Arsen und anderen Elementen auf AG 1-X8 im Essigsäure-Medium wurde ebenfalls untersucht [107, 108]. Korkisch et al. beschreiben eine Trennung von Germanium und Arsen auf einem AG 1-X8 Harz unter Verwendung von HCl/Essigsäure-Gemischen [109]. Eine ganze Reihe von Veröffentlichungen beschreibt das Verhalten von Arsen in reinen Säuren wie Oxalsäure [110], HF [111], H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> [112] oder Gemischen aus HF/HNO<sub>3</sub> [113, 114], HF/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> [115], HF/HCl [116] oder HF/NH<sub>4</sub>F [117]. Leider fehlen hier jeweils die Daten für Ge(IV). Es gibt jedoch auch einige vorgeschlagene Abtrennungsmethoden, die am System Ge/As experimentell getestet wurden. So trennen Schindewolf et al. [118] Germanium von Arsen, indem sie ein Germaniumtarget nach der Bestrahlung in HF und HNO<sub>3</sub> lösen und es dann auf einer AG 1-X8-Säule in verdünnter HF-Lösung auftrennen. Dabei absorbieren Germanium und Gallium sehr stark, während As(III) keine und As(V) nur eine geringe Wechselwirkung mit der Säule aufweisen. Das Harz wurde hierfür zuvor von der Chlorid- in die Fluorid-Form überführt. Basile et al. [119] trennen <sup>74</sup>As aus einem am Zyklotron bestrahlten Germaniumtarget, indem sie eine Grobabtrennung nach Schindewolf durchführen und dann eine zweite Säule mit einem HF/HCl-Gemisch zur Reinigung benutzen. Jennewein et al. [120] entwickelten eine Festphasenextraktionsmethode zur Trennung von Germanium und \*As. Dabei wird das GeO<sub>2</sub>-Target zunächst in HF<sub>konz</sub> gelöst. Dabei bildet sich direkt GeF<sub>6</sub><sup>2-</sup>. Nach Zugabe von NaI wird die Lösung über eine Bond Elut ENV Kartusche aufgereinigt. Dabei wird das \*As als \*AsI<sub>3</sub> auf der Säule fixiert, während das Germanium ohne Wechselwirkung durch die Säule hindurchläuft. Nach dem Trocknen der Säule im Argonstrom kann das \*As mit Ethanol von der Säule eluiert werden. Diese Methode ist die einzige bisher beschriebene, die zu einer erfolgreichen Markierung von Antikörpern mit nca \*As verwendet wurde.

Tolmachev et al. [121] schlagen eine Trennung von \*As und GeO<sub>2</sub> mittels trockener Destillation vor. Dabei wird ein am Zyklotron bestrahltes GeO<sub>2</sub>-Target in einem Ofen auf 1105 °C erhitzt, um das flüchtige \*As aus dem Target im Luftstrom zu entfernen. Die Aktivität wird auf einem Stück Glaswolle absorbiert und nasschemisch aufgearbeitet. Dabei kann es je nach Aufarbeitung als \*As(III) oder \*As(V) erhalten werden. Der Verlust an GeO<sub>2</sub> liegt bei dieser Methode bei unter 1 %. Das Target kann also ohne aufwändige Aufarbeitung mehrfach zur Bestrahlung verwendet werden.

Es wurden auch noch andere Methoden beschrieben, die etwas abseits der Standardtechniken liegen, aber trotzdem interessante Ansätze bieten könnten. So trennten Maki et al. [122] <sup>77</sup>As(V), <sup>77</sup>As(III) und <sup>77</sup>Ge(IV) über Dünnschichtchromatographie an Silikagel in Methanol / Wasser / HCl-Gemischen als Laufmittel. Ähnliches beschreiben Miketukova et al. [123], allerdings trennten sie mehrere Arsenspezies von anderen Metallen durch Papierchromatographie und Laufmittelgemische aus Methanol und Ammoniak. Genet et al. [124] beschreiben die Trennung von Ge(IV), As(III) und As(IV) durch Papierelektrophorese. Caletka et al. [125] entwickelten eine Trennungsmethode für Arsen, Germanium und andere

Metalle, die darauf beruht, dass Germanium bei hohen HCl-Konzentrationen quantitativ auf einer Silikagel-Säule absorbiert wird, während andere Metalle wie Gallium, Zink und Arsen mit 8 M HCl von der Säule eluiert werden können. Die Autoren schlagen sogar einen  $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Generator mit Silikagel als Absorber für das  $^{68}\text{Ge}$  vor, von dem mit 10 M HCl das  $^{68}\text{Ga}$  eluiert werden kann.

Aus den genannten Publikationen können nun verschiedene Strategien zur Trennung von Germanium und Arsen abgeleitet werden. Bei Flüssig-Flüssig-Extraktionen kann man aus der Literatur resümieren, dass nur das As(III) in organische Lösungsmittel extrahiert wird, während As(V) in der wässrigen Phase zurückbleibt. Eine Trennung von Germanium und Arsen in HCl-Lösungen erscheint nicht sinnvoll, da sowohl As(III) als auch  $\text{GeCl}_4$  aus konzentrierter HCl (< 8 M) parallel in die organische Phase übergehen. Man kann jedoch unter Verwendung anderer Säuren, wie z.B. Schwefelsäure oder Flusssäure, die Bildung von  $\text{GeCl}_4$  verhindern, so dass eine andere, nicht in die organische Phase extrahierbare Spezies entsteht. Ein Vorteil der Flüssig-Flüssig-Extraktion ist die Möglichkeit der Rückextraktion des Arsens in die wässrige Phase, was zu As(III) in einer neutralen Lösung (pH 7) führen sollte. Diese Möglichkeit wird in einigen Artikeln vorgeschlagen, die die Analyse von Arsengehalten in Böden zum Ziel hatten [126-128].

Eine weitere Möglichkeit ist die Trennung von Germanium und Arsen durch Destillation von  $\text{GeCl}_4$ . Diese wird in der Literatur einheitlich in HCl-Lösungen unter Verwendung eines Oxidationsmittels wie Wasserstoffperoxyd oder Salpetersäure durchgeführt, damit das Arsen als nicht flüchtiges \*As(V) vorliegt. Da die Abtrennung des Germaniums hierbei nicht vollständig ist, kann man an die Destillation eine Trennung über eine Anionenaustauschersäule anschließen. Bei der Verwendung von 10 M HCl als Elutionsmittel sollte die Trennung von \*As(V) und Ge(IV) möglich sein [102]. Im Anschluss könnte man das \*As(V) zu \*As(III) reduzieren und mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion zunächst in organisches und dann wieder in wässriges Medium extrahieren. Ein Vorteil der Verwendung der destillativen Abtrennung von Germanium und Arsen besteht darin, dass sowohl  $\text{GeO}_2$ - als auch Germaniummetalltargets verwendet werden können.

Nach [105] besitzen Germanium und As(V) ein deutlich verschiedenes Absorptionsverhalten auf Anionenaustauschern im HF/HCl-Medium. Es sollte also ebenfalls möglich sein, beide Elemente über eine reine Säulentrennung ohne vorhergehende Destillation voneinander zu trennen. Dabei sollte man das \*As(V) wie oben beschrieben am Ende mit 10 M HCl eluieren und somit wieder durch Flüssig-Flüssig-Extraktion am Ende \*As(III) in neutralem wässrigem Medium erhalten können.

## 1.6 Monoklonale Antikörper

Es ist bereits seit über einhundert Jahren bekannt, dass spezifisch bindende Biomoleküle wie Antikörper aus Blutseren gewonnen werden können. Die klassische Methode beruht auf der Immunisierung von Versuchstieren. Dabei wird ausgenutzt, dass das Immunsystem von Säugetieren auf die Anwesenheit von Fremdstoffen (Antigene) mit der Produktion von Antikörpern reagiert. Diese Antikörper sind große Proteine, die bestimmte Teile des Antigens (Determinanten) erkennen und spezifisch an es binden können. Durch diese Bindung können die Antigene inaktiviert werden [129]. Ein Antigen kann jedoch auch mehrere Determinanten aufweisen, was zur Bildung von verschiedenen spezifischen Antikörpern führt. Die aus diesem Verfahren gewonnenen Antiseren stellen immer ein Gemisch verschiedener Immunglobuline dar und die in ihnen enthaltenen Antikörper werden als polyklonal bezeichnet [130]. Für viele Anwendungen ist es jedoch nicht ratsam, ein Gemisch von verschiedenen Antikörpern z.B. zur Therapie von Krankheiten einzusetzen. Eine Alternative besteht in der Verwendung von monoklonalen Antikörpern.

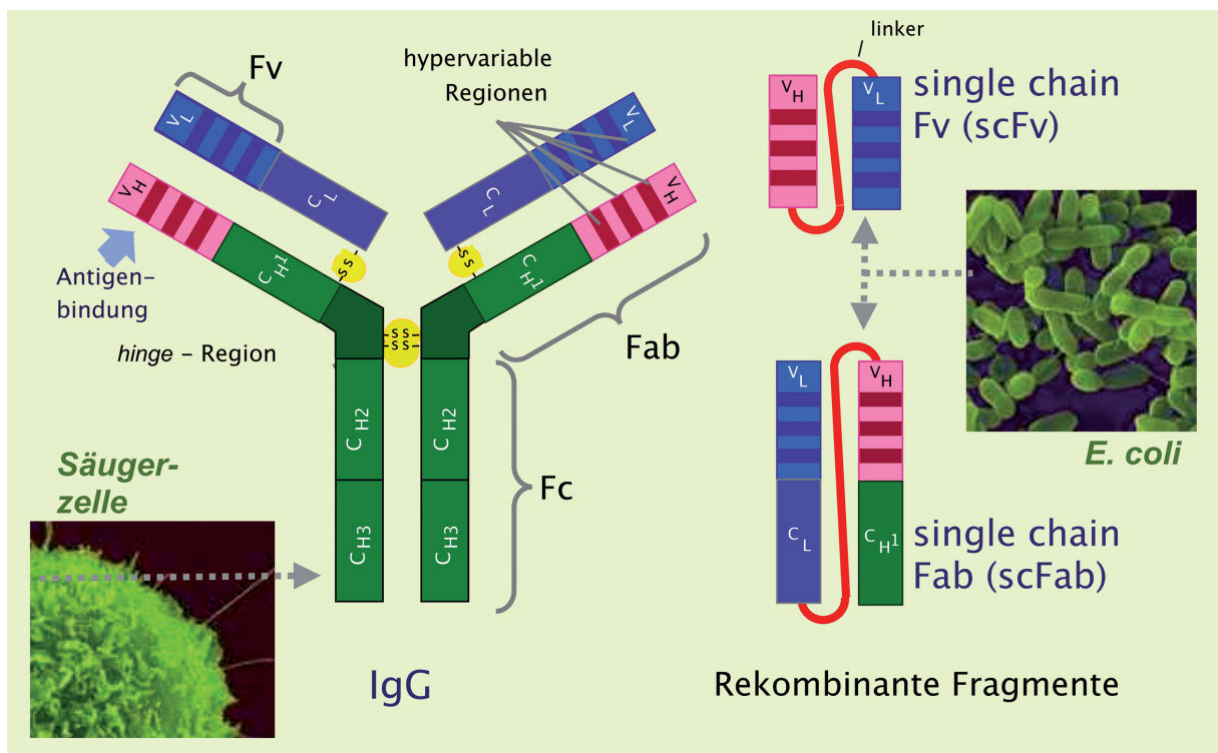


Abbildung 4: Struktureller Aufbau eines IgG-Antikörpers und von Antikörperfragmenten [131]

Sie bestehen aus identischen Molekülen, die sich nur gegen eine einzige Determinante richten. Seit den 1970er Jahren können sie relativ einfach hergestellt werden, indem den Tieren nach der Immunisierung die B-Zellen, die die Antikörper produzieren, aus der Milz entnommen. Nach der Fusion mit Myelomzellen können sich die so genannten Hybridomzellen nun ungehemmt vermehren und *in vitro* große Mengen des benötigten Antikörpers produzieren [129]. So wurden mit der Zeit einige monoklonale Maus-Antikörper

entwickelt, die sich gegen Proteine auf der Oberfläche von Tumorzellen richten. Der potentielle Nutzen für die Diagnostik und Therapie im Menschen ist in der Praxis jedoch eher gering, da das menschliche Immunsystem wiederum Antikörper gegen diesen Maus-Antikörper bildet und so eine effektive Behandlung verhindert.

Einen Ausweg bildet die Generierung so genannter chimärer Antikörper, die aus einem humanen Antikörpergerüst und den für die Antigenbindung verantwortlichen Fv-Fragmenten des ursprünglichen Maus-Antikörpers bestehen (Abbildung 4). Dies unterdrückt die menschliche Immunantwort jedoch noch nicht ganz. Auf dem Gebiet der Humanisierung von Antikörpern wurden jedoch in den letzten Jahren mit Hilfe gentechnischer Methoden weitere Erfolge erzielt. Auch werden heutzutage immer öfter Antikörperfragmente (scFv und scFab) eingesetzt. Die Anwendung von Antikörpern bleibt jedoch keineswegs auf eine Therapie von Krankheiten beschränkt. Sie werden unter anderem auch zur Reinigung von biologischen Substanzen verwendet. Ein wichtiges Einsatzgebiet sind Immunoassays, mit denen biologische Substanzen identifiziert und ihre Konzentration bestimmt werden kann. Auch können verschiedene Zellen durch die Antigene auf ihrer Oberfläche mittels Antikörpern identifiziert werden [132].

In dieser Arbeit wurde vorwiegend der humanisierte monoklonale Antikörper Bevacizumab (Handesname Avastin<sup>®</sup>) für alle chemischen Versuche verwendet. Bevacizumab gehört ebenfalls zur Gruppe der IgG-Immunglobuline und ist ein Angiogenesehemmer, der sich gegen den VEGF-Rezeptor (Vascular Endothelial Growth Factor) richtet. Der Antikörper hemmt die Neubildung von Blutgefäßen innerhalb von Tumoren und behindert so ihr weiteres Wachstum. Bevacizumab ist unter Anderem zur Behandlung von metastasierten kolorektalen Karzinomen in Verbindung mit einer Chemotherapie zugelassen. Dabei werden Dosen von 5 mg/kg Körpergewicht im Abstand von 2 Wochen gegeben [133]. Bevacizumab besitzt ebenfalls eine Zulassung zur Behandlung von Lungenkrebs, worüber ebenfalls klinische Studien vorliegen [134]. Seine Verwendung als Modellsystem zur Demonstration der Markierung von Antikörpern mit Arsenisotopen beruht auf seiner hervorragenden Verfügbarkeit und dem geringen Preis.

## 2 Problemstellung und Zielsetzung

Heutzutage ist eine große Zahl von mit Positronenemittern markierten Verbindungen für die quantifizierbare molekulare Bildgebung mittels PET verfügbar. Für viele Anwendungen gibt es Verbindungen, die mit Positronenemittern optimaler Zerfallscharakteristik markiert werden können. Eine gewisse Lücke gibt es aber bei der Versorgung mit langlebigen Positronenemittern, die benötigt werden, um relativ langsame physiologische Prozesse wie z.B. die Anreicherung von Antikörpern in Tumorgewebe zu beobachten und zu quantifizieren. Es gibt einige wenige Isotope, die eine längere und für solche Fragestellungen relevante Halbwertszeit besitzen (Tabelle 2). Unter diesen wenigen Kandidaten befinden sich neben den prominenten Isotopen  $^{64}\text{Cu}$  ( $T_{1/2} = 12$  h,  $\beta^+$  (17,6 %)) und  $^{124}\text{I}$  ( $T_{1/2} = 4,15$  d,  $\beta^+$  (22,7 %)) auch zwei Isotope des Arsens:  $^{72}\text{As}$  ( $T_{1/2} = 26$  h,  $\beta^+$  (88 %)) und  $^{74}\text{As}$  ( $T_{1/2} = 17,8$  d,  $\beta^+$  (29 %)). Die lange HWZ der Radioarsenisotope prädestiniert sie für die Entwicklung von radioaktiv markierten Substanzen, die eine langsame Pharmakokinetik von bis zu mehreren Tagen aufweisen.

**Tabelle 2: Auswahl einiger langlebiger Positronenemitter [135]**

<i>Isotop</i>	<i>T<sub>1/2</sub> [h]</i>	<i>Mittlere E<sub>β+</sub> [keV] (%)</i>	<i>E<sub>γ</sub> [keV] (%)</i>
$^{71}\text{As}$	65,0	352 (28)	175 (82), 327 (3), 500 (4), 1095 (4)
$^{72}\text{As}$	26,0	1117 (64), 1528 (16)	834 (80), 629 (8)
$^{74}\text{As}$	426,5	408 (26), 701 (3)	596 (59), 635 (15)
$^{55}\text{Co}$	17,5	436 (26), 649 (46)	931 (75), 477 (20)
$^{64}\text{Cu}$	12,7	278 (18)	1346 (0,5)
$^{69}\text{Ge}$	39,1	272 (2), 522 (21)	574 (13), 872 (12), 1107 (36)
$^{124}\text{I}$	100,2	687 (12), 974 (11)	603 (63), 723 (10), 1691 (11)
$^{90}\text{Nb}$	14,6	662 (51)	141 (67), 1129 (93), 2319 (82)
$^{57}\text{Ni}$	35,6	314 (7), 369 (35)	127 (17), 1378 (82), 1920 (12)
$^{86}\text{Y}$	14,7	535 (12), 681 (6)	628 (33), 1077 (83), 1153 (31)
$^{89}\text{Zr}$	78,4	396 (23)	909 (99)

Aus diesem Grund besteht das Ziel dieser Arbeit in der kern- und radiochemischen Forschung bezüglich solcher Arsenisotope, die zur Markierung von monoklonalen Antikörpern mit radioaktiven Arsenisotopen, um deren lange HWZ voll ausnutzen zu können. Dazu sollte ein Markierungssynthon entwickelt werden, das neben der Markierung von Antikörpern auch die Markierung von anderen Molekülen wie z.B. modifizierten Polymeren ermöglichen sollte. Die prinzipielle Machbarkeit wurde bereits in einem „proof of principle“-Experiment in einer vorangegangenen Arbeit demonstriert [66, 136]. Hier konnte der markierte Antikörper sogar mittels PET im geeigneten Tumormodell *in vivo* evaluiert werden. Im Gegensatz zu vielen in der Radiopharmazie eingesetzten Elementen, deren Produktion, Targetaufarbeitung und Markierungsschemie in den letzten Jahren intensiv untersucht wurde (z.B. das mittels Radionuklidgenerator produzierte  $^{68}\text{Ga}$  [137]) und die zum Teil sogar kommerziell in

konstanter Qualität verfügbar sind, sind diese Punkte beim Arsen bis auf einige wenige fundamentale Daten hinaus bis zum jetzigen Zeitpunkt weitgehend unerforscht.

Da zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit die Markierung von monoklonalen Antikörpern in Mainz nicht etabliert war, sollten alle notwendigen Arbeitsschritte basierend auf früheren Erfahrungen [66, 136] nachvollzogen, optimiert und wo nötig verändert werden. Dazu zählen alle Schritte von der Isotopenproduktion an Kernreaktor und Zyklotron, über die Abtrennungsschemie des Radioarsens aus den bestrahlten Targets bis hin zur Markierung der Proteine. Dabei sollte die gesamte Prozedur zunächst mit dem am Kernreaktor produzierten  $^{77}\text{As}$  optimiert werden, um danach auf die am Zyklotron erzeugten Radioarsenisotope übertragen zu werden. Diese Strategie sollte zum einen wegen der guten Verfügbarkeit des nca  $^{77}\text{As}$  durch Bestrahlungen am Kernreaktor TRIGA Mark II am Institut für Kernchemie in Mainz, als auch wegen der Produktions- und Transportkosten der externen Bestrahlungen am Zyklotron, verfolgt werden. Die zu bewältigenden Aufgaben sind im Einzelnen:

#### 1. Auswahl des richtigen Targetmaterials und Optimierung der Isotopenproduktion

Radioarsenisotope können durch Bestrahlung von Germanium am Kernreaktor mit Neutronen (nca  $^{77}\text{As}$ ) oder am Zyklotron mit Protonen (nca  $^{72/74}\text{As}$ ) produziert werden. Als Targetmaterial stehen sowohl Germanium(IV)oxid, als auch Germaniummetall zur Auswahl. Während beide Materialien problemlos am Kernreaktor in jeder physikalischen Form (Pulver, Metallstück, Lösung, usw.) bestrahlt werden können, müssen für Bestrahlungen am Zyklotron Targets mit definierter Form hergestellt werden, da der Protonenstrahl einen definierten Durchmesser von 1 cm besitzt. Es sollte hierbei untersucht werden, ob sich eine gepresste Germanium(IV)oxid Tablette, oder eine Germaniummetallscheibe besser eignet. Im Zuge dieser Versuche sollte insbesondere die simultane Produktion der Positronenemitter  $^{72/74}\text{As}$  durch Erhöhung des Strahlstromes optimiert werden. Diese Optimierungsversuche zur Isotopenproduktion sollten erstmals am MC32NI-Zyklotron des Deutschen Krebsforschungszentrums in Heidelberg durchgeführt werden. Von großem Interesse sind hierbei die Produktionsausbeuten der einzelnen bei den Bestrahlungen erzeugten Isotope. Diese Daten werden insbesondere zur Planung späterer in vivo-Experimente benötigt. Die Bestrahlungen mit Neutronen sollten am TRIGA Mark II Reaktor des Instituts für Kernchemie in Mainz durchgeführt werden.

#### 2. Separation der nca Arsenisotope aus dem Targetmaterial

Das Problem der Targetaufarbeitung kann im Prinzip auf die Trennung von makroskopischen Mengen Germanium von mikroskopischen Mengen Radioarsen reduziert werden, da alle für diese Arbeit relevanten Arsenisotope durch Bestrahlung von Germaniumtargets mit Neutronen oder Protonen erhalten werden können. Bei der Trennung von Arsen und

Germanium soll in einem ersten Schritt die vorhandene Abtrennungsmethode für Germanium(IV)oxid [120] etabliert und optimiert werden. Alternativ sollen neue Abtrennungsmethoden für GeO<sub>2</sub>-Targets und Germaniummetalltargets etabliert oder neu entwickelt werden. Besonderes Augenmerk soll dabei sowohl auf eine möglichst gute Abtrennung des Targetmaterials als auch auf eine möglichst hohe Ausbeute der gereinigten Radioarsen-Fraktion gelegt werden. Aus den Literaturdaten für die verwendeten Kernreaktionen ist bekannt, dass verschiedene andere radioaktive Isotope andere Elemente wie z.B. Zink und Gallium als Kontaminationen in geringen Ausbeuten produziert werden [138]. Diese Kontaminationen sollten mittels Gammaskopie in den radioaktiven Proben identifiziert und wenn möglich ihre Abtrennung während der Targetaufarbeitung vom Radioarsen erreicht werden.

### 3. Überführung des Radioarsens in eine zur Markierung von Proteinen geeigneten Lösung und Speziation des Oxidationszustandes

Nach einer erfolgreichen Abtrennung des Radioarsens aus der Targetlösung muss es in ein Medium und eine chemische Form überführt werden, in der eine Markierungsreaktion möglich ist. Für empfindliche Biomakromoleküle wie monoklonale Antikörper bedeutet dies ein wässriges Medium unter physiologischen Bedingungen. Dies bedeutet, dass das Radioarsen aus den konzentrierten Säuren, in die Targetmaterialien zunächst gelöst werden müssen, in eine neutrale Lösung bei pH-Werten von ca. 7 überführt werden muss. Dazu soll geprüft werden, ob die Flüssig-Flüssig-Extraktion in organische Medien und anschließende Rückextraktion in wässriges Medium dies bewerkstelligen kann. Ein weiteres Problem in diesem Zusammenhang ist, dass das Radioarsen in zwei Oxidationszuständen vorliegen kann (\*As(III) und \*As(V)). Es besteht die begründete Vermutung, dass nur \*As(III) in der Lage ist mit Proteinen, die SH-Gruppen besitzen, zu reagieren. Deshalb soll ein einfaches chromatographisches System zur Unterscheidung der beiden Oxidationszustände mittels Radio-DC etabliert werden. Dies bietet zum Einen die Möglichkeit, den Oxidationszustand des Radioarsens während der Targetaufarbeitung zeitnah zu bestimmen, zum Anderen kann die These, dass nur das \*As(III) mit SH-Gruppen reagiert, überprüft werden.

### 4. Markierung von Proteinen am Beispiel von monoklonalen Antikörpern

Um Proteine oder andere Moleküle mit radioaktiven Arsenisotopen markieren zu können, müssen diese freie SH-Gruppen aufweisen. Diese bilden dann kovalente Bindungen zum Arsen aus. Monoklonale Antikörper weisen in der Regel keine solchen freien SH-Gruppen auf. Folglich müssen diese erst in das Molekül eingeführt werden. Als Modellverbindung wurde der monoklonale Antikörper Bevacizumab (Avastin<sup>®</sup>) ausgewählt, an dem alle Optimierungsversuche der Markierungsstrategie getestet werden sollten. Dazu sollte zum

Einen auf die aus vorhergehenden Arbeiten bekannte Methode der Modifizierung der Antikörper mit SATA zurückgegriffen werden [66, 136]. Dabei werden zusätzliche, zunächst acetyl-geschützte SH-Gruppen in das Molekül eingeführt, die während oder kurz vor der Markierung entschützt werden können. Zum Anderen sollte eine alternative Methode der Direktmarkierung unter Verwendung von TCEP als Reduktionsmittel erarbeitet werden. Hierbei wird eine gewisse Zahl von Disulfidbrücken im Antikörper gespalten, um freie Cysteinreste zu generieren, die dann mit dem \*As reagieren können. TCEP stellt hierbei aus chemischer Sicht ein ideales Reduktionsmittel dar, da es selbst keine SH-Gruppen aufweist und somit nicht mit dem Radioarsen reagiert.

#### 5. Phantommessungen von $^{72}\text{As}$ und $^{74}\text{As}$ an der Kleintier-PET-Kamera Focus 120 der Universität Mainz

Da  $^{72/74}\text{As}$  nicht zu den Standard-Isotopen in der molekularen Bildgebung zählen, sind hier auch keinerlei Daten über die zu erwartende Auflösung am Kleintier-PET-Scanner bekannt. Deshalb sollten von  $^{72}\text{As}$  und  $^{74}\text{As}$  am Kleintier-PET-Scanner Phantome gemessen und mit  $^{18}\text{F}$  verglichen werden, um erste Daten über die zu erwartende Qualität von PET-Bildern zu erhalten.

#### 6. *In vivo*-Evaluierung der mit \*As markierten Antikörper

Nach dem erfolgreichen Abschluss all dieser Arbeiten soll dann die *in vivo*-Evaluierung der mit den Positronenemittern  $^{72/74}\text{As}$  markierten Antikörper im Tiermodell am Kleintier-PET erfolgen.

## 3 Ergebnisse und Diskussion

### 3.1 Bestrahlungen

#### 3.1.1 Wahl des Targetmaterials

Prinzipiell kann  ${}^{77}\text{As}$  sowohl durch Bestrahlung von  $\text{GeO}_2$ , als auch durch Bestrahlung von Germaniummetall mit Neutronen hergestellt werden. In vorhergehenden Arbeiten zur Produktion von  ${}^{77}\text{As}$  wurde  $\text{GeO}_2$  als Targetmaterial verwendet [120], da es sich sehr gut in konzentrierter Flusssäure ( $\text{HF}_{\text{konz}}$ ) löst. Zu Beginn dieser Arbeit wurde ebenfalls  $\text{GeO}_2$  als Targetmaterial zur Produktion von  ${}^{77}\text{As}$  eingesetzt. Ein Nachteil ist jedoch, dass es sich bei  $\text{GeO}_2$  um ein Pulver handelt, was im Umgang mit offener Radioaktivität immer ein erhöhtes Kontaminations- und Unfallrisiko bedeutet. Die für die Zyklotronbestrahlungen hergestellten  $\text{GeO}_2$ -Presslinge tendierten dazu, leicht auseinander zu brechen. Ein weiterer Nachteil von  $\text{GeO}_2$  besteht darin, dass sich bei Langzeitbestrahlungen (ca. 1 Woche) an den Hochflussreaktoren BER II in Berlin und FRM II in München kleine Mengen von unlöslichem Material bildeten. Das Problem trat jedoch in viel größerem Umfang bei den ersten Bestrahlungen am Zyklotron auf. Hier wurde aufgrund der viel größeren thermischen Belastung des Materials bei Strahlströmen  $> 3 \mu\text{A}$  eine Art „Brandschaden“ im ursprünglich weißen Material beobachtet (Abbildung 5).

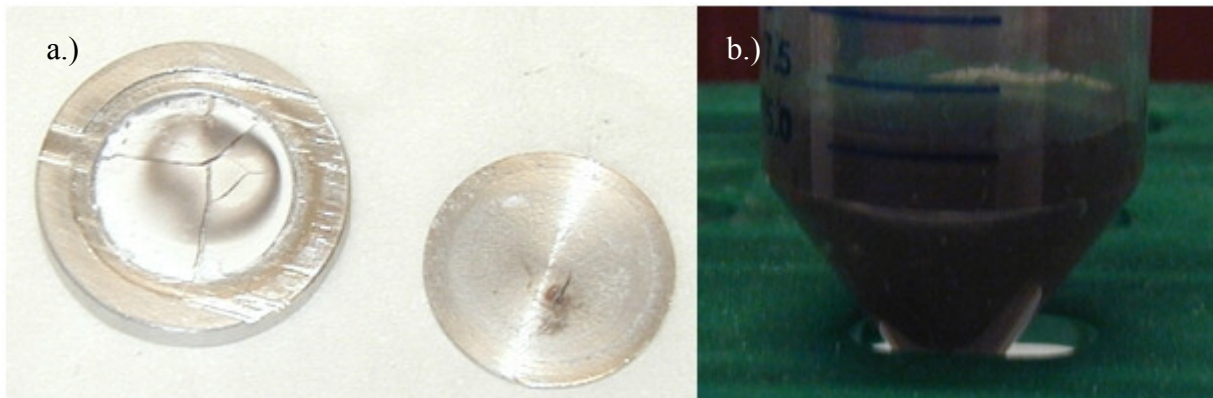
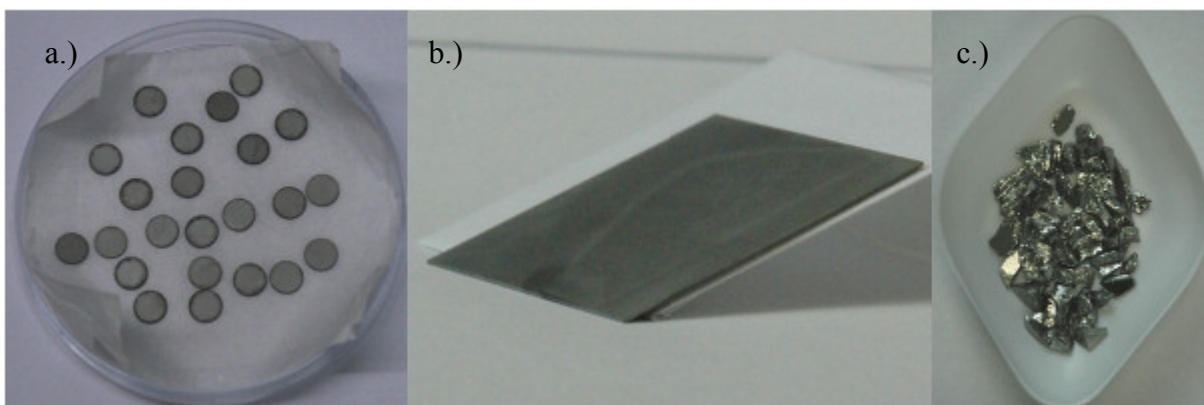


Abbildung 5: a.)  $\text{GeO}_2$  Zyklotrontarget nach Bestrahlung b.)  $\text{GeO}_2$  Zyklotrontarget nach Lösen in  $\text{HF}_{\text{konz}}$

Dies ist auf die schlechte thermische Leitfähigkeit im  $\text{GeO}_2$ -Pulver und den schlechten Kontakt des Presslings mit dem ihn umgebenden gekühlten Aluminiumcontainer zurückzuführen. Jeder Pressling hat eine etwas andere Dicke und kann so nicht optimal in den Container eingepasst werden. Beim Versuch, solche Targets in  $\text{HF}_{\text{konz}}$  zu lösen, wurde in den meisten Fällen eine schwarze Lösung mit unlöslichen Schwebstoffen erhalten. Die Verluste beim Filtrieren und Restanhaftungen des Materials in der Bestrahlungsdose betragen bis zu 50 %, bevor mit der chemischen Aufarbeitung überhaupt begonnen werden konnte. Der

schwarze Feststoff löst sich nach Zugabe von Oxidationsmitteln wie Wasserstoffperoxyd restlos in der  $\text{HF}_{\text{kon}}$  auf (und damit das in ihm enthaltene  $^{72/74}\text{As}$ ), was ein indirekter Beleg dafür ist, dass sich bei dem Radiolyseprodukt um elementares Germanium handelt.

Zur Anwendung von Arsenisotopen für die PET müssen größere Mengen an Radioaktivität erzeugt werden. Dazu ist die Verwendung von höheren Strahlströmen ( $> 20 \mu\text{A}$ ) absolut notwendig. Dies war jedoch unter den gegebenen Umständen unter Verwendung von  $\text{GeO}_2$  als Targetmaterial nicht möglich. Um dennoch zu hohen Kernreaktionsausbeuten zu gelangen, musste eine Lösung für das Problem der zerstörten Targets gefunden werden. Diese besteht in der Verwendung von Germaniummetall. Es steht in zwei Reinheitsgraden zur Verfügung. Für die Reaktorbestrahlungen, bei denen die Targetgeometrie keine Rolle spielt, wurden je 100 - 200 mg schwere Germaniumstücke in einer Reinheit von 99,9999+ % eingesetzt (Abbildung 6). Für das Zyklotron sind diese unförmigen Stücke jedoch nicht einsetzbar, da man eine ebene Oberfläche für einen guten thermischen Kontakt mit der Kühlung braucht. Deshalb wurden 50x50x0,5 mm große Germaniumplatten (99,999 %) am Institut für Mikrotechnik in Mainz mit einem Laser in 9,9x0,5 mm große Scheiben (je 200 mg) geschnitten. Diese passten dann in die Targethalterung eines anderen Strahlrohres des Zyklotrons, das mit einer optimierten Kühlung ausgestattet ist.



**Abbildung 6: a.) Zyklotron Germaniumtargets b.) Germaniumplatte c.) Reaktor Germaniumtarget**

Auf der anderen Seite musste die Chemie der Targetaufarbeitung komplett neu entwickelt werden, da sich Germaniummetall weder in  $\text{HF}_{\text{konz}}$ , noch in  $\text{HCl}_{\text{konz}}$  ohne Zugabe von Oxidationsmitteln löst. Laut Zertifikat lag der Gehalt an inaktivem Arsen im Targetmaterial für Bestrahlungen am Zyklotron bei 0,1 ppm, was einen Arsengehalt pro Target von 266 pmol (20 ng) bedeutet. Für das Germaniummetall, welches für Bestrahlungen am Reaktor verwendet wurde, liegt kein Analysenzertifikat vor. Da seine Reinheit jedoch höher ist, kann man zumindest davon ausgehen, dass nicht mehr inaktives Arsen im Material enthalten ist.

### 3.1.2 Produktion von $^{77}\text{As}$ durch Bestrahlungen am Kernreaktor

Die Bestrahlungen am Reaktor verlaufen relativ einfach, da man die Probe lediglich in eine Bestrahlungskapsel einfüllt und in die verschiedenen Bestrahlungspositionen am Reaktorkern herablässt. Dabei ist die Geometrie und chemische Form (Germaniummetall oder  $\text{GeO}_2$ ) des verwendeten Materials zweitrangig. Der Sauerstoff im  $\text{GeO}_2$  bildet nur sehr kurzlebige Aktivierungsprodukte ( $^{19}\text{O}$ ;  $T_{1/2} = 27,1 \text{ s}$ ).

Der TRIGA Mark II Reaktor bietet zwei mögliche Bestrahlungspositionen. Im Zentralen Bestrahlungsrohr (ZB) liegt der Neutronenfluss bei  $4 \cdot 10^{12} \text{ n} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , aber es bietet nur Platz für eine Probe. Die Produktionsausbeuten von  $^{77}\text{As}$  und  $^{77}\text{Ge}$  Isotopen im ZB bei einem 6 h Bestrahlungs- und 18 h Abklingzyklus für ein 100 mg Germaniumtarget zeigt Tabelle 3.

Die zweite Bestrahlungsposition am TRIGA Reaktor ist das Karussell. Es befindet sich in einem Ring um den Reaktorkern, wo der Neutronenfluss ca. um den Faktor 7 geringer ist. Dementsprechend ist auch die produzierte Aktivität geringer. Der Vorteil dieser Position besteht darin, dass mehrere Proben zur selben Zeit bestrahlt werden können.

**Tabelle 3: Produktionsraten bei einer 6 h Bestrahlung von 100 mg Ge-Metall im ZB am TRIGA**

<i>Nuklid</i>	<i>[kBq]/100 mg Ge-Metall</i>
$^{77}\text{As}$	$2075 \pm 153$
$^{77}\text{Ge}$	$1533 \pm 90$
$^{72}\text{Ga}$	$3,05 \pm 0,3$
$^{69\text{m}}\text{Zn}$	$< 1$

Die produzierten Mengen an  $^{77}\text{As}$  von ca. 2 MBq sind ausreichend, um chemische Versuche durchzuführen, reichen jedoch nicht, um groß angelegte *in vivo*-Studien durchzuführen. Dazu muss an Hochflussreaktoren bestrahlt werden.

Neben den erwünschten Kernreaktionen werden außerdem durch die Verwendung von Targetmaterialien natürlicher Isotopenzusammensetzung noch die Germaniumisotope  $^{71}\text{Ge}$  ( $T_{1/2} = 11,2 \text{ d}$ ) und  $^{75}\text{Ge}$  ( $T_{1/2} = 83 \text{ m}$ ) gebildet.  $^{71}\text{Ge}$  zerfällt unter Elektroneneinfang ohne Gammaemission in stabiles Gallium.  $^{75}\text{Ge}$  zerfällt unter  $\beta^-$ -Emission in stabiles  $^{75}\text{As}$ . Dies erhöht die Menge an inaktivem Träger aber nicht signifikant. Außerdem werden mit schnellen Neutronen noch über (n,p)- und (n, $\alpha$ )-Reaktionen Gallium- und Zinkisotope produziert. Details zu den Einfangquerschnitten finden sich in Tabelle 4 und Tabelle 5.

**Tabelle 4: Kernreaktionen von <sup>nat</sup>Ge mit thermischen Neutronen [138]**

Targetnuklid	Häufigkeit [%]	Kernreaktion	Einfangquerschnitt [ $\sigma$ ]	$T_{1/2}$ Produktkern
<sup>70</sup> Ge	20,7	<sup>70</sup> Ge(n, $\gamma$ ) <sup>71m</sup> Ge	280 $\pm$ 70 mb	20,0 ms
		<sup>70</sup> Ge(n, $\gamma$ ) <sup>71g</sup> Ge	3,15 $\pm$ 0,16 b	11,2 d
		<sup>70</sup> Ge(n, $\gamma$ ) <sup>71g</sup> Ge (cum)	3,43 $\pm$ 0,2 b	11,2 d
<sup>72</sup> Ge	27,5	<sup>72</sup> Ge(n, $\gamma$ ) <sup>73</sup> Ge	980 $\pm$ 90 mb	stabil
<sup>73</sup> Ge	7,7	<sup>73</sup> Ge(n, $\gamma$ ) <sup>74</sup> Ge	15 $\pm$ 2 b	stabil
<sup>74</sup> Ge	36,4	<sup>74</sup> Ge(n, $\gamma$ ) <sup>75m</sup> Ge	143 $\pm$ 14 mb	48,9 s
		<sup>74</sup> Ge(n, $\gamma$ ) <sup>75g</sup> Ge	260 $\pm$ 60 mb	82,8 m
		<sup>74</sup> Ge(n, $\gamma$ ) <sup>75g</sup> Ge (cum)	383 $\pm$ 70 mb	82,8 m
<sup>76</sup> Ge	7,7	<sup>76</sup> Ge(n, $\gamma$ ) <sup>77m</sup> Ge	92 $\pm$ 10 mb	54,3 s
		<sup>76</sup> Ge(n, $\gamma$ ) <sup>77g</sup> Ge	50 $\pm$ 20 mb	11,3 h

**Tabelle 5: Kernreaktionen von <sup>nat</sup>Ge mit schnellen Neutronen [138]**

Targetnuklid	Häufigkeit [%]	Kernreaktion	Einfangquerschnitt [ $\sigma$ ]	$T_{1/2}$ Produktkern
<sup>70</sup> Ge	20,7	<sup>70</sup> Ge(n,p) <sup>70</sup> Ga	6,5 (+3,9,-2,6) mb	21,1 m
		<sup>70</sup> Ge(n, $\alpha$ ) <sup>67</sup> Zn	1 (+0,8,-0,5) mb	stabil
		<sup>70</sup> Ge(n,2n) <sup>69</sup> Ge	59 (+40,-25) $\mu$ b	39,2 h
<sup>72</sup> Ge	27,5	<sup>72</sup> Ge(n,p) <sup>72</sup> Ga	180 (+180,-90) $\mu$ b	14,1 h
		<sup>72</sup> Ge(n, $\alpha$ ) <sup>69m</sup> Zn	25 $\pm$ 6 $\mu$ b	13,9 h
		<sup>72</sup> Ge(n, $\alpha$ ) <sup>69m+g</sup> Zn	120 (+100,-55) $\mu$ b	57 m
		<sup>72</sup> Ge(n,2n) <sup>71</sup> Ge	130 (+100,-50) $\mu$ b	11,2 d
<sup>73</sup> Ge	7,7	<sup>73</sup> Ge(n,p) <sup>73</sup> Ga	490 (+750,-300) $\mu$ b	4,88 h
		<sup>73</sup> Ge(n, $\alpha$ ) <sup>70</sup> Zn	4,4 (+3,5,-2,0) mb	stabil
		<sup>73</sup> Ge(n,2n) <sup>72</sup> Ge	7 (+5,-3) mb	stabil
<sup>74</sup> Ge	36,4	<sup>74</sup> Ge(n,p) <sup>74</sup> Ga	20 (+30,-12) $\mu$ b	8,2 min
		<sup>74</sup> Ge(n, $\alpha$ ) <sup>71m</sup> Zn	2,5 $\pm$ 1,3 $\mu$ b	3,97 h
		<sup>74</sup> Ge(n, $\alpha$ ) <sup>71m+g</sup> Zn	8 (+6,-4) $\mu$ b	2,4 m
		<sup>74</sup> Ge(n,2n) <sup>73</sup> Ge	230 (+160,-90) $\mu$ b	stabil
<sup>76</sup> Ge	7,7	<sup>76</sup> Ge(n,p) <sup>76</sup> Ga	1 (+1,5,-0,6) $\mu$ b	27,1 s
		<sup>76</sup> Ge(n, $\alpha$ ) <sup>73</sup> Zn	9,6 (+0,5,-0,3) $\mu$ b	23,5 s
		<sup>76</sup> Ge(n,2n) <sup>75m+g</sup> Ge	510 (+360,-200) $\mu$ b	48,9s + 82,8 m

Die produzierte Aktivität der Gallium- und Zinkisotope ist am TRIGA sehr gering. Zum Einen ist der Neutronenfluss am TRIGA um den Faktor 100 kleiner als an Hochflussreaktoren. Auch der Anteil der schnellen Neutronen, die die Nebenprodukte produzieren, ist hier bauartbedingt viel kleiner. Dennoch sollte eine Abtrennungsmethode für radioaktives Arsen aus Reaktor- und Zyklotronproduktion auch diese beiden Elemente abtrennen können. Bei einer angestrebten Produktion von <sup>77</sup>As in therapeutisch notwendigen Mengen von einigen GBq erhöht sich natürlich auch die unerwünschte Begleitaktivität. Zum Anderen wird am Zyklotron <sup>67</sup>Ga ( $T_{1/2} = 78,3$  h) als Nebenprodukt in größerem Maßstab produziert, welches auf jeden Fall vor einer Verwendung des Arsens abgetrennt werden muss.

### 3.1.3 Produktion von nca Arsenisotopen am Zyklotron

Am Zyklotron werden die Arsenisotope  $^{70,71,72,73,74,76}\text{As}$  durch (p,xn)-Reaktionen an  $^{\text{nat}}\text{Ge}$  hergestellt. Anders als bei Kernreaktionen am Kernreaktor hat man am Zyklotron die Möglichkeit, die Energie der Projektile (in diesem Fall der Protonen) in gewissen Grenzen zu wählen. Dafür ist eine genaue Kenntnis der Anregungsfunktion der gewünschten Kernreaktion absolut notwendig. Die Anregungsfunktionen für die (p,x)-Reaktionen an  $^{\text{nat}}\text{Ge}$  sind in der Vergangenheit mehrfach gemessen worden [119, 139, 140]. Die neueste Untersuchung zu diesem Thema aus dem Jahr 2007 findet sich in [141]. Hier wurden die gemessenen Daten mit Simulationsrechnungen und den älteren Daten von [119] und [139] verglichen.

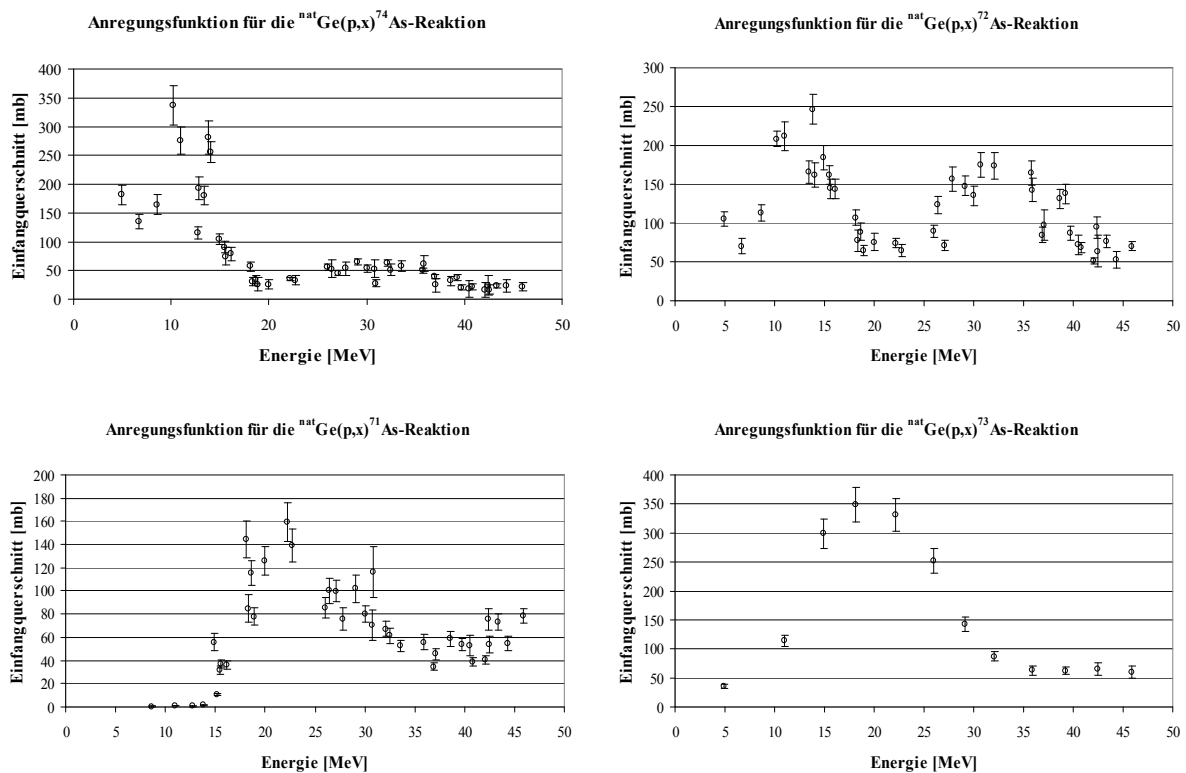


Abbildung 7: Anregungsfunktionen für  $^{\text{nat}}\text{Ge}(p,x)^*\text{As}$ -Reaktionen [141]

Ein Blick auf die Daten zeigt, dass es bei der Verwendung von  $^{\text{nat}}\text{Ge}$  als Targetmaterial nicht möglich ist, die verschiedenen Arsenisotope unabhängig voneinander zu produzieren. Dies war jedoch aufgrund verschiedener Randbedingungen die einzige Möglichkeit, Germaniummetall als Target einzusetzen. Zum Einen ist isotopenangereichertes Material sehr teuer, zum Anderen war die verwendete 500  $\mu\text{m}$  dicke  $^{\text{nat}}\text{Ge}$ -Platte das einzige kommerziell verfügbare Material in der richtigen Geometrie.

Für die Bestrahlungen am DKFZ Zyklotron in Heidelberg wurde eine Protonenenergie von 15 MeV auf der Targetoberfläche ausgewählt. Dies erscheint für die Produktion von  $^{74}\text{As}$

sinnvoll, da die Anregungsfunktion für die  $^{74}\text{Ge}(p,n)^{74}\text{As}$ -Reaktion ein Maximum bei ca. 10 MeV aufweist. Durch die Abbremsung der Protonen innerhalb des 500  $\mu\text{m}$  dicken Germaniummetalltargets liegt das Maximum der Anregungsfunktion noch im Target. Bei dieser Energie kann man die Bildung des  $^{71}\text{As}$ , wie aus Abbildung 7 ersichtlich ist, weitgehend unterdrücken. Dies zeigen auch die in dieser Arbeit bestimmten Werte für die Produktionsausbeuten der hergestellten Nuklide (Tabelle 6). Unter diesen Bedingungen findet auch die Produktion von  $^{72}\text{As}$  statt. Im Vergleich zum  $^{74}\text{As}$  liegt dieses Isotop bei Bestrahlungsende in ca. 10-mal höherer Aktivität vor. Will man  $^{72}\text{As}$  in höheren Ausbeuten herstellen, könnte man mit etwas höheren Protonenenergien die integrale Ausbeute noch etwas erhöhen. Im Gegenzug produziert man allerdings auch wiederum mehr des unerwünschten  $^{71}\text{As}$ , da hier das Maximum der Anregungsfunktion bei ca. 22 MeV liegt. In der Literatur [141] wird für das  $^{72}\text{As}$  im Energiebereich von 18  $\rightarrow$  8 MeV eine mögliche Produktionsrate von 92,8 MBq/ $\mu\text{Ah}$  angegeben. Dieser theoretische Wert wird im realen System allerdings nicht annähernd erreicht. Der für 15 MeV Protonen gemessene Wert (Tabelle 6) liegt hier nur bei ca. 10 %. Gleiches gilt für die Produktion von  $^{74}\text{As}$ , die theoretisch bei 6,8 MBq/ $\mu\text{Ah}$  liegen soll. Die in der vorliegenden Arbeit experimentell bestimmten Ausbeuten sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

**Tabelle 6: Gemessene Produktionsausbeuten für Arsenisotope bei Bestrahlungsende (EOB) ( $E_p = 15$  MeV, 30  $\mu\text{A}$ , 1 h)**

<i>Nuklid</i>	<i>MBq/<math>\mu\text{Ah}</math> bei EOB</i>	<i>kBq/<math>\mu\text{Ah}</math> bei EOB</i>	<i>MBq/<math>\mu\text{Ah}</math> bei EOB</i>	<i>kBq/<math>\mu\text{Ah}</math> bei EOB</i>
$E_p$ (MeV)	*9,3	*9,3	15	15
$^{71}\text{As}$ ( $T_{1/2} = 65$ h)		$47,5 \pm 17,6$		113,3
$^{72}\text{As}$ ( $T_{1/2} = 26$ h)	$7,13 \pm 0,6$		20,8	
$^{73}\text{As}$ ( $T_{1/2} = 80$ d)		nicht bestimmt		nicht bestimmt
$^{74}\text{As}$ ( $T_{1/2} = 17,8$ d)	$0,75 \pm 0,1$		2,01	
$^{76}\text{As}$ ( $T_{1/2} = 26$ h)	$2,6 \pm 0,25$		3,01	
$^{67}\text{Ga}$ ( $T_{1/2} = 78,3$ h)		$40,3 \pm 10,26$		399,5

\* nachträgliche Berechnungen der Abbremsung der Protonen vor der Targetoberfläche (Havar-Folie, Aluminiumabdeckung) ergaben, dass unter den gewählten Bedingungen die Protonenenergie, die in dieser Arbeit mit 15 MeV angegeben wird, bei nur 9,3 MeV lag. Dies erklärt auch zum Teil die deutlich hinter der Theorie zurückliegenden Produktionsausbeuten. Es konnte nur eine Bestrahlung mit 15 MeV durchgeführt werden (rechte Spalten). Hierbei lagen die Produktionsausbeuten näher an den aus der Theorie zu erwartenden Werten.

Die Produktionsausbeuten wurden mit Targets bestimmt, die für 1 h mit Strömen zwischen 20 und 30  $\mu\text{A}$  bestrahlt wurden. Da die Bestrahlungsdauer klein gegen die Halbwertszeit der produzierten Nuklide ist, treten hier noch keine Sättigungseffekte auf, welche die Werte stark verfälschen würden.

In dieser Arbeit wurden Germaniummetalltargets mehrfach mit Ladungen von bis zu 100  $\mu\text{Ah}$  bestrahlt (in der Regel mit ca. 30  $\mu\text{A}$  Strahlstrom), was in berechneten Ausbeuten von ca. 700 MBq  $^{72}\text{As}$  und ca. 80 MBq  $^{74}\text{As}$  resultierte.

Für die Anregungsfunktion von  $^{76}\text{As}$  liegen nur wenige Daten vor [119]. Sie sieht ähnlich wie die der anderen Isotope aus, besitzt jedoch wie das  $^{74}\text{As}$  ein Maximum bei ca. 10 MeV.  $^{76}\text{As}$  wird bezogen auf  $^{72}\text{As}$  bei den gewählten Bedingungen nur zu ca. 30 % hergestellt. Dies entspricht in etwa dem, was man aufgrund der geringeren Isotopenhäufigkeit im Germaniumtarget erwarten würde. Trotzdem bleibt es aufgrund der identischen Halbwertszeit von 26 h immer eine Begleitaktivität des  $^{72}\text{As}$ . Da  $^{76}\text{As}$  über keinerlei Positronenemission verfügt, stört es die Verwendung des so produzierten  $^{72}\text{As}$  für die PET nicht, kann jedoch zu einem erhöhten Untergrund durch zufällige  $\gamma$ -Koinzidenzen beitragen.

Die Anregungsfunktion von  $^{73}\text{As}$  zeigt eine sehr breite Verteilung. Bei der gewählten Protonenenergie von 15 MeV liegt man allerdings schon nahe am Maximum der Anregungsfunktion bei 20 MeV. Deshalb kann man davon ausgehen, dass  $^{73}\text{As}$  ebenfalls in messbaren Mengen produziert wird. Eine Messung des  $^{73}\text{As}$  ist aufgrund der geringen Energie der einzigen Gammalinie bei 53 keV sehr schwierig, da diese in der Regel im Untergrund der hochenergetischen Linien der anderen Arsenisotope verschwindet. Da das Target für eine Messung des  $^{73}\text{As}$  erst mehrere Monate abklingen muss, bis das  $^{74}\text{As}$  zerfallen ist, wurde auf eine Bestimmung der genauen Produktionsausbeute verzichtet. In die Aktivierungsgleichung  $A(t) = \phi \cdot \sigma \cdot N(1 - e^{-\lambda t})$  geht neben der Zahl der Targetatome (N) auch die HWZ des gebildeten Nuklids in die gebildete Aktivität (A(t)) mit ein. Wegen der um den Faktor 4 längeren Halbwertszeit des  $^{73}\text{As}$  und wegen der um den Faktor 5 geringeren Isotopenhäufigkeit des  $^{73}\text{Ge}$  kann man abschätzen, dass die gebildete Aktivität von  $^{73}\text{As}$  ca. um den Faktor 20 unter der Aktivität des  $^{74}\text{As}$  liegen sollte. Das  $^{73}\text{As}$  stört bei der Verwendung von  $^{72,74}\text{As}$  als Positronenemitter für die PET nicht, sorgt jedoch für eine zusätzliche Dosis.

Aufgrund des gewählten Setups (Bestrahlung von natürlichem Germaniummetall mit  $E_p = 15$  MeV, 20  $\mu\text{A}$  für bis zu 5 h, Ladung 100  $\mu\text{Ah}$ ) kann man aus den in Tabelle 6 erhaltenen Produktionsausbeuten den zeitlichen Verlauf der Arsenaktivitäten für ein 100  $\mu\text{Ah}$ -Target berechnen (Tabelle 7 und Abbildung 8). Man nun zwei Strategien verfolgen, um zu positronenemittierendem  $^*\text{As}$  zu kommen. Entscheidet man sich für die Verwendung von  $^{72}\text{As}$ , so muss man das Germaniummetalltarget direkt am Tag nach der Bestrahlung verarbeiten. Dann ist  $^{72}\text{As}$  das dominante Nuklid und die in der PET Kamera gemessene Strahlung wird von seinen Zerfallseigenschaften bestimmt. Die Aktivität des  $^{72}\text{As}$  fällt zwar bereits nach ca. 4 Tagen unter die des  $^{74}\text{As}$ , jedoch bleibt  $^{72}\text{As}$  bis ca. 6 Tage nach EOB aufgrund seiner um den Faktor 3 höheren Positronenemission für PET-Messungen das dominante Nuklid. Danach überwiegt das langlebige  $^{74}\text{As}$ .

Die andere Möglichkeit besteht in der Verwendung des  $^{74}\text{As}$ . Hierzu bestrahlt man mit  $100\ \mu\text{Ah}$  (Strahlstrom  $20 - 30\ \mu\text{A}$ ) und lässt das Target danach mindestens eine Woche abklingen. Nach 7 Tagen beträgt die Positronenemission von  $^{72}\text{As}$  nur noch 40 % der von  $^{74}\text{As}$ . So erhält man fast isotonenreines  $^{74}\text{As}$  mit kleinen Verunreinigungen der anderen Arsenisotope (Tabelle 7).

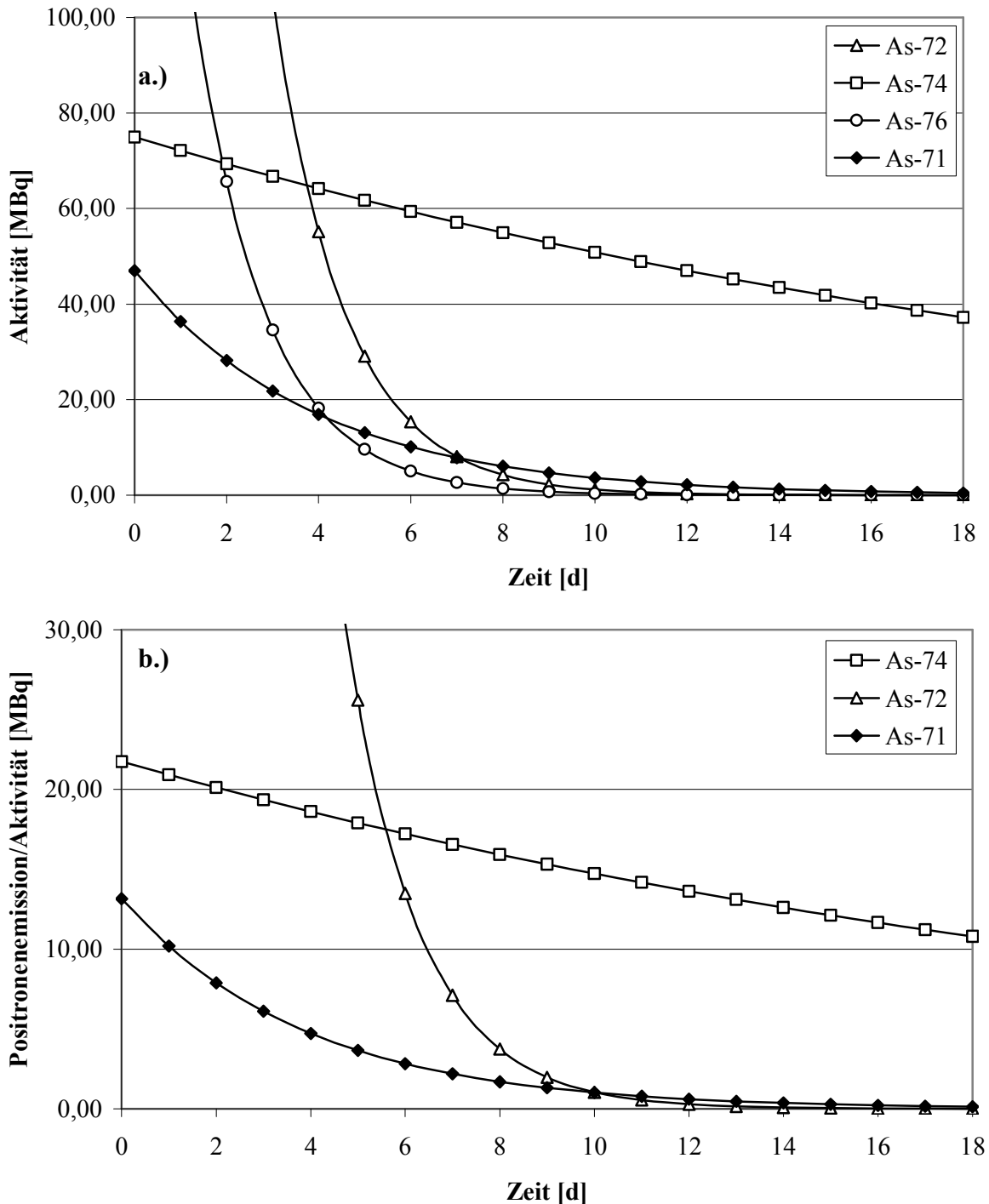


Abbildung 8: Zeitlicher Verlauf der Aktivität (a.) und der Positronenemission (b.) der am Zyklotron erzeugten Radioarsenisotope ( $E_p = 15\ \text{MeV}$ ,  $20\ \mu\text{A}$ , 5 h)

**Tabelle 7: Berechnete Aktivität bei EOB und zeitlicher Aktivitätsverlauf der am Zyklotron produzierten Radioarsenisotope ( $E_p = 15 \text{ MeV}$ ,  $20 \mu\text{A}$ ,  $5 \text{ h}$ )**

<i>Zeit [d]</i>	$^{72}\text{As}$ [MBq]	$^{74}\text{As}$ [MBq]	$\beta^+$ -Emission $^{72}\text{As}/^{74}\text{As}$	$^{71}\text{As}$ [MBq]	$^{76}\text{As}$ [MBq]
0 (EOB)	713,0	75,0	28,8	47,0	236,0
1	376,0	72,1	15,8	36,4	124,5
2	198,3	69,4	8,7	28,2	65,6
3	104,6	66,7	4,8	21,8	34,6
4	55,2	64,2	2,6	16,9	18,3
5	29,1	61,7	1,4	13,1	9,6
6	15,3	59,3	0,8	10,1	5,1
7	8,1	57,1	0,4	7,8	2,7
8	4,3	54,9	0,2	6,1	1,4
9	2,2	52,8	0,1	4,7	0,7
10	1,2	50,8	0,07	3,6	0,4

Ein weiterer positiver Nebeneffekt der Protonenenergie von 15 MeV besteht darin, dass kein  $^{68}\text{Ge}$  ( $T_{1/2} = 270 \text{ d}$ ) produziert wird. Dieses kann potentiell über eine  $^{nat}\text{Ge}(p,pxn)^{68}\text{Ge}$ -Reaktion erzeugt werden und führt dazu, dass der gesamte radioaktive Abfall als „ $\beta$ -Lang Abfall“ entsorgt werden müsste. Die Produktion dieses Isotops beginnt erst bei Protonenenergien  $> 20 \text{ MeV}$  [139]. Es ist erstaunlich, dass sich überhaupt keine Germaniumisotope im Target nachweisen lassen. Dafür findet man eine kleine Menge von  $^{67}\text{Ga}$ , das über eine  $^{70}\text{Ge}(p,\alpha)$ -Reaktion erzeugt wird.

## 3.2 Gammaskopie der relevanten Radioisotope

Die Aufnahme von hochaufgelösten Gammaskopie mit HPGe-Detektoren ist insbesondere im Hinblick auf die Trennung von  $^{77}\text{As}$  von  $^{77}\text{Ge}$  besonders wichtig, da die Gammalinien mit der höchsten Intensität der beiden Nuklide nur 25 keV auseinander liegen. Die Gammastrahlung wird immer im Anschluss an den radioaktiven Zerfall durch Abregung der angeregten Zustände in den Tochterkernen emittiert. Sie hat für jedes Nuklid eine charakteristische Zusammensetzung und stellt für jedes Isotop eine Art Fingerabdruck dar, aufgrund dessen das jeweilige Nuklid qualitativ identifiziert werden kann. Es ist mit Hilfe eines Energie- und Effizienz-geeichten Detektors möglich, die absolute Aktivität der gemessenen Probe zu bestimmen. Die Energieauflösung des verwendeten HPGe-Detektors liegt bei ca. 1 keV. Im Anschluss sollen die Spektren der zum Themenkomplex gehörenden Nuklide gezeigt und diskutiert werden.

### 3.2.1 Gammaskopie von $^{76}\text{As}$

Reines  $^{76}\text{As}$  (Abbildung 9) wurde für Vorversuche durch Bestrahlung von  $\text{As}_2\text{O}_5$  am Reaktor hergestellt. Bei den Zyklotronbestrahlungen zur Produktion von  $^{72,74}\text{As}$  entsteht es als Nebenprodukt. Allerdings liegt es hier immer im Gemisch mit anderen Nukliden vor. Die Gammalinien des  $^{76}\text{As}$  mit Emissionswahrscheinlichkeiten über 0,5 % finden sich in Tabelle 8.

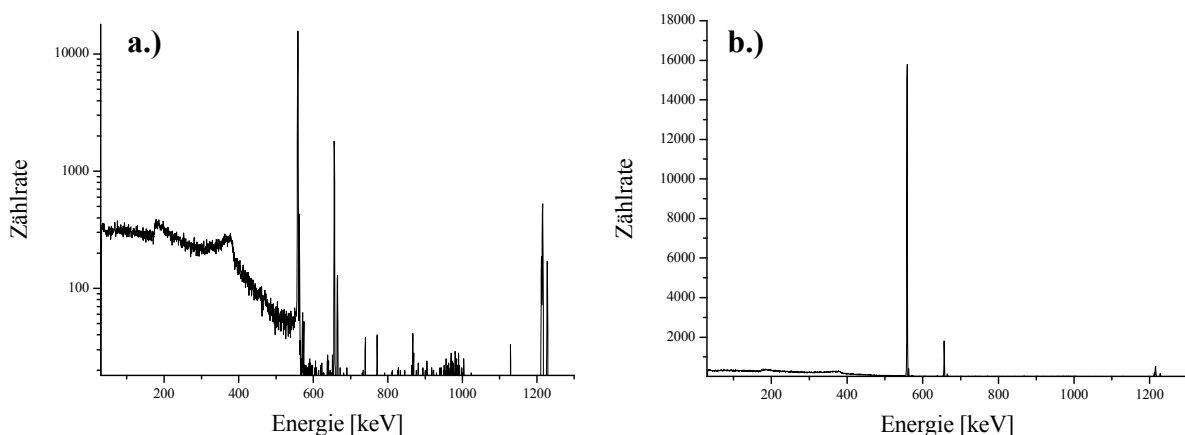


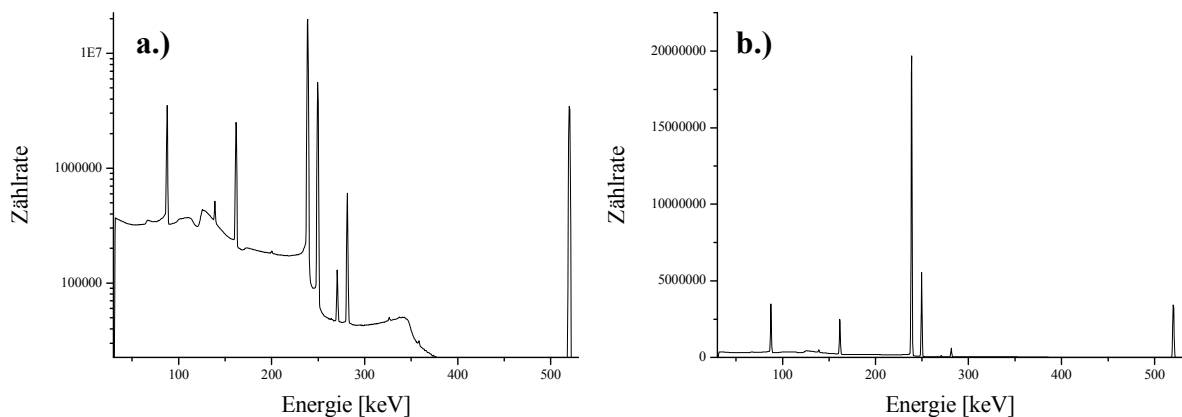
Abbildung 9: Gammaskopie von  $^{76}\text{As}$  a.) logarithmische Darstellung b.) lineare Darstellung

**Tabelle 8: Wichtige Gammalinien vom  $^{76}\text{As}$  [135]**

<i>Energien <math>^{76}\text{As}</math> [keV]</i>	<i>Häufigkeit [%]</i>
559,1	45,0
563,23	1,20
657,05	6,20
1212,92	1,44
1216,08	3,42
1228,52	1,22
2096,3	0,55

### 3.2.2 Gammaspektrum von $^{77}\text{As}$

Nca  $^{77}\text{As}$  wurde von den Arsenisotopen aufgrund seiner Eigenschaften und der guten Verfügbarkeit für die Optimierung aller chemischen Abtrennungs- und Markierungsversuche verwendet. Insgesamt wurden mehr als 95 % aller Versuche mit diesem Isotop durchgeführt. Das Spektrum von  $^{77}\text{As}$  findet sich in Abbildung 10, seine wichtigsten  $\gamma$ -Linien in Tabelle 9.



**Abbildung 10: Gammaspektrum von  $^{77}\text{As}$  a.) logarithmische Darstellung b.) lineare Darstellung**

**Tabelle 9: Wichtige Gammalinien vom  $^{77}\text{As}$  [135]**

<i>Energien <math>^{77}\text{As}</math> [keV]</i>	<i>Häufigkeit [%]</i>
87,85	0,2
125,84	0,00119
139,23	0,0099
161,93	0,146
200,47	0,00107
239,01	1,59
249,81	0,39
270,85	0,0083
281,642	0,058
439,49	0,00102
520,65	0,56

$^{77}\text{As}$  weist im Vergleich zu allen anderen Nukliden, mit denen sich diese Arbeit beschäftigt, eine Besonderheit auf. Die Intensität der einzelnen Gammalinien ist sehr klein (stärkste Linie bei 239 keV mit 1,59 %) im Vergleich mit z.B.  $^{77}\text{Ge}$ . Dies führt dazu, dass man das  $^{77}\text{As}$  im Spektrum des bestrahlten Targets fast nicht erkennen kann. Hier überlagert das  $^{77}\text{Ge}$  mit seinen intensiven Linien fast das gesamte  $^{77}\text{As}$ , obwohl die Aktivität von beiden Nukliden am Beginn einer Targetaufarbeitung in derselben Größenordnung liegt. Will man alle  $\gamma$ -Linien von  $^{77}\text{As}$  im Spektrum sehen, muss eine Probe mehrere Stunden gemessen werden, damit auch die weniger intensiven Linien gut sichtbar sind.

### 3.2.3 Gammaspektrum von $^{77}\text{Ge}$

Das Spektrum von  $^{77}\text{Ge}$  wird in der Regel direkt nach der Bestrahlung gemessen, wenn im Target noch alle produzierten Nuklide nebeneinander vorliegen. Das in Abbildung 11 dargestellte Spektrum wurde nach der Abtrennung von  $^{77}\text{As}$  aufgenommen und zeigt reines  $^{77}\text{Ge}$ . Diese Trennung ist nur von kurzer Dauer, da sich durch den Zerfall des  $^{77}\text{Ge}$  kontinuierlich  $^{77}\text{As}$  nachbildet. Charakteristisch für dieses Spektrum sind die Doppellinien bei 211 und 215 keV und die Linie mit der maximalen Intensität von 54 % bei 264 keV.

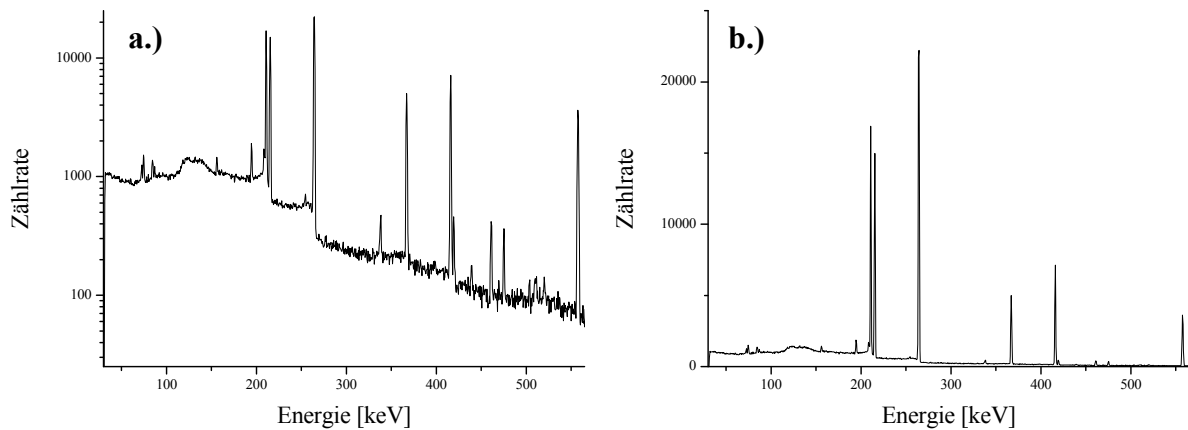


Abbildung 11: Gammaspektrum von  $^{77}\text{Ge}$  a.) logarithmische Darstellung b.) lineare Darstellung

Tabelle 10: Wichtige Gammalinien vom  $^{77}\text{Ge}$  [135]

Energien $^{77}\text{Ge}$ [keV]	Häufigkeit [%]
211,03	30,8
215,50	28,6
264,44	53,9
367,40	14,0
416,33	21,8
558,02	16,1

$^{77}\text{Ge}$  weist über 150 verschiedene Gammalinien auf, so dass hier nur eine Auswahl der intensivsten dargestellt werden kann (Tabelle 10). Misst man die  $^{77}\text{As}$ -Fraktion nach der Abtrennung des  $^{77}\text{Ge}$ , so ist die Linie mit der höchsten Intensität bei 264 keV in der Regel nicht mehr zu identifizieren. Alternativ könnte man sich der Linie bei 558 keV bedienen, um den Abtrennungsfaktor zu bestimmen, da hier kein  $^{77}\text{As}$ -Peak einen erhöhten Untergrund verursachen kann. Die Linie des  $^{76}\text{As}$  bei 559,1 keV liegt jedoch so eng bei dieser Linie, dass eine Trennung der beiden Signale nicht möglich ist. Daher scheidet diese Möglichkeit aus.

Es gibt zwei Möglichkeiten, wie das  $^{76}\text{As}$  in die Probe gelangen kann. Die erste Möglichkeit sind Spuren von Arsen, die bereits im Targetmaterial vorkommen und durch Bestrahlung mit Neutronen aktiviert werden. Die zweite Möglichkeit ist die Produktion von inaktivem  $^{75}\text{As}$  über den Zerfall von  $^{75}\text{Ge}$  während der Bestrahlung von  $^{\text{nat}}\text{Ge}$ . Die Zahl der gebildeten Arsenisotope ist zwar sehr klein, kann aber zu  $^{76}\text{As}$ -Aktivitäten im niedrigen Bq-Bereich führen.

### 3.2.4 Gammaskpektrum von $^{74}\text{As}$

Ein reines Spektrum von  $^{74}\text{As}$  (Abbildung 12) erhält man, wenn das Zyklotrontarget ca. 10 Tage nach Bestrahlungsende gemessen wird. Dann sind alle kurzlebigen Nuklide ( $^{72/76}\text{As}$ ) auf 1/1000 ihrer Startaktivität abgeklungen (10 Tage entspricht in etwa 10 HWZ).

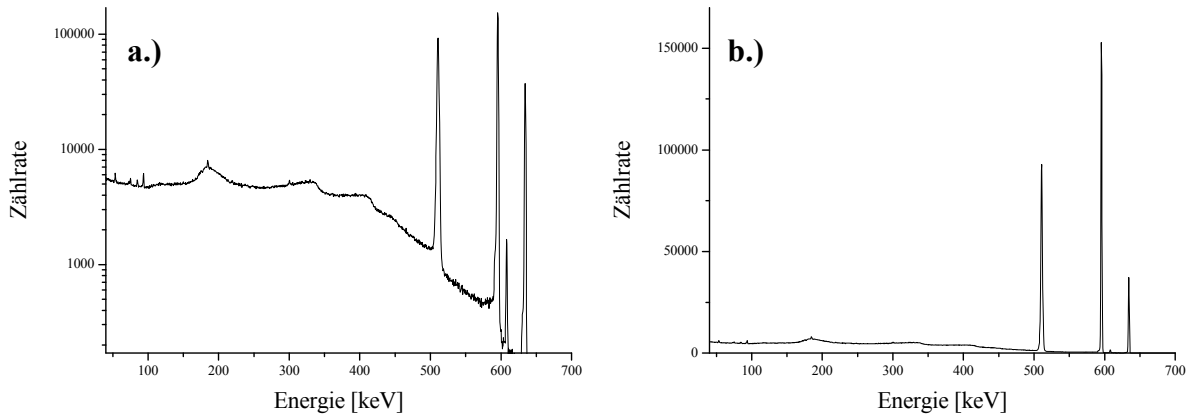


Abbildung 12: Gammaskpektrum von  $^{74}\text{As}$  a.) logarithmische Darstellung b.) lineare Darstellung

Tabelle 11: Wichtige Gammalinien vom  $^{74}\text{As}$  [135]

Energien $^{74}\text{As}$ [keV]	Häufigkeit [%]
511,00	58
595,83	59
608,43	0,552
634,78	15,4

Da  $^{74}\text{As}$  ein uu-Kern ist und entweder einen  $\beta^-$ - oder einen  $\beta^+$ -Zerfall durchführt, sieht man im Spektrum Gammalinien von zwei verschiedenen Tochterkernen. Die Linie bei 634,78 keV stammt aus dem  $\beta^-$ -Zerfall in  $^{74}\text{Se}$ , die Anderen entsprechen dem  $\beta^+$ -Zerfall in  $^{74}\text{Ge}$ . Zu beachten ist noch, dass die  $\beta^+$ -Emissionswahrscheinlichkeit nur bei 29 % liegt, durch die Vernichtungsstrahlung aber zwei  $\gamma$ -Quanten entstehen.

### 3.2.5 Gammaskpektrum von $^{72}\text{As}$

Das Spektrum in Abbildung 13 wurde einen Tag nach Ende einer Bestrahlung von Germanium mit Protonen am Zyklotron aufgenommen. Zu diesem Zeitpunkt ist  $^{72}\text{As}$  die dominante Spezies im Spektrum. Die anderen Arsenisotope wie  $^{76,74}\text{As}$  sind deutlich zu erkennen, ihre Ausbeute ist jedoch geringer. Reines  $^{72}\text{As}$  kann mit hoch angereichertem  $^{72}\text{Ge}$  als Target oder über einen  $^{72}\text{Se}/^{72}\text{As}$ -Generator erhalten werden. Es besitzt noch viele weitere Gammalinien, deren Häufigkeiten jedoch deutlich unter 1 % liegen.

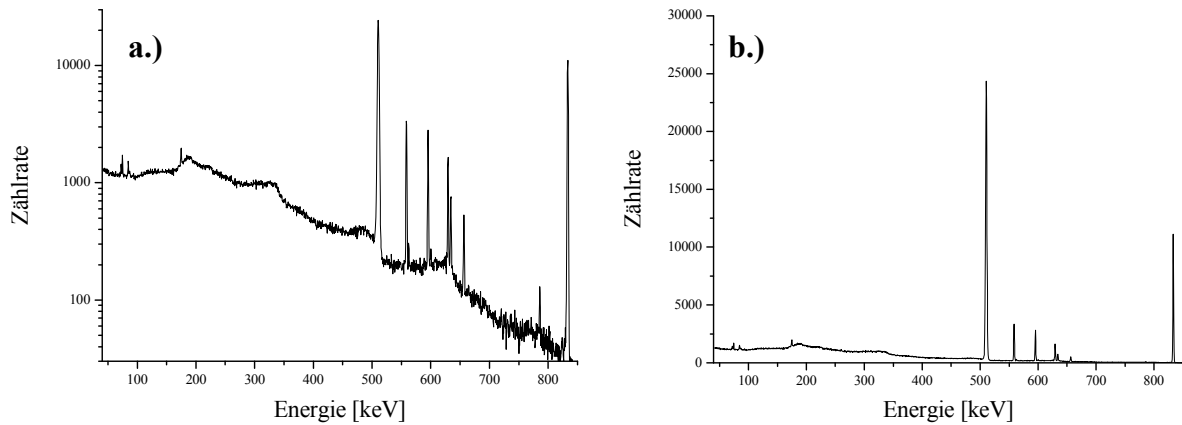


Abbildung 13: Gammaspektrum von  $^{72}\text{As}$  a.) logarithmische Darstellung b.) lineare Darstellung

Tabelle 12: Wichtige Gammalinien vom  $^{72}\text{As}$  [135]

<i>Energien <math>^{72}\text{As}</math> [keV]</i>	<i>Häufigkeit [%]</i>
511	176
629,92	7,92
833,99	79,5
1050,75	0,98
1464	1,11

Wie schon beim  $^{74}\text{As}$  liegt die Positronenemission bei der Hälfte der 511 keV Gammaemission.  $^{72}\text{As}$  emittiert somit 88 % Positronen.

### 3.2.6 Gammaspektrum von $^{71}\text{As}$

Wegen der geringen Produktionsausbeute von  $^{71}\text{As}$  und wegen der Dominanz von  $^{72/74}\text{As}$  im Gammaspektrum kann man kein separates Spektrum von  $^{71}\text{As}$  erhalten. Deshalb wird hier kein Spektrum gezeigt. Die Gammalinien von  $^{71}\text{As}$  finden sich in Tabelle 13.

Tabelle 13: Wichtige Gammalinien vom  $^{71}\text{As}$  [135]

<i>Energien <math>^{71}\text{As}</math> [keV]</i>	<i>Häufigkeit [%]</i>
174,95	82
326,78	3,03
499,87	3,62
511,0	56,5
1095,49	4,08

### 3.2.7 Gammaspektrum von $^{67}\text{Ga}$

Das  $^{67}\text{Ga}$  ist kein Positronenemitter, entsteht aber als Nebenprodukt bei der Bestrahlung von  $^{70}\text{Ge}$  mit Protonen in einer (p, $\alpha$ )-Reaktion in geringen Ausbeuten.

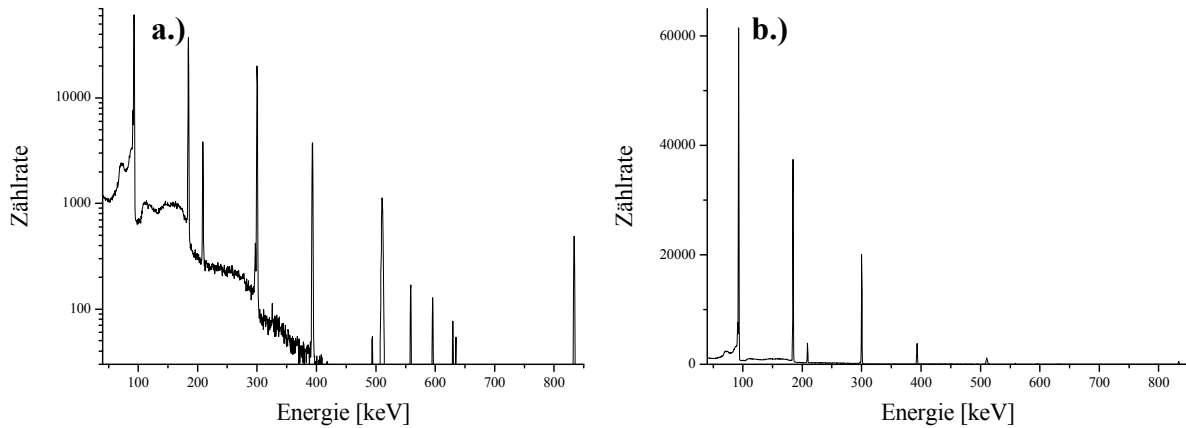


Abbildung 14: Gammaspektrum von  $^{67}\text{Ga}$  a.) logarithmische Darstellung b.) lineare Darstellung

Das Spektrum in Abbildung 14 wurde bei der Abtrennung des  $^{72,74}\text{As}$  aus einem Germaniumtarget erhalten. Hier zeigt sich deutlich der Vorteil der logarithmischen Darstellung. Während in der linearen Darstellung des Spektrums keine Verunreinigung mit Arsen zu erkennen ist, kann man in der logarithmischen Darstellung eindeutig Spuren von  $^{72,74,76}\text{As}$  erkennen.

Tabelle 14: Wichtige Gammalinien vom  $^{67}\text{Ga}$  [135]

<i>Energien <math>^{72}\text{As}</math> [keV]</i>	<i>Häufigkeit [%]</i>
91,265	3,11
93,310	38,81
184,576	21,410
208,950	2,460
300,217	16,64
393,527	4,56
494,166	0,0684
703,106	0,0105
794,381	0,0540
887,688	0,148

### 3.3 Speziation von \*As(III) und \*As(V)

Das Element Arsen kann in verschiedenen Oxidationszuständen vorliegen (-III, 0, +III, +V). Trotzdem sind für die vorliegende Arbeit nur die beiden Oxidationszustände \*As(III) und \*As(V) von praktischer Bedeutung. Eine genaue Untersuchung der vorliegenden Arsenspezies mit normalen analytischen Methoden erscheint aufgrund der geringen Substanzmengen des radioaktiven Arsens nicht möglich. Es liegen jedoch aus der Literatur genaue Daten zum Verhalten von Arsen in wässrigen Lösungen vor. Die Spezies, in der das Arsen vorliegt, ergibt sich aus dem Redoxpotential (Eh-Wert) und dem pH-Wert der Lösung (Abbildung 15). Für diese Arbeit von Interesse sind insbesondere die Arsenspezies der beiden Oxidationszustände, die in neutralen wässrigen Lösungen vorliegen.

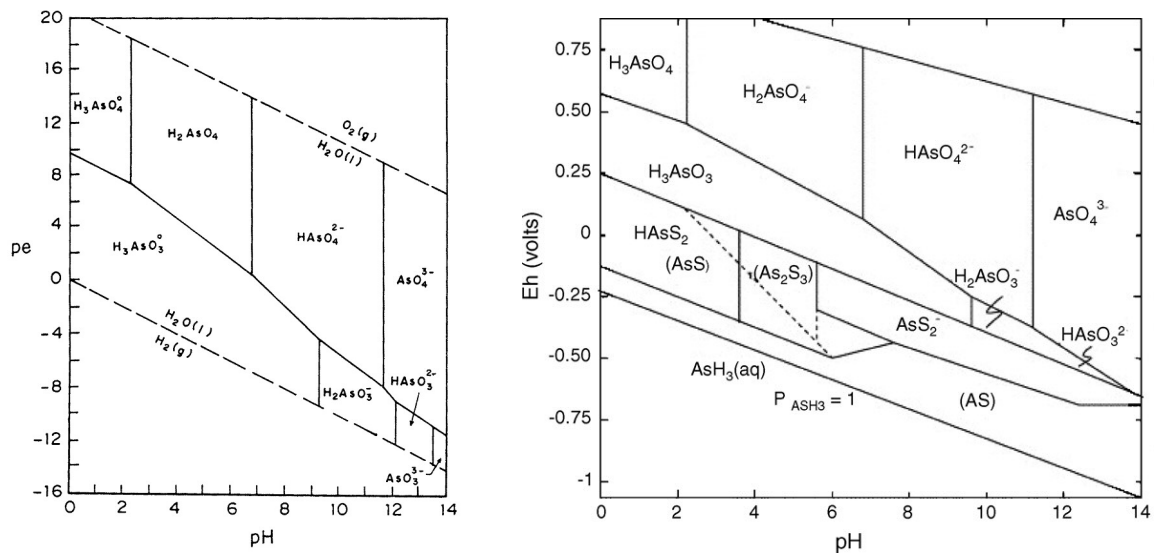


Abbildung 15: Pe-pH-Diagramm von Arsen in Wasser bei 25 °C [142] und Eh-pH-Diagramm von Arsen bei 25 °C [38]

Das fünfwertige Arsen liegt unter oxidierenden Bedingungen im niedrigen pH-Bereich zwischen 2 und 6,9 als  $H_2AsO_4^-$  vor. Bei höheren pH-Werten liegt es hingegen als  $HAAsO_4^{2-}$  vor. Die neutrale ( $H_3AsO_4$ ) und die vollständig deprotonierte Form der Arsensäure ( $AsO_4^{3-}$ ) bilden sich nur im stark sauren, bzw. stark basischen Milieu. Von weitaus größerem Interesse für diese Arbeit sind jedoch die dreiwertigen Arsenspezies. Dreiwertiges Arsen liegt über einen weiten pH-Bereich ( $< \sim 9,2$ ) unter reduzierenden Bedingungen als neutrales  $H_3AsO_3$  vor [38]. Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass es sich auch bei der in wässrigem Medium vorliegenden Spezies von \*As(III) um  $H_3AsO_3$  handelt. Für zukünftige Experimente sollte der pH-Wert deutlich genauer beobachtet werden, als dies bisher der Fall war. Ebenso kann eine Messung des Eh-Wertes weiter dazu beitragen, dass noch mehr Informationen über das Redoxverhalten des \*As in wässrigen Lösungen erhalten werden können.

### 3.3.1 Speziation von $^{76}\text{As(III)}$ , $^{76}\text{As(V)}$ und Bestimmung der Markierungsausbeute mittels Radio-DC

Radioaktive nca Arsenisotope können während der radiochemischen Targetaufarbeitung in den beiden Oxidationszuständen  $^{76}\text{As(III)}$  und  $^{76}\text{As(V)}$  vorliegen. Darum ist eine genaue Kenntnis des Oxidationszustandes während der Targetaufarbeitung erforderlich. Prinzipiell ist die Ionenchromatographie sehr gut zur Bestimmung des Oxidationszustandes geeignet. Insbesondere für das Verhalten von  $^{76}\text{As(III)}$  und  $^{76}\text{As(V)}$  auf dem Anionenaustauscher AG 1-X8 liegen sehr genaue experimentelle Daten vor [102, 103, 105, 107]. Dies ist jedoch ein zeit- und arbeitsintensives Verfahren, welches sich nicht zur schnellen Überprüfung des Oxidationszustandes im neutralen wässrigen Medium oder organischen Lösungsmitteln eignet. Eine schnelle und unkomplizierte Alternative bietet sich durch die Dünnschichtchromatographie an. In der Literatur findet man eine große Auswahl an Laufmitteln und auch unterschiedliche feste Phasen wie Papier oder Silicagelplatten [89, 122, 123], um eine Trennung der Oxidationsstufen zu erreichen. Die vorgeschlagenen Laufmittel wie Methanol / 5 M HCl (2 : 1) und Aceton / 1 M HCl (1 : 1) führten zur teilweisen Auflösung der DC-Platten und wurden deshalb nicht eingesetzt. Es konnte jedoch eine in vorhergehenden Arbeiten entwickelte Methode zur Trennung von geträgertem  $^{76}\text{As(III)}$  und  $^{76}\text{As(V)}$  [143] auf das nca  $^{72,74,77}\text{As}$ -System übertragen werden. Die Trennung der beiden Oxidationsstufen des Arsens beruht hierbei auf ihrer unterschiedlichen Neigung, mit Tartrat Komplexe zu bilden [144]. Daraus resultieren unter Verwendung des Laufmittels 0,01 M Natriumtartrat / Methanol (3 : 1) die unterschiedlichen  $R_f$ -Werte für  $^{76}\text{As(V)}$  0,9 und  $^{76}\text{As(III)}$  0,6 (Abbildung 16).

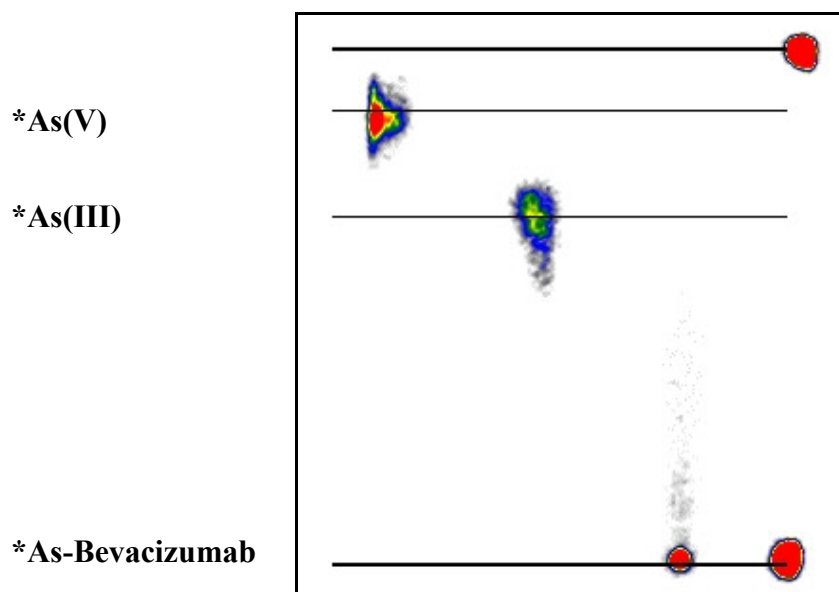


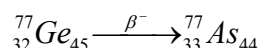
Abbildung 16:  $^{77}\text{As(V)}$ ,  $^{77}\text{As(III)}$ ,  $^{77}\text{As}$  markierter Antikörper Bevacizumab und Standardmarkierungen zur Bestimmung der  $R_f$ -Werte. Laufmittel: 0,01 M Natriumtartrat / Methanol (3 : 1)

Mit dieser Methode können wässrige, aber auch organische Lösungen wie Ethanol oder  $\text{CCl}_4$  analysiert werden, da diese Lösungsmittel sehr schnell verdampfen. Konzentrierte Säuren ( $\text{HCl}$ ,  $\text{HF}$ ) können jedoch nicht analysiert werden, da sie die DC-Platte zerstören. Aus diesem Grund ist die Radio-DC-Methode nicht geeignet, um den Oxidationszustand des  $^{77}\text{As}$  in der Targetlösung zu bestimmen.

Es zeigte sich, dass das Radio-DC-System ebenfalls eingesetzt werden kann, um die Markierungsausbeute von Antikörpern mit  $^{77}\text{As}$  zu bestimmen. Hierbei fällt der Antikörper auf der Startlinie aus ( $R_f = 0$ ) und besitzt somit einen von beiden Arsenspezies deutlich verschiedenen  $R_f$ -Wert. Die Ausbeutebestimmung mittels SEC-HPLC liefert vergleichbare Ergebnisse. Trotzdem liegen die mit Radio-DC bestimmten Markierungsausbeuten immer 5-10 % unter den mittels HPLC bestimmten Ausbeuten.

### 3.3.2 Bestimmung des Oxidationszustandes von $^{77}\text{As}$ in einem am Kernreaktor bestrahlten $\text{GeO}_2$ -Target mittels Anionenaustauschchromatographie

Eine interessante Frage ist, in welchem Oxidationszustand das  $^{77}\text{As}$  nach der Bestrahlung eines  $\text{GeO}_2$ -Targets vorliegt. Zunächst erscheint die Frage nach dem Oxidationszustand des  $^{77}\text{As}$  im Target eine rein akademische Fragestellung zu sein. Es zeigte sich jedoch im Laufe dieser Arbeit, dass sich am Ende jede gewonnene Information als nützlich erweisen kann. Das Germanium liegt als  $\text{GeO}_2$  im Oxidationszustand  $+\text{(IV)}$  vor. Durch Neutroneneinfang bildet sich  $^{77}\text{Ge}$  und zerfällt nach  $\beta^-$ -Emission in  $^{77}\text{As}$ , einem Element mit einer um eins erhöhten Ordnungszahl:



#### Formel 2: $\beta^-$ -Zerfall von $^{77}\text{Ge}$ in $^{77}\text{As}$

Da das  $^{77}\text{As}$  allerdings noch die Elektronenhülle des  $\text{Ge(IV)}$  besitzt, würde dies rein theoretisch einen Oxidationszustand von  $^{77}\text{As(V)}$  bedeuten.

Es gibt jedoch aus der Literatur und auch aus im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten die Vermutung, dass ein erheblicher Teil des gebildeten  $^{77}\text{As}$  zunächst als  $^{77}\text{As(III)}$  vorliegt. Dies konnte durch Verwendung einer neu entwickelten Trennungsmethode von  $\text{Ge(IV)}$ ,  $^{77}\text{As(III)}$  und  $^{77}\text{As(V)}$  durch Anionenaustauschchromatographie nach dem Lösen des Targets in  $\text{HF}_{\text{konz}}$  bestätigt werden.

Einige Veröffentlichungen beschäftigten sich bereits mit diesem Thema. So untersuchten Maki et al. [122] am Reaktor bestrahlte  $\text{GeO}_2$ -Targets mittels Dünnschichtchromatographie auf Kieselgelplatten im System  $^{77}\text{Ge}/^{77}\text{As}$  und fanden Bedingungen, unter denen sich  $^{77}\text{Ge}$ ,  $^{77}\text{As(III)}$  und  $^{77}\text{As(V)}$  voneinander trennen lassen. Das  $\text{GeO}_2$ -Target wurde dabei in 1,5 M

KOH gelöst und dann mittels Radio-DC untersucht. Es zeigten sich zwei Erkenntnisse. Ein Radio-DC aus der Targetlösung ohne die Zugabe von inaktivem Arsen-Träger ergab einen  $^{77}\text{As(III)}$ -Gehalt von nur 6 %. Erst bei Zugabe von inaktivem As(III)-Träger konnten ab einer Konzentration von  $> 10 \text{ mM As(III)}$  signifikante Mengen von  $^{77}\text{As(III)}$  von  $> 75 \%$  beobachtet werden. Die Autoren interpretieren ihre Ergebnisse so, dass das  $^{77}\text{As}$  zunächst nach dem  $\beta^-$ -Zerfall des  $^{77}\text{Ge}$  im Oxidationszustand  $^{77}\text{As(III)}$  vorliegt. Im Anschluss soll dieses dann durch in der KOH gelösten Sauerstoff schnell zu  $^{77}\text{As(V)}$  oxidiert werden. Vergleichbare Ergebnisse erzielten Genet et al. [124, 145, 146], als sie ein am Reaktor bestrahltes  $\text{GeO}_2$ -Target mit Papierelektrophorese untersuchten. Es wurde ebenfalls eine Autooxidation des  $^{77}\text{As(III)}$  zu  $^{77}\text{As(V)}$  beobachtet, wenn kein inaktiver As(III) Träger zugesetzt wurde. Erst das Zusetzen von ca.  $10 \text{ mM As(III)}$  führte zu gemessenen Werten von  $85 \%$   $^{77}\text{As(III)}$  und  $15 \%$   $^{77}\text{As(V)}$ . Die Autoren untersuchten ebenfalls den Einfluss von Temperatur und pH-Wert auf das Verhältnis  $^{77}\text{As(III)}/^{77}\text{As(V)}$ . Eigene Versuche mit in  $0,5 \text{ M NaOH}$  gelösten  $\text{GeO}_2$ -Targets zeigten ebenfalls eine schnelle Oxidation des in der Lösung befindlichen  $^{77}\text{As(III)}$  zu  $^{77}\text{As(V)}$ , als diese mit der in Kapitel 3.3.1 beschriebenen Radio-DC-Methode untersucht wurden. Direkt nach dem Lösen betrug der  $^{77}\text{As(III)}$ -Gehalt noch  $30 \%$ , während nach  $1 \text{ h}$  nur noch  $^{77}\text{As(V)}$  vorlag. Die eigentlich interessante Frage ist jedoch, ob eine schnelle Oxidation des  $^{77}\text{As(III)}$  ebenfalls in HF-Medium stattfindet. Diese Frage kann mit der Radio-DC-Methode nicht beantwortet werden, da die als Lösungsmittel verwendete HF die DC-Platte zerstört. In der Folge der Entwicklung einer Methode zur Abtrennung von  $^*\text{As}$  aus Germaniummetalltargets mittels Anionenaustausch ergab sich die Möglichkeit, den Oxidationszustand auch in HF-Medium zu untersuchen (siehe MJ07, Kapitel 3.5.8).

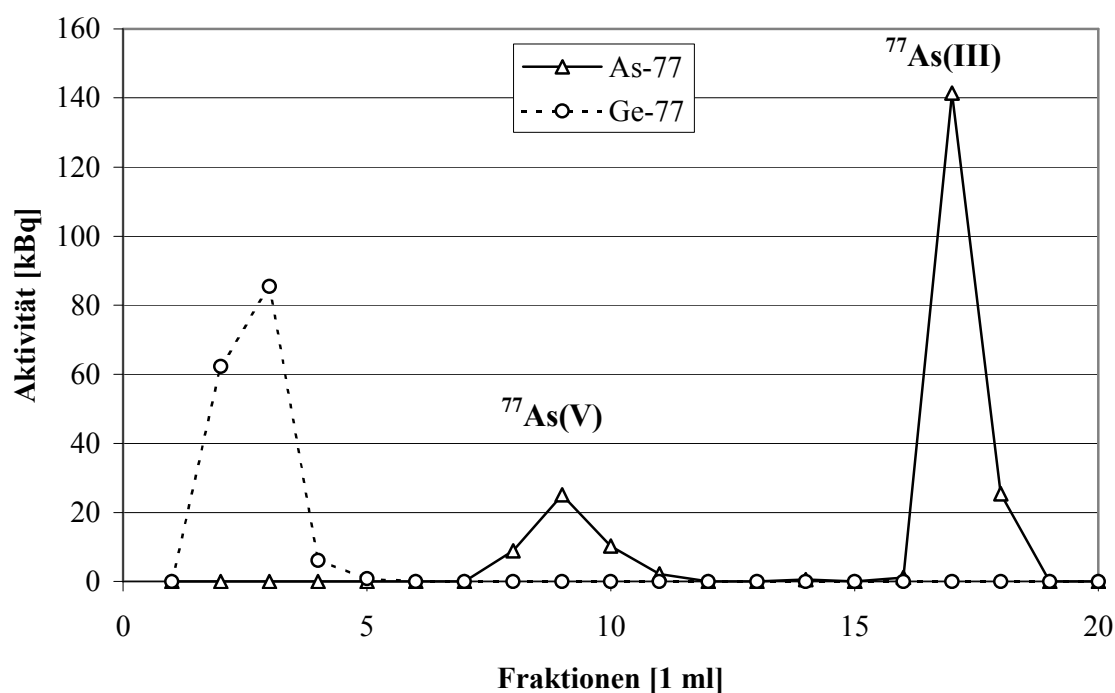


Abbildung 17: Exemplarisches Elutionsprofil von  $^{77}\text{Ge}$ ,  $^{77}\text{As(V)}$  und  $^{77}\text{As(III)}$  auf dem Anionenaustauscher AG 1-X8

Hierbei wurde ein GeO<sub>2</sub>-Target in HF ohne Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gelöst und dann auf dieselbe Anionenaustauschersäule aufgegeben und fraktioniert eluiert (Abbildung 17). Analog der Methode für Germaniummetalltargets bestanden die ersten 4 Fraktionen aus einer Mischung von 2 M HF / 10 M HCl. Dabei wird das Germanium quantitativ eluiert. Im Anschluss daran wurde in den Fraktionen 6 bis 16 mit 10 M HCl eluiert. Wie aus der Literatur bekannt [102], wird unter diesen Bedingungen das <sup>77</sup>As(V) weniger stark auf der Säule retardiert als dies beim <sup>77</sup>As(III) der Fall ist. In den Fraktionen 8, 9 und 10 ist dann das <sup>77</sup>As(V) zu beobachten. Das Elutionsprofil deckt sich nicht zu 100 % mit dem in Kapitel 3.5.8 beschriebenen, weil hier nur 500 µl Lösung anstatt der sonst ca. 2 ml Targetlösung auf die Säule aufgegeben werden. Um sicher zu gehen, dass es sich nicht um ein Artefakt handelt wurden noch ein paar weitere Fraktionen gesammelt, bevor dann in Fraktion 16 das Elutionsmittel zu 0,1 M HCl gewechselt wurde. Der Rest des <sup>77</sup>As liegt als <sup>77</sup>As(III) vor und kann aufgrund seines größeren Verteilungskoeffizienten erst bei niedrigen HCl-Konzentrationen von der Säule eluiert werden. Das gesamte <sup>77</sup>As(III) befindet sich in den Fraktionen 17 und 18. In zwei Experimenten ergab sich ein Mittelwert von 13 ± 11 % <sup>77</sup>As(V) und 86 ± 13 % As(III). Die schnelle Autooxidation von <sup>77</sup>As(III) zu <sup>77</sup>As(V) wie es Maki et al. und Genet et al. bei ihren im basischen Medium gelösten GeO<sub>2</sub>-Targets beobachtet haben fand im sauren HF-Medium nicht statt. Die Dauer vom Lösen des Targets bis zum Aufgeben auf die Säule betrug ca. 10 min, während die Elution insgesamt über 1 h in Anspruch nimmt. Dieses Experiment liefert im Nachhinein eine Erklärung für die in Kapitel 3.5.4 (MJ04) durchgeführten Experimente. Hierbei wurde beobachtet, dass man aus einem in HF/HCl gelösten GeO<sub>2</sub>-Target reines <sup>77</sup>As(III) in CCl<sub>4</sub> extrahieren kann, obwohl vorher kein Reduktionsmittel zugegeben wurde. Es bedeutet auch, dass die bei den anderen Extraktionsmethoden (NaI und HBr) beobachteten Mengen an \*As(V) nicht direkt aus der HF/HCl-Lösung extrahiert werden, sondern auf Oxidation im CCl<sub>4</sub> durch z.B. simultan extrahiertes I<sub>2</sub> oder Br<sub>2</sub> zurückzuführen sind. Interessant wäre es der Vollständigkeit halber auch, ein an Zyklotron bestrahltes GeO<sub>2</sub>-Target aus seinen \*As(III)-Gehalt hin zu untersuchen. Die Säulentrennung stand jedoch erst zur Verfügung, als bereits nur noch die Germaniummetalltargets bestrahlt wurden, weshalb das Experiment nicht mehr durchgeführt werden konnte. Zusammenfassend kann man sagen, dass bei der Produktion von <sup>77</sup>As am Kernreaktor in einem GeO<sub>2</sub>-Target zunächst <sup>77</sup>As(III) gebildet wird, welches je nach Wahl des Lösungsmittels schneller (NaOH, KOH), oder langsamer (HF) zu <sup>77</sup>As(V) oxidiert wird.

### 3.4 Modifizierung von monoklonalen Antikörpern zur Markierung mit Radioarsenisotopen

Die Strategie der Markierung von Proteinen mit Arsen beruht auf der hohen Affinität des Arsens zu Thiogruppen. Es gibt zum Einen die Möglichkeit, das Arsen direkt mit Molekülen umzusetzen, die bereits SH-Gruppen enthalten. Auf der anderen Seite können Moleküle ohne freie Thiogruppen ebenfalls markiert werden, wenn zusätzliche SH-Gruppen in das Molekül eingeführt werden. Für Proteine wie Antikörper gibt es dafür kommerziell verfügbare Standardmethoden.

#### 3.4.1 Modifizierung eines Antikörpers mit SATA zur Einführung von zusätzlichen Thiogruppen

Eine bereits in einer früheren Arbeit verwendete Möglichkeit [66, 136] ist die Einführung von zusätzlichen SH-Gruppen mittels SATA (N-succinimidyl S-acetylthioacetat) [147]. Dabei wird der Antikörper in einem ersten Schritt mit dem Reagenz SATA umgesetzt (Abbildung 18). Die primären Aminogruppen des Antikörpers reagieren mit dem N-Succinimidester unter Abspaltung von N-Hydroxysuccinimid und Bildung einer biologisch stabilen Peptidbindung.

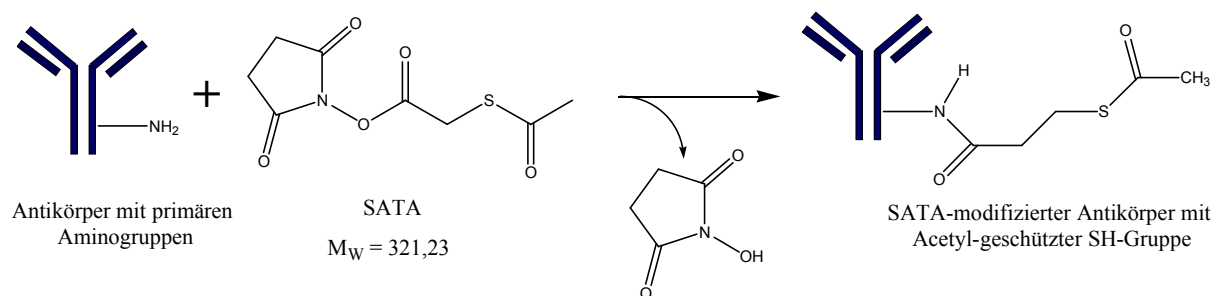
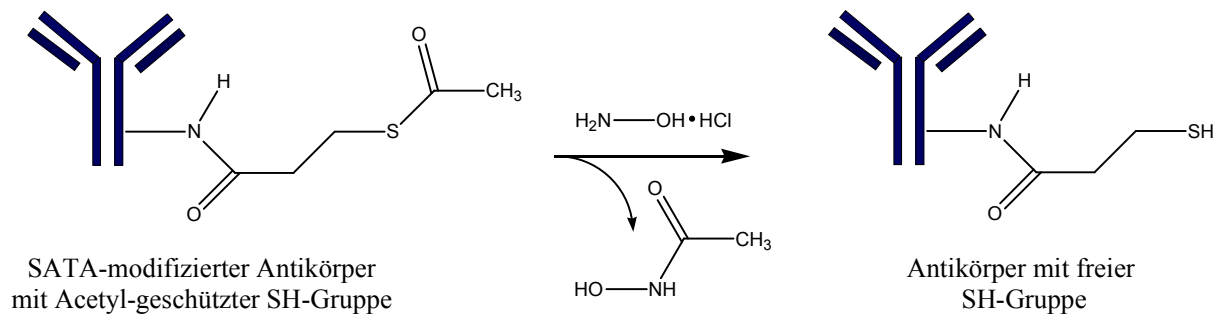


Abbildung 18: Modifizierung eines Antikörpers mit SATA

Das SATA wird dazu in DMSO gelöst (10 mg/ml) und 10  $\mu$ l der Lösung zu 500  $\mu$ l Antikörper in PBS-Puffer gegeben. Nach 30 min Reaktionsdauer wird die komplette Lösung mittels Gelfiltration (HPLC mit HiTrap Desalting Säule) aufgereinigt. Hierbei trennt man die großen Antikörpermoleküle ( $M_W = 150$  kDa) von den überschüssigen SATA und DMSO Molekülen, da diese bei den weiteren Reaktionsschritten stören würden. Das Volumen der Lösung vergrößert sich dadurch auf ca. 1 ml. Der SATA-modifizierte Antikörper trägt nun Acetyl-geschützte SH-Gruppen und kann sogar in dieser Form gelagert werden. Die SH-Gruppen sind sehr instabil gegen Autooxidation und sollen deshalb erst kurz vor bzw. während der Markierung entschützt werden. Die Menge an SATA und die Reaktionsdauer sind so bemessen, dass pro Antikörper am Ende ca. 3-4 freie SH-Gruppen vorliegen. Die Zahl der SH-Gruppen kann mit Hilfe von Ellman's Reagenz bestimmt werden [148].

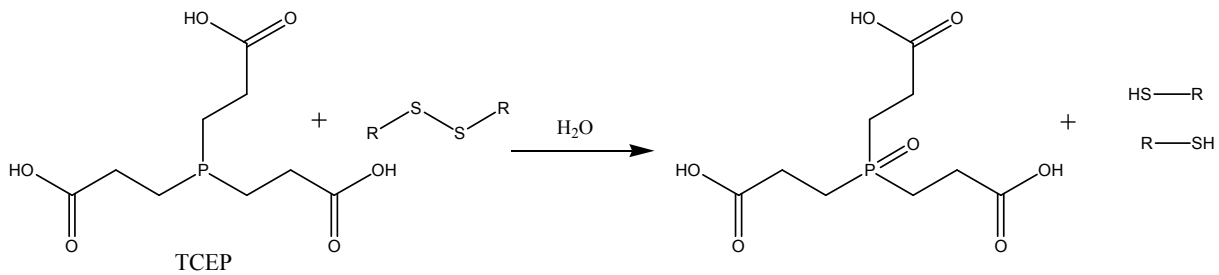


**Abbildung 19: Entschützung eines SATA-modifizierten Antikörpers mit Hydroxylamin**

Die Entschützung wird durch Zugabe von Hydroxylamin erreicht. Laut der Bedienungsanleitung für SATA [147] sollen zu der Antikörperlösung 100  $\mu\text{l}$  PBS-Puffer (0,5 M Hydroxylamin, 25 mM EDTA) zugegeben und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert werden. Danach soll das überschüssige Hydroxylamin ebenfalls mittels Gelfiltration entfernt werden. Diese Vorgehensweise wurde in dieser Arbeit jedoch leicht abgewandelt. Die Arsenaktivität, wurde nach der Targetaufarbeitung immer in 500  $\mu\text{l}$  PBS-Puffer (0,5 M Hydroxylamin, 25 mM EDTA) erhalten (bei allen Flüssig-Flüssig-Extraktionsmethoden) oder eine Ethanolfraktion mit Radioarsen durch Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  PBS-Puffer (0,5 M Hydroxylamin, 25 mM EDTA) verdünnt. Diese Lösung wurde direkt mit dem SATA-modifizierten Antikörper für 1 h umgesetzt, um die Entschützung und Markierung gleichzeitig durchzuführen, um eine ungewollte Oxidation der SH-Gruppen zu verhindern. Im Anschluss an die Markierung kann dann noch eine Gelfiltration erfolgen, um das Hydroxylamin wieder abzutrennen.

### 3.4.2 Modifizierung von Antikörpern mit TCEP zur Einführung von Thiogruppen

Eine weitere Möglichkeit, Thiogruppen in Proteinen zu erzeugen besteht in der Reduktion eines Teils der Disulfidbrücken, die in dem Molekül vorhanden sind. Dazu sind aus der Literatur einige Reduktionsmittel bekannt. Dithiothreitol, Mercaptoethanol und 2-Mercaptoethylamin sind jedoch selbst Thiole, die im Überschuss zugegeben werden müssen, um in einer Gleichgewichtsreaktion einige Disulfidgruppen des Proteins zu zerstören. Im Anschluss an die Reaktion wird das Reduktionsmittel dann wieder mittels Gelfiltration entfernt. Dies birgt das Risiko, dass nach der Gelfiltration noch Spuren der Thiole in der Antikörperlösung vorhanden sind. Bei der Verwendung von Arsen in nicht geträgerten Mengen könnte dann eventuell das Thiol und nicht der Antikörper markiert werden. Einen Ausweg bietet die Verwendung von TCEP (Tris(2-carboxyethyl)phosphin). Hierbei handelt es sich um ein Reduktionsmittel auf Phosphinbasis, das im Gegensatz zu den Thiolen keine Gleichgewichtsreaktion mit den Disulfidbrücken eingeht, sondern quantitativ abreagiert. Es besitzt keine Thiogruppen und reagiert deshalb auch nicht mit dem Radioarsen.

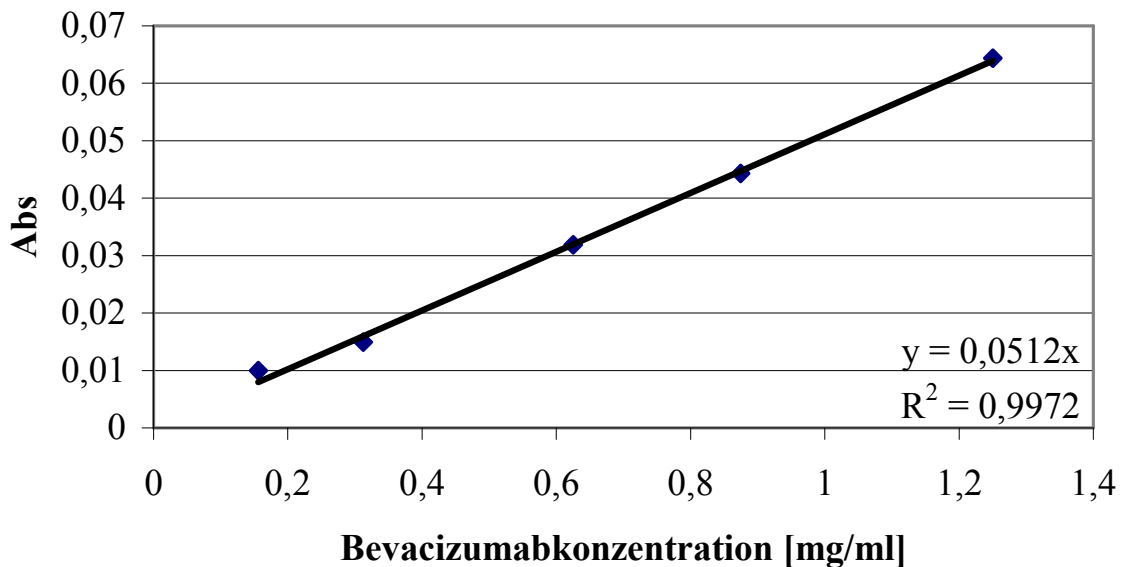


**Abbildung 20: Reduktion von Disulfidbrücken mit TCEP**

TCEP ist in wässrigen Lösungen über einen langen Zeitraum stabil. Darum wurde eine Stammlösung mit 12 mg/ml hergestellt. Aus dieser Lösung werden pro Markierung 10  $\mu$ l (410 nmol) zu 1,25 mg Antikörper und der radioaktiven Arsenfraktion in PBS-Puffer zugegeben. Dies entspricht der in der Bedienungsanleitung empfohlenen Menge [149]. Die Generierung freier SH-Gruppen und die Markierung laufen dabei parallel ab. An die erfolgreiche Markierung muss sich dann jedoch unbedingt eine Gelfiltration anschließen, um das überschüssige TCEP wieder aus der Lösung zu entfernen. Entfernt man das TCEP nicht, so reagiert es immer weiter. Dies führt dazu, dass irgendwann zu viele Disulfidbrücken im Antikörper gespalten werden und er so stark beschädigt wird, dass er seine Immunreaktivität verliert.

### 3.4.3 Erstellen einer Kalibrationsgeraden zur Bestimmung der Antikörperkonzentration

In der Regel ist die Konzentration eines Antikörpers zu Beginn eines Experimentes bekannt. Während der Modifizierung des Antikörpers mit SATA oder der Aufreinigung nach erfolgter Markierung mittels TCEP wird der Antikörper einer Gelfiltration unterzogen. Dabei bleibt immer eine unbekannte Menge Antikörper auf dieser Säule hängen. Um die genaue Konzentration des Antikörpers nach einer Gelfiltration bestimmen zu können muss ein Aliquot aus der Lösung entnommen und dessen Absorption bei 280 nm gemessen werden. Durch Vergleichen der gemessenen Absorption mit einer Standardkurve kann man dann die genaue Konzentration bestimmen. Um möglichst wenig Antikörper für diese Messung zu verbrauchen, wurde eine Kalibrationsgerade erstellt, bei der je 50  $\mu$ l aus den Proben entnommen wurden. Aus den Messungen der Absorption einer Verdünnungsreihe des Antikörpers Bevacizumab wurde eine Kalibrationskurve erhalten (Abbildung 21).



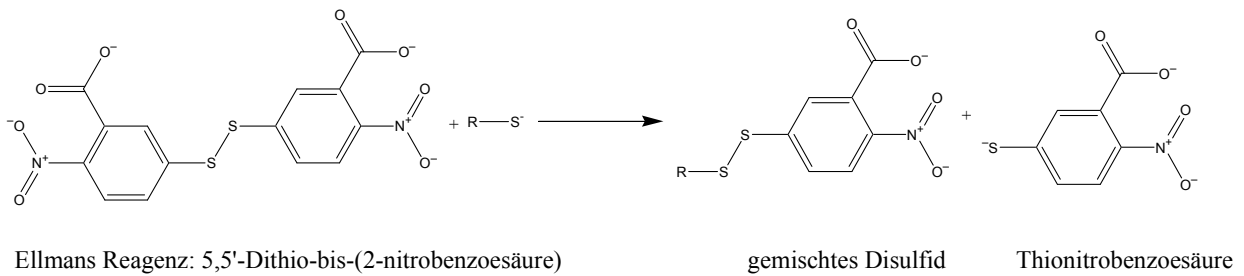
**Abbildung 21: Eichgerade zur Bestimmung der Antikörperkonzentration mittels UV-Vis-Spektroskopie**

Die Konzentrationen der Verdünnungsreihe sollten innerhalb der zu erwartenden Werte einer zu messenden unbekannt Probe liegen. Alle Experimente wurden mit Antikörperkonzentrationen zwischen 1,25 mg/ml und 0,625 mg/ml gestartet, so dass diese Bedingung erfüllt ist. Die genaue Konzentration muss bekannt sein, damit die Zahl der SH-Gruppen pro Antikörpermolekül korrekt bestimmt werden kann. Verwendet man den Antikörper in biologischen Experimenten muss die Konzentration ebenfalls korrekt bestimmt werden. Setzt man die gemessene Absorption der unbekannt Probe in die Geradengleichung der Regressionsgerade ein und löst nach x auf, erhält man direkt die Konzentration in mg/ml. Aus den Messungen der Antikörperkonzentration vor und nach einer Gelfiltration konnte bestimmt werden, dass der Verlust an Antikörper pro Gelfiltration (HPLC mit 5 ml HiTrap Desalting Säule) bei ca. 30 % liegt.

### 3.4.4 Bestimmung der Anzahl der SH-Gruppen pro Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper besitzen keine freien SH-Gruppen. Diese müssen erst mit einer der beiden oben beschriebenen Methoden zusätzlich eingeführt werden. Die Menge der generierten SH-Gruppen hängt sowohl von der Substanzmenge der Reagenzien, als auch von der Inkubationszeit ab. In der Literatur [147, 149] finden sich Richtwerte, jedoch muss die genaue Zahl für jedes Protein separat bestimmt werden. Eine einfache Methode zur Quantifizierung von SH-Gruppen in wässriger Lösung ist die Verwendung von Ellman's Reagenz. Ellman's Reagenz, ein Disulfid reagiert dabei mit den in Lösung vorhandenen SH-Gruppen zu einem gemischten Disulfid und Thionitrobenzoesäureanion (Abbildung 22). Dieses Anion hat bei 412 nm in PBS-Puffer einen sehr großen molaren

Extinktionskoeffizienten von 14.500. Dies resultiert in einer Gelbfärbung der Lösung, die man mittels eines UV-Vis Spektrometers messen kann.



**Abbildung 22: Verwendung von Ellman's Reagenz zur Bestimmung der SH-Gruppen Konzentration**

Zur Quantifizierung gibt es zwei Möglichkeiten. Man kann eine Eichgerade erstellen, indem man eine Verdünnungsreihe mit Cysteinestandards misst. Die unbekannte Probe wird dann analog hergestellt und von allen Proben die Absorption bei 412 nm gemessen. Aus den Werten der Standards erhält man eine Kalibrationskurve und kann daraus den Gehalt an SH-Gruppen in der unbekannt Probe berechnen. Alternativ kann man die Konzentration auch direkt aus der gemessenen Absorption berechnen, da der molare Extinktionskoeffizient bekannt ist.

$$c = \frac{A}{b \cdot E}$$

**Formel 3: Formel zur Berechnung der Konzentration freier Thiogruppen**

Hierbei sind A: Absorption, b: Weglänge durch Küvette (1 cm), E: 14.500 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>.

Beide Methoden wurden miteinander verglichen und es ergab sich eine Abweichung von nur 5 %, was für das Experiment vollkommen ausreichend ist. Aus diesem Grund wurde in späteren Experimenten die Konzentration ohne Aufnahme einer Standardkurve direkt berechnet. Für die SATA-Modifizierung wurde unter den gewählten Bedingungen 3-4 SH-Gruppen pro Antikörper erhalten, während die Verwendung von TCEP 5-8 SH-Gruppen pro Antikörper ergab. Allerdings wurden diese Daten in den ersten Experimenten erhalten und danach nicht mehr regelmäßig kontrolliert.

### 3.5 Abtrennungsmethoden für nca <sup>\*</sup>As aus Germaniumtargets und Markierung des Antikörpers Bevacizumab

Nach der in Kapitel 3.1 beschriebenen Isotopenproduktion von <sup>72,74,77</sup>As ist der nächste Schritt die Abtrennung des <sup>\*</sup>As aus dem Targetmaterial. Zur einfacheren Nomenklatur wurden die einzelnen entwickelten Abtrennungsmethoden von MJ01 bis MJ08 durchnummeriert. Da sowohl GeO<sub>2</sub> als auch Germaniummetall für Bestrahlungen eingesetzt wurden, müssen Abtrennungsmethoden für beide Materialien entwickelt werden. Der fundamentale Unterschied besteht darin, dass sich Germaniummetall nur in Mischungen von Säuren und Oxidationsmitteln löst (z.B. HCl/HNO<sub>3</sub> oder HF/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), während GeO<sub>2</sub> auch ohne Zugabe von Oxidationsmitteln gelöst werden kann (z.B. in NaOH oder HF). Dies bedeutet, dass die Abtrennungsmethoden für Germaniummetall auch auf GeO<sub>2</sub> übertragen werden können, jedoch nicht umgekehrt. Neben der reinen Isotopentrennung besteht die zweite Aufgabe darin, das abgetrennte <sup>\*</sup>As in eine Form zu überführen, die in der Lage ist, mit freien SH-Gruppen in nanomolarer Konzentration zu reagieren und somit Antikörper zu markieren. Da es sich bei Antikörpern um sehr empfindliche Biomoleküle handelt, kann man davon ausgehen, dass man Bedingungen benötigt, die biokompatibel sind. Dies bedeutet wässrige Lösungen mit einem neutralen pH-Wert. Alle in der Literatur beschriebenen Abtrennungsmethoden können das Arsen jedoch nicht in den benötigten Bedingungen bereitstellen. Sie liefern entweder gereinigtes <sup>\*</sup>As in hoch konzentrierten Säuren [90, 93, 98] oder in organischen, mit Wasser nicht mischbaren Lösungsmitteln [94, 96, 97]. Deshalb bestand eine Hauptaufgabe dieser Arbeit darin, die gesamte Prozedur so zu entwickeln, dass die oben genannten Bedingungen erreicht werden konnten. Ob die Abtrennungsmethoden prinzipiell dazu geeignet sind, um Antikörper zu markieren, wurde direkt im Anschluss an die Abtrennung mit dem monoklonalen Antikörper Bevacizumab (Handelsname Avastin) getestet.

#### 3.5.1 Abtrennung von <sup>72/74/77</sup>As aus einem GeO<sub>2</sub>-Target mittels Festphasenextraktion (MJ01)

Diese Methode zur Abtrennung von nca <sup>\*</sup>As Isotopen aus GeO<sub>2</sub> Targets [120] ist bis heute die einzige, die bis zur Markierung von biologisch aktiven Molekülen weiterentwickelt und veröffentlicht wurde [66, 136]. Im Zuge dieser Arbeit wurde versucht, einige Schwachpunkte dieser Methode auszuräumen. Eine schematische Darstellung der Methode findet sich in Abbildung 23.



Abbildung 23: Schematische Darstellung der Abtrennung von <sup>\*</sup>As aus GeO<sub>2</sub>-Targets mittels Festphasenextraktion

### 3.5.1.1 Lösen des GeO<sub>2</sub>-Targets

Der erste Schritt zum Abtrennen des \*As aus dem GeO<sub>2</sub>-Target besteht im Auflösen des Targets. GeO<sub>2</sub> löst sich nicht in vielen verschiedenen Lösungsmitteln. Als Lösungsmittel wurde z.B. Wasser vorgeschlagen (453 mg/100 ml bei 25 °C) [89]. Dies deckt sich nicht mit eigenen Beobachtungen. Außerdem gibt es keine beschriebene Abtrennungsmethode für As und Ge in Wasser und auch das zu erwartende große Volumen ist sehr unpraktisch. Die zweite beschriebene Methode besteht in der Verwendung von Laugen wie NaOH [95] oder KOH [94]. Dies wurde genau so beobachtet, allerdings sind diese Laugen nicht in vergleichbarer Reinheit wie die verwendeten Säuren erhältlich (niedriger ppb-Gehalt an metallischen Verunreinigungen, insbesondere an Arsen). Da jede Zugabe von inaktivem Arsen die spezifische Aktivität verschlechtert, wurde die Verwendung von Laugen als Lösungsmittel nicht in Betracht gezogen.

Ebenso konnte die in der Literatur beschriebene Löslichkeit von GeO<sub>2</sub> in 5 M HCl [97] nicht beobachtet werden. Deshalb wurde auf die in der Literatur wenig beschriebene Verwendung von HF<sub>konz</sub> als Lösungsmittel zurückgegriffen. Das in dieser Arbeit verwendete GeO<sub>2</sub> ist zu 100 % in HF<sub>konz</sub> löslich, während andere kommerzielle Produkte dies nicht waren oder unlösliche Bestandteile aufweisen. Die Reaktion von GeO<sub>2</sub> mit HF<sub>konz</sub> führt direkt zu der Bildung von GeF<sub>6</sub><sup>2-</sup> [89]. Diese ionische Form des Germaniums bietet eine einfache Möglichkeit, es von nicht ionischen Arsenspezies abzutrennen.

### 3.5.1.2 Fixierung und Reinigung des \*As auf einer Festphasenextraktionskartusche

Zu dem in HF<sub>konz</sub> gelösten Target wird NaI zugegeben und es bildet sich eine rötliche Lösung, die beim längeren Stehen tief rot wird. Dies ist auf die Bildung von Iod aus dem NaI zurückzuführen. Mit Hinblick auf eine spätere Verwendung der radioaktiven Lösung für *in vivo*-Anwendungen wurde das ursprünglich verwendete KI [120] durch NaI ersetzt. Die Lösung wird über eine Bond Elut ENV-Kartusche laufen gelassen. Dabei kann das \*As zu > 90 % auf der Kartusche fixiert werden, während das ionische GeF<sub>6</sub><sup>2-</sup> nicht von der Säule retardiert wird, worauf die Trennung basiert. Das Sorptionsmaterial dieser Kartusche besteht aus einem Styrol-Divinyl-Benzol-Polymer (SDVB), das ursprünglich für die Extraktion von polaren organischen Rückständen aus Wasserproben entwickelt wurde. Man kann also davon ausgehen, dass das \*As in einer polaren, aber nicht ionischen Form vorliegt und deshalb im Gegensatz zum GeF<sub>6</sub><sup>2-</sup> fixiert wird. Die Verteilungskoeffizienten für As und Ge auf diesem Material sind nicht literaturbekannt und wurden auch nicht experimentell bestimmt. Der gesamte Aufbau besitzt ein relativ großes Totvolumen. Deshalb wurde ein zusätzlicher Reinigungsschritt mit einem Gemisch aus HF<sub>konz</sub> und NaI etabliert. Hiermit werden Reste des GeF<sub>6</sub><sup>2-</sup> von der Säule gewaschen, während das \*As quantitativ auf der Säule bleibt. Dieser

Reinigungsschritt kann jedoch nicht alles Germanium von der Säule entfernen. Dies ist wahrscheinlich weniger auf eine Absorption des  $\text{GeF}_6^{2-}$  auf dem Säulenmaterial, als vielmehr auf Reste der HF-Lösung zurückzuführen, die sich aufgrund des Totvolumens des Versuchsaufbaus nicht vollständig entfernen lassen.

### 3.5.1.3 Elution des abgetrennten $^*As$ von der Bond Elut ENV Kartusche

Nach erfolgter Trocknung der Kartusche im Argonstrom kann diese mit 500  $\mu\text{l}$  Ethanol eluiert werden. Im Gegensatz zu den veröffentlichten Daten [120] konnten hier nur ca. 50 % der fixierten  $^*As$ -Aktivität eluiert werden. Allerdings kann die lange Trocknung im Argonstrom die Eigenschaften der Kartusche etwas verändert haben. Das Ethanol eluiert leider zusätzlich zum  $^*As$  auch das auf der Kartusche fixierte Iod, das aus der NaI-Lösung kommt. Um die Absorption des Iods zu minimieren wurden Bond Elut ENV Kartuschen mit 25 mg Inhalt, anstatt der ursprünglich 100 mg Kartuschen verwendet. Eine Verschlechterung der Fixierung des nca  $^*As$  wurde hierbei nicht beobachtet. Der Restgehalt an Germanium in der Ethanol Lösung liegt bei  $60,1 \mu\text{g} \pm 27 \mu\text{g}$  (bezogen auf 100 mg  $\text{GeO}_2$ ). Dies ergibt einen Abtrennungsfaktor von  $1344 \pm 666$  oder eine mittlere Abtrennung des  $\text{GeO}_2$  von 99,93 %. Diese Restmengen an Germanium stören die spätere Markierung von Antikörpern nicht. Auch sollte man die Toxizität solcher Mengen vernachlässigen können. Zyklotron-Targets, bei denen keine radioaktiven Germaniumisotope erzeugt werden kann man mit dieser Methode also durchaus verarbeiten.

Anders sieht dies jedoch für Bestrahlungen am Kernreaktor aus. Hier werden neben dem benötigten  $^{77}\text{As}$  auch  $^{77}\text{Ge}$  ( $T_{1/2} = 11,3 \text{ h}$ ) und  $^{71}\text{Ge}$  ( $T_{1/2} = 11,4 \text{ d}$ ) in nicht unerheblichen Aktivitäten produziert. Diese könnten bei einer Produktion des  $^{77}\text{As}$  im GBq-Maßstab an Hochflussreaktoren für therapeutische Zwecke zum Problem werden, da man bei einer im Vergleich zum TRIGA-Reaktor um den Faktor 1000 gesteigerten Produktion des  $^{77}\text{As}$  gleichzeitig auch mehr ungewollte Nebenprodukte mitproduziert.

### 3.5.1.4 Bestimmung des Oxidationszustands von $^*As$

Die wichtigsten Parameter am Ende der Abtrennung des  $^*As$  aus dem  $\text{GeO}_2$  Target sind am Schluss die radiochemische Reinheit, der pH-Wert und der Oxidationszustand, da nur  $^*As(\text{III})$  mit SH-Gruppen in nanomolaren Konzentrationen reagiert. Betrachtet man sich die Literatur zum Thema Arsen und Reduktion von  $\text{As}(\text{V})$  zu  $\text{As}(\text{III})$ , so wird immer wieder selbstverständlich davon gesprochen, dass NaI in der Lage ist, das Arsen zu reduzieren, welches dann als  $\text{AsI}_3$  vorliegen soll [85, 89, 94, 96, 97, 120]. Überraschenderweise konnte dies für die nca  $^*As$  Isotope so nicht bestätigt werden. Eluiert man das  $^*As$  mit Ethanol von der Säule und bestimmt den Oxidationszustand mittels Radio-DC, so findet man 100 %  $^*As(\text{V})$  (siehe Tabelle 15). Eine Erklärung hierfür ist das gebildete Iod, welches als

Oxidationsmittel für das  $^*As(III)$  wirkt. Löst man  $NaI$  in  $HF_{konz}$ , so wird ein kleiner Teil der Iodid-Ionen zu elementarem Iod oxidiert. Dieses ist optisch an der rötlichen Verfärbung der  $HF$ -Lösung zu erkennen. Das Iod wird dann im Gegensatz zu den im Überschuss vorhandenen Iodid-Ionen genauso wie das  $^*As$  auf der Bond Elut ENV Kartusche fixiert. Mit dem Entfernen des eigentlichen Reduktionsmittels Iodid aus dem Gleichgewicht kommt es dann zu einem Überschuss an Oxidationsmittel Iod, was nach der Elution mit Ethanol das  $^*As$  zu  $^*As(V)$  oxidiert. Gibt man nun  $500\ \mu l$  PBS-Puffer ( $0,5\ M$  Hydroxylamin,  $25\ mM$  EDTA) dazu, so hat dies zwei wichtige Effekte. Zum Einen wird das Iod direkt wieder zu Iodid reduziert, was sich durch die Entfärbung der Lösung bemerkbar macht. Zum Anderen wird das  $^*As(V)$  quantitativ zu  $^*As(III)$  reduziert und kann somit zum Markieren von Antikörpern eingesetzt werden.

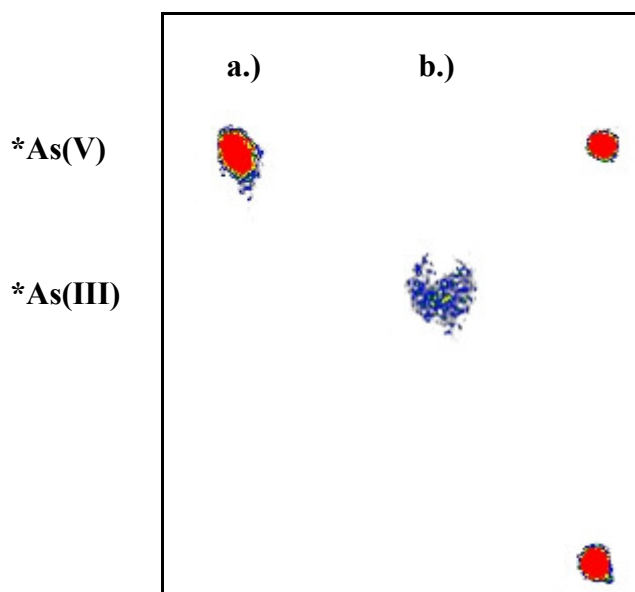


Abbildung 24: Radio-DC zur Bestimmung des Oxidationszustandes: a.) Ethanol; b.) PBS-Puffer

Tabelle 15: Oxidationszustand von  $^*As$  in Ethanol und PBS-Puffer mit Hydroxylamin

<i>Oxidationszustand Ethanol</i>	<i>[%]</i>	<i>Oxidationszustand in PBS</i>	<i>[%]</i>
$^*As(III)$	0	$^*As(III)$	99
$^*As(V)$	100	$^*As(V)$	1

Die ursprüngliche Theorie, dass es sich bei dem abgetrennten  $^*As$  um  $^*AsI_3$  handelt, scheint somit hinfällig, da sich in der wässrigen Phase nur noch ein Bruchteil der ursprünglich hinzugegebenen Iodid-Ionen befindet. Es sollte sich eher um eine hydrolysierte Form des  $^*As(III)$  wie z.B.  $As(OH)_3$  handeln. Eine genaue Analyse der vorhandenen Spezies mit konventionellen Methoden ist aufgrund der geringen Mengen an radioaktivem Arsen nicht möglich.

### 3.5.1.5 Zusammenfassung Abtrennungsmethode mittels Festphasenextraktion

Die typischen Ergebnisse einer Abtrennung von  $^{75}\text{As(III)}$  aus einem am TRIGA bestrahlten  $\text{GeO}_2$ -Target sind in Tabelle 16 dargestellt.

**Tabelle 16: Ergebnisse der Abtrennung von  $^{75}\text{As}$  aus  $^{75}\text{GeO}_2$ -Targets mittels Festphasenextraktion**

	<i>Ausbeute [%]</i>	<i>Fehler</i>
$^{75}\text{As}$ auf Bond Elut ENV fixiert	92,2	$\pm 6,2$
$^{75}\text{As}$ eluiert mit 500 $\mu\text{l}$ EtOH	39,6	$\pm 14,4$
$^{75}\text{As(III)}$ in EtOH / PBS	98,5	$\pm 0,7$
Reinheit $^{75}\text{As}$	99,93	

Der Abtrennungsfaktor für Germanium liegt bei  $1344 \pm 666$ . Dies bedeutet einen Germaniumgehalt von  $60,1 \mu\text{g} \pm 27 \mu\text{g}$  bezogen auf ursprünglich 100 mg  $\text{GeO}_2$ .

#### **Vorteile dieser Methode:**

Die Abtrennung mittels Festphasenextraktion ist im Vergleich zu anderen Methoden relativ schnell. Drückt man die Lösungen mit Druck durch die Säule, so kann man die Zeit der eigentlichen Abtrennung auf wenige Minuten verkürzen. Diese Methode ist auch die einzige bekannte, bei der man  $^{75}\text{As}$  aus einem relativ großem Volumen (z.B. 5 ml  $\text{HF}_{\text{konz}}$ ) auf ca. 500  $\mu\text{l}$  in EtOH ohne Erhitzen konzentrieren kann. Eine essentielle Bedingung zur weiteren Verwendung des abgetrennten  $^{75}\text{As}$  ist durch das Erhalten von nahezu 100 %  $^{75}\text{As(III)}$  nach der Zugabe von Hydroxylamin als Reduktionsmittel erfüllt.

#### **Nachteile dieser Methode:**

Man erzeugt bei der Abtrennung 10 ml radioaktiven  $\text{HF}_{\text{konz}}$  Abfall und sollte alle Arbeitsschritte immer in einer Glovebox durchführen. Der Trennfaktor As/Ge von etwas über 1000 ist zwar für Tierversuche vollkommen ausreichend, könnte jedoch bei einer potentiellen Anwendung am Menschen zum Problem werden. Gerade bei der Verwendung von Flusssäure muss man sich absolut sicher sein, alle Spuren bei der Trocknung zu entfernen, was die Prozedur in die Länge zieht. Gleichzeitig bedeutet eine gründliche Trocknung der Säule eine Verschlechterung der Ausbeute bei der Elution mit 500  $\mu\text{l}$  EtOH. Das Ethanol selbst ist ebenfalls bei der Verwendung der Lösung zur Markierung von Proteinen nicht optimal, da es in zu hoher Konzentration zu Denaturierung von Proteinen führen kann. Prinzipiell ist diese Abtrennungsmethode nur mit  $\text{GeO}_2$  durchzuführen, da sich Germaniummetall nicht in  $\text{HF}_{\text{konz}}$  ohne Zugabe von Oxidationsmitteln ( $\text{HNO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) löst.

### 3.5.1.6 Markierung von SATA-modifiziertem Bevacizumab mit $^{77}\text{As}$

Die  $^{77}\text{As(III)}$ -Lösung wird mit 1 ml SATA-modifiziertem Bevacizumab in PBS-Puffer für 1 h inkubiert. Dabei dient die zur Reduktion des  $^{77}\text{As}$  zugegebene Hydroxylamin-Lösung gleichzeitig als Entschützungslösung für den Antikörper, um freie SH-Gruppen zu erzeugen. Mit dem SATA-modifizierten Antikörper konnte in diesen Experimenten keine Markierungsausbeute erzielt werden, obwohl das  $^{77}\text{As}$  als  $^{77}\text{As(III)}$  vorliegt. Eine einfache Erklärung für diesen Sachverhalt gibt es nicht, zumal eine Zugabe von TCEP als Reduktionsmittel für endogene Disulfidbrücken dazu führt, dass innerhalb einer Stunde eine Markierung mit Ausbeuten  $> 90\%$  erzielt werden kann. Eine mögliche Erklärung ist die relativ große Menge an EtOH (25 %) in der Lösung. Retrospektiv lässt sich jedoch auch sagen, dass die am Anfang der Arbeit mit dieser Methode durchgeführten Markierungen nur dann erfolgreich waren, wenn TCEP vorher zur EtOH Fraktion zugegeben wurde, um das gebildete Iod zu reduzieren. Hier wurde das EtOH in der Regel vor seiner Verwendung im Argonstrom auf 50 - 100  $\mu\text{l}$  eingeeengt.

### 3.5.1.7 Markierungen von Bevacizumab unter Verwendung von TCEP

Die zweite Möglichkeit, freie SH-Gruppen im Antikörper zu generieren, besteht in der Verwendung von TCEP zur Reduktion endogener Disulfidbrücken im Antikörper. Dazu wird die  $^{77}\text{As(III)}$ -Lösung und Bevacizumab (1,25 mg) in PBS-Puffer oder 0,9 %iger NaCl-Lösung vereinigt und das TCEP zugegeben. Dies bietet die Möglichkeit, die Generierung freier SH-Gruppen und deren Markierung parallel durchzuführen. Manchmal wurden die 500  $\mu\text{l}$  Ethanol auch vorher im Argonstrom auf ca. 50  $\mu\text{l}$  eingeeengt. Dies bietet sich vor allem dann an, wenn man den markierten Antikörper später noch mittels Gelfiltration aufreinigen will, weil eine Volumenreduzierung so einfach durchzuführen ist. Typischerweise liegen die Markierungsausbeuten nach 30 Minuten bei 40 % und nach 1 h bei über 90 %.

Zur Überprüfung der Stabilität der Arsen-mab-Bindung wurde der Antikörper VG76e mit 50  $\mu\text{l}$   $^{77}\text{As}$  in Ethanol unter Zugabe von 10  $\mu\text{l}$  TCEP für 30 min bei 37 °C umgesetzt. Die Ausbeute war quantitativ. Nach erfolgter Gelfiltration wurde die Probe aufgehoben und bis zu 6 Tagen die Stabilität überprüft. Das Produkt war stabil. Im HPLC-Chromatogramm kann man das UV-Signal des Antikörpers bei 6,8 min sehen (Abbildung 25). Das korrespondierende radioaktive Signal kommt erst bei 7,5 min, da sich der Radio-Detektor hinter dem UV-Detektor befindet.

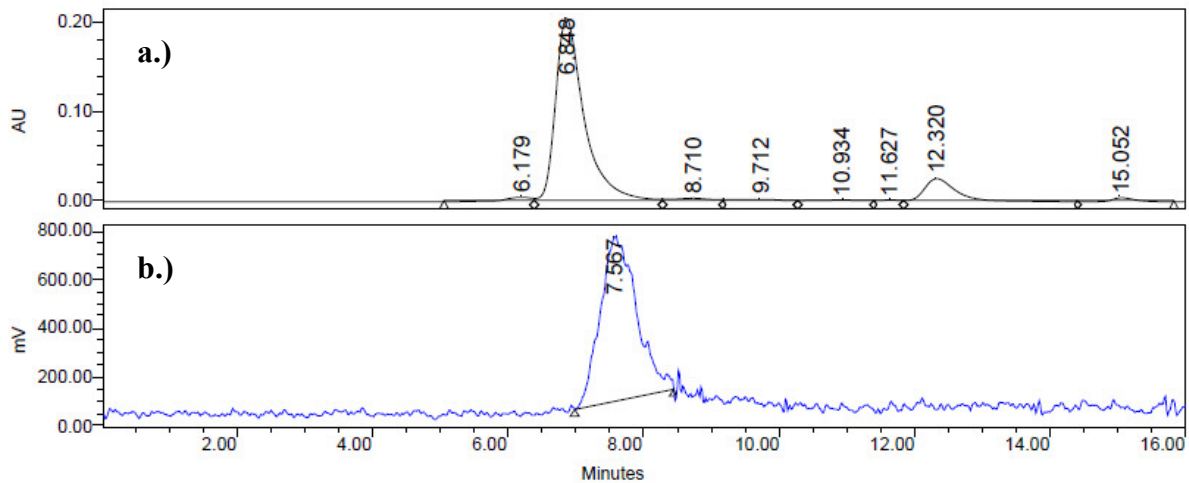


Abbildung 25: Stabilität von  $^{77}\text{As-VG76e}$  100 h nach Markierung mit SEC-HPLC a.) UV (280 nm) b.) Radiodetektor

Des Weiteren wurde zu 1 mg  $^{77}\text{As-VG76e}$  1 mg BSA in 100  $\mu\text{l}$  PBS-Puffer gegeben und die Lösung zu verschiedenen Zeiten mittels SEC-HPLC auf die Stabilität des mab getestet. Hiermit sollte herausgefunden werden, ob es zu einer Übertragung des  $^{77}\text{As}$  auf andere Proteine im Blut kommen kann. Mit Hilfe der hochauflösenden SEC-HPLC ergibt sich für den Antikörper mit einer Molmasse von 150 kDa eine Retentionszeit von ca. 6,9 Minuten. Das leichtere BSA hat eine Molmasse von ca. 68 kDa und wird nach ca. 7,8 min eluiert. Die Stabilität des  $^{77}\text{As-VG76e}$  wurde bis zu 64 h nach der Inkubation überwacht (Abbildung 26) und es war keine Zersetzung des Markierungsprodukts zu beobachten.

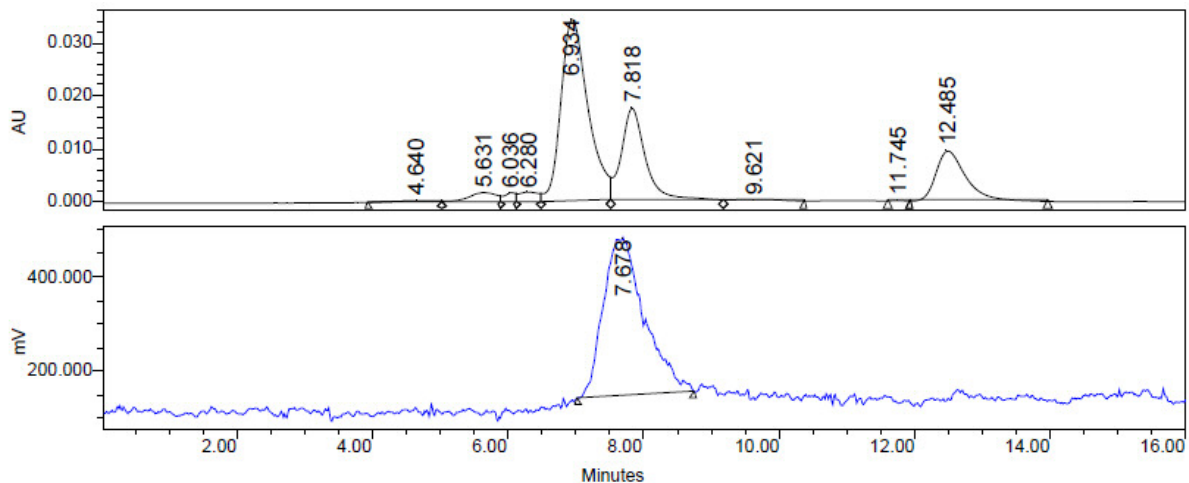


Abbildung 26: Stabilität von  $^{77}\text{As-VG76e}$  in 1 mg BSA 64 h nach Markierung mit SEC-HPLC a.) UV (280 nm) b.) Radiodetektor

### 3.5.2 Abtrennung von <sup>72/74/77</sup>As aus einem GeO<sub>2</sub>-Target mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) aus HF/NaI-Medium (MJ02)

#### 3.5.2.1 Allgemeines zur Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) zur Trennung von Arsen und Germanium

Die Trennung von As und Ge in verschiedenen Lösungen durch LLE wurde mehrfach in der Literatur beschrieben [86-89, 94, 96, 97]. Ein Problem bei der Trennung von As(III) und Ge in HCl-Lösungen stellt ihr ähnliches Extraktionsverhalten unter diesen Bedingungen dar [85, 89]. Es gibt zwei Möglichkeiten, dieses zu beeinflussen. Man kann das Arsen zunächst mit Oxidationsmitteln wie HNO<sub>3</sub> oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu As(V) oxidieren und es erst nach erfolgter Extraktion des Germaniums als GeCl<sub>4</sub> wieder reduzieren. Diese Strategie ist für die geringen Substanzmengen des nca \*As nicht so gut geeignet, da man zunächst das Oxidationsmittel zu 100 % aus der Lösung wieder entfernen muss. Außerdem ist es auch schwierig, die 100 mg GeO<sub>2</sub> in einem kleinen Volumen HCl zu lösen. Eine einfachere Alternative bietet die Verwendung eines anderen Lösungsmittels, da nur in HCl<sub>konz</sub> sowohl AsCl<sub>3</sub>, als auch GeCl<sub>4</sub> parallel nebeneinander vorliegen. HF<sub>konz</sub> scheint hierfür optimal geeignet zu sein, da es mit GeO<sub>2</sub> das geladene GeF<sub>6</sub><sup>2-</sup> bildet, das sich nicht in organische Lösungsmittel extrahieren lässt (siehe auch Kapitel 3.5.1). Auch ist HF als Lösungsmittel für GeO<sub>2</sub> prinzipiell sehr gut geeignet, da sich 100 mg bereits in 500 µl HF<sub>konz</sub> restlos auflösen. In Kapitel 3.3.2 wurde bereits diskutiert, dass das \*As nach Bestrahlung von GeO<sub>2</sub> am Kernreaktor zunächst als \*As(III) vorliegen sollte. In der Literatur finden sich keine auf dieses Problem zugeschnittene Aussagen, nur Hinweise [150]. Wenn das \*As eine Verbindung mit den Fluoridionen eingeht, dann spricht vieles dafür, dass es sich um AsF<sub>3</sub> handelt. Diese ist eine Flüssigkeit mit einem Siedepunkt von 57 °C. Im Gegensatz dazu ist AsF<sub>5</sub> ein flüchtiges Gas mit einem Siedepunkt von -52,8 °C. Dieses sollte also sofort verdampfen, was allerdings nicht beobachtet wurde. Außerdem ist es möglich, \*As aus der HF-Phase in CCl<sub>4</sub> zu extrahieren, wenn man die HF<sub>konz</sub> mit HCl zu etwa 8 M Lösung auffüllt (siehe Kapitel 3.5.4). HCl besitzt keinerlei reduzierende Eigenschaften für \*As(V). Interessant ist dann natürlich die Frage, warum man das AsF<sub>3</sub>, das unpolar sein sollte nicht in CCl<sub>4</sub> extrahieren kann. Man findet im Lehrbuch [151] folgendes Gleichgewicht:

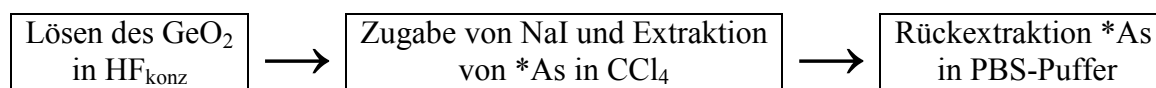


**Formel 4: Autoionisationsgleichgewicht von AsF<sub>3</sub>**

Sollte As(III) durch Autoionisation in HF also als Ionenpaar vorliegen, würde dies erklären, warum man es nicht extrahieren kann. Erst die Zugabe von anderen Anionen wie Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup> oder I<sup>-</sup> führt dann zu einem unpolaren Molekül, das sich ins CCl<sub>4</sub> extrahieren lässt. Mit klassischen analytischen Methoden beweisen lässt sich diese Theorie aufgrund der geringen Menge der nca Arsenatome nicht.

Eine in der analytischen Chemie bekannte Methode zur Probenvorbereitung bei der Arsenbestimmung ist die Extraktion von As(III) in unpolare organische Lösungsmittel und deren Rückextraktion in wässriges Medium vor einer Analyse [126-128, 152]. Ein ähnliches Setup (siehe Abbildung 27) wurde unter Verwendung von  $\text{HF}_{\text{konz}}$  als Lösungsmittel gewählt, um  $^*\text{As}$  aus  $\text{GeO}_2$ -Targets zu extrahieren.

In der Literatur wurden für Benzol sehr gute Extraktionsausbeuten für As(III) beschrieben [85]. Dies konnte in eigenen Versuchen auch bestätigt werden. Es zeigte sich jedoch, dass Benzol keine gute Wahl ist, wenn man das  $^*\text{As}$  danach wieder in die wässrige Phase extrahieren will. Es konnte keine gute Phasentrennung erreicht werden, was man bereits am Benzolgeruch der wässrigen Phase erkennen konnte. Die Zugabe von Antikörper zu dieser Lösung führte zu dessen sofortigem Ausfallen. Deshalb wurde  $\text{CCl}_4$  als organisches Lösungsmittel für die Extraktion ausgewählt. Es weist die geringste Mischbarkeit von allen getesteten Lösungsmitteln mit Wasser auf (0,8 %), was eine gute Abtrennung von der HF gewährleistet.



**Abbildung 27: Schematische Darstellung der Abtrennung von  $^*\text{As}$  aus  $\text{GeO}_2$ -Targets mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion nach Zugabe von NaI**

### 3.5.2.2 Extraktion des $^*\text{As}$ in $\text{CCl}_4$ und Rückextraktion in PBS-Puffer

Das in  $\text{HF}_{\text{konz}}$  gelöste  $\text{GeO}_2$ -Target wird nach Zugabe von NaI mit  $\text{CCl}_4$  ausgeschüttelt, und das  $^*\text{As}$  in die organische Phase extrahiert. Die Extraktionsausbeute von  $^*\text{As}$  beträgt nach zwei Extraktionen bis zu 100 %, während das gebildete  $\text{GeF}_6^{2-}$  in der wässrigen Phase verbleibt. In der Targetlösung bildet sich nur aus einem kleinen Teil des Iodids elementares Iod. Dieses macht sich durch eine Rotfärbung der Lösung bemerkbar. Bei der Extraktion des  $^*\text{As}$  in  $\text{CCl}_4$  wird ebenfalls das gebildete Iod mit in die organische Phase extrahiert. Um eine Abschätzung für den Iodgehalt in der  $\text{CCl}_4$ -Phase durchführen zu können wurde ein Tracerexperiment mit  $^{128}\text{I}$  ( $T_{1/2} = 25 \text{ m}$ ,  $\beta^- (93,1 \%)$ ) durchgeführt. Hieraus ergab sich für eine Extraktion ein Wert von ca. 160  $\mu\text{g}$  Iod in der organischen Phase. Man kann also davon ausgehen, dass in der wässrigen Phase ein Gleichgewicht zwischen beiden Oxidationsstufen des Iods vorliegt, welches noch stark auf der Seite des Iodids liegt und somit das Arsen als  $^*\text{As(III)}$  vorliegt. Man geht des Weiteren allgemein davon aus, dass As(V) nicht in die organische Phase extrahiert wird. Erst in der organischen Phase gilt dieses Gleichgewicht nicht mehr, da nur das unpolare  $\text{I}_2$  in  $\text{CCl}_4$  extrahiert werden kann. Somit sollte das Arsen erst

in der organischen Phase durch das I<sub>2</sub> zu \*As(V) oxidiert werden. Dies konnte mittels der Radio-DC-Methode auch nachgewiesen werden (Kapitel 3.5.2.3). Dies bedeutet, dass man bei der Rückextraktion in wässriges Medium ein Reduktionsmittel benötigt, welches sowohl das gebildete Iod wieder zu Iodid, als auch das \*As(V) zu \*As(III) reduziert.

Probleme bereitete auch das Abtrennen des \*As aus der CCl<sub>4</sub>-Phase. In den ersten Versuchen wurde versucht, das CCl<sub>4</sub> durch Verdampfen im Argonstrom zu Entfernen. Dies ist zwar möglich, führt jedoch zu Verlusten an \*As durch Absorption an den Gefäßwänden. Daraufhin wurde versucht, das \*As mit PBS-Puffer wieder in die wässrige Phase zurück zu extrahieren. Dies hat den großen Vorteil, dass man die HF<sub>konz</sub> direkt eliminiert hat und eine Lösung mit einem pH-Wert von ca. 7 bekommt, ohne weitere Maßnahmen zur Neutralisation der Lösung treffen zu müssen. Um das \*As(V) aus der organischen Phase wieder zu \*As(III) zu reduzieren, wurde dem PBS-Puffer Hydroxylamin zugesetzt. Es wurden 500 µl der PBS-Puffer-Lösung (0,5 M Hydroxylamin, 25 mM EDTA) verwendet, die sonst zum Entschützen eines SATA-modifizierten Antikörpers eingesetzt wird. Die Ergebnisse der einzelnen Schritte der Abtrennungsmethode sind in Tabelle 17 dargestellt.

**Tabelle 17: Ergebnisse der Abtrennung von <sup>77</sup>As aus <sup>77</sup>GeO<sub>2</sub>-Targets mittels LLE in HF/NaI-Medium**

	<i>Ausbeute [%]</i>	<i>Fehler</i>
Extraktion <sup>77</sup> As in CCl <sub>4</sub>	102,03	± 9,31
Extraktion <sup>77</sup> As in PBS	51,86	± 28,68
Gesamtextraktion	53,55	± 29,21
Reinheit <sup>77</sup> As	99,99	

Der Abtrennungsfaktor für Germanium liegt bei 8759 ± 4927. Dies bedeutet einen Germaniumgehalt von 10,5 µg ± 6,9 µg bezogen auf ursprünglich 100 mg GeO<sub>2</sub>.

Hervorzuheben ist die hohe Extraktionsausbeute des <sup>77</sup>As in CCl<sub>4</sub> zwischen 90 und 100 % nach zwei Extraktionen. Bei der Rückextraktion in PBS-Puffer konnten im Mittel zwar Ausbeuten von ca. 50 % erzielt werden, jedoch streuen die Ergebnisse relativ stark. Ohne erkennbare systematische Veränderung wurden Ausbeuten zwischen 15 und 80 % erreicht, was diese Methode anfällig erscheinen lässt. Insgesamt waren bezogen auf das Target Ausbeuten von 50 % an <sup>77</sup>As möglich. Die Reinheit des <sup>77</sup>As im PBS-Puffer bezogen auf <sup>77</sup>Ge ist etwas besser als das, was man mit der Festphasenextraktionsmethode erreichen kann. Dennoch kann man eine gewisse Schwankung des Germaniumgehaltes von 5 - 20 µg beobachten. Dies kann auch an einer minimalen Kontamination der CCl<sub>4</sub>-Phase beim Abtrennen aus der HF<sub>konz</sub> liegen, da sich die CCl<sub>4</sub>-Phase unter der HF-Phase befindet beim Herausziehen der Pipette durch die HF-Phase außen Anhaftungen eventuell verschleppt werden. Hier machen selbst 1/10 µl bereits ca. 20 µg Ge aus. Hervorzuheben ist auch die geringe Dauer der Abtrennung, die ohne die aufwändige Gammaskopie nur wenige Minuten dauert.

### 3.5.2.3 Bestimmung des Oxidationszustandes von \*As

Der Oxidationszustand des  $^{77}\text{As}$  wurde während der Abtrennung sowohl in der  $\text{CCl}_4$ - als auch in der PBS-Phase mittels der Radio-DC-Methode überwacht (Abbildung 28, Tabelle 18).

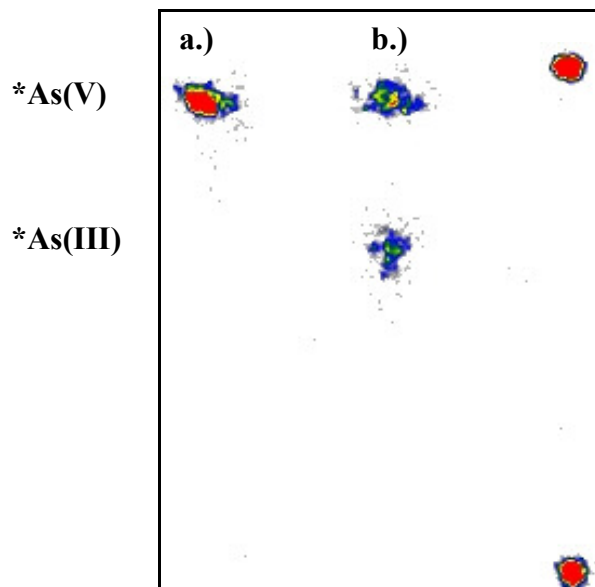


Abbildung 28: Radio DC zur Bestimmung des Oxidationszustandes: a.)  $\text{CCl}_4$ ; b.) PBS-Puffer

Tabelle 18: Oxidationszustand von  $^{77}\text{As}$  in  $\text{CCl}_4$  und PBS nach Reduktion mit NaI

<i>Oxidationszustand <math>\text{CCl}_4</math></i>	<i>[%]</i>	<i>Oxidationszustand in PBS</i>	<i>[%]</i>
*As(III)	$4,33 \pm 1,42$	*As(III)	$49,38 \pm 3,82$
*As(V)	$95,68 \pm 1,42$	*As(V)	$50,38 \pm 3,54$

Als die Radio-DC Methode zur Überprüfung des Oxidationszustandes von \*As zur Verfügung stand, war es eine große Überraschung, dass in der  $\text{CCl}_4$ -Phase fast ausschließlich  $^{77}\text{As(V)}$  vorlag. Umso überraschender ist jedoch, dass es nach dem Ausschütteln mit PBS-Puffer (0,5 M Hydroxylamin, 25 mM EDTA) nicht wie bei der Festphasenextraktions-Methode zu einer vollständigen Reduktion zu  $^{77}\text{As(III)}$  kommt. Stattdessen bildet sich reproduzierbar ein 1 : 1 Gemisch von beiden Oxidationszuständen. Für dieses Phänomen gibt es zunächst keine Erklärung. Auch stehen diese Ergebnisse nicht in Einklang mit den Untersuchungen zur Extraktion von geträgertem  $^{76}\text{As(V)}$  in  $\text{CCl}_4$  nach Zugabe von NaI (Kapitel 3.5.6.1). Hier war noch bei der Rückextraktion eine fast quantitative Reduktion zu  $^{76}\text{As(III)}$  beobachtet worden. Es bedeutet aber de facto auch, dass sich die im Vergleich zur Festphasenextraktion erhöhte Gesamtausbeute von 50 % auf 25 % effektiv nutzbares Arsen reduziert, da nur \*As(III) mit SH-modifizierten Antikörpern reagiert. Dieses wird im nächsten Abschnitt noch konkretisiert. Leider konnte während der gesamten Arbeit auch kein Reduktionsmittel gefunden werden, welches das \*As(V) in neutralem Medium wieder zu \*As(III) reduziert. Dabei muss natürlich auch darauf geachtet werden, dass ein

Reduktionsmittel nicht den Antikörper zerstört oder den pH-Wert zu stark verändert. Deshalb wurde im Laufe der weiteren Arbeit der Fokus auf die Verwendung eines anderen Reduktionsmittels für Arsen gelegt, das in  $\text{CCl}_4$  kein  $^*As(V)$  bilden sollte.

#### **Vorteile dieser Methode:**

Die Flüssig-Flüssig-Extraktion von  $^*As$  aus HF-Medium unter Zugabe von  $\text{NaI}$  ist eine schnelle und einfache Methode, um  $nca$   $^*As$  aus  $\text{GeO}_2$ -Targets abzutrennen. Die gesamte Prozedur kann in ca. 15 min durchgeführt werden. Insbesondere können hohe Extraktionsausbeuten in  $\text{CCl}_4$  von bis zu 100 % erzielt werden. Die Methode kommt mit weniger Flusssäure als die in Kapitel 3.4.1 beschriebene Festphasenextraktion aus und liefert dabei sogar noch eine etwas bessere Abtrennung des Germaniums. Dabei kann das Germanium zu 99,99 % abgetrennt werden, was einem mittleren Gehalt von ca. 10  $\mu\text{g}$  bedeutet. Bei der Rückextraktion in PBS-Puffer wird das  $^*As$  ohne weiteren Aufwand direkt in einer Lösung mit neutralem pH-Wert erhalten und steht somit für Markierungsversuche zur Verfügung. Ein weiterer Vorteil ist auch, dass das Volumen der wässrigen Phase mit 500  $\mu\text{l}$  sehr klein ist. Des Weiteren ist in der Produktlösung kein Ethanol enthalten, das zu Denaturierung von Proteinen führen könnte.

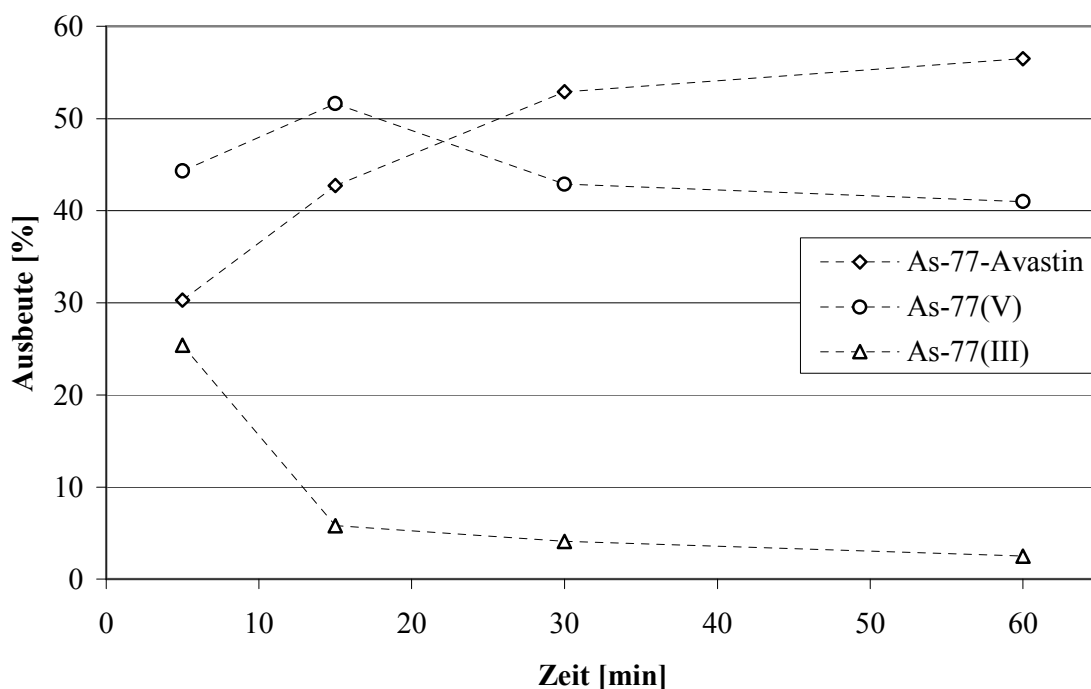
#### **Nachteile dieser Methode:**

Die Rückextraktion des  $^*As(V)$  aus der organischen Phase in das wässrige Medium unterliegt einer relativ großen Schwankung. Dazu kommt, dass in der wässrigen Produktfraktion immer eine 1:1-Mischung aus  $^*As(V)$  und  $^*As(III)$  vorliegt. Dies führt dazu, dass sich die nutzbare Aktivität von ca. 50 %, die in PBS extrahiert werden konnten, auf nur noch 25 % halbiert. Diese Tatsachen machen die Methode für praktische Anwendungen so lange unbrauchbar, bis ein zuverlässiges Reduktionsmittel für  $^*As(V)$  gefunden wird.

#### **3.5.2.4 Markierung von Bevacizumab mit $^{77}\text{As}$ aus $\text{GeO}_2$ -Targets nach Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) aus HF/ $\text{NaI}$ -Medium**

Das aus dieser Abtrennungsmethode erhaltene  $^{77}\text{As}$  wurde direkt für Markierungsversuche des monoklonalen Antikörpers Bevacizumab eingesetzt. Dies ist möglich, da kein Ethanol in der Lösung vorliegt, was zu einem Ausfallen des komplexen Proteins führen könnte. Aus Kapitel 3.5.2.3 ist bekannt, dass sich in der  $^*As$ -Lösung in etwa ein 1:1-Gemisch von  $^*As(III)$  und  $^*As(V)$  befindet. Aufgrund der Einfachheit der Methode wurden alle Versuche mittels TCEP als Reduktionsmittel für endogene Disulfidbrücken durchgeführt. Dazu wurde Bevacizumab direkt in die  $^*As$ -Lösung gegeben und mit TCEP versetzt. Die Lösung wird für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten Aliquots zur

Überwachung der Reaktionskinetik entnommen und per Radio-DC (Abbildung 26) bzw. per HPLC (Abbildung 30) analysiert.



**Abbildung 29: Reaktionsverlauf der Markierung von Bevacizumab mit  $^{77}\text{As}$  unter Verwendung von TCEP bei Raumtemperatur mittels Radio-DC bestimmt**

Diese Werte stammen aus einem einzelnen Experiment und stehen exemplarisch für die erzielten Ausbeuten mit dieser Abtrennungsmethode. Man erkennt die Abnahme des  $^{77}\text{As(III)}$  und die Zunahme der Markierungsausbeute von Bevacizumab. Parallel dazu ändert sich der Gehalt an  $^{77}\text{As(V)}$  nicht wesentlich. Man kann aus diesen Messwerten mehrere Dinge herauslesen:

1. Nur  $^{77}\text{As(III)}$  kann mit den freien SH-Gruppen reagieren. Dies wurde zwar schon immer vermutet, jedoch fehlte bisher der experimentelle Beweis.
2. Da der  $^{77}\text{As(V)}$  Gehalt mehr oder weniger konstant bleibt, ist die maximale Ausbeute an markiertem Antikörper über die Menge an  $^{77}\text{As(III)}$  in der Ursprungslösung festgelegt. Da diese in allen Versuchen nach LLE aus HF/NaI-Medium um die 50 % lag, kann man auch von einer maximal erreichbaren Markierungsausbeute von ca. 50 % ausgehen. Eine kleine Auffälligkeit kann man noch im Chromatogramm der Gelfiltrations-HPLC erkennen (Abbildung 30). Der erste Peak im Chromatogramm bei ca. 4 min kommt von dem markierten Bevacizumab. Das freie  $^{77}\text{As(III)}$  verteilt sich normalerweise auf einen sehr breiten Peak, der sein Maximum bei 10,8 min hat. Das  $^{77}\text{As(V)}$  jedoch kommt bereits 2 min früher in einem noch relativ scharfen Peak. Dies sollte eigentlich nicht passieren, da zwischen beiden

Oxidationszuständen keinerlei Größenunterschied besteht (im Vergleich zu einem Antikörper). Es müssen hier also sekundäre Wechselwirkungen des \*As(V) mit dem Säulenmaterial vorliegen. Leider kann man die HPLC trotzdem nicht zur Bestimmung des Oxidationszustandes des \*As einsetzen, da beide Peaks ineinander überlaufen und vor allem kleine Mengen einer Spezies somit im Signal der Anderen untergehen.

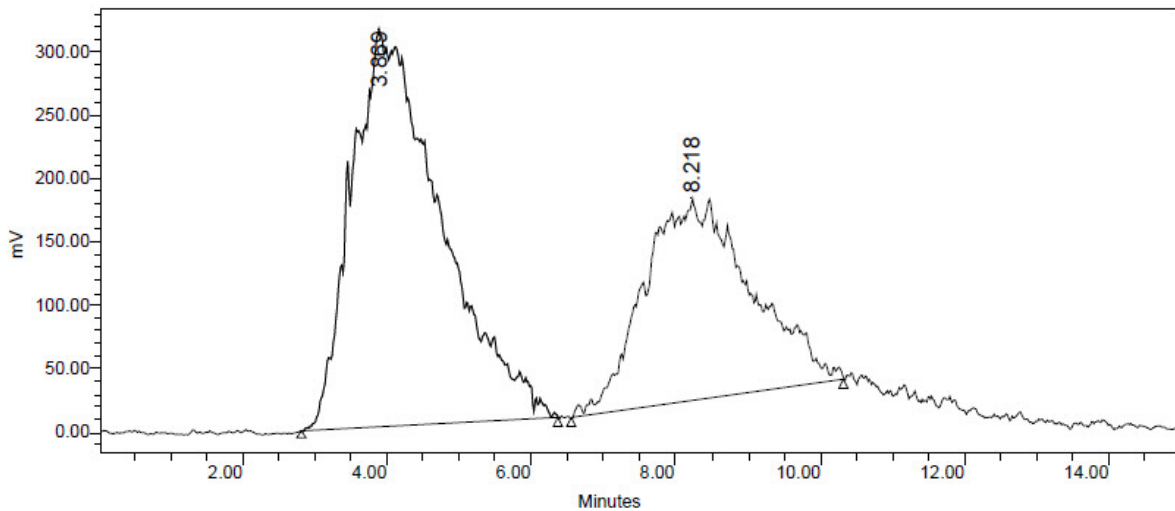


Abbildung 30: Radiosignal der Gelfiltrations-HPLC 1 h nach Reaktionsbeginn

Die Stabilität einer über Gelfiltration abgetrennten Antikörperfraktion wurde nicht untersucht, da die gesamte Methode für die Markierung von Antikörpern wegen der ca. 50 % \*As(V) nicht Erfolg versprechend erscheint.

### 3.5.3 Abtrennung von $^{72/74/77}\text{As}$ aus einem $\text{GeO}_2$ -Target mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) aus HF/HBr-Medium (MJ03)

Diese Methode (Abbildung 31) ist zum Abtrennen von  $^{72/74/77}\text{As}$ -Isotopen aus  $\text{GeO}_2$ -Targets geeignet. Sie baut auf der zuvor beschriebenen Methode der LLE aus HF/NaI-Medium (MJ02) auf. Da NaI sich als problematisch im Bezug auf den Oxidationszustand des \*As erwiesen hatte, sollte erprobt werden, ob sich diese Probleme unter Verwendung von HBr umgehen lassen.

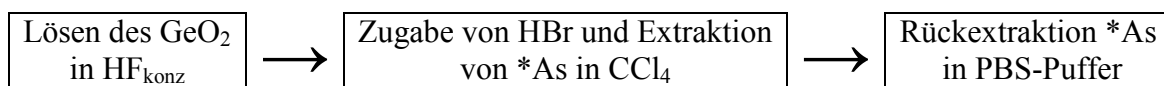


Abbildung 31: Schematische Darstellung der Abtrennung von \*As aus  $\text{GeO}_2$ -Targets mittels LLE nach Zugabe von HBr

### 3.5.3.1 Extraktion des <sup>77</sup>As in CCl<sub>4</sub> und Rückextraktion in PBS-Puffer

Zu dem in HF<sub>konz</sub> gelösten GeO<sub>2</sub>-Target wird HBr zugegeben und das <sup>77</sup>As in die CCl<sub>4</sub>-Phase extrahiert. Mit zwei Extraktionen lassen sich bis zu 90 % des <sup>77</sup>As in CCl<sub>4</sub> extrahieren, während das GeF<sub>6</sub><sup>2-</sup> in der wässrigen Phase verbleibt. Da man auch gute Ausbeuten für die Rückextraktion erreichen möchte wurde darauf verzichtet, eine dritte Extraktion durchzuführen, was wiederum ein größeres Lösungsmittelvolumen an CCl<sub>4</sub> bedeutet hätte. Für die Trennung essentiell ist die Bildung von GeF<sub>6</sub><sup>2-</sup> in HF<sub>konz</sub>, da dieses als ionische Verbindung anders als das unpolare <sup>77</sup>As(III) nicht in CCl<sub>4</sub> extrahiert werden kann. Im Gegensatz zur Verwendung von NaI bleibt die Lösung während der Extraktion die ganze Zeit farblos, was darauf hindeutet, dass entweder kein, oder nur sehr wenig Brom entsteht und in CCl<sub>4</sub> extrahiert wird. Mit einer Extraktion der organischen Phase mit PBS-Puffer erreicht man Extraktionsausbeuten ca. 60 % des in CCl<sub>4</sub> extrahierten <sup>77</sup>As. Dies bedeutet eine Gesamtausbeute von ca. 50 % <sup>77</sup>As bezogen auf die Startaktivität im Target. Die Lösung steht direkt für Markierungsexperimente von Antikörpern zur Verfügung, da sie bereits den richtigen pH-Wert von 7 besitzt. Die Ausbeuten der Extraktionsschritte werden in Tabelle 19 aufgelistet. Der Abtrennungsfaktor für Germanium liegt bei 4184 ± 855. Dies bedeutet einen Germaniumgehalt von 16,9 µg ± 3,4 µg bezogen auf ursprünglich 100 mg GeO<sub>2</sub>.

Tabelle 19: Ergebnisse der Abtrennung von <sup>77</sup>As aus <sup>77</sup>GeO<sub>2</sub>-Targets mittels LLE in HF/HBr-Medium

	<i>Ausbeute [%]</i>	<i>Fehler</i>
Extraktion in CCl <sub>4</sub>	88,3	± 1,6
Extraktion in PBS	58,2	± 11,8
Gesamtextraktion	51,4	± 10,3
Reinheit <sup>77</sup> As	99,98	

### 3.5.3.2 Bestimmung des Oxidationszustandes von $^{77}\text{As}$

Für den Oxidationszustand in  $\text{CCl}_4$  und PBS ergaben sich für diese Abtrennungsmethode das in Abbildung 32 dargestellte Radio-DC die in Tabelle 20 aufgelisteten Werte.

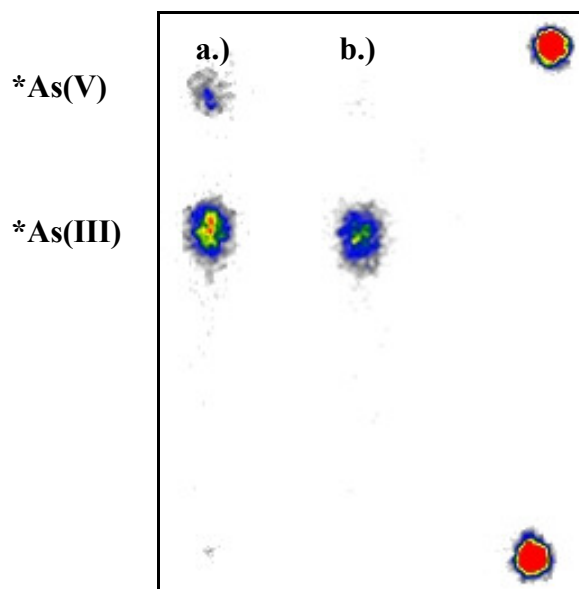


Abbildung 32: Radio-DC zur Bestimmung des Oxidationszustandes von  $^{77}\text{As}$ : a.)  $\text{CCl}_4$  b.) PBS

Tabelle 20: Oxidationszustand von  $^{77}\text{As}$  in  $\text{CCl}_4$  und PBS nach Reduktion mit HBr

<i>Oxidationszustand in <math>\text{CCl}_4</math></i>	<i>[%]</i>	<i>Oxidationszustand in PBS</i>	<i>[%]</i>
$^{77}\text{As(III)}$	$69,4 \pm 4,6$	$^{77}\text{As(III)}$	$93,4 \pm 2,7$
$^{77}\text{As(V)}$	$29,8 \pm 5,6$	$^{77}\text{As(V)}$	$6,5 \pm 2,6$

Im Gegensatz zur Verwendung von NaI als Reduktionsmittel wird mit HBr bereits in der organischen  $\text{CCl}_4$ -Phase ein deutlich höherer Anteil  $^{77}\text{As(III)}$  von ca. 70 % erhalten. Nach der Rückextraktion in PBS-Puffer (0,5 M Hydroxylamin, 25 mM EDTA) erreicht man reproduzierbar mehr als 90 %  $^{77}\text{As(III)}$  und kann diese Lösung direkt zur Markierung einsetzen. Aus den Daten ist nicht ersichtlich, ob es sich bei dem  $^{77}\text{As(V)}$  um Teile des in  $\text{CCl}_4$  befindlichen  $^{77}\text{As(V)}$  handelt, oder ob das in PBS extrahierte  $^{77}\text{As(III)}$  zu einem kleinen Teil wieder oxidiert.

#### Vorteile dieser Methode:

Die Flüssig-Flüssig-Extraktion von  $^{77}\text{As}$  aus HF-Medium unter Verwendung von HBr als Reduktionsmittel (MJ03) ist analog MJ02 (Kapitel 3.5.2) die schnellste Methode zur Abtrennung von  $^{77}\text{As}$  aus  $\text{GeO}_2$ -Targets, die während dieser Arbeit entwickelt wurde. Man kann innerhalb von 15 min zu einer gereinigten  $^{77}\text{As}$ -Fraktion in PBS-Puffer kommen und mit der Markierung beginnen, wenn man auf die aufwändige  $\gamma$ -Spektroskopie verzichtet. Die

Trennung kann in jedem Labor ohne besonderen apparativen Aufwand durchgeführt werden. Außer den verwendeten Chemikalien werden nur Plastikgefäße und Pipetten benötigt. Diese Methode ist insbesondere dann gut geeignet, wenn man nicht viel Zeit verlieren darf. Dies wäre beispielsweise der Fall, wenn man mit kurzlebigen  $^{70}\text{As}$  ( $T_{1/2} = 53 \text{ min}$ ) arbeiten würde. Man erreicht insgesamt eine Extraktion an  $^*\text{As}$  von ca. 50 % in 500  $\mu\text{l}$  PBS-Puffer, was mit der Abtrennungsmethode MJ02 (Kapitel 3.5.2) vergleichbar ist und über den Ausbeuten der Festphasenextraktion MJ01 (Kapitel 3.5.1) liegt. Im Gegensatz zu der Verwendung von NaI als Reduktionsmittel (MJ02) erhält man mit dieser Abtrennungsmethode über 90 %  $^{77}\text{As(III)}$  in PBS-Puffer. Die Reinheit bezogen auf  $\text{GeO}_2$  liegt bei 99,98 %. Sowohl die verwendete  $\text{HF}_{\text{konz}}$ , als auch die  $\text{HBr}_{\text{konz}}$  sind in sehr hoher Reinheit (Verunreinigungen an inaktivem Arsenträger  $< 1 \text{ ppb}$ ) verfügbar, was für eine hohe spezifische Aktivität unabdingbar ist.

#### **Nachteile dieser Methode:**

Leider gibt es hierbei keine einfache Möglichkeit, den Abtrennungsfaktor weiter zu erhöhen. Der limitierende Faktor ist die Löslichkeit von 0,08 % Wasser in  $\text{CCl}_4$ . Dies ist in etwa auch die Größenordnung des mitextrahierten Germaniums. Da die wässrige und organische Phase manuell mittels einer Pipette voneinander getrennt werden, kann es hier zu einer ungewollten Übertragung der wässrigen in die organische Phase kommen und somit den Abtrennungsfaktor erniedrigen. Leider ist diese Methode nicht auf Germaniumtargets anzuwenden, da sich das Metall nicht in  $\text{HF}_{\text{konz}}$  löst und die Zugabe von Oxidationsmitteln die Extraktion von  $^*\text{As(III)}$  aus der Lösung verhindert. Wie in späteren Kapiteln beschrieben sind zur Aufarbeitung von Germaniummetalltargets weitaus größere Anstrengungen nötig.

#### **3.5.3.3 Markierung von Bevacizumab mit $^{77}\text{As}$ aus $\text{GeO}_2$ -Targets nach LLE aus HF/HBr-Medium**

Im Anschluss an die Abtrennung des  $^{77}\text{As}$  aus  $\text{GeO}_2$ -Targets mit dieser LLE-Methode wurde die prinzipielle Eignung des gebildeten  $^*\text{As(III)}$  für die Markierung des Antikörpers Bevacizumab evaluiert. Aus diesem Grund wurden nur Markierungen unter zu Hilfenahme von TCEP durchgeführt. Da bei dieser Methode keine störenden Reagenzien wie Ethanol in der finalen PBS-Fraktion vorhanden sind, kann der Antikörper direkt zu der radioaktiven  $^*\text{As}$ -Lösung zugegeben werden. Nach der Zugabe von TCEP wird die Lösung für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Man erhält folgenden Verlauf der Kinetik (Abbildung 33):

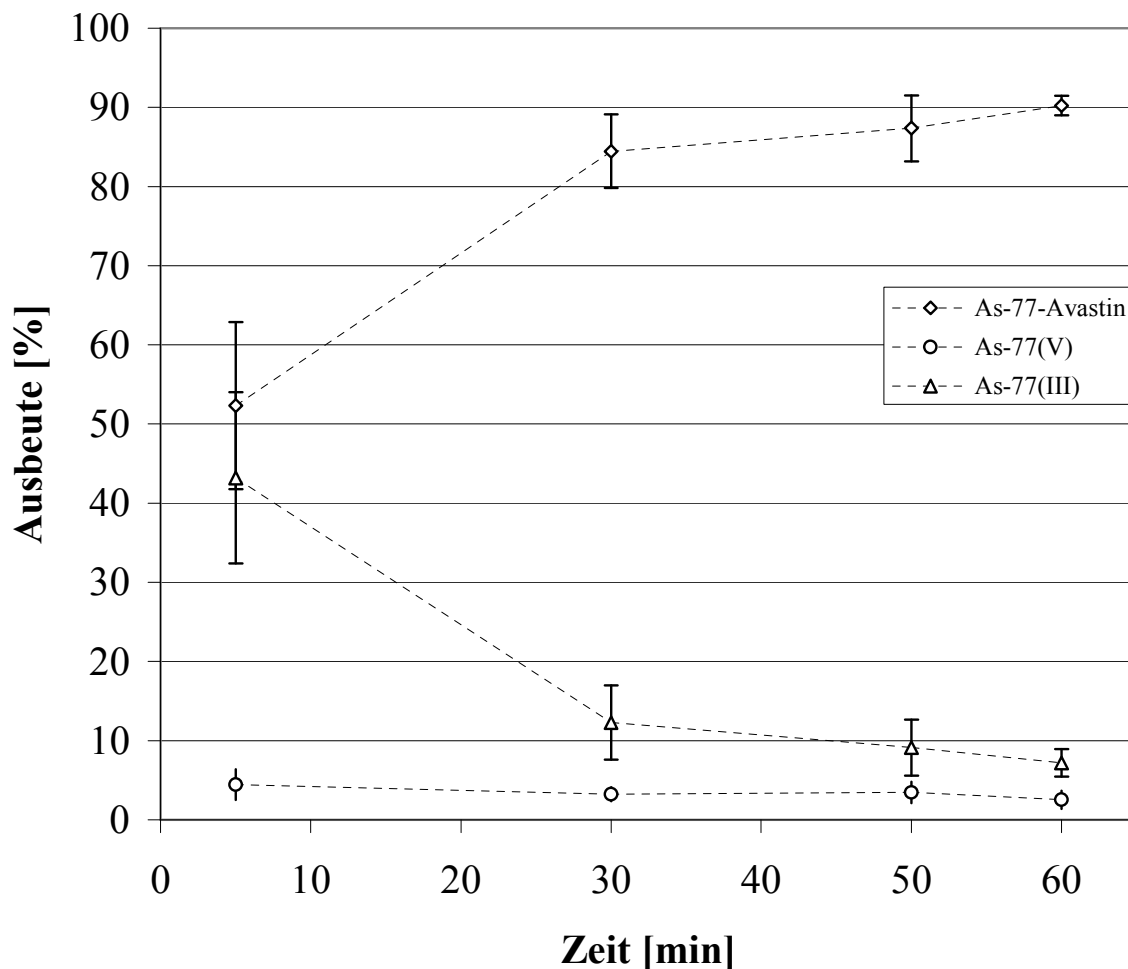


Abbildung 33: Reaktionskinetik von  $^{77}\text{As}$ -Bevacizumab bei Raumtemperatur

Mittels Radio-DC kann zusätzlich zur Markierungsausbeute auch noch der Gehalt an  $^{77}\text{As(III)}$  und  $^{77}\text{As(V)}$  bestimmt werden. Interessant ist, dass sich der Gehalt an  $^{77}\text{As(V)}$  mit der Zeit innerhalb der Fehler nicht ändert und konstant bei 2,5 % bleibt. Außerdem zeigen die Daten, dass ein kleiner Teil des  $^{77}\text{As(III)}$  (ca. 7 %) nicht mit dem Antikörper reagiert. Daraus ergeben sich nach 1 h Markierungsausbeuten von > 90 %. Mit der LLE-Abtrennungsmethode von  $\text{GeO}_2$ -Targets aus  $\text{HF/HBr}$ -Medium lassen sich sehr gute Markierungsausbeuten erzielen, was diese Methode auch für einen Routineeinsatz zur Markierung von Antikörpern interessant macht. Prinzipiell ist es möglich, die Reaktion auch im Wasserbad bei 37 °C durchzuführen und somit die Ausbeute eventuell zu erhöhen. Da eine Temperaturerhöhung allerdings auch eine Zerstörung des Antikörpers bewirken kann, wurde darauf verzichtet. Alternativ wurde die Markierungsausbeute nach 1 h ebenfalls mittels HPLC bestimmt (Abbildung 34).

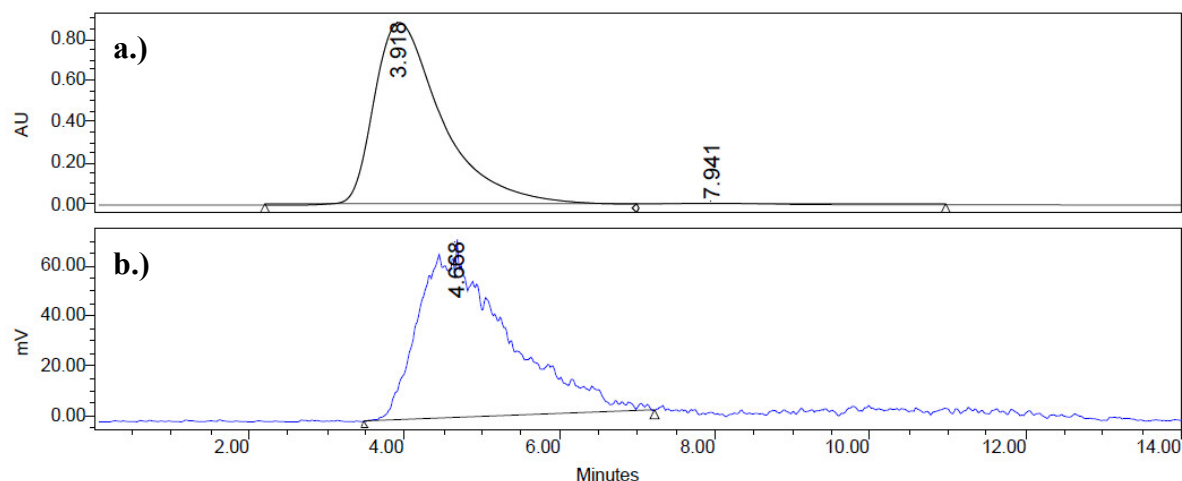


Abbildung 34:  $^{77}\text{As}$ -Bevacizumab mit Radio-HPLC a.) UV 280 nm b.) Radio-Detektor

Da alle Bestrahlungen für diese Experimente im Karussell des TRIGA-Reaktors in Mainz durchgeführt wurden, konnte nur wenig  $^{77}\text{As}$  produziert werden und die Stabilität der markierten Verbindung wurde nicht bestimmt. Soll der markierte Antikörper für *in vivo*-Experimente verwendet werden, so muss die gesamte Lösung nach erfolgreicher Markierung über eine Gelfiltration von TCEP gereinigt werden, da das TCEP mit der Zeit alle Disulfidbrücken im Antikörper spaltet und er somit zerstört werden könnte.

### 3.5.4 Abtrennung von $^{77}\text{As}$ aus einem $\text{GeO}_2$ -Target mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) aus $\text{HF}/\text{HCl}$ -Medium (MJ04)

Aus der Literatur ist bekannt, dass man  $^*\text{As}(\text{III})$  aus  $\text{HCl}$ -Lösungen ab ca. 8 M in organische Lösungsmittel extrahieren kann [85]. Deshalb wurde das  $\text{GeO}_2$ -Target in  $\text{HF}_{\text{konz}}$  gelöst und vor seiner Extraktion in  $\text{CCl}_4$  mit  $\text{HCl}$  zu einer  $> 8 \text{ M}$  Lösung aufgefüllt. Dies sollte unter anderem Rückschlüsse auf den initialen Oxidationszustand des  $^*\text{As}$  im  $\text{GeO}_2$ -Target zulassen.

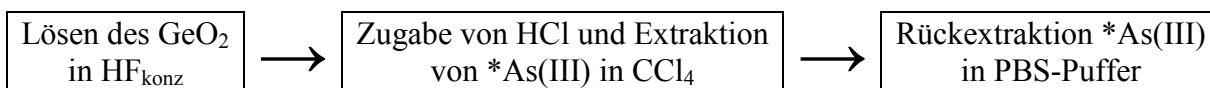


Abbildung 35: Schematische Darstellung der Abtrennung von  $^*\text{As}$  aus  $\text{GeO}_2$ -Targets mittels LLE nach Zugabe von  $\text{HCl}$

#### 3.5.4.1 Extraktion des $^{77}\text{As}$ in $\text{CCl}_4$ und Rückextraktion in PBS-Puffer

Nach dem Lösen des  $\text{GeO}_2$ -Targets erhält man 4 ml 8,3 M  $\text{HCl}$  mit etwas  $\text{HF}$ . Diese Lösung wird zwei Mal mit  $\text{CCl}_4$  extrahiert. Dabei lassen sich fast 50 % des im Target befindlichen  $^{77}\text{As}(\text{III})$  in die organische Phase extrahieren. Es fällt auf, dass dieser Wert deutlich unter den mit  $\text{NaI}$  (100 %, MJ02) oder  $\text{HBr}$  (90 %, MJ03) versetzten Proben liegt. Versuche zeigten

jedoch, dass sich mit vier Extraktionen bis zu 80 % des  $^{77}\text{As}$  extrahieren lassen. Dies wurde im Zusammenhang mit Antikörpermarkierungen nicht durchgeführt, da das größte für die Rückextraktion zur Verfügung stehende Gefäß nur ein Volumen von 2 ml hatte. Für die Trennung vom Germanium ist hierbei wieder die Bildung von  $\text{GeF}_6^{2-}$  in der  $\text{HF}_{\text{konz}}$  essentiell. Normalerweise würde man in der HCl-Lösung eine Koextraktion von  $^{77}\text{As(III)}$  und  $\text{Ge(IV)}$  (als  $\text{GeCl}_4$ ) erwarten [86, 87]. Der  $\text{GeF}_6^{2-}$ -Komplex scheint jedoch viel stabiler als die durch HCl induzierte Bildung von  $\text{GeCl}_4$  zu sein. In Vorversuchen zeigte sich, dass man  $\text{GeCl}_4$  unter den gegebenen Umständen erst dann in  $\text{CCl}_4$  extrahieren kann, wenn die HF vorher restlos zerstört wird. Dies geschieht am besten durch die Zugabe von Borsäure. Unter anderem zeigt die Arbeit von Beard et al. [85], dass sich  $\text{As(III)}$  aus HCl-Lösungen  $> 6 \text{ M}$  leicht in Benzol extrahieren lässt. Man könnte prinzipiell noch über eine Erhöhung des HCl-Anteils in der Lösung nachdenken, um eine bessere Extraktion zu erreichen. Aus praktischen Gründen wurde dies jedoch nicht durchgeführt. Aus den in Kapitel 3.3.2 mittels Anionenaustauschchromatographie erhaltenen Werten lässt sich ablesen, dass zur Zeit der Auflösung des Targets nach der Bestrahlung die dominante Spezies  $^{77}\text{As(III)}$  ist. Man kann davon ausgehen, dass nur der Teil des  $^{77}\text{As}$ , der zum Zeitpunkt der Extraktion als  $^{77}\text{As(III)}$  vorliegt, auch in  $\text{CCl}_4$  extrahiert werden kann, da die zugesetzte HCl keine reduzierende Wirkung auf das  $^{77}\text{As(V)}$  hat. Die  $\text{CCl}_4$ -Phase wird analog den anderen Extraktionsmethoden (MJ02 und MJ03) in PBS-Puffer zurückextrahiert. Dabei lassen sich im Mittel 66 % des in  $\text{CCl}_4$  befindlichen  $^{77}\text{As}$  in die wässrige Phase extrahieren. Diese Ausbeute liegt leicht über den der beiden anderen LLE-Methoden (NaI und HBr). Trotzdem erhält man durch die niedrigen Werte bei der Extraktion in  $\text{CCl}_4$  insgesamt nur eine Ausbeute von ca. 30 %. Die so erhaltene Lösung kann direkt ohne weitere Arbeitsschritte zur Markierung von Antikörpern eingesetzt werden. Der Abtrennungsfaktor für Germanium liegt bei  $1974 \pm 28$ . Dies bedeutet einen Ge-Gehalt von  $35,6 \mu\text{g} \pm 0,3 \mu\text{g}$  bezogen auf ursprünglich 100 mg  $\text{GeO}_2$ .

**Tabelle 21: Ergebnisse der Abtrennung von  $^{77}\text{As}$  aus  $^{77}\text{GeO}_2$ -Targets mittels LLE in HF/HCl-Medium**

	<i>Ausbeute [%]</i>	<i>Fehler</i>
Extraktion in $\text{CCl}_4$	47,5	$\pm 0,6$
Extraktion in PBS	66,3	$\pm 4,2$
Gesamtextraktion	31,4	$\pm 1,6$
Reinheit $^{77}\text{As}$	99,95	

Man beobachtet zwar eine gegenüber den anderen LLE Methoden um 20 % verminderte Gesamtausbeute, jedoch sind die einzelnen Schritte viel besser reproduzierbar. Dies drückt sich in einer geringeren Standardabweichung aus. Eine mögliche Erklärung ist, dass hier im Gegensatz zu den anderen LLE-Methoden keine zusätzlichen Substanzen (wie z.B.  $\text{I}_2$  oder  $\text{Br}_2$ ) in die organische Phase extrahiert werden und dort zu keinen weiteren Wechselwirkungen mit dem  $^{77}\text{As}$  führen.

### 3.5.4.2 Bestimmung des Oxidationszustandes von $^{77}\text{As}$

Der Oxidationszustand in  $\text{CCl}_4$  und PBS wurde für diese Abtrennungsmethode mittels Radio-DC bestimmt (Abbildung 36). Es ergaben sich folgende Werte (Tabelle 22):

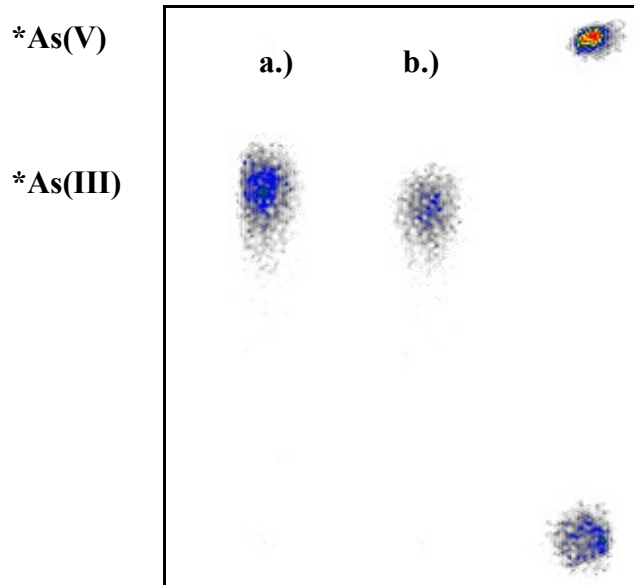


Abbildung 36: Radio-DC zur Bestimmung des Oxidationszustandes von  $^{77}\text{As}$ : a.)  $\text{CCl}_4$  b.) PBS

Tabelle 22: Oxidationszustand von  $^{77}\text{As}$  in  $\text{CCl}_4$  und PBS im HF/HCl-Medium

<i>Oxidationszustand in <math>\text{CCl}_4</math></i>		<i>Oxidationszustand in PBS</i>	
	<i>[%]</i>		<i>[%]</i>
$^{77}\text{As(III)}$	$98,2 \pm 0,2$	$^{77}\text{As(III)}$	$97,8 \pm 0,3$
$^{77}\text{As(V)}$	$1,9 \pm 0,2$	$^{77}\text{As(V)}$	$2,2 \pm 0,3$

Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Extraktionsmethoden mit NaI oder HBr als Reduktionsmittel beobachtet man in diesem Fall ausschließlich eine Extraktion von  $^{77}\text{As(III)}$  in die organische Phase. Für die Rückextraktion in die wässrige Phase wurde auch hier derselbe PBS-Puffer (0,5 M Hydroxylamin, 25 mM EDTA) wie bei den anderen Abtrennungsmethoden verwendet. Auch in der wässrigen Phase bleibt der Oxidationszustand des Arsens ( $^{77}\text{As(III)}$ ) erhalten und ist mit knapp 98 % genauso groß, wie bei der Festphasenextraktion (MJ01). Es bleibt festzuhalten, dass HCl keine beschriebene reduzierende Wirkung auf As(V) hat. Folglich muss das als  $\text{AsCl}_3$  extrahierte Arsen bereits im Target als  $^{77}\text{As(III)}$  vorgelegen haben (siehe dazu auch Kapitel 3.3.2). Ob diese Extraktionsmethode auch mit am Zyklotron bestrahlten Targets so funktioniert, wurde nicht untersucht. Da jedoch bei der Bestrahlung am Zyklotron immer wieder die Bildung von elementarem Germanium während der Bestrahlung von  $\text{GeO}_2$ -Targets beobachtet wurde, scheinen hier zumindest reduzierende Bedingungen für das Germanium vorzuliegen. Bei dieser Technik scheint kein  $\text{Cl}_2$  zu entstehen, das analog  $\text{I}_2$  und  $\text{Br}_2$  in die organische Phase

mitextrahiert wird, um dann das  $^{77}\text{As}$  wieder zu oxidieren. Dies ist somit die einzige der entwickelten LLE-Methoden für  $\text{GeO}_2$ -Targets, die bereits in der organischen Phase nahezu quantitativ  $^{77}\text{As(III)}$  liefert. Dies ist notwendig, wenn man Markierungen von z.B. Polymeren im nicht wässrigen Medium durchführen will. Auch ist es prinzipiell möglich durch Entfernen des  $\text{CCl}_4$  im Argonstrom oder durch abdestillieren das  $^{77}\text{As(III)}$  in jedes andere organische Lösungsmittel zu überführen.

#### **Vorteile dieser Methode:**

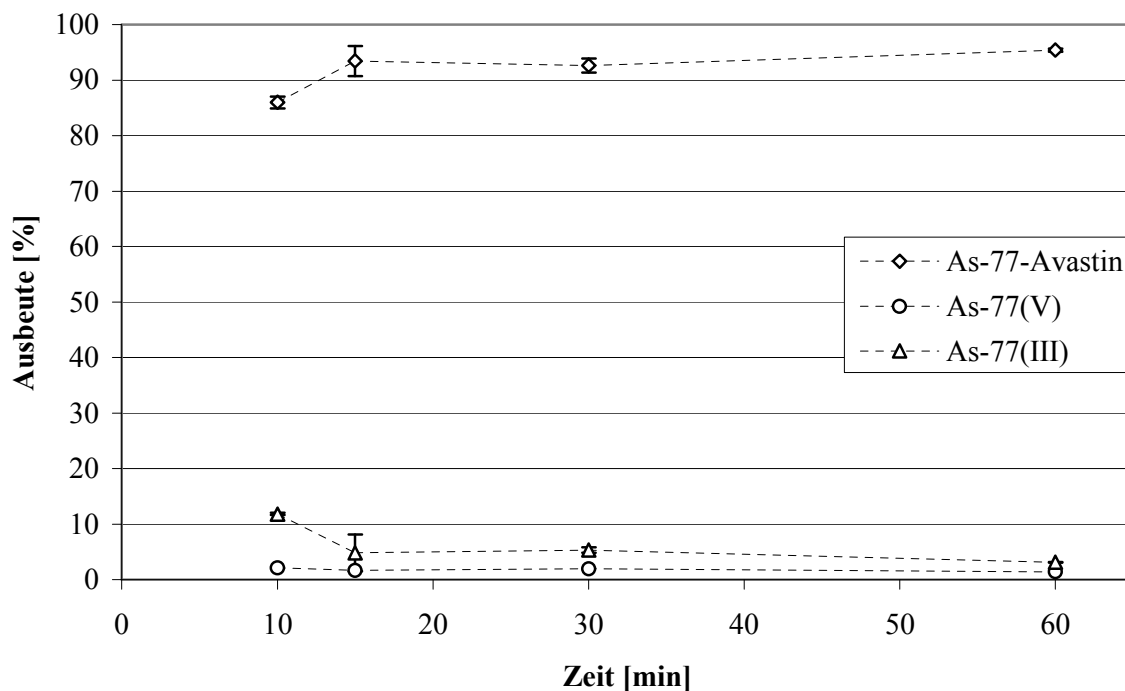
Die Flüssig-Flüssig-Extraktion von  $^{77}\text{As}$  aus HF/HCl-Medium bietet dieselben Vorteile wie die Extraktion aus HF/HBr-Medium was die Reinheit des  $^{77}\text{As}$  von Germanium und die Schnelligkeit der Abtrennungsmethode angeht. Hervorzuheben daneben das nahezu quantitative Vorliegen des  $^{77}\text{As}$  als  $^{77}\text{As(III)}$  sowohl im organischen, als auch im wässrigen Medium, was die Option der Verwendung des  $^{77}\text{As(III)}$  für Markierungen im organischen Medium eröffnet. Durch Verdampfen des  $\text{CCl}_4$  kann das  $^{77}\text{As}$  prinzipiell in jedes andere organische Lösungsmittel überführt werden.

#### **Nachteile dieser Methode:**

Da keine Informationen über den initialen Oxidationszustand von  $^{77}\text{As}$  in am Zyklotron bestrahltem  $\text{GeO}_2$  vorliegen, und da bei dieser Extraktionsmethode kein Reduktionsmittel zugegeben wird, ist eine Aussage über das Verhalten eines mit Protonen bestrahlten Targets nicht möglich. Ausserdem kann diese Methode ebenfalls nicht auf Germaniummetalltargets angewendet werden.

#### **3.5.4.3 Markierung von Bevacizumab mit $^{77}\text{As}$ aus $\text{GeO}_2$ -Targets nach Flüssig-Flüssig-Extraktion aus HF/HCl-Medium**

Wie bei den bereits zuvor beschriebenen Methoden der LLE wurde auch hier die prinzipielle Eignung des abgetrennten  $^{77}\text{As}$  zur Markierung von Antikörpern untersucht. Hierbei wurde ebenfalls ausschließlich die Markierung mit Hilfe von TCEP als Reduktionsmittel für endogene SH-Gruppen verwendet. Dabei wurde die  $^{77}\text{As(III)}$ -Lösung in PBS-Puffer mit dem direkt mit Bevacizumab und TCEP für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Man erhält folgenden Verlauf der Kinetik (Abbildung 37).



**Abbildung 37: Reaktionskinetik von <sup>77</sup>As-Bevacizumab (\*As mit MJ04 abgetrennt) bei Raumtemperatur mittels Radio-DC bestimmt**

Man erkennt auch hier, dass sich der ohnehin geringe Anteil an <sup>77</sup>As(V) (1-2 %) während der Reaktion nicht mehr verändert. Die Markierung verläuft sehr schnell, da bereits nach 15 min über 90 % des Antikörpers markiert sind, was sich bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes von 1 h nicht mehr signifikant erhöht. Gleichzeitig sinkt die Menge des freien <sup>77</sup>As(III) auf ca. 3 % ab. Nach 1 h Reaktionszeit liegt die Markierungsausbeute mit 95 % sogar noch leicht über dem, was man mit der Flüssig-Flüssig-Extraktion unter Verwendung von HBr als Reduktionsmittel erreichen kann (Kapitel 3.5.3). Bestimmt man die Markierungsausbeute mit der Radio-HPLC-Methode, beträgt die Markierungsausbeute nach 1 h 100 % (Abbildung 38) Da auch hier alle Versuche mit im Karussell des TRIGA Mainz bestrahlten GeO<sub>2</sub>-Targets durchgeführt wurden, konnte die Stabilität der Markierung nicht überprüft werden. Dazu wurde unter diesen Umständen zu wenig Aktivität produziert. Das geringe Gesamtvolumen von 560 µl macht es sehr leicht, die gesamte Probe über eine Gelfiltration mittels HPLC aufzureinigen, um das TCEP aus der Lösung zu entfernen. Obwohl die Gesamtausbeute der Extraktionsmethode von <sup>77</sup>As(III) aus HF/HCl-Medium mit ca. 30 % <sup>77</sup>As in PBS-Puffer von allen LLE-Methoden (MJ02 - MJ04) am geringsten ist, scheint das mit dieser Methode erhaltene <sup>77</sup>As(III) am Besten zur Markierung von Antikörpern geeignet zu sein, da es mit TCEP die höchsten Ausbeuten und die schnellste Reaktionskinetik aufweist. Dies eröffnet die Möglichkeit, die Reaktion bereits nach 15 min durch eine Gelfiltration abubrechen und ein gereinigtes Produkt zu erhalten.

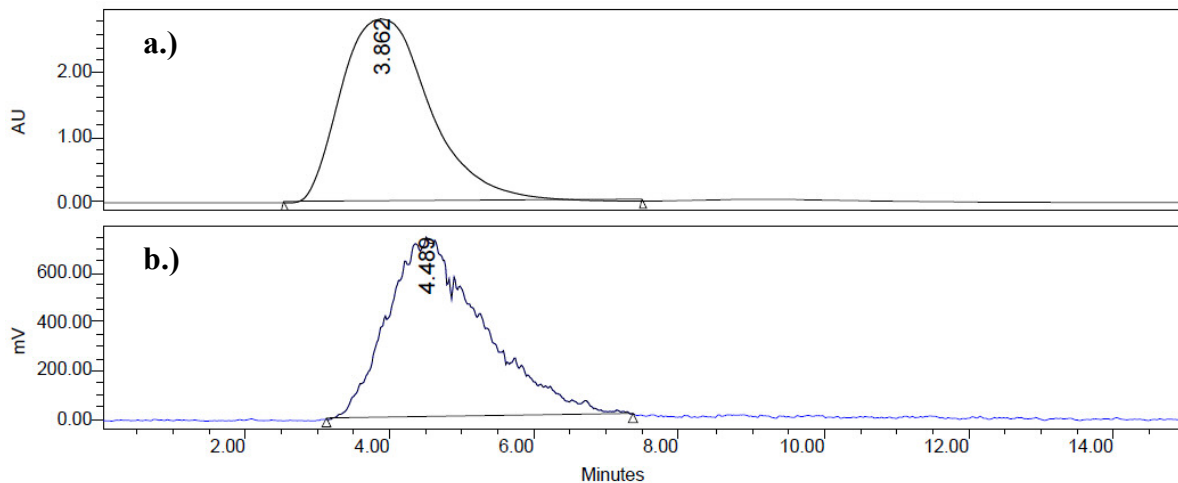


Abbildung 38: Markierungsausbeute  $^{77}\text{As}$ -Bevacizumab nach 1 h mit Radio-HPLC bestimmt a.) UV 280 nm b.) Radio-Detektor

### 3.5.5 Abtrennung von $^{72/74/77}\text{As}$ aus einem Germaniummetalltarget mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion (LLE) aus HF/HI-Medium (MJ05)

Diese Abtrennungsmethode ist die erste komplette Eigenentwicklung auf dem Gebiet der Abtrennung von nca  $^*\text{As}$  aus Germaniumtargets. Sie baut auf der Flüssig-Flüssig-Extraktionsmethode von  $\text{GeO}_2$  in HF/NaI auf. Die eigentliche Idee besteht darin, möglichst wenig an der Methode zu verändern. So wurde ein Weg gesucht, das Metall in einem Gemisch aus  $\text{HF}_{\text{konz}}$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu lösen und danach das  $\text{H}_2\text{O}_2$  wieder zu zerstören. Dann sollten theoretisch dieselben oder zumindest ähnliche Bedingungen herrschen wie beim Lösen des  $\text{GeO}_2$  in HF. Die Methode sieht im Einzelnen aus wie folgt (Abbildung 39).

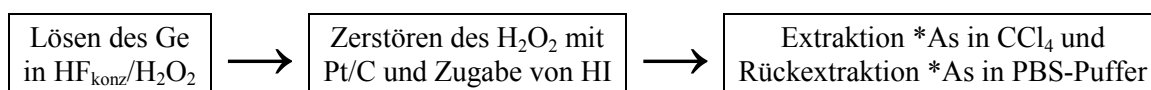


Abbildung 39: Schematische Darstellung der Abtrennung von  $^*\text{As}$  aus Germaniummetalltargets mittels LLE aus HF/HI-Medium

#### 3.5.5.1 Lösen des Germaniummetalltargets

Germaniummetall lässt sich nicht einfach wie das  $\text{GeO}_2$  in  $\text{HF}_{\text{konz}}$  lösen. Deshalb kann man keine der vorher beschriebenen Abtrennungsmethoden auf dieses Problem anwenden. Allgemein kann man sagen, dass man zum Lösen immer eine Komponente braucht, die das  $\text{Ge}(0)$  zu  $\text{Ge}(IV)$  oxidiert und eine Komponente, die eine Verbindung mit ihm eingeht. So kommen nur Gemische von Säuren wie  $\text{HCl}/\text{HNO}_3$ ,  $\text{HCl}/\text{H}_2\text{O}_2$  oder Mischungen von  $\text{HF}/\text{HNO}_3$ , bzw.  $\text{HF}/\text{H}_2\text{O}_2$  in betracht. Germanium wird nur sehr langsam von Königswasser

angegriffen. Die Reaktion beschleunigt sich erst bei erhöhten Temperaturen. Ähnliches gilt für ein Gemisch aus HF und HNO<sub>3</sub>. Da man beim Umgang mit HF gerne auf das Erhitzen verzichtet, muss man auf das Gemisch HF/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zurückgreifen. Am besten Eignete sich eine 1 : 1 Mischung. Hierbei reagiert das Germaniummetall in einer exothermen Reaktion innerhalb von 1-2 Minuten zu GeF<sub>6</sub><sup>2-</sup> ab und bildet Sauerstoff aus der Spaltung des Wasserstoffperoxyds. Die Reaktion ist sogar so heftig, dass beim Lösen von Zyklotrontargets das Lösungsmittel immer nur in 200 µl Schritten zugegeben wurde. Dies liegt an der größeren Oberfläche der Ge-Scheiben im Vergleich zu den für Reaktorbestrahlungen verwendeten Germanium Stücken. Trotzdem kann man das H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nicht so dosieren, dass es quantitativ bei dem Lösevorgang abreagiert. Es muss also im Anschluss durch zusätzliche Maßnahmen zerstört werden.

### 3.5.5.2 Zerstörung des überschüssigen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Beim auflösen von Germaniummetall in HF/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> muss man immer einen Überschuss des Lösungsmittels einsetzen, da sonst Teile des Metalls ungelöst bleiben. Um das überschüssige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aus dem Reaktionsgemisch zu entfernen, wurden am Beginn der Entwicklung mehrere Methoden ausprobiert. Zunächst wurde versucht, das H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durch Abrauchen zu zerstören. Dies war jedoch nur dann erfolgreich, wenn die Lösung komplett eingedampft wurde, was nicht sinnvoll erschien, da dabei auch ca. 1 ml HF<sub>konz</sub> mit abgeraucht werden musste. Außerdem gab es Probleme mit der Absorption der Aktivität an den Teflonwänden des Reaktionsgefäßes. Alternativ wurde Platin in mehreren Formen getestet, um die am Besten geeignete herauszufinden. Platin erscheint prinzipiell eine gute Wahl, da es sich nicht in der HF löst. Bei der Verwendung von Platin als Draht konnte man zwar eine Blasenbildung in der Lösung feststellen, jedoch ist die Reaktion aufgrund der relativ kleinen Oberfläche sehr langsam und selbst beim Stehen über Nacht noch nicht vollständig. Alternativ wurde Platin in Form von feinem Pulver eingesetzt. Hier beobachtet man bereits heftige Gasentwicklung. Schlussendlich wurde jedoch Platin auf Aktivkohle (Pt/C, 10 %) standardmäßig verwendet. Die Aktivkohle ist ebenfalls nicht in HF löslich und lässt sich nach beendeter Reaktion leicht durch Filtration entfernen. Gibt man ca. 5 mg Pt/C in die 2 ml Targetlösung, so beobachtet man relativ rasch eine zügige Reaktion, die sich in der Bildung von O<sub>2</sub> sichtbar äußert. Da eine möglichst quantitative Zerstörung des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in kurzer Zeit erforderlich ist, wird die Lösung leicht geschüttelt. Danach erhält man eine schwarze Suspension aus HF und Aktivkohle, in der keine Blasenbildung mehr zu beobachten ist. Nach diesem Arbeitsschritt ist eine Entfernung der Aktivkohle über einen Filter erforderlich. Bei dieser Methode wurde ein iCon Größenausschluss-Membranfilter der Firma Pierce zum Abzentrifugieren verwendet. Dabei werden die großen Aktivkohlepartikel zurückgehalten, während die Lösung mit der Aktivität durchfließt. Erstaunlicherweise bleiben weder nennenswerte Mengen \*As, noch das

GeF<sub>6</sub><sup>2-</sup> auf der Aktivkohle hängen. Die Ausbeute nach der Filtration liegt für das \*As noch bei 90 %.

### 3.5.5.3 Extraktion des \*As in CCl<sub>4</sub> und Rückextraktion in PBS-Puffer

Im Prinzip gilt für die Extraktion des \*As aus dieser Lösung dasselbe wie bei der in Kapitel 3.5.2 beschriebenen Methode für die LLE von GeO<sub>2</sub>-Targets aus HF/NaI-Medium (MJ02). Es zeigte sich jedoch, dass hier zum Erreichen ähnlich hoher Extraktionsausbeuten in CCl<sub>4</sub> die Zugabe von weit mehr NaI erforderlich ist (500-1000 mg), als bei der Methode ohne Zugabe von Wasserstoffperoxyd (ca. 100 mg). Dies könnte eventuell daran liegen, dass noch Spuren von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in der Lösung zurückbleiben, die eine Extraktion behindern. Da so große Mengen an Feststoff die 2 ml HF übersättigen und zu einem Niederschlag führen würden, wurde nach anderen Möglichkeiten gesucht, Iodid-Ionen in die Lösung zu bekommen. Die einfachste Lösung bietet sich in der Verwendung von HI<sub>konz</sub> (57 %). Dazu wird die Targetlösung mit HI<sub>konz</sub> versetzt und das \*As in die organische CCl<sub>4</sub>-Phase extrahiert. In der HI ist bereits so viel Iod enthalten, dass sie eine tiefrote Farbe besitzt. Dies bedingt auch eine Extraktion von I<sub>2</sub> in die organische Phase, was auch hier zu einer Oxidation des \*As(III) zu \*As(V) führt. Da die Extraktionsausbeute trotz der Verwendung von HI geringer ist als bei der Verwendung von GeO<sub>2</sub> und NaI, wird die Extraktion insgesamt drei Mal durchgeführt. Dann beträgt die Extraktionsausbeute im Mittel ca. 70 %. Im Anschluss werden die organischen Phasen vereinigt und mit 500 µl PBS-Puffer (0,5 M Hydroxylamin, 25 mM EDTA) ausgeschüttelt, um das \*As in die wässrige Phase zu extrahieren. Dabei wird auch das in CCl<sub>4</sub> extrahierte Iod reduziert. Man erhält eine Gesamtausbeute von 44 %.

**Tabelle 23: Ergebnisse der Abtrennung von <sup>77</sup>As aus <sup>77</sup>Ge-Targets mittels LLE in HF/HI-Medium**

	<i>Ausbeute [%]</i>	<i>Fehler</i>
Lösung nach Filtration	89,8	± 7,9
Extraktion in CCl <sub>4</sub>	70,8	± 7,9
Extraktion in PBS	63,4	± 15,6
Gesamtextraktion	44,2	± 7,5
Reinheit <sup>77</sup> As	99,997	

Der Germaniumgehalt liegt nach der Extraktion bei 2,2 µg ± 2,8 µg bezogen auf ursprünglich 100 mg Germanium. Es fällt direkt auf, dass die Abtrennung von Germanium mit dieser LLE-Methode etwa um den Faktor 10 besser ist, als bei allen anderen beschriebenen LLE-Methoden. Ob dies an der Bildung einer anderen Germaniumverbindung als GeF<sub>6</sub><sup>2-</sup> unter Einfluss des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oder an dem Fehlen der Na<sup>+</sup>-Ionen durch die Verwendung von HI liegt, kann nicht beantwortet werden. Im Vergleich mit den anderen LLE-Methoden schneidet diese was die Extraktionsausbeuten angeht nur besser, als die Methode LLE-Methode von GeO<sub>2</sub> aus HF/HCl-Medium. Dort lag die Gesamtausbeute bei nur 30 %. Diese Methode zur Abtrennung

von  $^{77}\text{As}$  aus Germaniummetalltargets wurde auch auf ein am Zyklotron bestrahltes  $\text{GeO}_2$ -Target angewendet, dass wie bereits in Kapitel 3.1.1 beschrieben, unlösliche Anteile an elementarem Germanium aufwies. Die Gesamtausbeute vom Target bis zum  $^{77}\text{As}$  in PBS-Puffer lag hier bei 35 %. Dies liegt noch innerhalb des Fehlers. Man kann also auch  $\text{GeO}_2$ -Targets mit dieser Methode verarbeiten.

### 3.5.5.4 Bestimmung des Oxidationszustandes von $^{77}\text{As}$

Auch bei dieser Abtrennungsmethode wurde der Oxidationszustand des  $^{77}\text{As}$  in der organischen und der wässrigen Phase mittels Radio-DC überprüft. Die hier dargestellten Ausbeuten stammen aus einem Einzelexperiment, sind aber typisch für diese Methode. Wie sich durch die Rotfärbung der organischen Phase bereits optisch andeutet, findet man hier analog der Verwendung von NaI bei der Extraktion von  $^{77}\text{As}$  aus  $\text{GeO}_2$ -Targets (MJ02) fast 100 %  $^{77}\text{As(V)}$  (Abbildung 40, Tabelle 24).

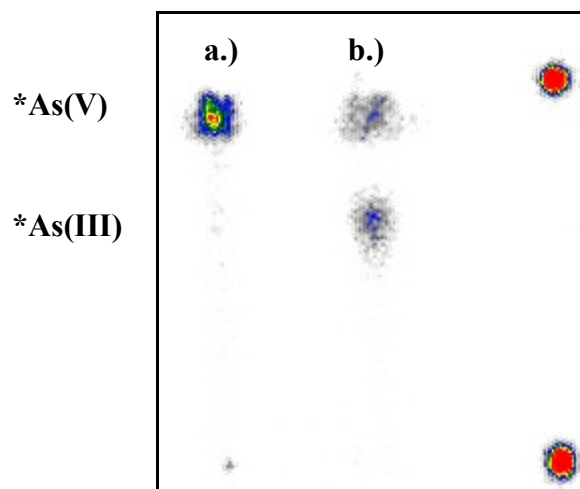


Abbildung 40: Radio-DC zur Bestimmung des Oxidationszustandes in Germaniumtargets a.)  $\text{CCl}_4$ ; b.) PBS-Puffer

Tabelle 24: Oxidationszustand von  $^{77}\text{As}$  in  $\text{CCl}_4$  und PBS im HF/HI-Medium

<i>Oxidationszustand in <math>\text{CCl}_4</math></i>	<i>[%]</i>	<i>Oxidationszustand in PBS</i>	<i>[%]</i>
$^{77}\text{As(III)}$	3	$^{77}\text{As(III)}$	48
$^{77}\text{As(V)}$	97	$^{77}\text{As(V)}$	52

Die Analogie zu der Extraktionsmethode für  $\text{GeO}_2$ -Targets setzt sich auch bei der Rückextraktion in PBS-Puffer (0,5 M Hydroxylamin, 25 mM EDTA) fort. Obwohl mit Hydroxylamin ein Reduktionsmittel zugesetzt wurde, kann man nicht mehr als 50 % des  $^{77}\text{As(V)}$  wieder zu  $^{77}\text{As(III)}$  reduzieren. Die effektive Ausbeute halbiert sich dadurch auf jetzt nur noch 20 %, da nur das  $^{77}\text{As(III)}$  mit den SH-Gruppen des Antikörpers reagieren kann.

### **Vorteile dieser Methode:**

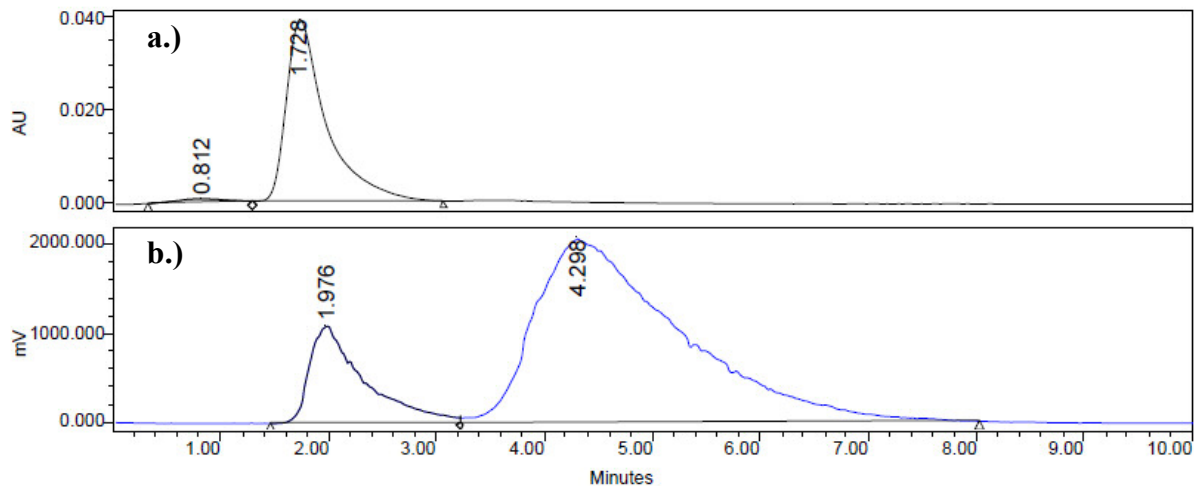
Diese an die LLE von  $^{74}\text{As}$  aus  $\text{GeO}_2$ -Targets in HF/NaI-Medium angelehnte Abtrennungsmethode zeigt, dass es prinzipiell möglich ist,  $^{74}\text{As}$  aus Germaniummetalltargets abzutrennen und in eine zur Markierung von Antikörpern geeignete Lösung zu überführen. Dabei konnte die Abtrennung des Germaniums um einen Faktor 10 gegenüber den LLE-Methoden von  $\text{GeO}_2$ -Targets (MJ02-MJ04) gesteigert werden.

### **Nachteile dieser Methode:**

Analog der in Kapitel 3.5.2 beschriebenen Abtrennungsmethode im HF/NaI-Medium aus  $\text{GeO}_2$ -Targets (MJ02) ist auch hier in der finalen  $^{74}\text{As}$ -Fraktion in PBS-Puffer ein 1 : 1-Gemisch aus  $^{74}\text{As(III)}$  und  $^{74}\text{As(V)}$  zu beobachten. Auch verlängerte sich die Gesamtdauer der Abtrennung, da man mindestens 1 h benötigt, um das Wasserstoffperoxid vollständig zu zerstören. Ein weiterer negativer Punkt ist die Reinheit der verwendeten Chemikalien. Während das NaI noch in sehr hoher Qualität (0,2 ppm As) kommerziell verfügbar ist, liegt der Arsengehalt in HI mit 1-5 ppm deutlich darüber. Bei Verwendung von 1 ml HI kommt man so bereits in dieselbe Größenordnung Arsenträger, in der man den Antikörper einsetzt. Es kann also durchaus vorkommen, dass man mehr Arsenatome als freie SH-Gruppen in der Lösung hat. Dies führt dann automatisch zu einer geringen Markierungsausbeute.

### **3.5.5.5 Markierung von Bevacizumab mit $^{74}\text{As}$ aus einem Zyklotron $\text{GeO}_2$ -Target nach LLE aus HF/HI-Medium**

In der Übergangsphase von  $\text{GeO}_2$  zu Germaniummetalltargets für die Bestrahlungen am Zyklotron wurde ein Target mit der LLE-Methode so aufgearbeitet, als würde es sich um ein Germaniummetalltarget handeln. Dies war die logische Folge, als klar wurde, dass sich die bei den Zyklotronbestrahlungen gebildeten unlöslichen Bestandteile nach Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  direkt auflösen (Kapitel 3.1) Nach der Extraktion des Targets in  $\text{CCl}_4$  und PBS-Puffer wurde es direkt mit Bevacizumab und TCEP versetzt. Nach 1 h und nach 4 h wurde die Markierungsausbeute mittels HPLC bestimmt.



**Abbildung 41: Markierungsausbeute  $^{74}\text{As}$ -Bevacizumab ( $\text{GeO}_2$ -Target mit MJ05 abgetrennt) nach 4 h mit Radio-HPLC bestimmt a.) UV 280 nm b.) Radio-Detektor; Flow: 1 ml/min**

Zu beiden Zeitpunkten lag die Markierungsausbeute konstant bei 18 %. Dies liegt deutlich unter den für diese Abtrennungsmethode üblichen 50 %  $^*\text{As}(\text{III})$ . Da zu diesem Zeitpunkt die Radio-DC Methode zur Bestimmung des Oxidationszustandes noch nicht entwickelt war, kann man nicht mit letzter Sicherheit sagen, ob in speziell diesem Experiment der Anteil an  $^*\text{As}(\text{V})$  viel größer als 50 % war, oder ob durch die Verwendung von HI als Reduktionsmittel einfach zu viel inaktiver Träger in das System eingebracht wurde.

Bei der Markierung werden ca. 8 nmol Antikörper verwendet. Der Arsengehalt der HI liegt zwischen 1 und 5 ppm. Dies bedeutet für 1 ml Lösung einen Arsengehalt von 13 - 66 nmol. Mit 3-5 SH-Gruppen pro Antikörpermolekül kommt man somit auf 24-40 nmol SH-Gruppen. Dies bedeutet auf jeden Fall ein zusätzliches Problem bei der Verwendung von HI. Alle anderen Säuren (HF, HCl, HBr) sind im Gegensatz zu HI in sehr hoher Reinheit (Arsengehalt < 1ppb) kommerziell erhältlich, was eine Reduktion des inaktiven Arsenträgers um den Faktor 1.000 bedeutet. Wegen den unlösbaren Problemen der zu hohen Zugabe von inaktivem Arsenträger und dem hohen Anteil von unreaktivem  $^*\text{As}(\text{V})$  wurde diese Abtrennungsmethode für Germaniummetalltargets, ebenso wie Markierungsversuche von Antikörpern nicht weiter verfolgt.

### 3.5.6 Vorversuche zur Reduktion von As(V) zu As(III) in HCl-Medium mit geträgertem $^{76}\text{As}_2\text{O}_5$

Die wichtigste Voraussetzung zur Markierung von nanomolaren Mengen freier SH-Gruppen mit Arsen ist das Vorliegen der trägerfreien Aktivität im Oxidationszustand +(III). Die zweite Bedingung ist eine wässrige Lösung mit einem pH von ca. 7. Bisher wurden alle bestrahlten Targets in HF-Medium gelöst. Im folgenden Kapitel wird eine Abtrennungsmethode beschrieben, die ausschließlich HCl-Lösungen verwendet. In diesem Zusammenhang wurden zunächst Vorversuche mit geträgertem  $^{76}\text{As}_2\text{O}_5$  durchgeführt, um eventuell neue Reduktionsmittel zu finden, bzw. das Verhalten von aus Versuchen im HF-Medium bekannten Reduktionsmitteln im HCl-Medium zu untersuchen. Da alle Abtrennungsmethoden das \*As zunächst in konzentrierter HF oder HCl liefern, bietet die Flüssig-Flüssig-Extraktion von \*As(III) in  $\text{CCl}_4$  eine elegante Methode, diese Säuren abzutrennen. Eine Rückextraktion des \*As(III) in wässrige Lösungen sollte laut Literatur möglich sein [126-128]. In der Literatur sind verschiedene Reduktionsmittel beschrieben, die As(V) zu As(III) in HCl-Medium reduzieren können sollen um das As(III) daraufhin in ein unpolares Lösungsmittel extrahieren zu können. Dazu gehören NaI [86, 97], CuCl [91] und HBr [88, 95, 153]. Um verschiedene Reduktionsmittel testen zu können, ohne jedes Mal einen kompletten, zeitaufwendigen Abtrennungsvorgang durchführen zu müssen, wurde für die Vorversuche eine einfache, standardisierte Methode mit geträgertem  $^{76}\text{As}_2\text{O}_5$  konzipiert. Dabei wurde eine  $\text{As}_2\text{O}_5$ -Lösung im TRIGA Reaktor bestrahlt, und somit das As(V) radioaktiv markiert. So konnten ca. 100  $\mu\text{g}$   $^{76}\text{As(V)}$  (1,3  $\mu\text{mol}$ ) in ca. 9 M HCl-Lösung erhalten werden. Dies ist notwendig, da die Extraktion von As(III) nur bei hohen HCl Konzentrationen (> 8 M) stattfinden sollte [85, 86]. Die Verwendung von kleinen Mengen geträgertem  $^{76}\text{As}_2\text{O}_5$  (ca. 100  $\mu\text{g}$ ) führt dazu, dass man sehr leicht einen ca. 100-fachen Überschuss an Reduktionsmittel einsetzen kann. Dies sollte dem idealen System des nicht geträgerten \*As(V) bereits relativ nahe kommen.

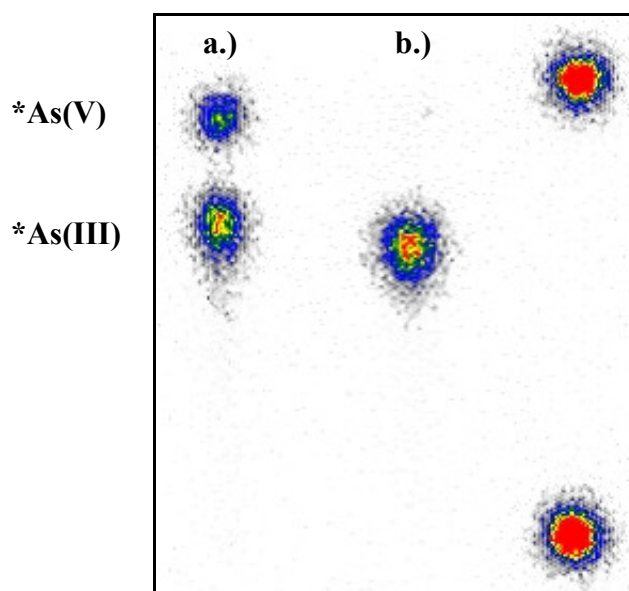
#### 3.5.6.1 Vorversuche mit NaI als Reduktionsmittel im HCl-Medium

Die Verwendung von NaI als Reduktionsmittel bei der Abtrennung von \*As aus  $\text{GeO}_2$ -Targets aus HF/NaI-Medium mittels Festphasenextraktion (Kapitel 3.5.1) oder Flüssig-Flüssig-Extraktion (Kapitel 3.5.2) brachte für den Oxidationszustand des nca \*As die überraschende Erkenntnis, dass das \*As zu 100 % als \*As(V) vorliegt und nicht wie in der Literatur beschrieben als \*As(III). Um dieses Phänomen auch im HCl-Medium zu untersuchen, wurden einige Versuche mit geträgertem  $^{76}\text{As(V)}$  durchgeführt. Dazu wurden zunächst 500  $\mu\text{l}$  Lösungen von ca. 100  $\mu\text{g}$  As(V) in 9 M HCl hergestellt. Zu dieser Lösung wird 20 mg NaI (130  $\mu\text{mol}$ , ca. 100-facher Überschuss) zugegeben. Die geringe Löslichkeit von NaI in 10 M HCl machte es nicht möglich, die Menge an NaI weiter zu erhöhen. Durch die Bildung von Iod erhält man eine rötliche Lösung mit etwas Niederschlag. Die Lösung

wird sofort mit  $\text{CCl}_4$  einmal extrahiert und man erhält eine leicht rötliche Lösung. Diese Lösung entfärbt sich sofort beim Ausschütteln mit PBS-Puffer (0,5 M Hydroxylamin, 25 mM EDTA). Das Hydroxylamin in der Lösung ist in der Lage, das gebildete Iod zu reduzieren. Die Ausbeuten der Extraktion und der Oxidationszustand in organischer und wässriger Phase wurden bestimmt (Tabelle 25, Abbildung 42).

**Tabelle 25: Extraktionsausbeuten von geträgertem  $^{76}\text{As}$  in  $\text{CCl}_4$  und PBS mit NaI als Reduktionsmittel**

	<i>Extraktionsausbeute [%]</i>	<i>Fehler</i>
Extraktion in $\text{CCl}_4$	89,6	$\pm 0,87$
Extraktion in PBS	97,9	$\pm 0,05$
Extraktion gesamt	87,8	$\pm 0,80$



**Abbildung 42: Radio-DC zur Bestimmung des Oxidationszustandes: a.)  $\text{CCl}_4$  b.) PBS**

**Tabelle 26: Oxidationszustand von geträgertem  $^{76}\text{As}$  in  $\text{CCl}_4$  und PBS-Puffer mit Hydroxylamin**

<i>Oxidationszustand in <math>\text{CCl}_4</math></i>	<i>[%]</i>	<i>Oxidationszustand in PBS</i>	<i>[%]</i>
$^{76}\text{As(III)}$	$62 \pm 3$	$^{76}\text{As(III)}$	$95,7 \pm 0,14$
$^{76}\text{As(V)}$	$38 \pm 3$	$^{76}\text{As(V)}$	$4,3 \pm 0,14$

Beim Blick auf die gemessenen Ergebnisse (Tabelle 26) könnte man davon ausgehen, in NaI ein ideales Reduktionsmittel für die Reduktion von  $^{76}\text{As(V)}$  zu  $^{76}\text{As(III)}$  gefunden zu haben. Sieht man von den ca. 40 %  $^{76}\text{As(V)}$  in der organischen Phase ab, so erhält man am Ende mit nur je einer Extraktion fast 90 %  $^{76}\text{As}$  in der wässrigen Phase, von denen > 95 % im erwünschten Oxidationszustand  $^{76}\text{As(III)}$  vorliegen. Da die Phasentrennung mit einer Eppendorf-Pipette durchgeführt wird, kann man die eingesetzten 500  $\mu\text{l}$  Extraktionslösung

nicht quantitativ abtrennen. Es bleiben immer geschätzte 10-20 µl Lösung zurück, was insgesamt zu fast 10 % Verlust führt. Da in der PBS-Fraktion im Gegensatz zur CCl<sub>4</sub>-Fraktion > 95 % \*As(III) vorhanden ist, bedeutet dies, dass das im PBS-Puffer enthaltene Hydroxylamin in der Lage sein muss, \*As(V) bei der Rückextraktion zu \*As(III) zu reduzieren.

Anders verhält sich dieses System leider bei der Extraktion von nca \*As-Isotopen aus HF/NaI-Medium (siehe Kapitel 3.5.2). Gleiches gilt für das HCl/NaI-Medium. Die hohen Extraktionsausbeuten in CCl<sub>4</sub> werden mit nca \*As erst nach 2 Extraktionen erreicht. Bemerkenswert ist auch der Wert von ca. 98 % für die Rückextraktion. Dieser Wert wird in dem analogen nca \*As-System nicht annähernd erreicht. Es scheint hier durch die sehr geringe Menge an Arsenatomen zu einer Interferenz mit anderen in der Lösung enthaltenen Verunreinigungen zu kommen. Der Oxidationszustand in der CCl<sub>4</sub>-Phase ist bei der Verwendung von NaI als Reduktionsmittel immer 100 % nca \*As(V). Dies ist darauf zurückzuführen, dass selbst die geringe Menge des in CCl<sub>4</sub> extrahierten Iods immer deutlich über der Menge der Zahl der nca \*As-Atome liegt, welche somit zu \*As(V) oxidiert werden. Im Falle des geträgerten <sup>76</sup>As(V) wurden immerhin noch 40 % der ca. 100 µg As durch das mitextrahierte Iod zu As(V) oxidiert. Extraktionsversuche mit radioaktivem NaI zeigten, dass pro Extraktion ca. 700 nmol in die CCl<sub>4</sub>-Phase extrahiert werden. Dies ist etwa die Hälfte der 100 µg As(V) (1,3 µmol), die sich im CCl<sub>4</sub> befinden und erklärt ganz gut die 40 % As(V). Leider ergaben sich bei der Rückextraktion des nca \*As(V) in PBS-Puffer trotz Zugabe von Hydroxylamin immer Mischungen aus beiden Oxidationszuständen, die von 0-100 % \*As(V) ohne erkennbare Systematik variierten. Meist jedoch ergab sich ein 1:1-Gemisch der Oxidationszustände. Dies ist mit dem Befund des geträgerten Arsens nicht in Einklang zu bringen. Es muss im nca-System noch andere Faktoren geben, die Einfluss auf den Oxidationszustand nehmen. Man kann festhalten, dass NaI kein geeignetes Reduktionsmittel für nca \*As(V) ist, um reproduzierbar hohe Extraktionsausbeuten und einen hohen \*As(III)-Gehalt zu erhalten. Aus diesem Grund wurden weitere Reduktionsmittel getestet.

### 3.5.6.2 Vorversuche mit CuCl als Reduktionsmittel

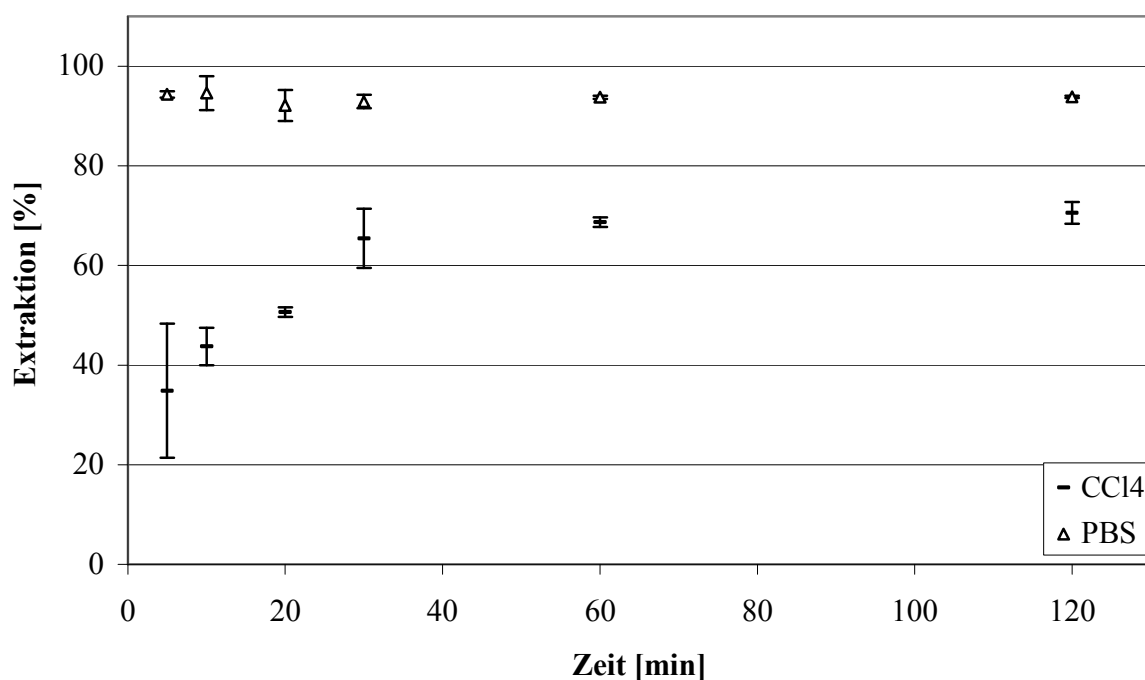
Nachdem das Verhalten des NaI als Reduktionsmittel mit seinen Eigenarten im Zusammenhang mit nca \*As bekannt war, musste als nächster Schritt ein neues Reduktionsmittel gefunden werden. Dabei sollte vor allem Wert darauf gelegt werden, dass sich im Laufe der Reduktion keine weitere Substanz bildet, die das reduzierte \*As(III) wieder oxidieren kann. In der Literatur findet man dazu direkt keine hilfreichen Informationen. Jedoch wurde in einer Veröffentlichung [91] CuCl verwendet, um nca \*As in die AsCl<sub>3</sub> zu überführen und zu destillieren. Außerdem besitzt CuCl in saurer Lösung ein ähnliches Standardreduktionspotential wie I<sup>-</sup> [151]. Hierbei sollte sich Cu<sup>2+</sup> bilden, das dann nicht mehr

in CCl<sub>4</sub> extrahiert werden kann. Somit sollte man reines \*As(III) bereits in der CCl<sub>4</sub>-Phase erhalten. Die Eignung von CuCl wurde in mehrere Batchversuchen analog den Vorversuchen mit NaI an geträgertem <sup>76</sup>As(V) untersucht. Dazu wurden analog den Vorversuchen mit NaI eine Lösung von ca. 100 µg <sup>76</sup>As(V) (1,3 µmol) in 500 µl 9 N HCl hergestellt. Nach Zugabe von 50 mg CuCl (500 µmol, ca. 400-facher Überschuss) wird die Reaktionslösung nach 30 min in CCl<sub>4</sub> extrahiert. Die Extraktionsausbeute liegt hierbei < 10 %, was eigentlich bedeutet, dass CuCl nicht als Reduktionsmittel zu gebrauchen ist. Da jedoch das <sup>76</sup>As nach Extraktion in CCl<sub>4</sub> im erwünschten Oxidationszustand <sup>76</sup>As(III) vorlag wurde die Zeit- und Temperaturabhängigkeit der Reaktion näher untersucht. Dazu wurden Batchversuche bei 60 °C zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt (5 - 120 min). Das Ergebnis ist in Abbildung 43 dargestellt. Man erkennt einen schnellen Anstieg der Extraktionsausbeute in CCl<sub>4</sub> bis ca. 30 min. Danach ist ab 1 h Reduktion ein Plateau bei ca. 70 % Extraktionsausbeute erreicht. Die Rückextraktion in PBS-Puffer (0,5 M Hydroxylamin, 25 mM EDTA) liefert konstante Ausbeuten von > 90 % für eine einzelne Extraktion. Eine Erhöhung der Temperatur auf 80 °C ergab keine signifikante Erhöhung der Extraktionsausbeute. Parallel dazu wurde der Einfluss der Menge an CuCl untersucht (Tabelle 27). Dazu wurden verschiedene Mengen an CuCl (10 - 100 mg) in 500 µl 9 N HCl mit 100 µg <sup>76</sup>As(V) gelöst und vor der Extraktion für 30 min bei 60 °C erhitzt.

**Tabelle 27: Einfluss der Menge an CuCl auf die Extraktionsausbeute (nach 30 min auf 60°C erhitzen)**

<i>CuCl [mg]</i>	<i>CCl<sub>4</sub> [%]</i>	<i>PBS [%]</i>	<i>Total [%]</i>
10	64,3	94,5	60,8
20	63,9	94,6	60,4
30	65,8	90,3	59,4
50	58,9	90,9	53,5
75	60,6	89,9	54,5
100	58,7	100,9	59,2

Das Experiment wurde nur einmal durchgeführt. Die Daten deuten darauf hin, dass es keinen direkten Zusammenhang zwischen der eingesetzten Menge an Reduktionsmittel und der Extraktionsausbeute gibt. Dies war bei einem Überschuss an Reduktionsmittel um den Faktor 400 auch nicht anders zu erwarten.



**Abbildung 43: Extraktion von  $^{76}\text{As(III)}$  in  $\text{CCl}_4$  und Rückextraktion in PBS-Puffer nach Reduktion mit  $\text{CuCl}$  bei  $60^\circ\text{C}$**

Die erhobenen Daten ergeben, dass 50 mg  $\text{CuCl}$  nach 1 h Erhitzen bei  $60^\circ\text{C}$  das Optimum darstellen. Dieses Optimum liegt fast 20 % unter den Werten, die mit  $\text{NaI}$  erreicht werden können. Dafür liefert das  $\text{CuCl}$  aber bereits in  $\text{CCl}_4$  nur  $^{76}\text{As(III)}$  (Abbildung 44), was im Bezug auf eine spätere Verwendung des Arsens als Markierungssynthone der wichtigere Parameter ist. Ein weiterer Vorteil der Verwendung des  $\text{CuCl}$  liegt darin, dass nun auch nca  $^{76}\text{As(III)}$  in organischen Lösungsmitteln zur Verfügung steht, was zur Markierung von z.B. Polymeren notwendig ist. Dies erweitert die Einsatzmöglichkeiten von Arsenisotopen. Die Vorversuche zeigen, dass  $\text{CuCl}$  ein geeignetes Reduktionsmittel für  $^{76}\text{As(V)}$  ist. In Kapitel 3.5.7 wird später noch beschrieben, dass sich die guten Ausbeuten an  $^{76}\text{As(III)}$  im Prinzip auch auf das nca  $^{76}\text{As}$ -System übertragen lassen.

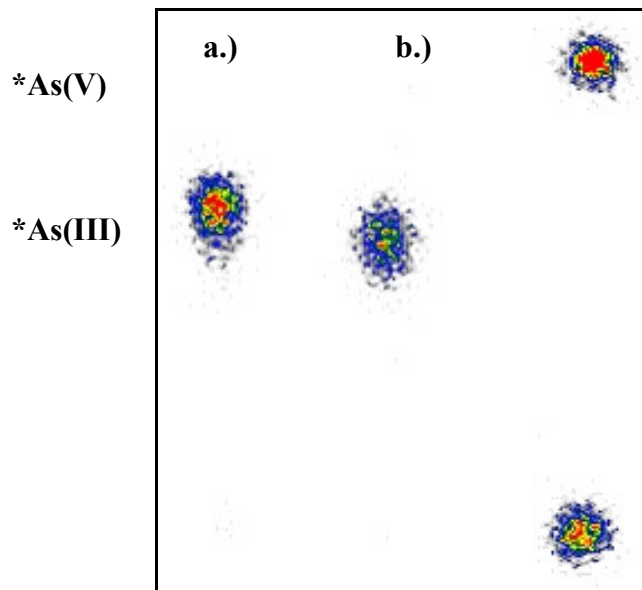


Abbildung 44: Radio-DC zur Bestimmung des Oxidationszustandes nach Reduktion mit CuCl:  
a.) CCl<sub>4</sub> b.) PBS

Tabelle 28: Oxidationszustand von geträgertem <sup>76</sup>As in CCl<sub>4</sub> und PBS-Puffer mit Hydroxylamin nach Reduktion mit CuCl

<i>Oxidationszustand in CCl<sub>4</sub></i>		<i>Oxidationszustand in PBS</i>	
	<i>[%]</i>		<i>[%]</i>
<sup>76</sup> As(III)	100	<sup>76</sup> As(III)	100
<sup>76</sup> As(V)	0	<sup>76</sup> As(V)	0

Trotz des Vorteils des CuCl, im Gegensatz zu NaI reproduzierbar \*As(III) in CCl<sub>4</sub> zu liefern, bleibt seine Anwendung auf die Verwendung in HCl-Lösungen beschränkt. CuCl bildet in HF einen unlöslichen Niederschlag und ist deshalb nicht für eine Anwendung in diesem Medium geeignet. Desweiteren ist die lange Dauer der Prozedur im Verhältnis zum NaI hervorzuheben, was die Gesamtdauer einer radiochemischen Abtrennung um mindestens eine Stunde verlängert.

### 3.5.6.3 Vorversuche mit anderen Reduktionsmitteln

Neben NaI und CuCl wurden mit der standardisierten Methode noch andere Reduktionsmittel auf ihre Wirksamkeit <sup>76</sup>As(V) zu reduzieren getestet. Dazu wurden jeweils ca. 50 mg der Substanz in 500 µl einer 9 N HCl-Lösung von 100 µg <sup>76</sup>As(V) gegeben und für 1 h vor der Extraktion auf 60 °C erhitzt (Tabelle 29).

**Tabelle 29: Übersicht der Extraktionsausbeuten von \*As nach Zugabe diverser Reduktionsmittel (1 h Inkubation bei 60 °C)**

<i>Reduktionsmittel</i>	<i>CCl<sub>4</sub> [%]</i>	<i>PBS [%]</i>	<i>Gesamt [%]</i>
FeSO <sub>4</sub>	3,2	96,6	3,1
Ferrocen	15,0	95,7	14,4
Na-Hypophosphit	0,1	96,4	0,1
Cysteamin	0	0	0
3-Thiopropionsäure	7,3	91	6,6
Mercaptoethanol	74,8	51,5	38,5
Hydroxylamin	0	0	0
Hydrazin	4,2	100	4,3
TCEP	2,5	94	2,4
Oxalsäure	0,2	0	0

Allgemein kann man sagen, dass alle Reduktionsmittel außer Mercaptoethanol schlechte Ausbeuten liefern und deshalb keine Alternative zu NaI oder CuCl darstellen. Mercaptoethanol liefert zwar eine beachtliche Extraktionsausbeute in CCl<sub>4</sub>, dafür funktioniert die Rückextraktion viel schlechter als bei allen anderen Versuchen. Dies deutet darauf hin, dass das Mercaptoethanol mit dem Arsen reagiert und es nicht nur reduziert. Die Bildung einer molekularen Verbindung zwischen \*As und Mercaptoethanol wurde in früheren Experimenten mittels Radio-DC bereits beobachtet, jedoch nicht weiter verfolgt. Aus diesem Grund erscheinen tendenziell alle Thiole, von denen einige durchaus in der Lage sind Arsen zu reduzieren, keine gute Wahl als Reduktionsmittel. Aus demselben Grund scheidet auch H<sub>2</sub>S-Gas aus.

Einige Reduktionsmittel wurden ohne Quantifizierung getestet. Dazu gehört das in der Literatur manchmal gebräuchliche SO<sub>2</sub>-Gas und Ascorbinsäure. Beide waren in diesem System nicht geeignet, um das Arsen zu reduzieren. Ein anderes in der Literatur gebräuchliches Reduktionsmittel ist HBr [95]. Dieses wurde jedoch nicht systematisch untersucht, da es hier ganz besonders auf die Konzentration von HBr und HCl ankommt, um eine Extraktion erreichen zu können. HBr hat sich jedoch auch in dieser Arbeit als durchaus brauchbar erwiesen und liefert ähnliche Ergebnisse wie CuCl, jedoch bereits bei Raumtemperatur und ohne lange Reaktionszeiten. Ein besonderes Augenmerk gilt dem Hydroxylamin. Unter den gegebenen Bedingungen war es nicht in der Lage, das As(V) zu As(III) zu reduzieren. Dies deckt sich auch mit früheren Beobachtungen [154]. Trotzdem ist es bei der Extraktion von As(V) aus CCl<sub>4</sub> in PBS in der Lage, zumindest zum Teil das Arsen zu reduzieren. Dies könnte jedoch auch daran liegen, dass es das gebildete I<sub>2</sub> wieder zu Iodid reduziert, was in der Folge zu einer Reduktion des As(V) führen könnte. Versuche As(V) in PBS durch Zugabe von NaI wieder zu reduzieren, waren jedoch trotz der Präsenz von Hydroxylamin nicht erfolgreich. Die Entdeckung eines guten Reduktionsmittels für As(V) zu As(III) in neutraler wässriger Lösung (z.B. 0,9 %ige NaCl oder PBS-Puffer) wäre ein weiterer

wichtiger Schritt in der Entwicklung von Arsenradiopharmaka, da das  $^{76}\text{As(III)}$  in PBS-Puffer bei Raumtemperatur und im Licht mit der Zeit wieder zu  $^{76}\text{As(V)}$  oxidiert werden kann.

#### **3.5.6.4 Zusammenfassung Reduktionsmittel für geträgertes $^{76}\text{As(V)}$ im HCl-Medium**

Aus den Versuchen mit geträgertem  $^{76}\text{As(V)}$  kristallisierten sich sowohl NaI als auch CuCl als mögliche Kandidaten zur Reduktion von nca  $^{76}\text{As(V)}$  zu  $^{76}\text{As(III)}$  in HCl-Medium heraus. Die LLE-Versuche in die organische Phase und die anschließende Rückextraktion in PBS-Puffer ergaben für NaI einen  $^{76}\text{As(III)}$ -Gehalt von  $> 95\%$  und für CuCl sogar  $100\%$   $^{76}\text{As(III)}$ . Für CuCl konnten die Reaktionsbedingungen in Batch-Experimenten optimiert werden, um eine möglichst große Extraktionsausbeute an  $^{76}\text{As(III)}$  zu erzielen (Inkubation für 1 h bei  $60^\circ\text{C}$ ). Diese Bedingungen sollen auch auf die nca  $^{76}\text{As}$ -Isotope angewendet werden. Da NaI im Zusammenhang mit LLE aus HF/NaI-Medium (Abtrennungsmethoden MJ02 und MJ05) bereits schlechte Ergebnisse lieferte, erscheint es sinnvoll, zunächst die Entwicklung auf die Verwendung von CuCl als Reduktionsmittel für nca  $^{76}\text{As(V)}$  zu  $^{76}\text{As(III)}$  zu konzentrieren. Später durchgeführte Versuche mit nca  $^{76}\text{As}$  unter Verwendung von NaI ergaben analog den Abtrennungsmethoden MJ02 und MJ05 in der PBS-Phase jeweils ein 1:1-Gemisch beider Oxidationszustände. NaI ist somit kein geeignetes Reduktionsmittel für nca  $^{76}\text{As}$  in HCl-Medium.

### **3.5.7 Abtrennung von <sup>72/74/77</sup>As aus einem Germaniummetalltarget durch Destillation von GeCl<sub>4</sub> und anschließender Aufreinigung mittels Anionenaustausch (MJ06)**

Nachdem die erste Flüssig-Flüssig-Extraktionsmethode zur Abtrennung von \*As aus Germaniumtargets nicht zum Ziel führte (Kapitel 3.5.5, MJ05), wurde die auf Flusssäure aufbauende Chemie verlassen und etwas vollkommen anderes versucht. Eine der ältesten Methoden zur Trennung von Germanium und Arsen besteht in der Destillation des Germaniums als GeCl<sub>4</sub> (Sdp = 84 °C) aus konzentrierten HCl-Lösungen. Die Zugabe von Oxidationsmitteln hält das \*As im Oxidationszustand +(V), welches nicht flüchtig ist. In der Literatur sind dazu einige Methoden bekannt. Die hier ausgewählte Methode ist in Grundzügen in [93] beschrieben. Die Destillation ist je nach den gewählten Bedingungen bereits sehr effizient und liefert eine \*As(V)-Fraktion, die eine bessere Abtrennung des Germaniums aufweist, als die Extraktionsmethoden. Es ist jedoch einfach möglich, die Reinheit weiter zu erhöhen, indem man die Lösung über eine Anionenaustauschersäule aufreingt. An diesem Punkt erhält man \*As(V) in 10 M HCl, die man nicht zur Markierung von Antikörpern einsetzen kann. Es wurde dann, ähnlich den zuvor beschriebenen LLE-Methoden, entschieden, das \*As als \*As(III) in CCl<sub>4</sub> und danach wieder in PBS-Puffer zu extrahieren. Als Reduktionsmittel wurde hierbei CuCl eingesetzt.

#### **3.5.7.1 Lösen der Germaniummetalltargets**

Anders als bei der ersten Abtrennungsmethode für Germaniummetalltargets (MJ05) konnte hier nicht auf HF/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Lösungsmittel zurückgegriffen werden, da die HF die Glasdestillationsapparatur zerstören würde. Als Alternative kommt hier Königswasser zum Einsatz. Das Königswasser reagiert bei Raumtemperatur nur sehr langsam mit dem Germaniummetalltarget [89], weshalb direkt mit dem Aufheizen der Lösung für die Destillation begonnen wird. Eine andere Möglichkeit besteht darin, eine Mischung aus HCl und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu verwenden. Dies erwies sich jedoch nicht als vorteilhaft, da beide Reagenzien direkt miteinander abreagieren. Das Germaniummetalltarget löst sich in der Regel in der Zeit, die benötigt wird, um das Ölbad auf Temperatur zu bringen im Königswasser vollständig auf.

#### **3.5.7.2 Abtrennung von Germanium durch Destillation von GeCl<sub>4</sub>**

Nachdem das Germanium sich vollständig im Königswasser gelöst hat, beginnt die Destillation des GeCl<sub>4</sub>. Zur Beschleunigung des Vorgangs wird ein leichter Argonstrom durch die Apparatur geleitet. Über einen Zeitraum von ca. 1,5 h wird stetig das GeCl<sub>4</sub> abdestilliert. Das GeCl<sub>4</sub> kondensiert entweder schon im Kühler als GeO<sub>2</sub>, oder wird in ein Gemisch aus 20 % Schwefelsäure eingeleitet, wo es ebenfalls ausfällt. Immer, wenn die Lösung fast bis zur Trockne eingedampft ist, wird erneut 10 M HCl zugegeben, um die Destillation fortführen zu

können. Aus der nach dem Lösen des Targets zunächst klaren Lösung fällt beim Aufkonzentrieren  $\text{GeO}_2$  als Niederschlag aus der Lösung aus und kann sich auch am Rand des Destillationskolbens absetzen. Hier muss die Menge an zugegebener  $\text{HCl}$  so gewählt werden, dass der Niederschlag von  $\text{HCl}$  komplett bedeckt ist. Insgesamt werden so 6 ml  $\text{HCl}$  zugegeben.

Die Zugabe von  $\text{HCl}$  hat zwei Funktionen. Zum Einen soll möglichst viel  $\text{GeCl}_4$  abdestilliert werden. Zum Anderen soll die  $\text{HCl}$  gleichzeitig die überschüssige  $\text{HNO}_3$  zerstören, die nach dem Lösen des Targets nicht mehr gebraucht wird. Dieser zweite Grund ist für die spätere Verwendung des Arsens weitaus bedeutender, da selbst kleinste Reste  $\text{HNO}_3$  dazu führen können, dass die anschließende Reduktion von  $^*\text{As(V)}$  zu  $^*\text{As(III)}$  nicht mehr funktioniert. Aus diesem Grund wird auch nach dem Starten der Destillation im Gegensatz zu anderen Publikationen [83] kein weiteres Oxidationsmittel mehr zugegeben. Eine befürchtete Reduktion zu  $^*\text{As(III)}$  konnte jedoch auch so nicht beobachtet werden. Nach der letzten Zugabe von  $\text{HCl}$  wird die Lösung auf deutlich unter 500  $\mu\text{l}$  eingedampft und aus der Destillationsapparatur entnommen. Die Apparatur wird noch einmal mit etwas  $\text{HCl}$  ausgespült, damit möglichst wenig  $^*\text{As}$  auf der Glasoberfläche absorbiert bleibt. Die vereinigten  $\text{HCl}$ -Phasen sollten ein Volumen von ca. 500  $\mu\text{l}$  haben. Bei der Entnahme der aktiven Lösung muss darauf geachtet werden, dass sie nicht mit eventuell auf der kälteren Seite des Kolbens kondensierter Flüssigkeit in Berührung kommt. Hier befinden sich meistens noch minimale Reste der  $\text{HNO}_3$ . Wenn diese in die Lösung gelangen, kann dies zum Scheitern der Reduktion zu  $^*\text{As(III)}$  führen, was gleichbedeutend mit einem kompletten Verlust des Targets für Marierungsexperimente ist.

Die  $^*\text{As(V)}$ -Ausbeute nach der Destillation beträgt  $93 \pm 2 \%$  in ca. 500  $\mu\text{l}$   $\text{HCl}$  (10 M). Zu diesem Zeitpunkt beträgt der Germanium-Gehalt noch  $9 \pm 7,6 \mu\text{g}$  (für ein 100 mg Ge-Target). Dies bedeutet, dass man so 99,991 % des Germaniums abtrennen kann. Es gab jedoch auch wenige Experimente, bei denen eine größere Menge  $^*\text{As(V)}$  auf den Wänden der Destillationsapparatur absorbiert wurde und nicht mehr aus der Apparatur entnommen werden konnte. Dies trat zwar nur sehr selten auf, wurde aber gerade bei Zyklotrontargets mehrfach beobachtet.

Bei Reaktortargets konnten in der durch Destillation gereinigten  $^{77}\text{As(V)}$ -Fraktion neben Spuren von Germanium noch Isotope des Galliums ( $^{72/73}\text{Ga}$ ) und des Zinks ( $^{69\text{m}}\text{Zn}$ ) nachgewiesen werden. Diese entstehen durch Kernreaktionen mit schnellen Neutronen [138] (siehe auch Kapitel 3.1.2) und lassen sich nicht durch Destillation aus der Lösung entfernen. Bei Bestrahlungen am Zyklotron bestand die einzige detektierbare Verunreinigung aus  $^{67}\text{Ga}$ , welches über die  $^{70}\text{Ge(p,\alpha)^{67}\text{Ga}}$ -Reaktion in kleinen Mengen gebildet wird (siehe Kapitel 3.1.3). Aus diesem Grund wurde über die Anwendung einer zweiten zusätzlichen Aufreinigungsmethode nachgedacht, um all diese Elemente vom  $^*\text{As}$  abzutrennen. Eine gute

Möglichkeit, Elemente selektiv voneinander zu trennen, bietet die Ionenaustauschchromatographie.

### 3.5.7.3 Aufreinigung der \*As(V)-Fraktion nach Destillation durch Anionenaustausch

Wie bereits in der Einleitung beschrieben (Kapitel 1.3), besitzen weder Arsen noch Germanium eine nennenswerte Absorption auf Kationenaustauscherharzen [70, 71, 89]. Darum scheidet Kationenaustausch zur weiteren Aufreinigung der Lösung aus. Auf diese Art können nur die Gallium- und Zinkisotope abgetrennt werden, da sie eine höhere Absorption aufweisen [100]. Auf Anionenaustauscherharzen ist die Absorption von As(III), As(V) und Ge(IV) nennenswert größer, was eine Trennung der verschiedenen Elemente und sogar der verschiedenen Oxidationszustände des Arsens möglich machen sollte. Auch sind die Absorptionskoeffizienten einer Vielzahl von Elementen in HCl-Lösungen auf dem Harz AG 1-X8 sehr gut aus der Literatur bekannt [69, 104]. Speziell mit dem System Ge(IV), As(III) und As(V) beschäftigen sich ebenfalls mehrere Publikationen [102, 103]. Hier werden auch bereits Strategien zur Trennung der Elemente vorgeschlagen. Ein Blick auf die Absorptionskoeffizienten der verschiedenen Elemente (Abbildung 45) zeigt, dass As(V) den geringsten Absorptionskoeffizienten aufweist. Bei hohen HCl-Konzentrationen von 8 - 10 M unterscheiden sich die einzelnen Elemente am Deutlichsten in ihren Absorptionseigenschaften voneinander.

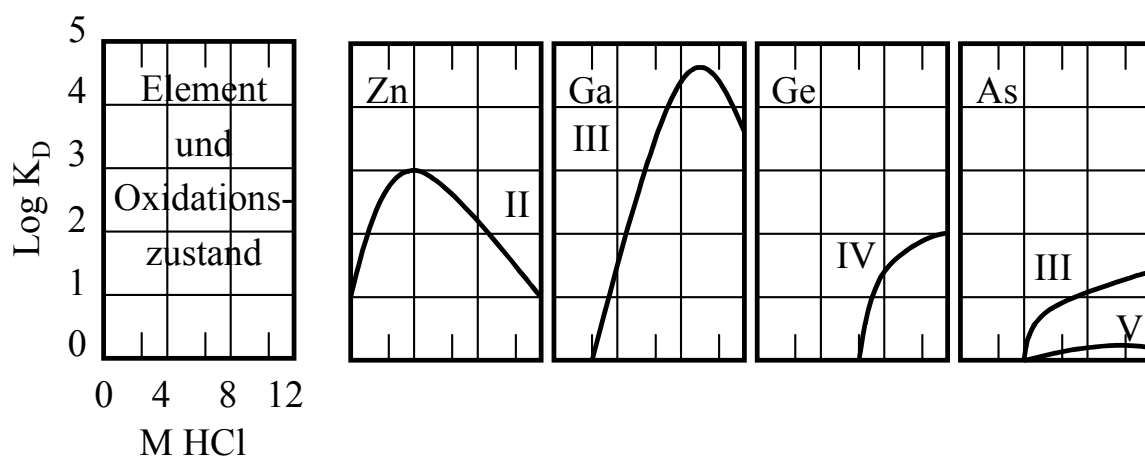


Abbildung 45: Qualitative Darstellung der Verteilungskoeffizienten von Zn(II), Ga(III), Ge(IV), As(III) und As(V) auf dem Anionenaustauscher Dowex 1-X10 in HCl-Lösungen [69].

Eine gute Strategie besteht also darin, die 500 µl der \*As(V)-Fraktion nach der Destillation auf eine mit AG 1-X8 gefüllte Säule aufzugeben und diese mit 10 M HCl fraktioniert zu eluieren. Dabei sollte \*As(V) in den ersten Fraktionen eluiert werden, während alle anderen Elemente, von denen radioaktive Kontaminationen in der Lösung vorliegen, zunächst auf der

Säule fixiert bleiben. Diese können dann mit z.B. 0,1 N HCl leicht wieder von der Säule entfernt werden.

Die erste verwendete Säule war ca. 5 x 150 mm groß. Ein exemplarisches Elutionsprofil findet sich in Abbildung 46. Aufgrund der Unterschiede in den Absorptionskoeffizienten von As(III) und As(V) in hochkonzentrierten HCl-Lösungen kann man an der Tatsache, wann das <sup>77</sup>As von der Säule eluiert wird, auch direkt seinen Oxidationszustand erkennen.

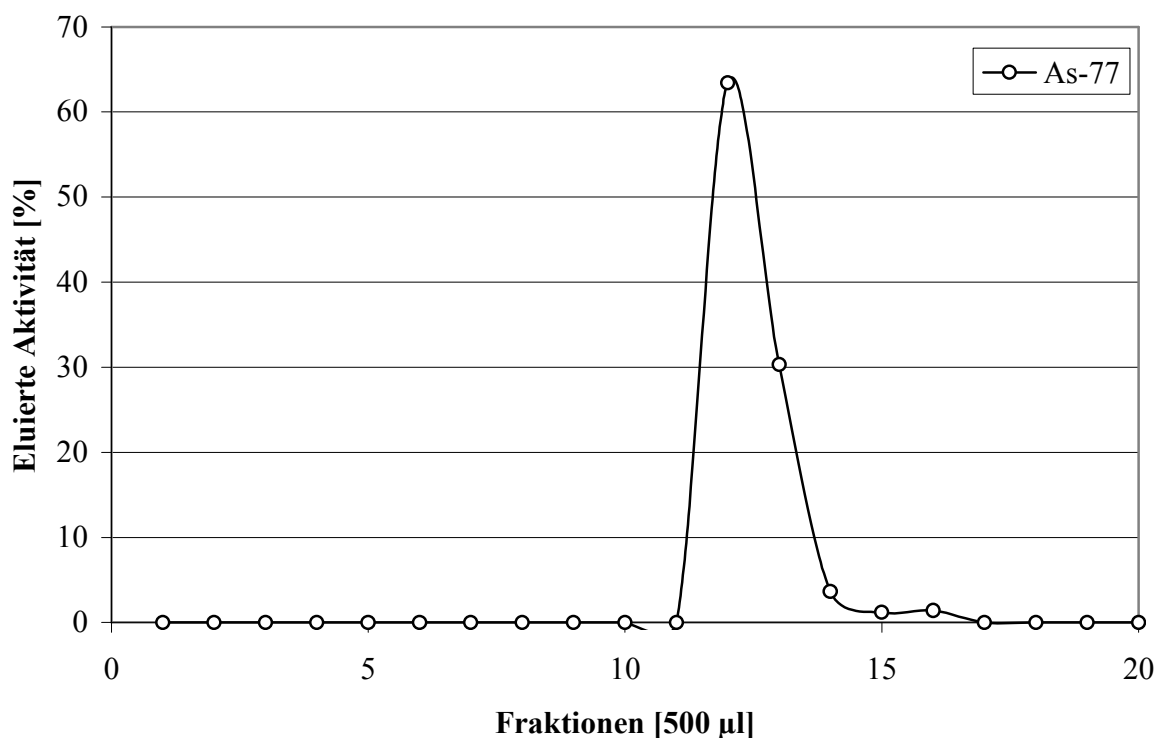


Abbildung 46: Elutionsprofil von <sup>77</sup>As(V) auf AG 1-X8. F1-F9: 10 M HCl, F9-F16 7 M HCl, ab F17 0,1 M HCl

Hierbei wurde die nach der Destillation in 500 µl erhaltene Aktivität noch mit 500 µl 10 M HCl versetzt, so dass 1 ml Lösung auf die Säule aufgegeben wurde. Insgesamt können in den Fraktionen 12 und 13 ca. 94 % der Aktivität in 1 ml 10 M HCl erhalten werden. Die <sup>77</sup>As-Fraktion enthielt keine messbaren Spuren von Germanium mehr. Dies sind für ein erstes Experiment sehr ermutigende Ergebnisse, weshalb die Entwicklungen auf diesem Gebiet fortgesetzt wurden. Da das <sup>77</sup>As erst in den Fraktionen 12 und 13 von der Säule eluiert wird, gab es Überlegungen, die Säule zu verkleinern, damit die gesamte Prozedur beschleunigt werden kann. Die schlussendlich verwendete Säule ist in ihren Dimensionen etwas kleiner (3 x 100 mm) und kann zusätzlich mit Druck (Argon) betrieben werden. Die Verkleinerung ist möglich, da sich nur noch sehr kleine Substanzmengen an Germanium im Bereich von wenigen µg in der Lösung befinden. Aufgrund der geänderten Geometrie ergibt sich auch ein verändertes Elutionsprofil (siehe Abbildung 47).

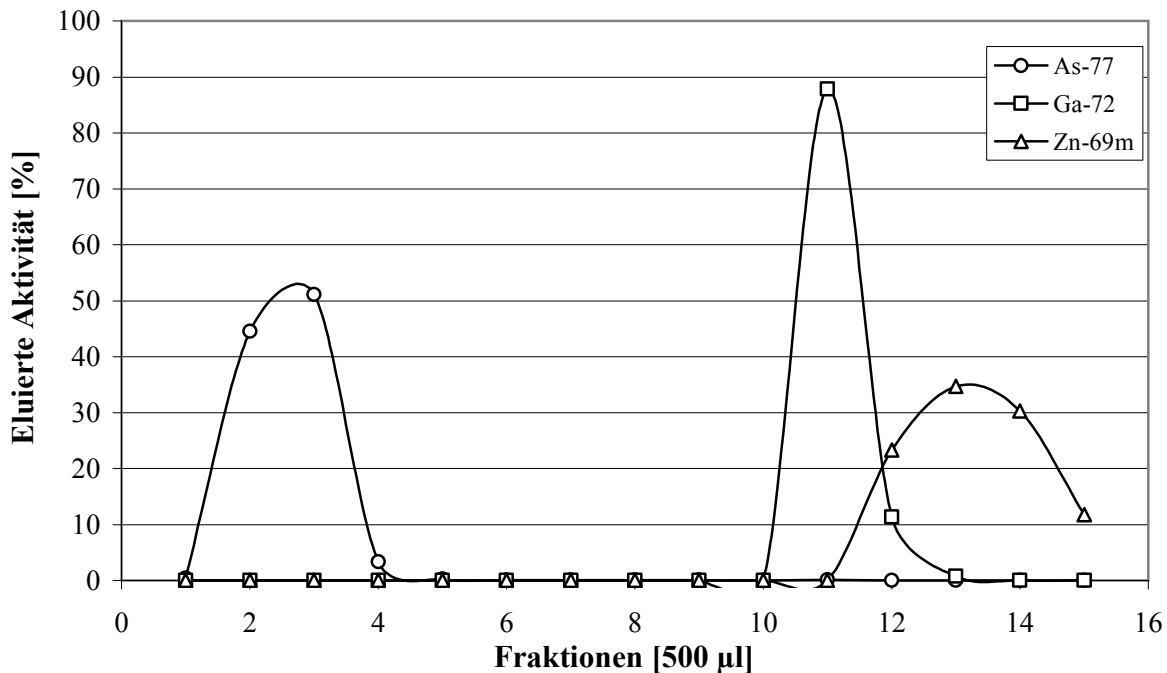
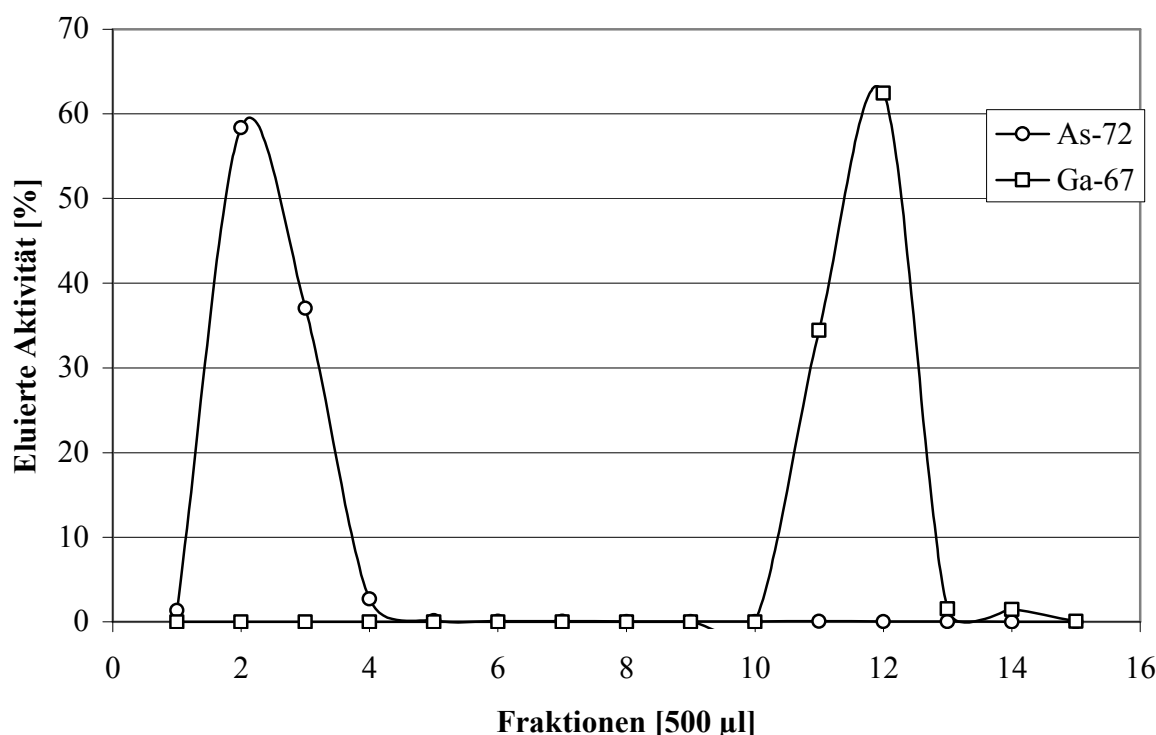


Abbildung 47: Typisches Elutionsprofil für  $^{77}\text{As(V)}$ ,  $^{72}\text{Ga(III)}$  und  $^{69\text{m}}\text{Zn(II)}$  auf AG 1-X8 in 10 M HCl. Ab F11 Elution mit 0,1 N HCl

Hier wurden immer direkt die 500 µl von der Destillation auf die Säule aufgegeben und dann unter Anlegung eines leichten Überdrucks fraktioniert eluiert. Im Vergleich zu den ersten Versuchen erhält man jetzt das  $^{77}\text{As(V)}$  direkt in Fraktion 2 und 3 (1 ml). Nach der Säule betrug die Wiederfindungsrate  $94 \pm 1,7\%$ . Die  $^{77}\text{As}$ -Fraktion weist keinerlei messbare Spuren von  $\text{Ge(IV)}$ ,  $^{72}\text{Ga(III)}$  und  $^{69\text{m}}\text{Zn(II)}$  mehr auf. Dies bedeutet nicht, dass sich kein Germanium mehr in der Lösung befindet, sondern nur, dass der Germaniumgehalt unter der Nachweisgrenze liegt. Die Nachweisgrenze für  $^{77}\text{Ge}$  wurde für eine 12 h Messung zu 0,25 Bq bestimmt. Bei einer Startaktivität von 2 MBq  $^{77}\text{Ge}$  kann man also davon ausgehen, dass der Abtrennungsfaktor für das Germanium nach der Säule  $> 1 \cdot 10^6$  ist. Um diesen Wert genauer bestimmen zu können, müsste man eine höhere Startaktivität erreichen, was bei Bestrahlungen in Mainz nicht möglich war. Trotzdem kann man festhalten, dass diese Art der Targetaufarbeitung von allen bisher entwickelten die sauberste  $^{77}\text{As(V)}$  Fraktion liefert. Erst nachdem das Eluens auf 0,1 N HCl gewechselt wird, kann man die stärker absorbierten Elemente von der Säule eluieren. Dies steht im Einklang mit den aus der Literatur bekannten Verteilungskoeffizienten. Ein Elutionsprofil für ein Zyklotrontarget mit  $^{72}\text{As}$  und  $^{67}\text{Ga}$  findet sich in Abbildung 48. Man sieht, dass es keine signifikanten Unterschiede im Verhalten der Aktivitäten gibt.

Eine nicht erschöpfend zu beantwortende Frage ist die, was mit dem Germanium passiert. Es taucht in den Elutionsprofilen nicht auf, weil es weder in der  $^{77}\text{As}$ , noch in den  $^{72}\text{Ga}$  bzw.  $^{69\text{m}}\text{Zn}$  Fraktionen zu messen ist. Es gibt zwei mögliche Erklärungen. Auf der einen Seite ist

die Abtrennung des Germaniums mittels Destillation bereits sehr gut. Dies führt dazu, dass die Aktivität, die man auf die Säule aufgibt, bereits deutlich unter 1 kBq liegt. Im Vergleich dazu ist die Aktivität des  $^{72}\text{Ga}$  ca. 10 Mal höher. Dennoch sollte selbst bei kurzen Messzeiten das  $^{77}\text{Ge}$  im Spektrum auftauchen. Dies ist jedoch nicht der Fall. Man kann also davon ausgehen, dass das  $\text{GeCl}_4$  in hoher  $\text{HCl}$ -Konzentration mit großer Wahrscheinlichkeit flüchtig ist. Dies ist aus der Literatur bereits bekannt [89], sollte jedoch erst bei  $\text{HCl}$ -Konzentrationen über 10 M signifikant werden. Aus diesem Grund wurde auch darauf verzichtet, ein Elutionsprofil mit größerer Aktivität  $^{68}\text{Ge}$  ( $T_{1/2} = 270$  d) aufzunehmen, da hier ein erhöhtes Kontaminationsrisiko bestand.



**Abbildung 48:** Typisches Elutionsprofil für  $^{72}\text{As(V)}$  und  $^{67}\text{Ga(III)}$  AG 1-X8 in 10 M  $\text{HCl}$ . Ab F11 Elution mit 0,1 N  $\text{HCl}$

Prinzipiell kann man die Trennung auch bei niedrigeren  $\text{HCl}$ -Konzentrationen durchführen. Jedoch benötigt man am Ende für die Weiterverarbeitung des  $^{72}\text{As(V)}$  eine möglichst hohe  $\text{HCl}$ -Konzentration [85], um nach der Reduktion das  $^{72}\text{As(III)}$  in die organische Phase extrahieren zu können. Aus diesem Grund, und weil in den Zyklotrontargets unter den gewählten Bedingungen keine Germaniumisotope erzeugt wurden, wurde an dem gewählten Setup nichts mehr geändert, sondern dem Ziel ein möglichst kleines Volumen in möglichst kurzer Zeit zu erhalten untergeordnet. Die Säulentrennung verläuft relativ schnell innerhalb von ca. 15 min, da man für eine Abtrennung des  $^{72}\text{As(V)}$  nur die ersten drei Fraktionen benötigt. Die Aufnahme eines kompletten Elutionsprofils dauert fast 2 Stunden, auch weil die Messzeit der einzelnen Fraktionen nicht unter 5 min liegen sollte.

Rückblickend betrachtet war die Verkleinerung der Säule jedoch ein strategischer Fehler. Dadurch, dass das  $^{76}\text{As(V)}$  nun fast ohne Wechselwirkung durch die Säule läuft, besteht auch keine Chance mehr, etwaige in der Destillationslösung vorhandene Spuren von  $\text{HNO}_3$  abzutrennen.  $\text{HNO}_3$  läuft ähnlich wie das  $^{76}\text{As(V)}$  ohne große Wechselwirkung durch die Säule und befindet sich in denselben Fraktionen wie das  $^{76}\text{As(V)}$ . Bereits Spuren von  $\text{HNO}_3$  verhindern hohe Extraktionsausbeuten an  $^{76}\text{As(III)}$  nach Reduktion in  $\text{CCl}_4$  und können einen Verlust der kompletten Aktivität bedeuten, da sie dann nicht mehr weiterverarbeitet werden kann. Dies wurde einige Male leider auch bei Zyklotrontargets beobachtet. Gerade bei teuren Zyklotrontargets ist dies besonders ärgerlich, auch weil hier in der Regel immer *in vivo*-Experimente anhängig waren, die dann leider nicht mehr durchgeführt werden konnten. Dies ist der eigentliche Grund, warum die Methode am Ende nicht mehr zur Aufarbeitung von Germaniumtargets eingesetzt wurde. Die Probleme scheinen jedoch lösbar, so dass durchaus über eine leicht modifizierte Variante mit einer größeren Säule nachgedacht werden kann.

#### **3.5.7.4 Reduktion mit $\text{CuCl}$ , Extraktion in $\text{CCl}_4$ und Rückextraktion in PBS-Puffer**

Nachdem klar war, dass  $\text{NaI}$  in  $\text{HF}$ -Lösungen keine gute Wahl ist, um  $^{76}\text{As(V)}$  zu  $^{76}\text{As(III)}$  zu reduzieren (Kapitel 3.5.2), wurde nach alternativen Reduktionsmitteln gesucht (siehe Kapitel 3.5.6). Das einzige Erfolg versprechende Reduktionsmittel aus den Batchversuchen mit  $^{76}\text{As(V)}$  war  $\text{CuCl}$ . Die Vorversuche hatten gezeigt, dass die besten Ergebnisse zur Reduktion von  $^{76}\text{As(V)}$  zu  $^{76}\text{As(III)}$  nach Zugabe von 50 mg  $\text{CuCl}$  zu der  $^{76}\text{As}$ -Lösung und Inkubieren für 1 h bei 60 °C erzielt wurden. Diese Bedingungen kamen deshalb auch bei der nca  $^{76}\text{As(V)}$  Fraktion zur Anwendung. Während dem Erhitzen färbt sich die vorher tiefgrüne Lösung noch dunkler ein. Erhält man nach 1 h hingegen eine hellgrüne Lösung, so waren in der  $\text{HCl}$ -Fraktion noch Reste des Oxidationsmittels  $\text{HNO}_3$  zu finden und eine Extraktion des  $^{76}\text{As}$  in  $\text{CCl}_4$  war daraufhin nicht mehr möglich. Die Lösung wird nach kurzem Abkühlen mit  $\text{CCl}_4$  ausgeschüttelt. Dabei geht das  $^{76}\text{As(III)}$  als  $^{76}\text{AsCl}_3$  in die organische Phase über. Um die Ausbeute zu erhöhen, wird die Prozedur wiederholt. Normalerweise führt die Extraktion von  $^{76}\text{As(III)}$  aus  $\text{HCl}$ -Lösungen > 8 M dazu, dass das  $\text{GeCl}_4$  ebenfalls in die organische Phase extrahiert wird [86, 87]. In diesem Fall ist dies jedoch kein Problem, da bereits alles Germanium durch die Verwendung der Anionenaustauschersäule abgetrennt wurde. Es geht in diesem Schritt nur noch darum, das  $^{76}\text{As}$  aus 10 M  $\text{HCl}$  in eine neutrale wässrige Lösung zu überführen. Dazu werden die vereinigten organischen Phasen mit 500  $\mu\text{l}$  PBS-Puffer (0,5 M Hydroxylamin, 25 mM EDTA) ausgeschüttelt, um das  $^{76}\text{As(III)}$  in die neutrale wässrige Phase zu extrahieren. Eine Übersicht der erzielten Extraktionsausbeuten findet sich in Tabelle 30.

**Tabelle 30: Ergebnisse der Abtrennung von \*As aus Ge-Targets mittels LLE aus HCl nach Destillation und Anionenaustausch**

	<i>Ausbeute [%]</i>	<i>Fehler</i>
Extraktion in CCl <sub>4</sub>	72,4	± 7,2
Extraktion in PBS	63,6	± 3,4
Gesamtextraktion	40,4	± 1,7

Im Vergleich mit den Daten aus den Reduktionsversuchen von geträgertem <sup>76</sup>As(V) mittels CuCl (Kapitel 3.5.6) kann man erkennen, dass hier zwei Extraktionen des nca \*As aus 10 M HCl notwendig sind, um eine ähnliche Extraktionsausbeute zu erhalten. Auch ist im Vergleich mit <sup>76</sup>As die Rückextraktion mit nur 64 % gegenüber > 90 % deutlich reduziert. Das nca \*As scheint sich einfach etwas anders zu verhalten, da die 64 % reproduzierbar erhalten werden. Dies könnte bei den geringen Mengen nca \*As z.B. an Wechselwirkungen mit in der Lösung vorhandenen Verunreinigungen liegen, die bei größeren As-Mengen nicht ins Gewicht fallen. Trotzdem beträgt die Gesamtausbeute dieser Prozedur 40 % \*As(III) bezogen auf die Startaktivität im Germaniumtarget. Dies liegt zwar unter den in vorhergehenden Abschnitten beschriebenen Ausbeuten für die Flüssig-Flüssig-Extraktion von \*As aus GeO<sub>2</sub>-Targets, jedoch handelt es sich bei dieser Methode um eine 4-Stufen-Synthese des Markierungssynthons \*As (Destillation, Säulentrennung, Extraktion in CCl<sub>4</sub>, Rückextraktion in PBS-Puffer). Auch liefert keine andere Methode das \*As in vergleichbarer Reinheit bezogen auf den Restgehalt an Germanium.

### 3.5.7.5 Bestimmung des Oxidationszustandes von \*As

Aufgrund des Verhaltens des \*As auf der Anionenaustauschersäule ist bekannt, dass es sich um 100 % \*As(V) handelt. Der Oxidationszustand in CCl<sub>4</sub> und PBS wurde wiederum mit Radio-DC bestimmt (Abbildung 49).

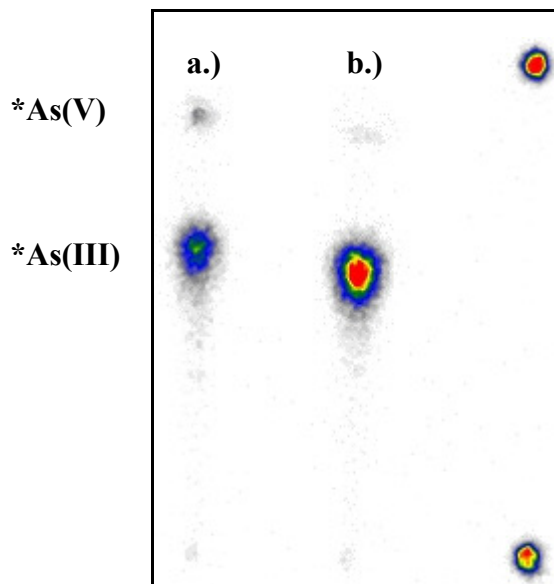


Abbildung 49: Radio-DC zur Bestimmung des Oxidationszustandes von \*As nach Reduktion mit CuCl:  
a.) CCl<sub>4</sub> b.) PBS

Tabelle 31: Oxidationszustand von \*As in CCl<sub>4</sub> und PBS nach Reduktion mit CuCl

Oxidationszustand in CCl <sub>4</sub>	[%]	Oxidationszustand in PBS	[%]
<sup>77</sup> As(III)	92,3 ± 1,9	<sup>77</sup> As(III)	96,7 ± 1,1
<sup>77</sup> As(V)	7,4 ± 1,7	<sup>77</sup> As(V)	3,3 ± 1,1

Die Experimente zeigen, dass das mit CuCl reduzierte \*As sehr hohe Ausbeuten an \*As(III) sowohl in der organischen (> 90 %), als auch in der wässrigen Phase (> 95 %) liefert. Wie schon bei den Extraktionsausbeuten ist hier jedoch eine geringfügige Verschlechterung gegenüber den Versuchen mit geträgertem <sup>76</sup>As zu erkennen, wo in beiden Fraktionen das \*As zu 100 % als \*As(III) vorliegt. Fast 97 % \*As(III) in der finalen Phase sind jedoch ein guter Ausgangswert, um hohe Markierungsausbeuten erzielen zu können. Dies zeigt, dass CuCl ein hervorragendes Reduktionsmittel für \*As(V) ist und die Verwendung von \*As(III) zu Markierungsexperimenten sowohl in CCl<sub>4</sub>, als auch in wässrigem Medium ermöglicht. Der einzige Nachteil der Verwendung von CuCl als Reduktionsmittel liegt darin begründet, dass die Gesamtdauer der Targetaufarbeitung wegen der langen Dauer für die Reduktion um eine Stunde verlängert wird.

### **Vorteile dieser Abtrennungsmethode:**

Der erste Vorteil dieser Abtrennungsmethode (MJ06) besteht darin, dass sie mit Germaniummetall funktioniert und man somit auch am Zyklotron bestrahlte Targets verarbeiten kann. Ein weiterer Vorteil ist die verwendete Kombination aus Destillation und Anionenaustausch, welche in der höchsten Reinheit der finalen  $^{75}\text{As}$ -Fraktion, die in dieser Arbeit erreicht wurde, resultiert. Für einen angenommenen Abtrennungsfaktor von  $> 1 \cdot 10^6$  (der Restgehalt an Germanium liegt unterhalb der Nachweisgrenze von ca. 0,25 Bq) ergibt sich für ein 200 mg Germaniummetalltarget eine Germaniumgehalt in der finalen  $^{75}\text{As}$ -Fraktion von  $< 200$  ng. Im Vergleich zu den davor entwickelten Abtrennungsmethoden kann man hier vollständig auf den Gebrauch von  $\text{HF}_{\text{konz}}$  als Lösungsmittel verzichten, was die Handhabung der Radioaktivität auch außerhalb einer Glovebox ermöglicht. Ebenso positiv ist die Verwendung von  $\text{CuCl}$  als Reduktionsmittel zu nennen. Sowohl in der organischen Phase als auch im PBS-Puffer können mit dieser Methode hohe Ausbeuten an  $^{75}\text{As(III)}$  von  $> 90$  % erzielt werden. Dies sind ideale Voraussetzungen für hohe Markierungsausbeuten von Antikörpern.

### **Nachteile dieser Abtrennungsmethode:**

Die Gesamtdauer der Prozedur liegt bei ca. 4 h. Im Gegensatz zu den Abtrennungsmethoden für  $\text{GeO}_2$ -Targets bedeutet dies eine deutliche Verlängerung. Ein Nachteil ist auch, dass es bisher nicht gelungen ist, eine mögliche „Verschleppung“ von  $\text{HNO}_3$ -Resten aus der Destillation gänzlich auszuschließen, was in der Folge in einigen Fällen die Reduktion von  $^{75}\text{As(V)}$  zu  $^{75}\text{As(III)}$  verhinderte und das Experiment an dieser Stelle beendete. Dieses Problem sollte sich allerdings lösen lassen.

### **3.5.7.6 Markierung von Bevacizumab mit $^{75}\text{As}$ unter Verwendung von TCEP**

Bis zu diesem Punkt wurde die chemische Targetaufarbeitung optimiert und durch Analysemethoden verifiziert, dass die finale PBS-Puffer Fraktion ca. 96 %  $^{75}\text{As(III)}$  in hoher radiochemischer Reinheit enthält. Um zu testen, ob man die 500  $\mu\text{l}$  PBS-Puffer zur Markierung von Proteinen einsetzen kann, wurden 50  $\mu\text{l}$  (1,25 mg) des Antikörpers Bevacizumab direkt in die Lösung gegeben und mit 10  $\mu\text{l}$  (12 mg/ml, 410 nmol) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Der zeitliche Verlauf der Reaktion ist exemplarisch in Abbildung 50 dargestellt.

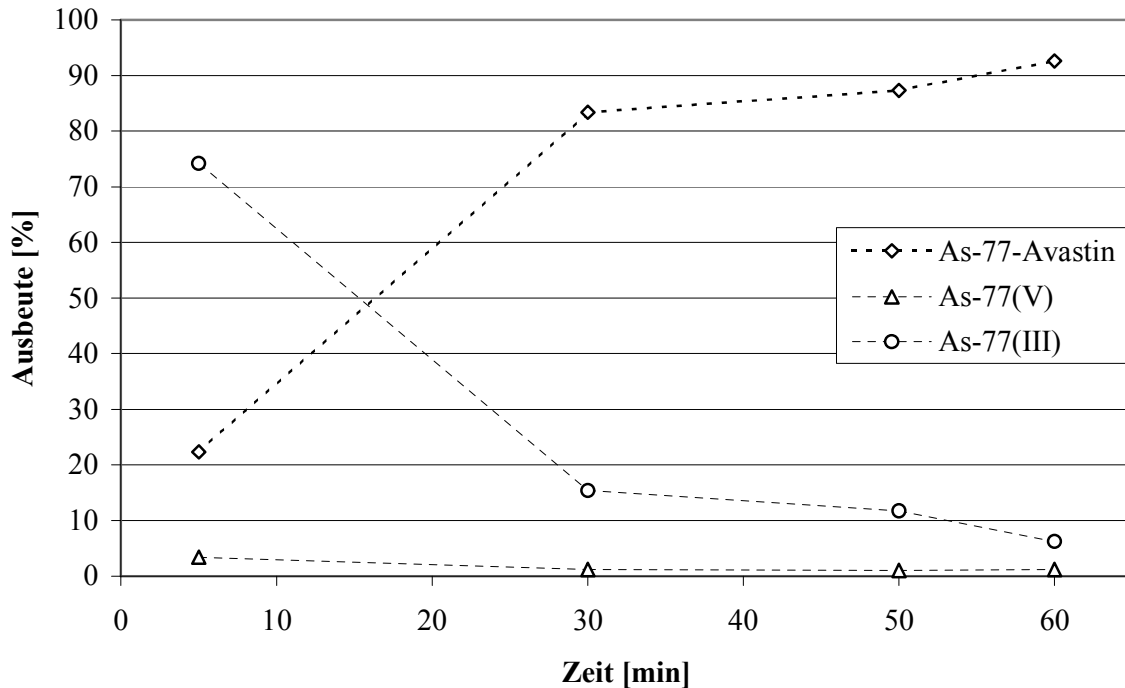


Abbildung 50: Reaktionskinetik <sup>77</sup>As-Bevacizumab bei Raumtemperatur, mittels Radio-DC bestimmt

Die Kinetik der Reaktion von \*As(III) mit dem Antikörper ist vergleichbar mit den aus Experimenten mit anderen Abtrennungsmethoden erhaltenen Daten. Auch hier bleibt der Gehalt an \*As(V) während der Reaktion konstant, während die Abnahme von \*As(III) mit der Zunahme der Markierungsausbeute korreliert. Die Markierungsausbeute liegt nach 1 h Reaktion bei 92 %. Bestimmt man die Markierungsausbeute mittel Gelfiltrations-HPLC, so erhält man eine quantitative Ausbeute, ohne freies \*As(III) (Abbildung 51).

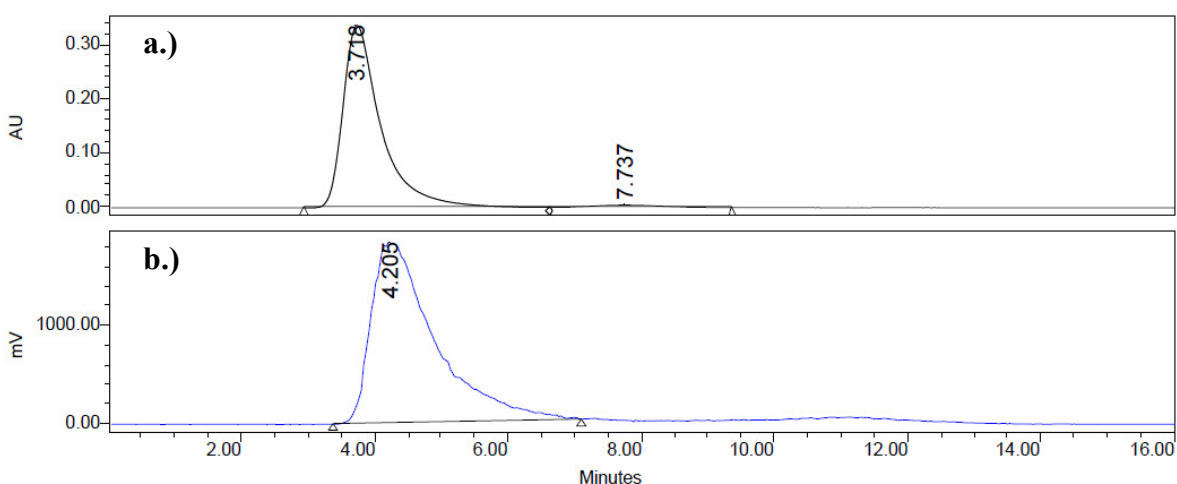
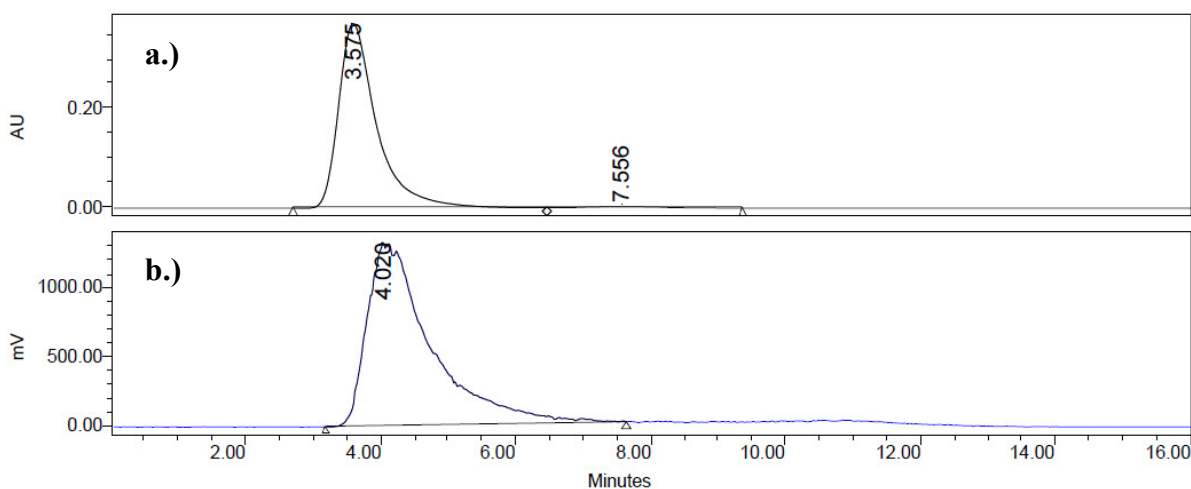


Abbildung 51: Markierungsausbeute <sup>77</sup>As-Bevacizumab nach 1 h mit Gelfiltrations-HPLC bestimmt  
a.) UV 280 nm b.) Radio-Detektor

Die Stabilität der markierten Verbindung wurde bei einem Experiment mit <sup>74</sup>As bis zu 8 Tage nach erfolgter Markierung und einer Gelfiltration der gesamten Probe bestimmt. Dabei wurde

keinerlei Zersetzung des Produktes beobachtet (Abbildung 52). Das Experiment zeigt, dass diese Abtrennungsmethode hervorragend geeignet ist, um den Antikörper Bevacizumab nach Zugabe von TCEP in hohen Ausbeuten und hoher zeitlicher Stabilität zu markieren.

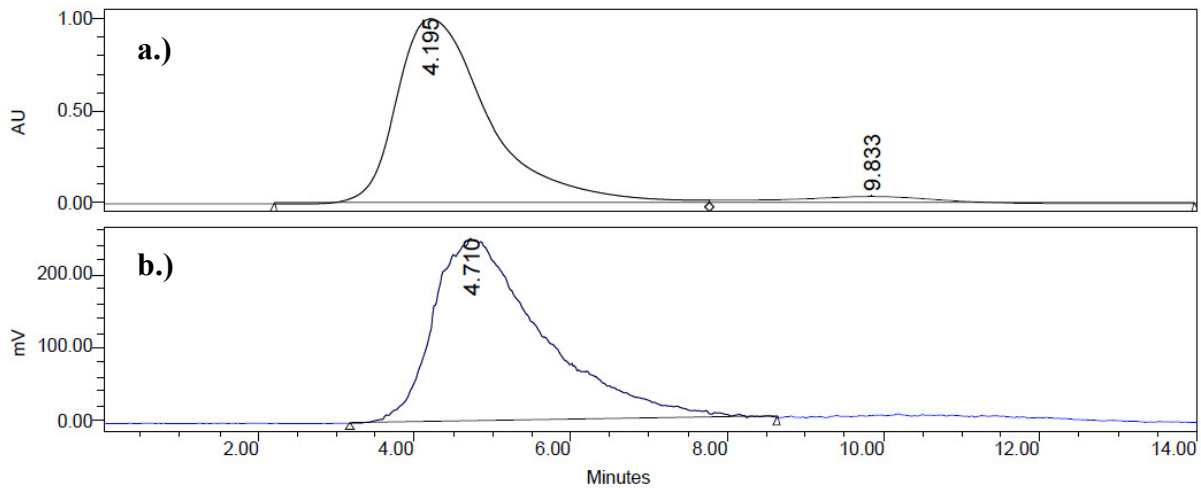


**Abbildung 52: Stabilität von  $^{74}\text{As}$ -Bevacizumab 8 Tage nach Synthese mittels Gelfiltrations-HPLC bestimmt a.) UV 280 nm b.) Radio-Detektor**

### 3.5.7.7 Markierung von SATA-modifiziertem Bevacizumab mit $^{74}\text{As}$

Aus Kapitel 3.5.1 ist bekannt, dass eine erfolgreiche Markierung von Antikörpern mittels Zugabe von TCEP nicht automatisch bedeutet, dass ebenfalls eine Markierung von SATA-modifizierten Antikörpern möglich ist. Die in diesem Kapitel (3.5.7) beschriebene Abtrennungsmethode ist die erste für Radioarsen aus Germaniummetalltargets mittels Destillation und Anionenaustausch. Da nur durch die Bestrahlung von Germaniummetall am Zyklotron genug Arsenaktivität für eine *in vivo*-Anwendung von markierten Verbindungen am Kleintier-PET erzeugt werden konnte, ist es von besonderem Interesse, ob eine Markierung auch von SATA-modifizierten Antikörpern möglich ist. Dazu wurde der Antikörper Bevacizumab nach der in Kapitel 3.4.1 beschriebenen Methode modifiziert.

Aus Kapitel 3.5.7.4 werden 500  $\mu\text{l}$   $^{74}\text{As}(\text{III})$  in PBS-Puffer erhalten. Diese Fraktion wird mit 1 ml SATA-modifiziertem Bevacizumab (Konzentration ca. 0,875 mg/ml) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird die ein Aliquot der Lösung entnommen und mittels Gelfiltrations-HPLC analysiert (Abbildung 53). Hierbei wurde die Kinetik der Reaktion nicht näher untersucht.



**Abbildung 53: Markierungsausbeute  $^{77}\text{As}$ -SATA-Bevacizumab nach 1 h mit Gelfiltrations-HPLC bestimmt a.) UV 280 nm b.) Radio-Detektor**

Die Markierung ist nach 1 h quantitativ. Die Stabilität des markierten Antikörpers wurde ebenfalls untersucht. Einen Tag nach der Markierung war sowohl eine Probe, die nach der Reaktion nicht durch eine Gelfiltration aufgereinigt wurde, als auch eine Probe, die im Anschluss an die Markierung direkt mittels Gelfiltration aufgereinigt wurde, stabil. Da kein  $^{74}\text{As}$  zur Verfügung stand, konnte die Stabilität nicht über einen größeren Zeitraum beobachtet werden. Die Versuche zeigen, dass es möglich ist, mit dieser Methode abgetrenntes Radioarsen sowohl an TCEP-modifizierte, als auch an SATA-modifizierte Antikörper stabil und in hohen Ausbeuten zu binden.

### 3.5.8 Abtrennung von $^{72/74/77}\text{As}$ aus einem Germaniummetalltarget mittels Anionenaustauschchromatographie im HF/HCl-Medium (MJ07)

Parallel zu der im vorhergehenden Abschnitt beschriebenen Abtrennungsmethode für Radioarsen aus Germaniummetalltargets mit Destillation und anschließendem Anionenaustausch begann die Entwicklung eines alternativen Ansatzes, um das  $^*\text{As}$  vom Target zu trennen. Da das Auflösen von Germaniummetall in Königswasser selbst bei hohen Temperaturen nur sehr langsam vonstatten geht, wurde hierbei wiederum auf das Lösungsmittel HF/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zurückgegriffen, das bereits in früheren Versuchen zur Flüssig-Flüssig-Extraktion (Kapitel 3.5.5) erfolgreich zum Einsatz kam. Die schlechte Extraktionsausbeute, die mit dieser ersten Methode erzielt werden konnte, wurde ursächlich auf eventuell vorhandene Spuren des als Oxidationsmittel eingesetzten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nach dessen Zerstörung mit Pt/C zurückgeführt. Die grundsätzliche Idee besteht nun darin, Bedingungen zu finden, unter denen sowohl das Germanium als auch das  $^*\text{As}$  auf einer Anionenaustauschersäule (AG 1-X8) fixiert wird, während die ursprüngliche Targetlösung zusammen mit dem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ohne Wechselwirkung durch die Säule fließt. Somit sollten sich alle interferierenden Substanzen von der Lösung abtrennen lassen. So eine Methode wurde bereits von Schindewolf et al. beschrieben [118]. Hier wird ein sehr hoher Verteilungskoeffizient für Germanium ( $K_D = 50.000$ ) und Gallium ( $K_D = 1.500$ ) in 0,5 M HF beschrieben, der bei beiden Elementen zu höheren Konzentrationen hin absinkt. Die Autoren sprechen von einer Absorption von As(V), dessen Verteilungskoeffizient im HF-Medium wurde jedoch nicht bestimmt. Faris [111] bestimmte den Absorptionskoeffizienten von As(V) zu  $> 100$  in 5 M HF auf AG 1-X10. Dies deutet darauf hin, dass alle diese Elemente in verdünnter HF stark auf der Säule fixiert werden sollten. Außerdem liegen nach Experimenten von Nelson et al. [105] und Kraus et al. [69] Daten über das Verhalten vieler Elemente in 1 M HF und variablen Konzentrationen HCl auf Dowex 1 vor.

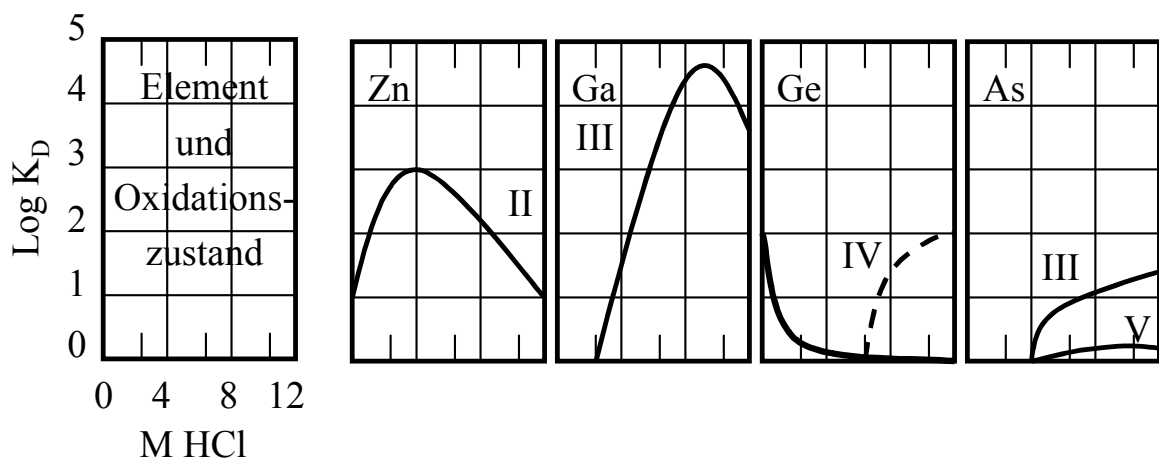


Abbildung 54: Qualitative Darstellung der Verteilungskoeffizienten von Zn(II), Ga(III), Ge(IV), As(III) und As(V) auf dem Anionenaustauscher Dowex 1-X10 in HCl-Lösungen mit 1 M HF [69]

Nach diesen Daten verhalten sich die Elemente Ga, Zn, As(III) und As(V) weitgehend analog zu der Verwendung von reinen HCl-Lösungen. Einzig das Verhalten von Germanium ist nahezu invers zu der Verwendung reiner HCl. Die gestrichelte Linie beim Germanium (Abbildung 54) beschreibt zum Vergleich sein Verhalten in reinem HCl-Medium. Mit diesen Daten wurden die ersten Säulentrennungsversuche durchgeführt. Da das H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zunächst nicht mittels Pt/C zerstört wurde, muss reine HF als Elutionsmittel verwendet werden, da sonst das H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mit dem HCl unter Gasentwicklung reagiert, was die Säule unbrauchbar macht. Die ersten Trennversuche wurden wie folgt durchgeführt. Das Germaniumtarget wurde in ca. 1,5 ml HF/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 : 1) gelöst und auf eine mit 0,35 M HF vorkonditionierte AG 1-X8 Säule aufgegeben (Abbildung 77). Die Säule muss wegen der Verwendung von HF-Lösungen aus Plastik bestehen, da Glas von HF stark angegriffen wird.

Die Säule wird fraktioniert eluiert und die einzelnen Fraktionen  $\gamma$ -spektroskopisch vermessen. In den Fraktionen 2 - 10 wurde mit 2,5 M HF, in den Fraktionen 11 - 15 mit 1 M HF/5 M HCl und schließlich in den Fraktionen 16 - 30 mit 10 M HCl eluiert. Ein typisches Elutionsprofil findet sich in Abbildung 55. Es ist zunächst überraschend, dass beide Elemente in zwei Peaks eluiert werden. Nach den aus der Literatur bekannten Daten [69, 111, 118] würde man erwarten, dass sowohl Ge(IV) als auch As(V) stark auf dem Harz retardiert werden, wenn mit 0,35 M HF eluiert wird. Dies scheint jedoch jeweils nur für einen Teil der aufgegebenen Aktivität zuzutreffen. Sowohl ein Teil des <sup>77</sup>Ge(IV), als auch des <sup>77</sup>As(V) werden in den Fraktionen 3 - 9 eluiert. Es scheint also bisher nicht untersuchte Wechselwirkungen des Harzes mit dem Überschuss an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu geben, der noch vom Lösen der Germaniummetalltargets in der Lösung vorhanden ist. Ebenso denkbar ist, dass die relativ kleine Säule von den 100 - 200 mg Germanium überladen wird. Ab Fraktion 11 wird mit einem Gemisch aus 1 M HF / 5 M HCl eluiert. Wie aus den Literaturdaten erwartet [69], kann man damit den Rest des Germaniums eluieren. In der Mischung aus HF und HCl weist Ge(IV) nahezu keine Absorption auf dem Harz auf, während sich das As(V) nahezu identisch wie in reiner HCl verhält (Abbildung 54).

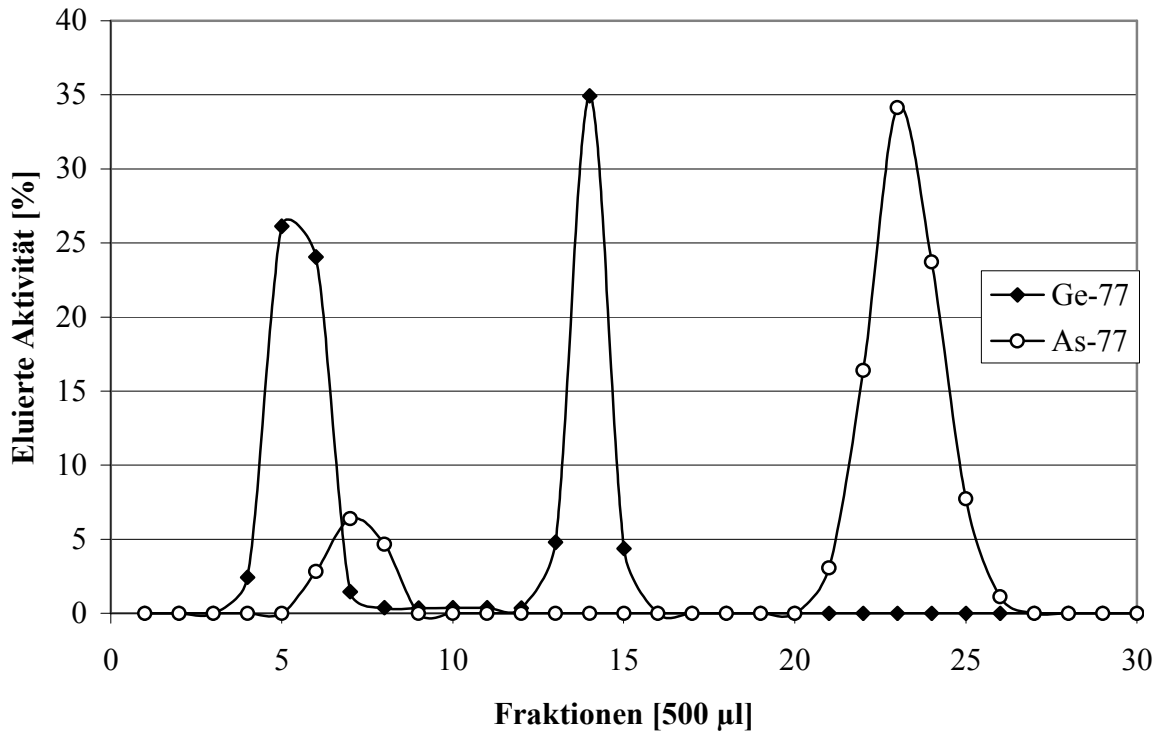


Abbildung 55: Typisches Elutionsprofil für in HF/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gelöste Germaniumtargets auf AG 1-X8

Im Anschluss wird ab Fraktion 16 aus praktischen Gründen mit 10 M HCl eluiert, damit in der finalen <sup>77</sup>As(V)-Fraktion nur wenige Spuren HF enthalten sind. Die Ergebnisse waren reproduzierbar, was die Lage der Peaks, jedoch nicht was die Intensität der einzelnen Fraktionen angeht. Die Verluste von <sup>77</sup>As(V) im ersten Peak betragen bis zu 50 %. Diese ersten Ergebnisse zeigten, dass es prinzipiell möglich ist, Ge(IV) und As(V) auf dem Harz AG 1-X8 direkt zu trennen, ohne vorher die makroskopischen Mengen des Germaniumtargets zu entfernen. Die Strategie wurde dann an zwei Punkten geändert. Zum Einen wurde der nach dem Lösen des Germaniumtargets vorhandene Überschuss H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wieder analog Kapitel 3.5.5 mittels Pt/C vor der Trennung zerstört, zum Anderen wurde nun direkt in den ersten Fraktionen mit einer Lösung aus 2 M HF/10 M HCl eluiert, damit das Ge(IV) direkt ohne große Wechselwirkung durch die Säule laufen sollte. Diese modifizierten Versuche werden im Anschluss detailliert beschrieben.

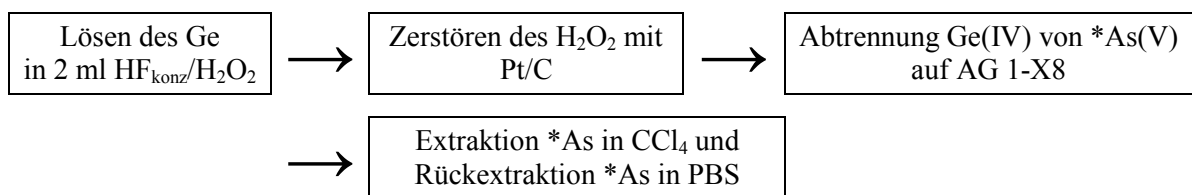


Abbildung 56: Schematische Darstellung der Abtrennung von \*As aus Germaniummetalltargets mittels Anionenaustausch und Flüssig-Flüssig-Extraktion

### 3.5.8.1 Lösen des Germaniummetalltargets in HF/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Der Lösevorgang wird analog Kapitel 3.5.5.1 durchgeführt. Dabei werden die bestrahlten Germaniummetalltargets einem 1 : 1 Gemisch aus HF/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gelöst. Im Falle von Zyklotrontargets wird darauf geachtet, dass das Gemisch nur langsam in 200 µl Schritten zugegeben wird, da die Reaktion wegen der großen Oberfläche der Germaniummetallscheiben stark exotherm werden kann. Während des Lösevorgangs bildet sich GeF<sub>6</sub><sup>2-</sup> und \*As(V). Es ist nicht möglich, das Lösungsmittel in exakt stöchiometrischen Mengen zuzugeben, da immer ein Überschuss an HF und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vorliegen muss. Dies bedeutet ebenfalls, dass sich nach dem Lösen noch ein gewisser Überschuss beider Reagenzien in der Lösung befindet.

### 3.5.8.2 Zerstörung des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Analog Kapitel 3.5.5.2 wird die Targetlösung mit Platin auf Aktivkohle (Pt/C, 10 %) umgesetzt. Dabei reagiert das H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf der Katalysatoroberfläche zu O<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O ab. Um die Reaktion zu beschleunigen wird die Lösung dabei leicht geschüttelt. Erst wenn keine Blasenbildung mehr zu beobachten ist, ist die Reaktion beendet. Es ist sehr wichtig, dass dieser Arbeitsschritt sorgfältig durchgeführt wird, weil eine unvollständige Zerstörung des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dazu führen kann, dass ein Teil des \*As analog den ersten Versuchen bei der Säulentrennung zusammen mit dem Germanium eluiert wird und somit die Gesamtausbeute an \*As sinkt. Die Lösung wird im Anschluss über einen Spritzenfilter von der Aktivkohle abgetrennt, da diese die Säule sonst zusetzt. Die Arsenaktivität nach der Filtration liegt bei 93,2 ± 13,2 %.

### 3.5.8.3 Trennung von Germanium und Arsen auf einer AG 1-X8 Säule

Für die Säulentrennung wurde eine mit AG 1X-8 gefüllte Anionenaustauschersäule (0,9 x 6,5 cm) verwendet. Diese muss im Vorfeld mit 2 M HF/10 M HCl konditioniert werden, bevor die Targetlösung auf die Säule aufgegeben wird. Durch die Filtration gehen im Mittel 10 % der Lösung verloren, so dass ca. 1,8 ml Lösung auf die Säule aufgegeben werden. Der Einfachheit halber wird die gesamte Fraktion als Fraktion 1 bezeichnet. Zur Elution wird in Fraktion 2 - 5 je 1 ml eines 2 M HF/10 M HCl Gemisches verwendet. Aus der Literatur ist bekannt, dass Ge(IV) unter diesen Bedingungen als GeF<sub>6</sub><sup>2-</sup> vorliegt und nicht auf der Säule retardiert wird [69, 105]. Daraus ergibt sich die Strategie, das Ge(IV) zunächst durch die Säule laufen zu lassen, während das \*As(V) fixiert wird, um so eine effektive Trennung beider Elemente zu erreichen. Dies ist insbesondere deshalb von Vorteil, weil so eine unnötig große Säule (100 - 200 mg Germaniummetall) vermieden werden kann. Im Gegensatz dazu soll sich das Verhalten von \*As(V) durch die Anwesenheit der Flusssäure nicht verändern.

Gleiches gilt für Ga(III), welches ebenfalls unter den gewählten Bedingungen auf der Säule fixiert werden sollte. Das Elutionsprofil eines am TRIGA Reaktor bestrahlten Germaniummetalltargets (Abbildung 57) sieht jedoch an diesem Punkt anders als erwartet aus.

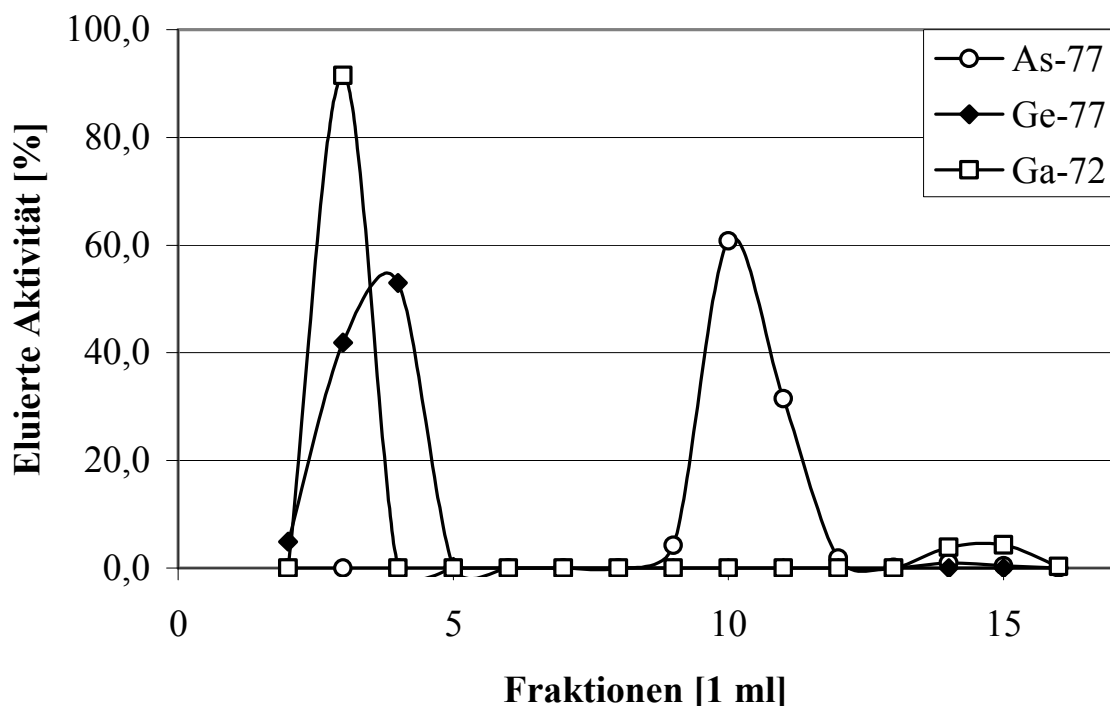
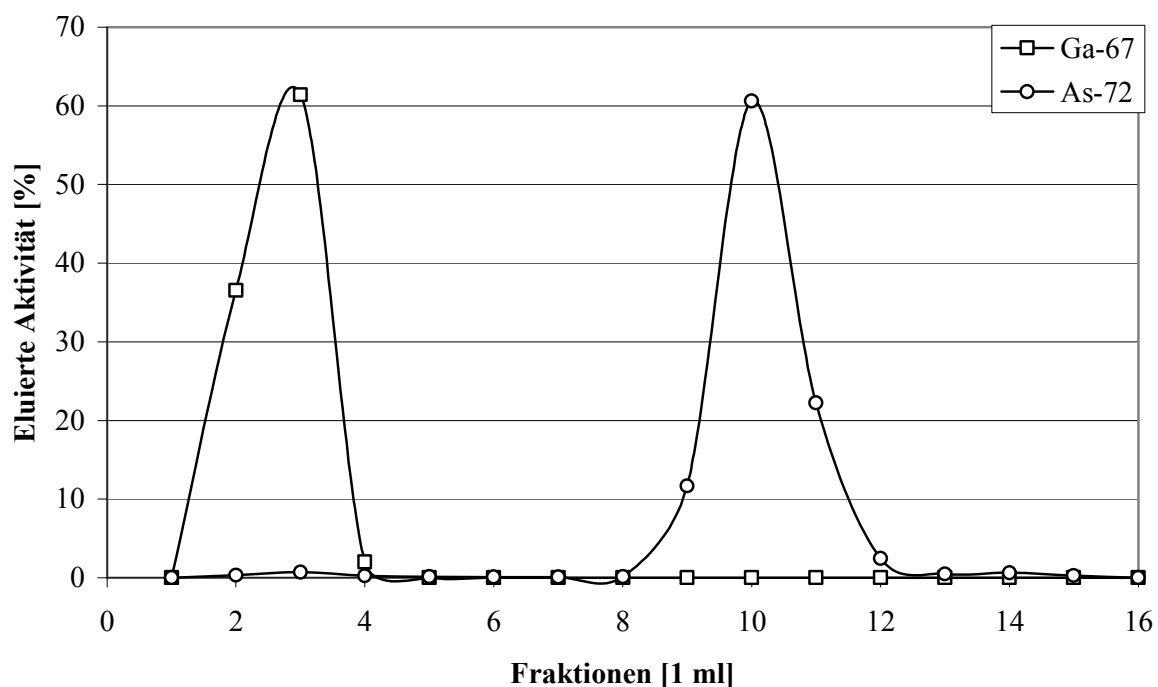


Abbildung 57: Elutionsprofil von  $^{77}\text{Ge(IV)}$ ,  $^{72}\text{Ga(III)}$  und  $^{77}\text{As(V)}$  auf dem Anionenaustauscher AG 1-X8 F2 - F5 2 M HF/10 M HCl, F6 - F11 10 M HCl, F12 - F16 0,1 M HCl

$^{77}\text{Ge(IV)}$  und  $^{77}\text{As(V)}$  verhalten sich wie erwartet. Das  $^{77}\text{Ge(IV)}$  wird in den ersten Fraktionen (2 - 4) komplett von der Säule eluiert, während das  $^{77}\text{As(V)}$  auf der Säule fixiert bleibt. Gleichzeitig wird in Fraktion 3 > 90 % des  $^{72}\text{Ga(III)}$  ebenfalls von der Säule eluiert. Dies deutet darauf hin, dass durch das Aufgeben der Targetlösung in HF auf der Säule für das Ga(III) deutlich andere Bedingungen vorliegen müssen, unter denen keine Absorption stattfindet. Ab Fraktion 6 - 11 wird mit 10 M HCl eluiert. Dies hat hauptsächlich den Vorteil, dass in der  $^{77}\text{As(V)}$  Fraktion dann deutlich weniger Flusssäure vorliegt, was eine Handhabung deutlich vereinfacht. Man erhält in den Fraktionen 10 - 11 in 2 ml 10 M HCl > 90 % der aufgegebenen Arsenaktivität. Ab Fraktion 12 wird mit 0,1 N HCl eluiert, um alle verbliebene Aktivität von der Säule zu waschen. Eigentlich würde man in diesen Fraktionen das  $^{72}\text{Ga(III)}$  erwarten, was jedoch nur zu einem minimalen Teil auf der Säule absorbiert worden ist. Das in Kapitel 3.5.7.3 durch Anionenaustausch abgetrennte  $^{69\text{m}}\text{Zn}$  konnte bei diesen Experimenten nicht detektiert werden. Dies liegt daran, dass sowohl  $^{69\text{m}}\text{Zn}$ ,  $^{77}\text{Ge}$  als auch  $^{77}\text{As}$  eine  $\gamma$ -Linie bei 439 keV besitzen. Dies ist die einzige Linie des  $^{69\text{m}}\text{Zn}$ , was dazu führt, dass es aufgrund der Signalüberlagerung nicht im Gemisch mit den anderen Isotopen nachgewiesen werden kann. Es ist wahrscheinlich, dass es entweder zusammen mit dem  $^{77}\text{Ge}$ , oder dem  $^{77}\text{As(V)}$

eluiert wird. Weitere Experimente zum Verbleib des  $^{69m}\text{Zn}$  wurden nicht durchgeführt. Das Elutionsprofil eines am Zyklotron bestrahlten Germaniummetalltargets ist in Abbildung 58 abgebildet. Hierbei wird unter den gewählten Bedingungen (Kapitel 3.1.3) kein messbares Germaniumisotop produziert. Neben den erwünschten Arsenisotopen findet man lediglich geringe Verunreinigungen von  $^{67}\text{Ga}$  im Gammaspektrum. Bis auf leichte Verschiebungen der beiden Peaks ist das Elutionsprofil identisch. Man kann deshalb auch davon ausgehen, dass das inaktive Ge(IV) ebenfalls in den ersten Fraktionen von der Säule eluiert wird und man eine reine Radioarsen-Fraktion erhält. Im Schnitt waren in der vereinigten  $^{77}\text{As(V)}$  Fraktion noch  $7 \mu\text{g} \pm 8,5 \mu\text{g}$  Germanium bezogen auf 100 mg Germaniummetall nachweisbar. Dies entspricht einer Reinheit von 99,991 %. Der Fehler ist hierbei relativ groß, was auch auf die relativ große Varianz der verwendeten Germaniummenge zwischen 100 und 200 mg zurückgeführt werden kann. Die Bestimmung des Germaniumgehalts wurde wegen der langen Messzeit (bis zu 12 h) nur an wenigen Proben durchgeführt.



**Abbildung 58:** Elutionsprofil von  $^{67}\text{Ga(III)}$  und  $^{72}\text{As(V)}$  auf dem Anionenaustauscher AG 1-X8  
 F2 - F5 2 M HF/10 M HCl, F6 - F11 10 M HCl, F12 - F16 0,1 M HCl

Es sollte jedoch sehr einfach sein, den Germaniumgehalt weiter zu verringern, indem eine etwas längere Säule verwendet wird. Damit wird das  $^{77}\text{As(V)}$  eine oder mehrere Fraktionen später eluiert, was zu einer besseren Trennung führen sollte. Die Arsenausbeute nach der Säule liegt bei  $88,8 \pm 9,8 \%$ .

### 3.5.8.4 Reduktion mit HBr, Extraktion in CCl<sub>4</sub> und Rückextraktion in PBS-Puffer

Die Säulentrennung liefert eine saubere \*As(V) Fraktion in 10 M HCl. Die weiteren Arbeitsschritte, um das Arsen in eine zur Markierung von Antikörpern verwendbare Form zu überführen sollten analog den Experimenten in Kapitel 3.5.7.4 durchgeführt werden. Anders als bei der Säulentrennung einer zuvor destillierten Fraktion sind in diesem Fall jedoch noch Spuren von HF auf der Säule und deshalb auch in der \*As(V)-Fraktion zu finden. Dies beeinflusst die Reduktion mit CuCl negativ, so dass die Extraktionsausbeuten sehr stark absinken. Da mit NaI bis dahin nur negative Erfahrungen gemacht wurden, wurde auf HBr als Reduktionsmittel zurückgegriffen. Dazu werden die vereinigten Arsenphasen in 10 M HCl mit HBr versetzt und mit CCl<sub>4</sub> ausgeschüttelt, um das \*As in die organische Phase zu überführen. Die Prozedur wird wiederholt und dann die vereinigten organischen Phasen mit 500 µl PBS-Puffer (0,5 M Hydroxylamin, 25 mM EDTA) ausgeschüttelt, um das \*As in die neutrale wässrige Phase zu überführen. Die Extraktionsausbeuten im Einzelnen finden sich in Tabelle 32.

**Tabelle 32: Ergebnisse der Abtrennung von \*As aus Germaniumtargets mittels LLE aus HCl nach Anionenaustausch**

	<i>Ausbeute [%]</i>	<i>Fehler</i>
Extraktion in CCl <sub>4</sub>	66,5	± 1,9
Extraktion in PBS	81,8	± 6,4
Gesamtextraktion	45,3	± 3,6

Im Vergleich mit der im letzten Kapitel (3.5.7) beschriebenen Abtrennungsmethode (MJ06) ergibt sich eine ähnliche Gesamtausbeute für \*As in 500 µl PBS-Puffer. Im Vergleich mit der Abtrennungsmethode für GeO<sub>2</sub>-Targets aus HF/HBr-Medium (MJ03, Kapitel 3.5.3) ist die Extraktion in CCl<sub>4</sub> aus HCl/HBr-Medium etwas erniedrigt, während die Rückextraktion hier etwas besser funktioniert.

Die Reinheit der PBS-Puffer-Fraktion von Germanium wurde hierbei nicht mehr explizit untersucht. Da sich die Germaniumspuren nach der Anionenaustauschersäule jedoch in 10 M HCl befinden, sollte das Germanium als GeCl<sub>4</sub> vorliegen. Man kann davon ausgehen, dass diese Spuren zumindest zum Teil ebenfalls in die organische Phase und danach ebenfalls in die PBS-Puffer-Phase extrahiert werden. Somit ist analog MJ06 dieser letzte Extraktionsschritt ausschließlich dazu da, das \*As als \*As(III) in die wässrige Phase bei neutralem pH-Wert zu überführen. Die Gesamtdauer der Prozedur beträgt 4 - 5 Stunden und ist mit der Destillationsmethode vergleichbar. Ein relativ großer Teil der Zeit (ca. 1 h) muss dabei auf die Zerstörung des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verwendet werden.

### 3.5.8.5 Bestimmung des Oxidationszustandes von \*As

Der Oxidationszustand des \*As in der organischen und wässrigen Phase wurde mit der Radio-DC-Methode bestimmt (Abbildung 59).

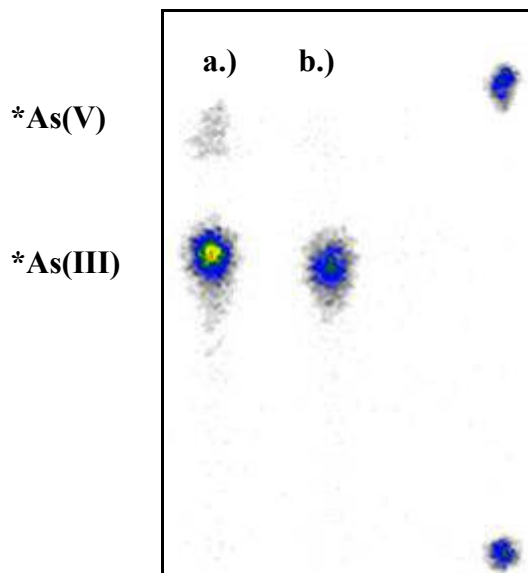


Abbildung 59: Radio-DC zur Bestimmung des Oxidationszustandes von \*As nach Reduktion mit HBr: a.) CCl<sub>4</sub> b.) PBS

Tabelle 33: Oxidationszustand von \*As in CCl<sub>4</sub> und PBS nach Reduktion mit HBr

<i>Oxidationszustand in CCl<sub>4</sub></i>	<i>[%]</i>	<i>Oxidationszustand in PBS</i>	<i>[%]</i>
<sup>77</sup> As(III)	87,8 ± 5,1	<sup>77</sup> As(III)	95,6 ± 2,6
<sup>77</sup> As(V)	12,2 ± 5,1	<sup>77</sup> As(V)	4,3 ± 2,6

Analog zu Kapitel 3.5.3 beobachtet man bei der Verwendung von HBr als Reduktionsmittel in der organischen Phase das Vorhandensein von \*As(V). Bei dieser Methode ist der Gehalt an \*As(V) jedoch mit ca. 10 % im Vergleich zu ca. 30 % deutlich geringer, was sogar nur leicht über den mit CuCl erhaltenen Werten liegt (MJ06). Bei der Rückextraktion in PBS-Puffer liegt der Wert unter 5 %, was ebenfalls mit CuCl vergleichbar ist. Positiv macht sich hier allerdings die geringe Dauer der Reduktion im Vergleich zu der Verwendung von CuCl bemerkbar, da man direkt im Anschluss an die Zugabe der HBr das \*As in die organische Phase extrahieren kann.

#### Vorteile dieser Methode:

Die Methode weist gegenüber den für GeO<sub>2</sub> entwickelten Abtrennungsmethoden (MJ01 - MJ04) eine bessere Abtrennung von Germanium auf. Zwar kommt sie nicht ganz an die in

MJ06 beschriebene Reinheit heran, aber dafür wird hier auch nur ein einziger Reinigungsschritt durchgeführt. Die Vorteile gegenüber MJ06 liegen hierbei insbesondere in der Zeitersparnis bei der Verwendung von CuCl als Reduktionsmittel, da hierbei nicht 1 h gewartet werden muss. Die Gesamtausbeute liegt mit ca. 45 % etwas über den mit MJ06 erzielten Werten. In der finalen PBS-Fraktion sind stabil > 90 % \*As(III) vorhanden, was für eine hohe Markierungsausbeute sehr wichtig ist.

#### **Nachteile dieser Methode:**

Der Vorteil der geringeren Dauer bei der Verwendung von HF/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Lösungsmittel und HBr als Reduktionsmittel gegenüber MJ06 wird durch das Warten auf die Zerstörung des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Überschusses mit Pt/C fast aufgebraucht. Die Dauer der Gesamtprozedur liegt bei 4 - 5 h. Der Lösungsvorgang des Germaniummetalltargets muss im Gegensatz zu MJ06 in einer Glovebox durchgeführt werden, da HF eingesetzt wird und die Reaktion sehr exotherm ist. Auch ist die Handhabung eines stark bestrahlten Zyklotrontargets mit dieser Abtrennungsmethode aus Strahlenschutzgründen ohne zusätzliche Automatisierungen nicht zu empfehlen, da man der radioaktiven Lösung näher kommt, als bei der Destillation/Anionenaustausch-Methode (MJ06), was im Verhältnis zu einer höheren Dosis führt.

#### **3.5.8.6 Markierung von SATA-modifiziertem Bevacizumab mit \*As**

Die Markierung von Antikörpern wurde bei dieser Methode hauptsächlich mit SATA-modifizierten Antikörpern durchgeführt. Dazu wird der modifizierte Antikörper direkt mit den 500 µl \*As-Lösung in PBS-Puffer für 1 h bei Raumtemperatur umgesetzt. Die Reaktion ist bereits nach 30 min sehr fortgeschritten und in der Zeit bis zur vollen Stunde kann nur noch eine geringe Ausbeutesteigerung erzielt werden (Abbildung 60). Auffällig ist jedoch, dass sich der \*As(III)-Anteil bei 10 % stabilisiert, obwohl das \*As(III) eigentlich komplett reagieren sollte. Der Anteil an \*As(V) liegt stabil bei ca. 5 %. Die Ausbeute stabilisiert sich nach 1 h bei 85 %, während mit anderen Abtrennungsausbeuten (MJ06) etwas höhere Ausbeuten von bis zu 92 % erzielt werden konnten. Der Antikörper kann mittels Gelfiltration aufgereinigt werden und war nach 3 Tagen in der Lösung noch stabil.

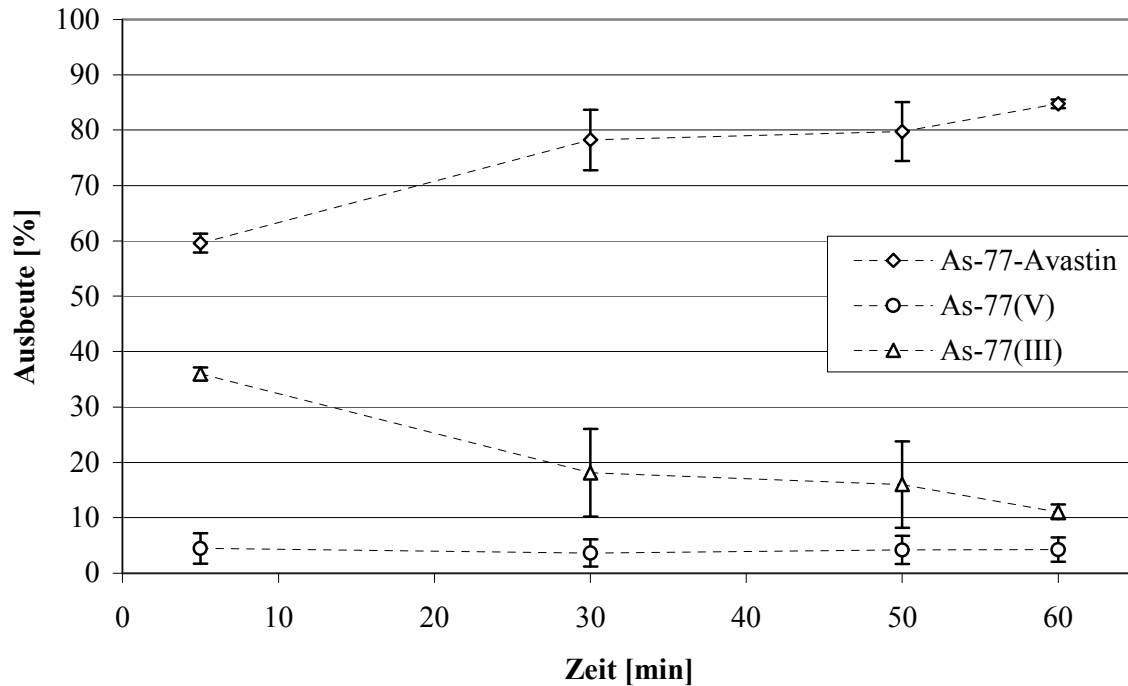


Abbildung 60: Reaktionskinetik <sup>77</sup>As-SATA-Bevacizumab bei Raumtemperatur mittels Radio-DC bestimmt

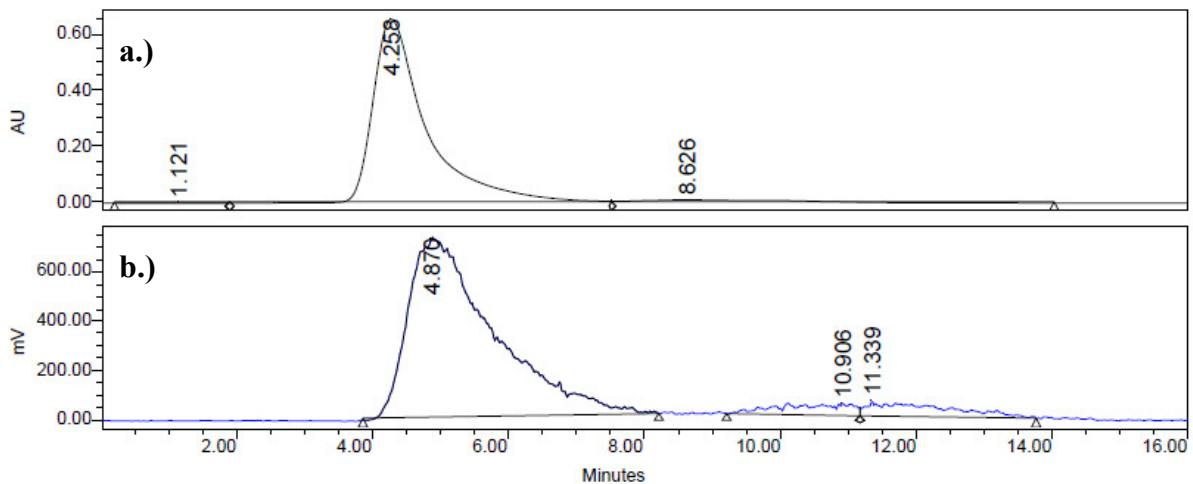


Abbildung 61: Markierungsausbeute <sup>77</sup>As-SATA-Bevacizumab nach 1 h mit Gelfiltrations-HPLC bestimmt a.) UV 280 nm b.) Radio-Detektor

Im Vergleich zu der vorhergehenden Abtrennungsmethode (MJ06) kann man hier auch in den HPLC-Chromatogrammen relativ deutlich das freie \*As in einem breiten Peak bei 10 - 15 min erkennen (Abbildung 61). Hier liegen die Ausbeuten bei ca. 88 %. Bei der Verwendung der TCEP-Methode waren die Ausbeuten nach 1 h Inkubationszeit auch mit dieser Methode quantitativ (mit HPLC bestimmt).

### 3.5.9 Abtrennung von $^{72/74/77}\text{As}$ aus einem Germaniummetalltarget mittels Anionenaustausch im HF/HCl-Medium und Festphasenextraktion (MJ08)

Bei dieser Abtrennungsmethode handelt es sich um eine Modifizierung der in Kapitel 3.5.8 beschriebenen Abtrennung von Germaniummetalltargets durch Anionenaustausch und anschließender Flüssig-Flüssig-Extraktion (MJ07) des abgetrennten  $^*\text{As}$  zur Herstellung einer markierungsfertigen Lösung in PBS-Puffer. Deshalb werden die Einzelheiten der eigentlichen Abtrennung des  $^*\text{As}$  auf der Anionenaustauschersäule (AG 1-X8, 200 - 400 mesh) hier auch nicht mehr diskutiert. Anstatt einer sich bei MJ07 anschließenden Aufarbeitung mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion wird bei dieser Modifizierung die aus Kapitel 3.5.1 bekannte Festphasenextraktion von  $^*\text{As}$  aus HF/NaI-Medium eingesetzt. In diesem Fall findet die Festphasenextraktion jedoch aus HCl/NaI-Medium statt, was die gesamte Prozedur leichter zu handhaben macht. Hierbei wird die Festphasenextraktion nicht mehr dazu verwendet,  $^*\text{As}$  und Ge voneinander zu trennen. Ziel dieses Schrittes ist vielmehr die Verringerung des Volumens und die Überführung der salzsauren in eine neutrale Lösung.

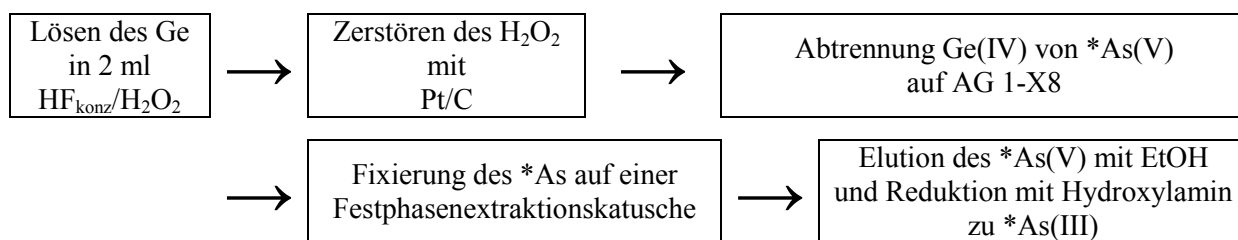


Abbildung 62: Schematische Darstellung der Abtrennung von  $^*\text{As}$  aus Germaniummetalltargets mittels Anionenaustausch und Festphasenextraktion

#### 3.5.9.1 Fixierung des $^*\text{As}$ auf einer Festphasenextraktionskartusche

Nach der Anionenaustauschchromatographie erhält man  $^*\text{As}$  in ca. 2 ml 10 M HCl (Kapitel 3.5.8.3). Das  $^*\text{As}$  kann analog der in Kapitel 3.5.1 beschriebenen Prozedur auf einer konditionierten Bond Elut ENV Kartusche fixiert werden. Dies ist sogar aus reinem HCl-Medium möglich, wenn zuvor NaI zugegeben wurde. Die Fixierung des  $^*\text{As}$  liegt dabei, sowohl für Reaktor- als auch für Zyklotrontargets konstant  $> 90\%$  ( $92 \pm 4,3\%$ ). Im Gegensatz zu den in Kapitel 3.5.1 beschriebenen Versuchen wurde hierbei die radioaktive Lösung mittels einer Einwegspritze durch die Kartusche angesaugt, während sie dort mittels Gravitation durch die Säule gelaufen war. Es bestand die Hoffnung, dass dadurch das  $^*\text{As}$  im Vorderen Teil der Kartusche fixiert wird, was bei der Elution ein geringeres Volumen an EtOH bedeutet hätte. Nach erfolgreicher Fixierung wird die Säule mit einer HCl/NaI-Lösung gespült, um eventuell vorhandene Verunreinigungen wie z.B. Spuren eines Oxidationsmittels restlos zu entfernen. Dies ist notwendig, damit die spätere Reduktion des  $^*\text{As(V)}$  zu  $^*\text{As(III)}$  funktioniert. Für die Prozedur wurde auch die Trocknung der Säule verbessert. Das Trocknen

im Argonstrom wurde auf wenige Minuten verkürzt. In dieser kurzen Zeit kann die HCl nicht restlos entfernt werden. Diese letzten Reste können durch Zentrifugieren entfernt werden. Hierbei werden im Mittel 10 - 20 µl HCl aus der Säule zentrifugiert. In Summe erreicht man so eine Zeitersparnis von ca. 50 min gegenüber einer einstündigen Trocknung im Argonstrom. Ebenfalls konnte auf das Arbeiten in einer Glovebox verzichtet werden, da sich maximal Spuren von HF in der HCl-Lösung befinden.

### 3.5.9.2 Elution des <sup>\*</sup>As von der Festphasenextraktionskartusche

Nach erfolgter Trocknung wird die Säule mit ca. 300 µl EtOH eluiert. Dabei werden Elutionsausbeuten von  $68,8 \pm 18,2$  % erzielt. Die verkürzte Trocknung der Kartusche im Vergleich zu Kapitel 3.5.1 (dort wurde noch 1 h im Argonstrom getrocknet) hat sich also positiv auf das Elutionsverhalten ausgewirkt. Die Gesamtausbeute der Kombination aus Aufreinigung durch Anionenaustausch (MJ07) und Festphasenextraktion (MJ08) liegt bei  $56,7 \pm 14$  %. Insgesamt ist ein möglichst geringes Volumen an EtOH wünschenswert, da ein zu hoher EtOH-Gehalt in der Markierungslösung zu einem Ausfällen des Antikörpers führen kann. Zu der <sup>\*</sup>As-Lösung in EtOH werden 500 µl PBS-Lösung (0,5 M Hydroxylamin, 25 mM EDTA) zugegeben, um das <sup>\*</sup>As(V) zu <sup>\*</sup>As(III) zu reduzieren. Eine prinzipiell mögliche Volumenreduktion des EtOH im Argonstrom erwies sich als problematisch, weil dann nach Zugabe der Reduktionslösung nur geringere Ausbeuten an <sup>\*</sup>As(III) erzielt werden konnten. Ein komplettes Verdampfen des EtOH führt auch zu einem nicht unbeträchtlichen Verlust an <sup>\*</sup>As-Aktivität und sollte somit unbedingt vermieden werden. Die Reinheit der finalen <sup>\*</sup>As-Fraktion in EtOH/PBS-Puffer wurde nicht bestimmt. Da sich diese Abtrennung aber an die in Kapitel 3.5.8 beschriebene Abtrennung mittels Anionenaustausch (MJ07) anschließt, sollte die Reinheit nicht schlechter als die dort erzielte Abtrennung des Germaniums von 99,991 % sein. Leider kann man nicht davon ausgehen, dass die in Kapitel 3.5.1 (MJ01) erzielte Abtrennung von Germanium und <sup>\*</sup>As durch Festphasenextraktion aus HF/NaI-Medium quasi auf die durch MJ07 erzielte Abtrennung aufaddiert. In MJ01 entsteht aus dem GeO<sub>2</sub> in HF-Medium GeF<sub>6</sub><sup>2-</sup>, während man das bei MJ07 nicht der Fall ist. Die <sup>\*</sup>As-Aktivität wird hier in HCl-Medium erhalten, das allenfalls Spuren von HF enthält. Die in der Lösung vorhandenen Germaniumspuren sollten also wahrscheinlich als GeCl<sub>4</sub> vorliegen, über dessen Verhalten auf der Bond Elut ENV Kartusche keinerlei Daten vorliegen. Die Zugabe von HF an diesem Punkt würde zwar eine zu MJ01 analoge zusätzliche Abtrennung des Germaniums ermöglichen, jedoch muss man dann die Handhabung der Aktivität wieder in der Glovebox durchführen. Dies ist zwar prinzipiell möglich, jedoch war gerade eine wichtige Triebfeder der gesamten Entwicklung neuer Abtrennungsmethoden für Radioarsen aus Germaniummetall, die Menge an verwendeter HF<sub>konz</sub> so weit als möglich zu reduzieren, oder wie in Kapitel 3.5.7 (MJ06) komplett darauf zu verzichten.

### 3.5.9.3 Bestimmung des Oxidationszustandes von $^*As$

Der Oxidationszustand des  $^*As$  wurde sowohl in der EtOH-Phase, als auch nach Zugabe des PBS-Puffers (0,5 M Hydroxylamin, 25 mM EDTA) mittels der Radio-DC-Methode bestimmt (Abbildung 63).

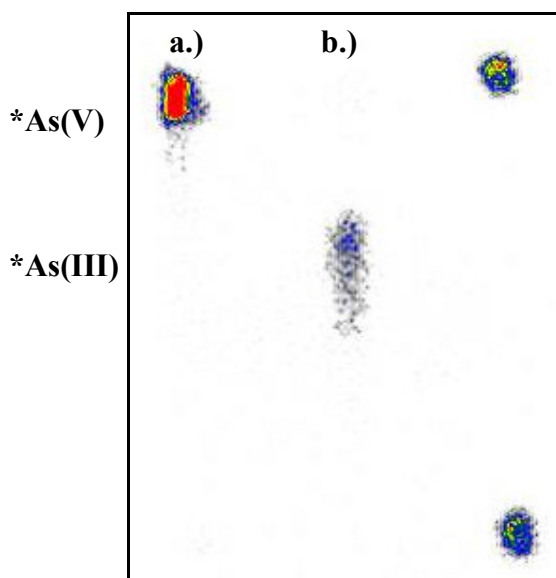


Abbildung 63: Radio-DC zur Bestimmung des Oxidationszustandes von  $^*As$  nach SPE aus HCl/NaI-Medium a.) EtOH b.) EtOH + PBS

Tabelle 34: Oxidationszustand von  $^*As$  in EtOH und PBS nach SPE aus HCl/NaI-Medium

<i>Oxidationszustand in EtOH</i>	<i>[%]</i>	<i>Oxidationszustand in EtOH + PBS</i>	<i>[%]</i>
$^*As(III)$	$4,7 \pm 2,7$	$^*As(III)$	$95,6 \pm 2,2$
$^*As(V)$	$95,3 \pm 2,7$	$^*As(V)$	$4,4 \pm 2,2$

Der Oxidationszustand in EtOH und nach Zugabe von PBS-Puffer ist vergleichbar mit den in Kapitel 3.5.1 unter Verwendung von MJ01 erhaltenen Werten. Auch hier ist es möglich das in EtOH fast quantitativ als  $^*As(V)$  vorliegende Radioarsen durch Zugaben von PBS-Puffer (0,5 M Hydroxylamin, 25 mM EDTA) nahezu quantitativ zu reduzieren. Die Werte sind sowohl mit den in Kapitel 3.5.8 (MJ07) als auch mit den in Kapitel 3.5.7 (MJ06) erzielten Werten vergleichbar. Es sollten sich bei der finalen  $^*As(III)$ -Lösung um eine gute Ausgangsbasis für Markierungsreaktionen mit Radioarsenisotopen handeln.

#### Vorteile dieser Methode:

Die Verwendung der Festphasenextraktion in HCl/NaI-Medium ermöglicht es, ein großes Volumen von  $^*As$  in HCl in ein kleines Volumen an EtOH zu überführen. Dabei wird die

gesamte HCl entfernt, so dass man am Ende eine neutrale Lösung in PBS-Puffer erhält, die direkt für Markierungsversuche zur Verfügung steht. Es ist sogar möglich, ein bereits mit einer anderen Abtrennungsmethode in PBS-Puffer extrahiertes Target mit HCl aufzufüllen und dieses mittels Festphasenextraktion zu verarbeiten. Dies kann notwendig sein, wenn z.B. durch einen Unfall das  $^{75}\text{As}$  als  $^{75}\text{As(V)}$  in PBS-Puffer vorliegt. Ausserdem kann man durch diese Arte der Aufarbeitung nach der reinen Abtrennung des  $^{75}\text{As}$  vom Germanium mittels Anionenaustausch die Gesamtausbeute von  $^{75}\text{As}$  im Vergleich zu MJ06 (40 %) und MJ07 (45%) auf ca. 60 % erhöhen. Dies ist insbesondere wichtig, da das  $^{75}\text{As}$  nicht wie andere Isotope in theoretisch unbegrenzten Aktivitäten erzeugt werden kann. Dabei liefert die Methode am Ende vergleichbar hohe Ausbeuten an  $^{75}\text{As(III)}$ , was für Markierungsreaktionen unabdingbar ist. Man kann sogar darüber nachdenken, diese Methode auch mit MJ06 zu kombinieren, da man so auf die zeitaufwändige Reduktion mit CuCl verzichten kann.

#### **Nachteile dieser Methode:**

Der einzige echte Nachteil ist die Elution der Aktivität mit EtOH. EtOH kann zu Konformationsänderungen im Antikörper führen, was sich optisch durch die Bildung eines Niederschlags andeutet. Man kann die Niederschlagsbildung durch ein etwas vergrößertes Volumen zwar umgehen, jedoch kann es auch zu nicht sichtbaren Beeinträchtigungen der Immunreaktivität des Antikörpers kommen. Deshalb ist diese Abtrennungsmethode idealerweise dort anzuwenden, wo andere, nicht so empfindliche Moleküle wie z.B. Polymere markiert werden sollen.

#### **3.5.9.4 Markierung von SATA- und TCEP-modifiziertem Bevacizumab mit $^{75}\text{As}$**

Um zu testen, wie sich der Antikörper Bevacizumab unter Verwendung der beiden Modifizierungsmethoden (SATA und TCEP) verhält, wurde mit jeder Methode je ein Experiment durchgeführt. Besonders interessant ist hierbei das Verhalten des SATA-modifizierten Bevacizumab, da die Abtrennungsmethode MJ08 sehr stark an die in Kapitel 3.5.1 beschriebene Methode zur Abtrennung von  $^{75}\text{As}$  aus  $\text{GeO}_2$ -Targets mittels Festphasenextraktion (MJ01) angelehnt ist. Dort war mit SATA-modifizierten Antikörpern überhaupt keine Ausbeute erzielt worden.

Dies ist hier anders. Nach der Inkubation für 1 h liegt die Ausbeute immerhin bei ca. 35 %. Aus Abbildung 64 ist klar zu erkennen, dass die Kinetik gegenüber anderen erfolgreichen Markierungen mit SATA-modifiziertem Bevacizumab stark verlangsamt ist. Die mittels HPLC bestimmten Ausbeuten liegen nach 1 h mit 43 % etwas darüber Abbildung 65. Lässt man die radioaktive Antikörperlösung über Nacht stehen, so erhöht sich die Ausbeute auf 70 -

80 %. Eine quantitative Markierung lässt sich auf diese Art jedoch nicht erzielen. Ob dies nun an dem in der Lösung vorhandenen EtOH oder anderen Faktoren liegt, lässt sich nicht beantworten. Weitere Optimierungsversuche wurden bisher noch nicht unternommen, sind aber geplant. Hierzu kann man darüber nachdenken, die Zahl der SH-Gruppen zu erhöhen, oder aber die Temperatur während der Markierung auf 37 °C zu regulieren. Wie bereits im vorigen Abschnitt erwähnt führt eine Verdampfung des EtOH nicht zu einer Verbesserung, da dann in der Regel auch geringere Ausbeuten an \*As(III) erzielt wurden.

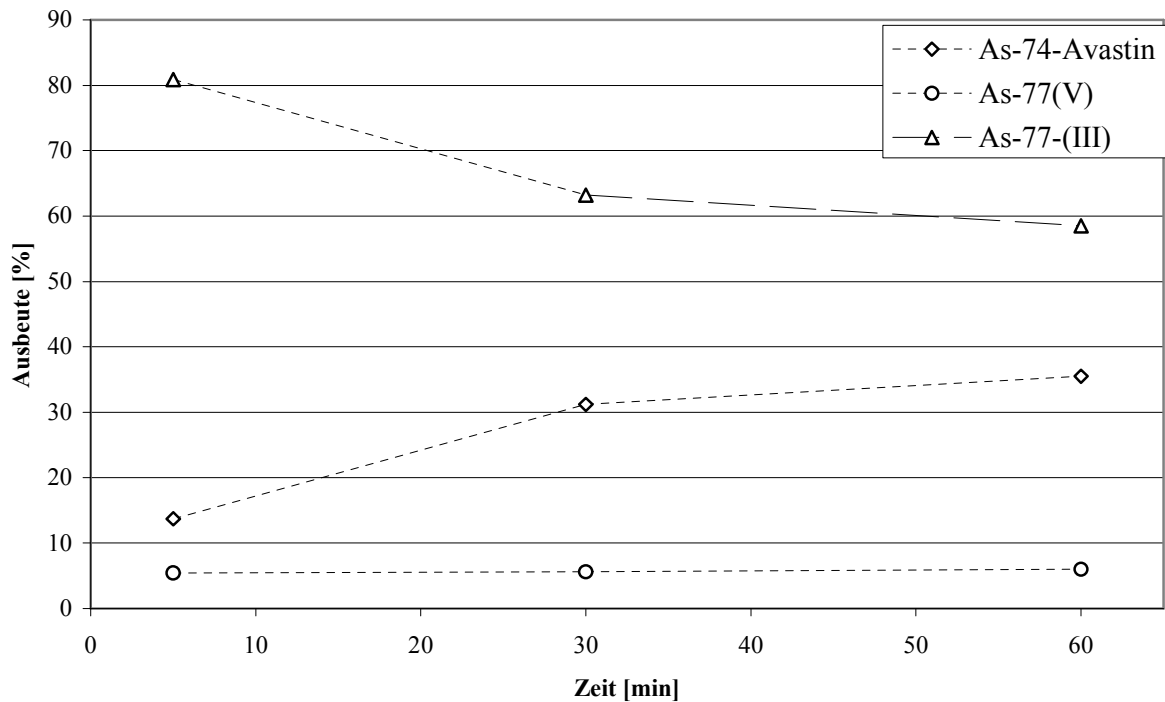


Abbildung 64: Reaktionskinetik <sup>74</sup>As-SATA-Bevacizumab bei Raumtemperatur mittels Radio-DC bestimmt

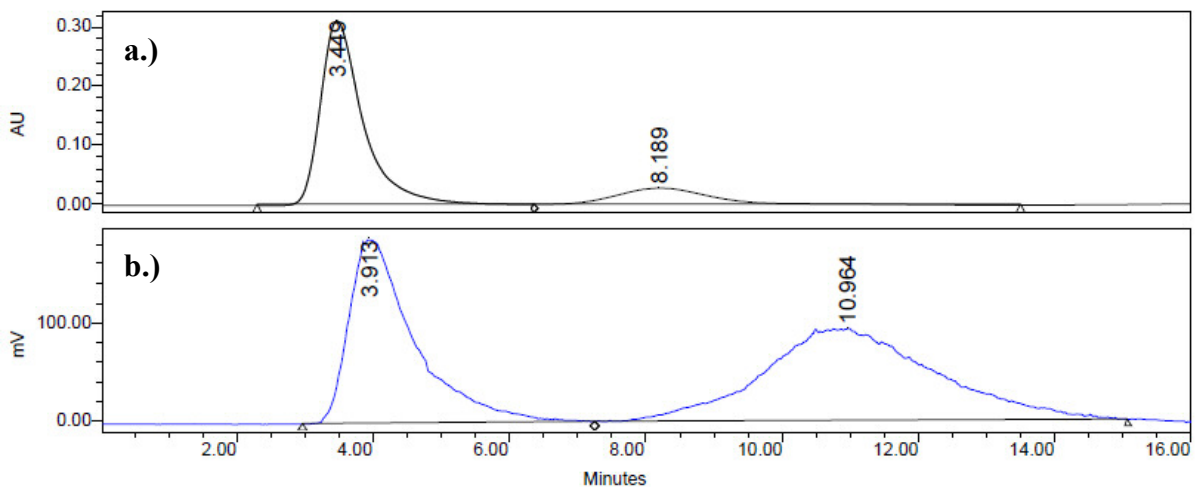


Abbildung 65: Markierungsausbeute <sup>74</sup>As-SATA-Bevacizumab nach 1 h mit Gelfiltrations-HPLC bestimmt a.) UV 280 nm b.) Radio-Detektor

Die Markierung mit TCEP funktioniert hingegen so, wie es von den anderen Methoden her gewohnt ist. Nach 1 h Reaktion bei Raumtemperatur können nahezu quantitative Ausbeuten erzielt werden (Abbildung 67). Die Kinetik wurde nur bis 30 min mittels Radio-DC bestimmt (Abbildung 66). Sie ist etwas langsamer, als bei MJ06, aber da sich die Daten hier nur auf ein Experiment beziehen, kann man keine endgültigen Aussagen treffen. Die Stabilität von SATA- und TCEP-modifiziertem Bevacizumab wurde noch nicht getestet.

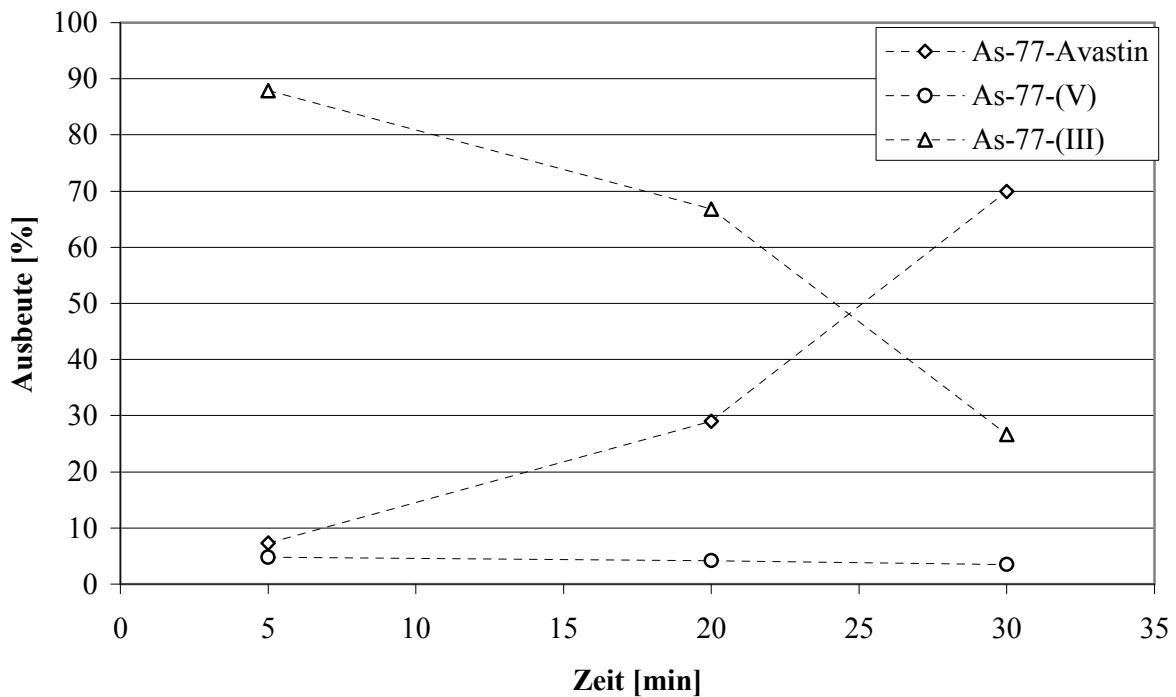


Abbildung 66: Reaktionskinetik <sup>77</sup>As-Bevacizumab bei Raumtemperatur mittels Radio-DC bestimmt

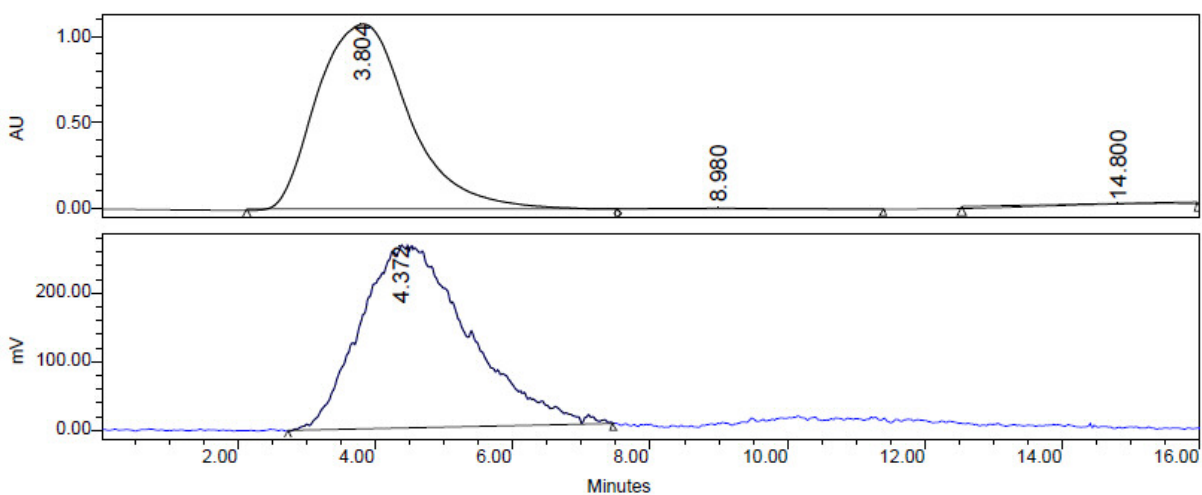


Abbildung 67: Markierungsausbeute <sup>77</sup>As-Bevacizumab nach 1 h mit Gelfiltrations-HPLC bestimmt  
a.) UV 208 nm b.) Radio-Detektor

### 3.5.10 Zusammenfassung Abtrennungsmethoden und Markierungen von Bevacizumab

Um die einzelnen Abtrennungsmethoden und Markierungsexperimente besser vergleichen zu können, werden sie im Folgenden nicht einmal tabellarisch mit ihren wichtigsten Merkmalen zusammengestellt.

#### 3.5.10.1 Zusammenfassung Abtrennungsmethoden für GeO<sub>2</sub>-Targets und anschließende Markierung von Bevacizumab mit \*As

In Tabelle 35 sind die einzelnen Abtrennungsmethoden für \*As aus GeO<sub>2</sub>-Targets gegenübergestellt. Diese beinhalten zunächst die Festphasenextraktion von \*As aus HF/NaI-Medium (MJ01, Kapitel 3.5.1). Diese Methode bildete den Startpunkt der Entwicklung auf dem Gebiet der As-Ge-Trennung, da sie als einzige schon aus einer Vorgängerarbeit bekannt war [155]. Daneben wurden drei Methoden entwickelt, um \*As von in HF<sub>konz</sub> gelösten GeO<sub>2</sub>-Targets mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion abzutrennen. Hierbei wird das \*As zunächst aus dem Medium in CCl<sub>4</sub> extrahiert und danach durch Ausschütteln in PBS-Puffer in eine zum Markieren von Antikörpern fähige Form überführt. Die drei Medien bestehen hierbei aus HF/NaI (MJ02, Kapitel 3.5.2), HF/HBr (MJ03, Kapitel 3.5.3) und HF/HCl (MJ04, Kapitel 3.5.4). Das erste wichtige Kriterium beim Vergleich dieser vier Methoden ist die Reinheit der finalen \*As-Fraktion. Hierbei fällt auf, dass alle vier Methoden das Germanium in derselben Größenordnung abtrennen. Von 100 mg eingesetztem GeO<sub>2</sub> sind nach der Abtrennung noch zwischen 10 µg und 60 µg Germanium in der gereinigten Lösung vorhanden. Dieses stört die spätere Verwendung des \*As zur Markierung von Antikörpern nicht. Insbesondere der Vergleich der LLE-Methoden untereinander ergibt lediglich einen Unterschied im Germaniumgehalt von ca. 2. Es sei hierbei noch erwähnt, dass der Aufwand, eine möglichst saubere \*As-Fraktion herzustellen, bei der Verwendung der Festphasenextraktion ungleich zeitaufwändiger und präparativ schwieriger ist.

**Tabelle 35: Vergleich der Abtrennungsmethoden für GeO<sub>2</sub>-Targets mittels Festphasenextraktion (MJ01) und Flüssig-Flüssig-Extraktion (MJ02-MJ04)**

	<i>MJ01</i>	<i>MJ02</i>	<i>MJ03</i>	<i>MJ04</i>
	<i>Ausbeute [%]</i>	<i>Ausbeute [%]</i>	<i>Ausbeute [%]</i>	<i>Ausbeute [%]</i>
Extraktion <sup>77</sup> As in CCl <sub>4</sub>	---	102,03 ± 9,31	88,3 ± 1,6	47,5 ± 0,6
Extraktion <sup>77</sup> As in PBS	---	51,86 ± 28,68	58,2 ± 11,8	66,3 ± 4,2
Gesamtausbeute	39,6 ± 14,4	53,55 ± 29,21	51,4 ± 10,3	31,4 ± 1,6
*As(III) in PBS	98,5 ± 0,7	49,38 ± 3,82	93,4 ± 2,7	97,8 ± 0,3
Markierungsausbeute *	> 90	56,6	90 ± 1,2	95,4 ± 0,3
Ge in PBS [µg]	60,1 ± 27	10,5 ± 6,9	16,9 ± 3,4	35,6 ± 0,3
Reinheit <sup>77</sup> As/ <sup>77</sup> Ge	99,93	99,99	99,98	99,95
Zeitlicher Aufwand [min]	90	15	15	15

\* 1,25 mg Bevacizumab mit \*As-Lösung und TCEP für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert

Der zweite wichtige Punkt ist die Gesamtausbeute. Hier liegt MJ02 leicht vor MJ03 (beide ca. 50 %), auch wenn beide eine größere Streuung aufweisen als die beiden anderen Abtrennungsmethoden. MJ01 und MJ04 liegen mit Durchschnittswerten um die 30 % deutlich darunter. Betrachtet man die Ausbeute jedoch unter dem Gesichtspunkt eines möglichst hohen Anteils an \*As(III) in der finalen PBS-Puffer-Lösung, so ist MJ03 die beste Wahl, da sie eine hohe Gesamtausbeute an \*As mit einer hohen Ausbeute an \*As(III) in PBS-Puffer kombiniert. MJ04 ist nur wegen der schlechteren Gesamtausbeute nicht zu bevorzugen. Ähnliches gilt für MJ01.

Am Ende zählt jedoch nur das Verhalten der abgetrennten Lösungen zur Markierung von Antikörpern. Hierbei wurde nur die wesentlich einfacher zu handhabende Methode der Modifizierung von Bevacizumab mit TCEP eingesetzt, da GeO<sub>2</sub> zu diesem Zeitpunkt schon als Targetmaterial am Zyklotron durch Germaniummetall ersetzt worden war. Hier liegt MJ04 etwas vor MJ03 und MJ01. Man kann aus den Daten von MJ02 auch klar herauslesen, dass es eine Korrelation zwischen der Menge an \*As(V) und der Markierungsausbeute gibt. MJ02 liefert immer ein 1 : 1-Gemisch aus \*As(V) und \*As(III). Hier liegt die maximale Ausbeute auch nur bei ca. 50 %. MJ02 ist also trotz der hervorragenden Gesamtausbeute nicht geeignet, um als Abtrennungsmethode zur Markierung von Antikörpern eingesetzt zu werden. Die Situation würde sich allerdings ändern, wenn man ein Reduktionsmittel für \*As(V) in neutralem wässrigen Medium finden würde. Bis dahin sind MJ03 und MJ04 die Methoden der Wahl, um \*As(III) aus GeO<sub>2</sub>-Targets zu extrahieren und mit der erhaltenen Lösung Antikörper wie Bevacizumab zu markieren. Die LLE-Methoden sind sehr schnell und erfordern außer ein paar Plastikgefäßen und einer Pipette keinerlei aufwändige Laborgeräte. Die Nachteile dieser neuentwickelten Abtrennungsmethoden liegen darin, dass die Abtrennungsfaktoren für Germanium bei dieser einstufigen Abtrennung nicht weiter gesteigert werden können. Daneben sind diese schnellen Trennungsverfahren leider nur für GeO<sub>2</sub>-Targets anwendbar. Da im Zuge der Ausbeutesteigerung von <sup>72/74</sup>As am Zyklotron auf Germaniummetall als Targetmaterial zurückgegriffen wurde, finden diese Methoden (MJ01 - MJ04) bei der Verwendung von Positronen emittierenden Arsenisotopen leider keine Anwendung. Die Methoden könnten erst wieder gefragt sein, wenn auch <sup>77</sup>As als Therapienuklid an Hochfluss-Kernreaktoren produziert und für Markierungen eingesetzt werden soll.

### **3.5.10.2 Zusammenfassung Abtrennungsmethoden für Germaniummetalltargets und anschließende Markierung von Bevacizumab mit \*As**

Interessanter für die Anwendung der Positronenemitter des Arsens zur molekularen Bildgebung sind aufgrund der gewählten Produktionsroute über (p,n)-Reaktion mit Germaniummetalltargets die Abtrennungsmethoden für Germaniummetall. Nur mit

Germaniummetall kann genug  $^{72/74}\text{As}$ -Aktivität für ein *in vivo*-Experiment erzeugt werden. Hierbei finden sich die für die vorhergehenden Methoden (MJ01 - MJ04) entwickelten Techniken der Festphasenextraktion und Flüssig-Flüssig-Extraktion wieder in den einzelnen Abtrennungsmethoden wieder. Allerdings dienen sie hier nicht zu einer Erhöhung der Abtrennungsfaktoren Ge/As, sondern lediglich dazu, das \*As in eine Form zu überführen, in der es für Markierungsexperimente von Antikörpern geeignet ist. Die wichtigsten Eigenschaften der Abtrennungsmethoden für Germaniummetall sind in Tabelle 36 dargestellt.

**Tabelle 36: Vergleich der Abtrennungsmethoden für Germaniummetalltargets (MJ05-MJ08)**

	<i>MJ05</i> <i>Ausbeute [%]</i>	<i>MJ06</i> <i>Ausbeute [%]</i>	<i>MJ07</i> <i>Ausbeute [%]</i>	<i>MJ08</i> <i>Ausbeute [%]</i>
Gesamtausbeute	44,2 ± 7,5	40,4 ± 1,7	45,3 ± 3,6	56,7 ± 14
*As(III) in PBS	48	96,7 ± 1,1	95,6 ± 2,6	95,6 ± 2,2
Markierungsausbeute TCEP [1 h]	18	Quantitativ (HPLC)	Quantitativ (HPLC)	Quantitativ (HPLC)
Stabilität	nicht bestimmt	> 8 Tage stabil	Nicht bestimmt	nicht bestimmt
Markierungsausbeute SATA [1 h]	---	Quantitativ (HPLC)	84,7 ± 0,77	44 % (HPLC)
Stabilität	---	> 1 Tag*	Nicht bestimmt	nicht bestimmt
Ge in PBS [µg]	2,2 ± 2,8	< Nachweisgrenze	7 ± 8,5	nicht bestimmt
Reinheit $^{77}\text{As}/^{77}\text{Ge}$	99,997	---	99,991	besser MJ07
Zeitlicher Aufwand [h]	1,5	5	5	5

**\* Wegen der zu geringen Aktivität konnte die Stabilität nicht über einen längeren Zeitraum bestimmt werden**

Hierbei bietet die rein auf Flüssig-Flüssig-Extraktion von \*As aus HF/HI-Medium basierende Methode MJ05 (Kapitel 3.5.5) zwar eine im Vergleich zu ihrem  $\text{GeO}_2$  Analogon MJ02 deutlich verbesserte Abtrennung von Germanium, jedoch ist der große Nachteil des hohen Anteils (ca. 50 %) von \*As(V) in der finalen PBS-Fraktion sehr von Nachteil, der noch zusätzlich durch den hohen Trägerzusatz von inaktivem Arsen aus der verwendeten HI dazu führt, dass nur sehr schlechte Markierungsausbeuten des Antikörpers Bevacizumab erzielt werden können. Dies lässt trotz der im Vergleich zu den anderen Abtrennungsmethoden für Germaniummetall relativ kurzen Dauer der Methode diese als ungeeignet erscheinen.

MJ06 ist die apparativ aufwändigste Abtrennungsmethode, die in einem ersten Schritt eine grobe Abtrennung des Germaniums durch Destillation vorsieht. Danach wird mittels Anionenaustauschchromatographie das \*As(V) von den letzten Resten des Germaniums und zusätzlich noch von bei der Bestrahlung des Targets entstehenden radioaktiven Verunreinigungen wie Isotope des Galliums und Zinks gereinigt. Die Abtrennung des Germaniums gelingt hierbei so gut, dass es in der gereinigten \*As-Fraktion auch nach 12 h Messdauer nicht mehr nachzuweisen ist. Die Gesamtausbeute ist mit ca. 40 % \*As vom Target zur Markierungs-Lösung für eine mehrstufige Aufreinigung nicht schlecht. Hohe Ausbeuten an \*As(III) in der finalen \*As-Fraktion bieten beste Voraussetzungen für erfolgreiche Markierungsexperimente. Diese sind sowohl mit SATA als auch mit TCEP nach

1 h in quantitativen Ausbeuten möglich. Die Markierungsprodukte sind jeweils auch über mehrere Tage stabil. Dazu kommt noch, dass diese Methode keinerlei  $\text{HF}_{\text{konz}}$  benötigt, was die Handhabung stark vereinfacht. Wenn man es schafft, in Zukunft die immer wieder aufgetretenen Probleme der teilweise hohen Absorption des  $^*\text{As}$  auf der Glasoberfläche der Destillationsapparatur und der teilweisen „Verschleppung“ von  $\text{HNO}_3$ -Spuren auf die Anionenaustauschersäule zu lösen, ist dies die Methode der Wahl für jedwede Markierungsexperimente, bei denen  $^*\text{As(III)}$  in wässrigem, oder organischen Medium benötigt wird. Die Ausbeute könnte durch eine optionale Kombination der Abtrennung nach der Anionenaustauschersäule (dort erhält man  $^*\text{As(V)}$  in 1 ml 10 M HCl) mit der Methode MJ08 (Festphasenextraktion aus HCl/NaI-Medium) noch um einige Prozentpunkte erhöhen. Zwar ist dies aufgrund der Verwendung von EtOH keine optimale Lösung zur Markierung von Antikörpern, jedoch kann man sich durchaus auch andere Makromoleküle markieren, die nicht so empfindlich auf eine Mischung aus organischem und wässrigem Medium reagieren.

MJ07 ist als Alternative zu MJ06 gedacht und basiert auf einer direkten Abtrennung von  $^*\text{As}$  auf einer Anionenaustauschersäule im HF/HCl-Medium. Im direkten Vergleich sticht MJ07 durch eine etwas höhere Ausbeute hervor, während die Abtrennung von Germanium nicht vergleichbar hoch ist. Der relativ hohe Wert von ca. 7  $\mu\text{g}$  in der gereinigten Fraktion täuscht etwas darüber hinweg, dass bereits mit kleinen Änderungen an der Säule (z.B. etwas kleinerer Querschnitt bei etwas vergrößerter Länge) das Germanium noch besser abgetrennt werden kann. Die etwas geringere Markierungsausbeute mit SATA-modifizierten Antikörpern gegenüber MJ06 ist offensichtlich. Sollte also in ersten *in vivo*-Experimenten herauskommen, dass SATA-modifizierte Antikörper deutlich bessere Ergebnisse liefern als TCEP-modifizierte Antikörper, dann ist MJ06 vorzuziehen. Bei der Verwendung von TCEP ist der Unterschied marginal.

MJ08 ist eine Kombination der guten Abtrennungseigenschaften von MJ07 mit der Ausbeutesteigernden Festphasenextraktion aus HCl/NaI-Medium. Diese Methode führt zu einer signifikanten Erhöhung der Gesamtausbeute bei gleich bleibend hohem  $^*\text{As(III)}$ -Anteil. Da bei dieser Methode jedoch ca. 300  $\mu\text{l}$  EtOH in der finalen PBS-Fraktion vorhanden sind, ist sie zwar radiochemisch für zukünftige Projekte sehr interessant, jedoch gibt es hier die Möglichkeit, dass bei der Markierung von Antikörpern zusätzliche Probleme auftreten können. So könnte der Antikörper entweder direkt ausfallen, oder seine Immunreaktivität einbüßen. Will man jedoch andere, nicht so empfindliche Moleküle wie z.B. Polymere markieren, oder einfach nur  $^*\text{As(III)}$  als Tracer für ATO herstellen, dann könnte diese Methode sich in Zukunft noch als sehr wichtig erweisen.

### 3.5.11 Phantommessungen mit $^{18}\text{F}$ und $^{72/74}\text{As}$ am Kleintier-PET-Scanner Focus 120

Die mit  $^*\text{As}$  markierten Verbindungen sollen in Zukunft an dem Focus 120 Kleintier-PET-Scanner der Universität Mainz auch *in vivo* evaluiert werden. Wie auf vielen anderen Gebieten liegen auch hier aus der Literatur für Radioarsenisotope nur sehr wenige Vergleichsdaten vor. Pagani et al. [156] erwähnen  $^{72}\text{As}$  in einem Review Artikel über nicht konventionelle Positronenemitter, aber es werden keine Daten über die mögliche Auflösung angegeben. Die einzige bekannte  $^{72}\text{As}$  Phantommessung wurde von Phillips et al. [157] durchgeführt. Hier wurden  $^{72}\text{As}$  und  $^{18}\text{F}$  in einen 20 x 17 cm großen Zylinder gefüllt, PET-Messungen durchgeführt und die erhaltenen Daten beider Isotope miteinander verglichen. Hierbei ergab sich eine gute Übereinstimmung der PET-Daten von  $^{72}\text{As}$  und  $^{18}\text{F}$ , was die Autoren ein großes Potential von  $^{72}\text{As}$  als PET-Isotop für die molekulare Bildgebung sehen lässt. Da die Daten jedoch mit einem Human-PET-Scanner erhalten wurden, kann man die Ergebnisse nicht auf einen Kleintier-PET-Scanner übertragen. Im Prinzip muss die Auflösung an jeder PET Kamera neu bestimmt werden.

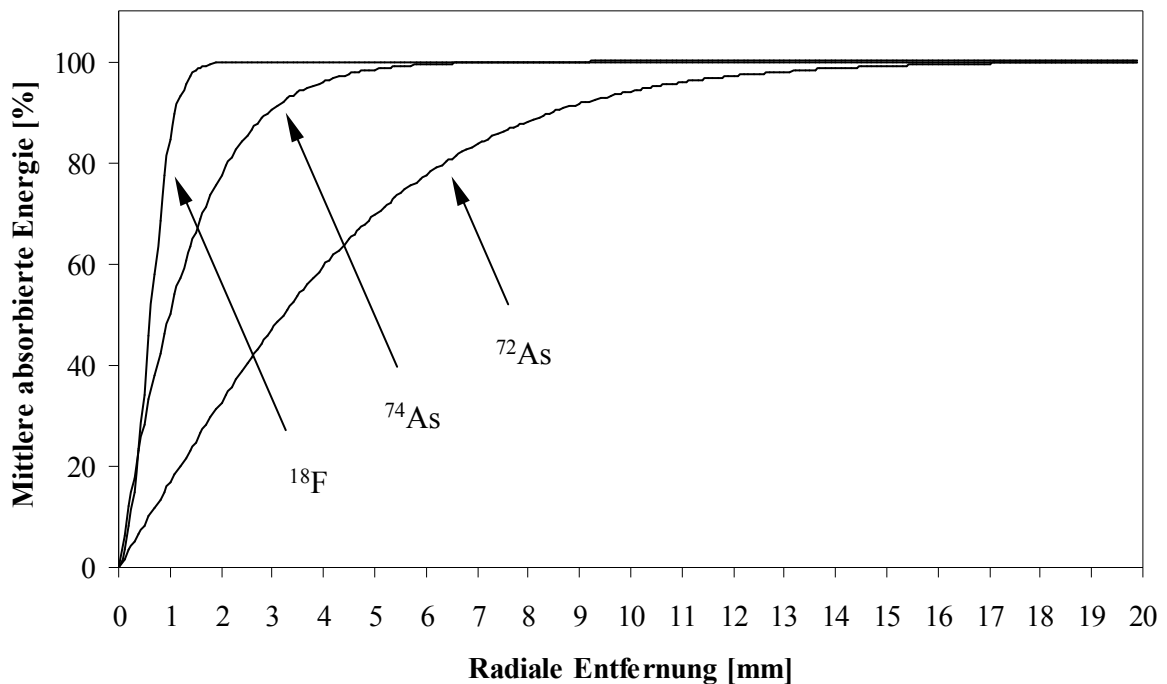


Abbildung 68: Berechnete mittlere absorbierte Positronenenergie von  $^{18}\text{F}$ ,  $^{72}\text{As}$  und  $^{74}\text{As}$  in Wasser [158, 159]

Erste Anhaltspunkte für das Verhalten von  $^{72/74}\text{As}$  können aus theoretischen Berechnungen des Positronenzerfalls im wässrigen Medium aus Monte Carlo-Simulationen erhalten werden. Hierzu wurde von Champion et al. [160] das Verhalten von Positronen in wässrigem Medium, welches ein Modellsystem für biologisches Medium darstellt, berechnet. Die Monte Carlo-Simulation wurde so z.B. auf  $^{18}\text{F}$  [159] und  $^{72/74}\text{As}$  [158] angewendet. Interessant ist in diesem

Zusammenhang z.B. die Berechnung des Energieverlusts der emittierten Positronen mit der zurückgelegten Wegstrecke (Abbildung 68), da sich dadurch bereits Rückschlüsse auf die mit den genannten Positronenemittern zu erzielende maximale Auflösung ergeben können. Die Auflösung hängt nicht nur von der Güte des Detektors ab, sondern auch von der freien Weglänge, die die Positronen zurücklegen, bevor sie ihre kinetische Energie aufgebraucht haben und zu 2·511 keV Gammaquanten annihilieren. Insbesondere bei Nukliden mit hohen Positronenenergien wie z.B.  $^{72}\text{As}$  kann sich dieser Effekt bereits negativ auf die zu erzielende Auflösung auswirken. In Tabelle 37 sind die theoretischen Werte für einige Isotope zusammengetragen.

**Tabelle 37: Positronenenergien und theoretische Reichweiten einiger Positronenemitter in Wasser [158, 159]**

<i>Isotop</i>	$E_{\beta^+ \text{ mittel}} [\text{keV}]$	$E_{\beta^+ \text{ max}} [\text{keV}]$	$R_{\text{mittel}} [\text{mm}]$	$R_{\text{max}} [\text{mm}]$
$^{18}\text{F}$	252	635	0,661	2,633
$^{74}\text{As}$	417	1540	1,438	8,520
$^{72}\text{As}$	1150	3334	5,189	18,154
$^{44}\text{Sc}$	636	1474	3,559	10,273
$^{68}\text{Ga}$	844	1899	2,458	7,355

Aus den abgebildeten theoretischen Werten in Tabelle 37 und Abbildung 68 kann man ersehen, dass  $^{18}\text{F}$  und  $^{74}\text{As}$  aufgrund ihrer relativ geringen Positronenenergien bessere Auflösungen liefern sollten, als das höherenergetische  $^{72}\text{As}$ . In wieweit sich diese theoretischen Werte in der Praxis bestätigen, soll durch Messungen von  $^{72}\text{As}$  und  $^{74}\text{As}$  in Plexiglas-Phantomen evaluiert werden.

Hierzu werden zwei Arten von Phantomen verwendet. Das Bohrlochphantom besteht aus einem Plexiglaszylinder, in den Löcher mit unterschiedlichem Durchmesser (2, 3, und 4 mm) gebohrt werden, in die dann die radioaktiven Lösungen der einzelnen Isotope eingefüllt werden. Das zweite Phantom ist das so genannte 3-Stab-Phantom. Es besteht aus einem hohlen Plexiglaszylinder, in den die radioaktive Lösung eingefüllt wird (Volumen = 100 ml). In das Phantom sind drei Stäbe (gefüllt mit Luft, Wasser und Teflon) eingelassen, in denen sich keine Radioaktivität befindet. Es ist besonders geeignet, um mögliche Artefakte, die z.B. durch einen hohen Anteil an zufälligen Koinzidenzen entstehen können, zu visualisieren. Somit kann man ebenfalls Aussagen über die Eignung der eingesetzten Positronenemitter für die PET erhalten.

Das Bohrlochphantom wurde jeweils mit den Isotopen  $^{74}\text{As}$ ,  $^{72}\text{As}$  und zum Vergleich mit  $^{18}\text{F}$  befüllt und am Fokus 120 Scanner gemessen. Das radioaktive Abbild des Phantoms findet sich in Abbildung 69. Die real gemessenen Halbwertsbreiten (FWHM) und die Signalbreite bei einem zehntel des Maximums (FWTM) der Signale in den einzelnen Bohrungen wurden für jedes Isotop bestimmt und miteinander verglichen (Tabelle 38).

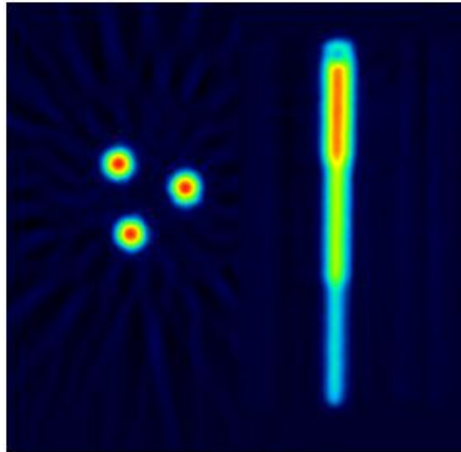


Abbildung 69: PET-Bild der coronalen und sagittalen Ansicht des mit  $^{74}\text{As}$  befüllten Bohrlochphantoms

Man kann einen Zusammenhang zwischen der Positronenenergie und der Auflösung erkennen. So liegen sowohl die FWHM- als auch die FWTM-Werte von  $^{18}\text{F}$  und  $^{74}\text{As}$  für die einzelnen Bohrungen relativ nahe beieinander. Dies ist auf ihre vergleichbare mittlere Positronenenergie zurückzuführen. Sowohl bei  $^{74}\text{As}$  als auch bei  $^{18}\text{F}$  liegen die Werte der Halbwertsbreiten nahe am realen Durchmesser der Bohrungen.  $^{72}\text{As}$  hingegen besitzt wegen seiner deutlich höheren mittleren Positronenenergie eine etwas schlechtere Auflösung. Die Halbwertsbreite liegt hier für alle Bohrungen ca. 1 mm über dem realen Durchmesser der Bohrungen (Tabelle 38). Man muss jedoch bei den Werten für  $^{72}\text{As}$  beachten, dass es sich hierbei um ein Isotopengemisch aus  $^{72/74/76}\text{As}$  handelt, da alle Isotope parallel am Zyklotron produziert werden (Kapitel 3.1.3). Unter den gegebenen Bedingungen ist jedoch  $^{72}\text{As}$  das dominante Isotop.  $^{74/76}\text{As}$  erhöhen jedoch die Streueffekte und verursachen zusätzliche falsche  $\gamma$ -Koinzidenzen, da ihre Linien bei 595 keV ( $^{74}\text{As}$ ) und 559 keV ( $^{76}\text{As}$ ) voll im Energiefenster der PET-Kamera (350 - 750 keV) liegen. Aus den Werten kann man die untere Auflösungsgrenze nicht bestimmen, dazu wären Bohrungen mit noch geringerem Durchmesser nötig. Man kann jedoch sagen, dass mit  $^{18}\text{F}$  und  $^{74}\text{As}$  die minimale Auflösung in der Größenordnung von 2 mm liegt, während mit  $^{72}\text{As}$  die minimale Auflösung fast 4 mm beträgt.

Tabelle 38: Vergleich der Auflösung von  $^{18}\text{F}$ ,  $^{74}\text{As}$  und  $^{72}\text{As}$  am Focus 120 PET Scanner

Bohrungsdurchmesser [mm]	$^{18}\text{F}$	$^{18}\text{F}$	$^{74}\text{As}$	$^{74}\text{As}$	$^{72}\text{As}$	$^{72}\text{As}$
	FWHM [mm]	FWTM [mm]	FWHM [mm]	FWTM [mm]	FWHM [mm]	FWTM [mm]
4	3,71	6,82	3,80	6,91	4,91	9,06
3	3,02	5,61	3,11	5,70	4,40	7,96
2	2,61	4,81	2,76	5,01	3,98	7,28
$E_{\beta^+}$ (mittlere) [keV] [135]	249		440		1170	

Dies stellt jedoch nur dann ein Problem dar, wenn sehr kleine Strukturen in kleinen Tieren abgebildet werden sollen. So könnte sich  $^{72}\text{As}$  besser für die Evaluierung  $^{72}\text{As}$ -markierter

Substanzen in Ratten eignen, weil die biologischen Strukturen hier bedeutend größer als in Mäusen sind. Für die angedachte Verwendung  $^{74}\text{As}$ -markierter Antikörper zur Visualisierung von Tumoren *in vivo* stellt dies aller Voraussicht nach kein Hindernis dar, da die Tumore größer als einige Millimeter sind. Ebenso existiert die Möglichkeit, durch eine längere Abklingzeit auf das reine Isotop  $^{74}\text{As}$  auszuweichen, welches eine vergleichbare Auflösung wie das  $^{18}\text{F}$  bietet.

Die Isotope wurden ebenfalls in einem 3-Stab-Phantom vermessen. Es soll unterschiedlich dichte Materie im Körper simulieren (z.B. Knochen). Hierbei kommt es nicht so sehr auf die Auflösung an, sondern man kann z.B. herausfinden, ob und wie stark z.B. zufällige  $\gamma$ -Koinzidenzen aus den höherenergetischen  $\gamma$ -Linien der verwendeten Isotope Bildartefakte verursachen können. Um bei der Bildrekonstruktion eine Schwächungskorrektur durchführen zu können, wird in Anschluss an die PET-Messung noch eine heiße Transmission mit  $^{57}\text{Co}$  gemessen (Abbildung 70).  $^{57}\text{Co}$  emittiert  $\gamma$ -Quanten bei 122 keV, was eine Messung mit einem befüllten radioaktiven Phantom ermöglicht. Dazu muss nur das Energiefenster von 120 - 125 keV gewählt werden, was die Strahlung des Phantoms ausblendet. Dies ermöglicht eine Transmissionsmessung, ohne die Lage des Phantoms zu verändern.

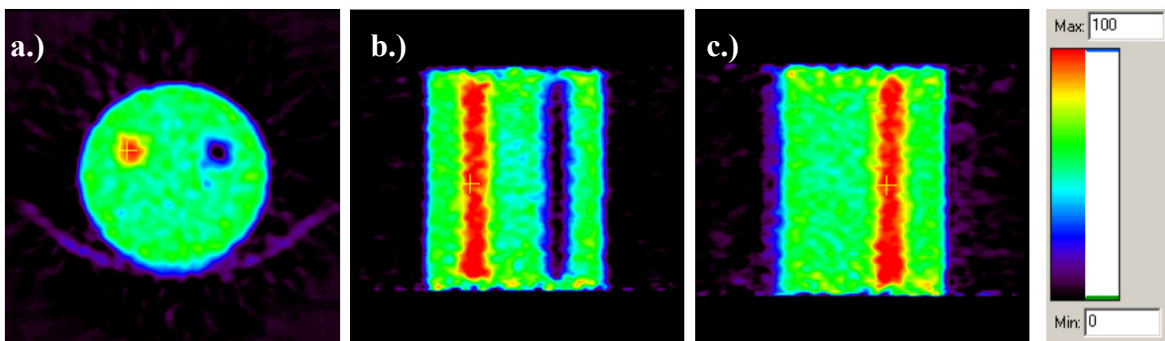


Abbildung 70: Transmissionsmessung 3-Stab-Phantom mit  $^{57}\text{Co}$  a.) transversal b.) coronal c.) sagittal

Hierbei sind die Areale mit der größten Schwächung (Teflon) rot dargestellt. Der mit Luft gefüllte Stab ist schwarz, weil er eine geringere Dichte als das grüne Wasser besitzt. Der mit Wasser gefüllte Stab lässt sich aufgrund derselben Dichte nicht von seiner Umgebung unterscheiden und ist ebenfalls grün. Die in Abbildung 70 a.) dargestellte heiße Transmission des 3-Stab-Phantoms zeigt also im Uhrzeigersinn Teflon (rot) Luft (schwarz) und Wasser (grün). Die PET-Messungen des mit den drei Isotopen ( $^{18}\text{F}$ ,  $^{74}\text{As}$ ,  $^{72}\text{As}$ ) befüllten 3-Stab-Phantoms werden in derselben Orientierung durchgeführt.

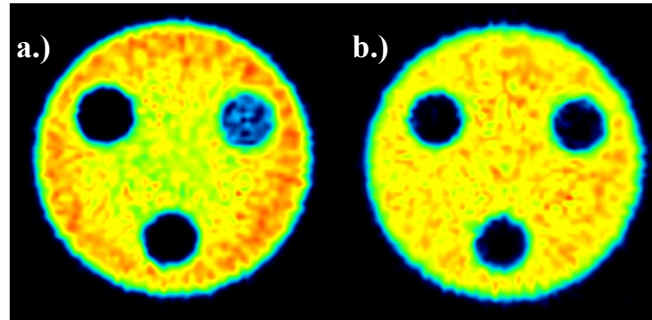


Abbildung 71: Mit  $^{18}\text{F}$  gefülltes 3-Stab-Phantom a.) ohne b.) mit Streu- und Schwächungskorrektur

Die in Abbildung 71 dargestellte Messung des mit  $^{18}\text{F}$  gefüllten Phantoms ohne Korrektur zeigt in dem mit Luft gefüllten Stab eine geringe Aktivität, die nach der Streu- und Schwächungskorrektur nicht mehr zu sehen ist. Auch die Ränder des Phantoms sind deutlich zu erkennen.

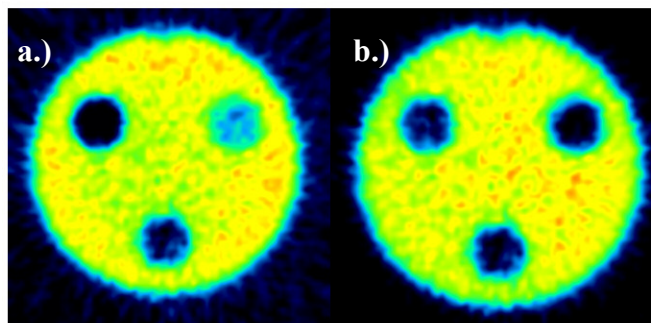


Abbildung 72: Mit  $^{74}\text{As}$  gefülltes 3-Stab-Phantom a.) ohne b.) mit Streu- und Schwächungskorrektur

Für das mit  $^{74}\text{As}$  gefüllte Phantom sind die Streueffekte noch deutlicher zu sehen (Abbildung 72). Sie können aber noch relativ gut korrigiert werden. Man sieht auch, dass um das Phantom herum deutlich mehr Artefakte als beim  $^{18}\text{F}$  auftreten. Nach der Korrektur befindet sich im Areal des Teflonstabs mehr Aktivität als davor. Dies deutet darauf hin, dass durch höherenergetische  $\gamma$ -Linien des  $^{74}\text{As}$  (595 keV, 634 keV) vermehrt zufällige  $\gamma$ -Koinzidenzen hervorgerufen werden, die die Messwerte verfälschen. Dies ist auch von anderen PET-Isotopen bereits bekannt (z.B.  $^{86}\text{Y}$  [161] oder  $^{120}\text{I}$  [162]).

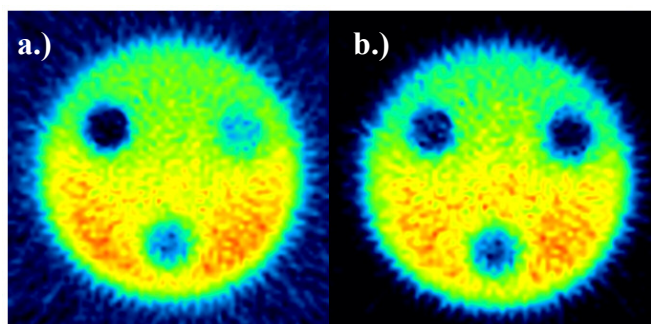


Abbildung 73: Mit  $^{72}\text{As}$  gefülltes 3-Stab-Phantom a.) ohne b.) mit Streu- und Schwächungskorrektur

Schon rein optisch sind die PET-Bilder des mit  $^{72}\text{As}$  befüllten Phantoms (Abbildung 73) deutlich unschärfer, zeigen deutlich mehr Artefakte außerhalb des Phantoms und wirken über die mit Aktivität gefüllten Areale hinaus wie ausgefranst. Dies ist zum Einen auf die höhere Energie der Positronen des  $^{72}\text{As}$ , zum Anderen aber auch auf einen viel höheren  $\gamma$ -Untergrund (834 keV, 79,5 %) als beim  $^{74}\text{As}$  zurückzuführen. Während bei der Messung des  $^{74}\text{As}$  die Begleitaktivität an  $^{72}\text{As}$  und  $^{76}\text{As}$  bereits deutlich abgeklungen ist, befinden sich in dem gemessenen  $^{72}\text{As}$ -Phantom noch signifikante Anteile an  $^{74}\text{As}$  und  $^{76}\text{As}$ . Die  $\gamma$ -Linien von  $^{76}\text{As}$  (559 keV, 45 %) und  $^{74}\text{As}$  (595 keV, 59 %) liegen voll im Energiefenster der PET-Kamera (350 - 750 keV) und tragen somit zur Erhöhung zufälliger  $\gamma$ -Koinzidenzen bei. Diese Effekte können dann auch durch eine mathematische Korrektur der Messwerte nicht mehr vollständig ausgeglichen werden.

### **Zusammenfassung Phantommessungen mit $^{18}\text{F}$ , $^{74}\text{As}$ und $^{72}\text{As}$**

Die Phantommessungen sind die ersten, die mit  $^{74/72}\text{As}$  am Kleintier-PET-Scanner in Mainz durchgeführt wurden. Sinn dieser ersten Experimente war es zunächst, wichtige fundamentale Daten über das Verhalten der einzelnen Isotope bei PET-Messungen zu erhalten. Aus den Daten des Bohrlochphantoms kann man sehen, dass  $^{74}\text{As}$  eine ähnliche Ortsauflösung wie  $^{18}\text{F}$  ermöglicht, die deutlich besser als die des  $^{72}\text{As}$  ist. Bei der Messung der 3-Stub-Phantome treten die Unterschiede der einzelnen Isotope noch deutlicher zutage. Hier zeigt  $^{18}\text{F}$  eindeutig die besseren Zerfalleigenschaften. Auch ist  $^{74}\text{As}$  schon rein optisch deutlich besser als  $^{72}\text{As}$ . Da  $^{72}\text{As}$  jedoch am Zyklotron durch (p,n)-Reaktion an natürlichem Germanium produziert wird, liegt es zu keinem Zeitpunkt in Reinform vor. Es befinden sich immer „Verunreinigungen“ von  $^{74/76}\text{As}$  in der Lösung, die aufgrund ihrer  $\gamma$ -Linien die Performance des mit höherer Positronenenergie ausgestatteten  $^{72}\text{As}$  gegenüber dem  $^{74}\text{As}$  weiter verschlechtern. Man kann aus dem Versuchsaufbau nicht abschätzen, in wieweit die höhere Positronenenergie des  $^{72}\text{As}$ , oder der höhere  $\gamma$ -Untergrund für schlechtere Auflösung verantwortlich sind. Dies könnte nur eine Phantommessung mit Isotopenreinem  $^{72}\text{As}$  aus dem Generatorsystem  $^{72}\text{Se}/^{72}\text{As}$  klären [76, 163, 164], welches jedoch nicht zur Verfügung stand. Auf der anderen Seite sollte man bei der Verwendung von  $^{74}\text{As}$  darauf achten, dass die kurzlebigeren Isotope ( $^{72}\text{As}$  und  $^{76}\text{As}$ ) vor Beginn einer PET-Messung deutlich abgeklungen sind, um Probleme mit hochenergetischen  $\gamma$ -Linien zu minimieren.

## **4 Experimenteller Teil**

### **4.1 Bestrahlungen**

#### **4.1.1 Bestrahlungen mit Neutronen am Kernreaktor TRIGA Mark II des Instituts für Kernchemie in Mainz**

##### **4.1.1.1 Bestrahlungen von GeO<sub>2</sub>**

100 mg GeO<sub>2</sub> (99,999 %, Strem) werden in eine Bestrahlungskapsel eingewogen und doppelt in Plastikfolie eingeschweißt. Das Target wird im zentralen Bestrahlungsrohr des TRIGA Mark II bei einem Neutronenfluss von  $4 \cdot 10^{12} \text{ n} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  oder im Karussell bei einem Neutronenfluss von  $7 \cdot 10^{11} \text{ n} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  für 6 h bestrahlt, um sowohl <sup>77</sup>Ge, als auch <sup>77</sup>As zu produzieren. Das Target klingt über Nacht (je 15 h) im Reaktor ab, damit sich das <sup>77</sup>As aus dem <sup>77</sup>Ge bilden kann. Die Probe wird am nächsten Morgen entnommen und steht direkt zur Aufarbeitung zur Verfügung.

##### **4.1.1.2 Bestrahlungen von Germaniummetall**

100 - 200 mg Germaniumstücke (99,9999+ %, Chempur) werden in eine Bestrahlungskapsel eingewogen und doppelt in Plastikfolie eingeschweißt. Das Target wird im zentralen Bestrahlungsrohr bei einem Neutronenfluss von  $4 \cdot 10^{12} \text{ n} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  oder im Karussell des TRIGA Mark II bei einem Neutronenfluss von  $7 \cdot 10^{11} \text{ n} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  für 6 h bestrahlt, um sowohl <sup>77</sup>Ge, als auch <sup>77</sup>As zu produzieren. Das Target klingt über Nacht (je 15 h) im Reaktor ab, damit sich das <sup>77</sup>As aus dem <sup>77</sup>Ge bilden kann. Die Probe wird am nächsten Morgen entnommen und steht direkt zur Aufarbeitung zur Verfügung.

##### **4.1.1.3 Bestrahlungen von As<sub>2</sub>O<sub>5</sub> in wässriger Lösung**

30 mg As<sub>2</sub>O<sub>5</sub> werden in 10 ml Wasser gelöst (3 mg/ml). Je 1 ml dieser Lösung wird in eine Bestrahlungskapsel gefüllt, doppelt in Plastikfolie eingeschweißt und für 30 min im Karussell des TRIGA Mark II bei  $7 \cdot 10^{11} \text{ n} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  bestrahlt, um <sup>76</sup>As(V) als radioaktiven Tracer für As(V) zu produzieren. Die Probe wird direkt ohne Abklingzeit weiterverarbeitet.

#### **4.1.1.4 Bestrahlung von NaI**

50 mg NaI werden in eine Bestrahlungskapsel gefüllt, doppelt in Plastikfolie eingeschweißt und für 2 min im Karussell des TRIGA Mark II bei  $7 \cdot 10^{11} \text{ n} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  bestrahlt, um  $^{128}\text{I}$  als radioaktiven Tracer für  $\text{I}^-$  und  $\text{I}_2$  zu produzieren. Die Probe wird direkt ohne Abklingzeit weiterverarbeitet.

#### **4.1.1.5 Bestrahlung von CuCl**

50 mg CuCl werden in eine Bestrahlungskapsel gefüllt, doppelt in Plastikfolie eingeschweißt und für 3 h im Karussell des TRIGA Mark II bei  $7 \cdot 10^{11} \text{ n} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  bestrahlt, um  $^{64}\text{Cu}$  als radioaktiven Tracer für  $\text{Cu}^+$  zu produzieren. Nach einer Abklingzeit von 18 h wird die Probe aus dem Reaktor geholt und steht für Tracerexperimente zur Verfügung.

### **4.1.2 Bestrahlungen mit Protonen am MC32NI Zyklotron des DKFZ in Heidelberg**

#### **4.1.2.1 Bestrahlungen von GeO<sub>2</sub>**

300 mg GeO<sub>2</sub> (99,999 %, Strem) werden bei 10 t zu einer Tablette in den Dimensionen 13 x 0,8 mm gepresst. Diese Tablette wird in eine Vertiefung eines runden Aluminiumhalters (20 mm x 3 mm) eingebaut. Der Deckel, durch den der Protonenstrahl auf das Target trifft, hat eine Dicke von 0,5 mm. Die Bestrahlungsdauer wird von 30 min - 5 h variiert. Der Strahlstrom wird auf  $< 5 \mu\text{A}$  begrenzt und hat eine Energie von ca. 12 MeV auf dem Target.

#### **4.1.2.2 Bestrahlungen von Germaniummetall**

Eine Germaniumscheibe (9,9 x 0,5 mm, 204 mg, 99,999 %, Goodfellow) wird im Targethalter des MC32NI Zyklotrons direkt eingebaut und mit einer 50  $\mu\text{m}$  dicken Havar-Folie zum Strahl hin abgedeckt. Die Bestrahlungsdauer wird von 1 - 7 h variiert. Der Strahlstrom beträgt bis zu 30  $\mu\text{A}$  bei einer Energie von 15 MeV auf dem Target. Die maximale Ladung liegt bei 200  $\mu\text{Ah}$ .

## 4.2 Analytische Methoden

### 4.2.1 Radio-DC-Analytik zur Bestimmung des Oxidationszustandes von \*As und der Markierungsausbeute von \*As-markierten Antikörpern

Zur Analyse des Oxidationszustandes von \*As-Isotopen in organischen oder neutralen wässrigen Lösungen werden 0,5 - 1 µl der entsprechenden Lösung auf eine 5 \* 7,5 cm große Si-60 Silikagel DC-Platte (Merck) gespottet. Das Laufmittel (0,01 M Natriumtartrat / Methanol (3 : 1)) wird ca. 0,5 cm hoch in eine DC-Kammer gefüllt und das Radio-DC darin entwickelt. Wegen dem hohen Anteil an wässriger Lösung benötigt die Entwicklung des Radio-DC ca. 30 Minuten. Das Radio-DC wird aus der DC-Kammer entnommen und am rechten Rand werden mit 0,5 - 1 µl radioaktiver Lösung sowohl der Startpunkt, als auch die Lösungsmittelfront markiert, um bei der Auswertung den  $R_f$ -Wert bestimmen zu können. Zur Auswertung wird das Radio-DC in eine Plastikfolie gelegt und die DC-Platte mit dem Instant-Imager von Packard ausgelesen, um eine orts aufgelöste Verteilung der Radioaktivität zu erhalten. Die Messwerte werden mit der Software Packard Imager for Windows (V 2.03) aufgenommen. Durch Integration der Peakflächen können die Ausbeuten bestimmt werden. Zur Bestimmung der Markierungsausbeute von Antikörpern mit Arsenisotopen wird analog verfahren.

### 4.2.2 Bestimmung der Markierungsausbeute von Antikörpern mittels Radio-HPLC und Gelfiltration mittels HPLC

Zur Bestimmung der Markierungsausbeuten von Antikörpern mit Arsenisotopen wurde ein HPLC-System von Waters verwendet (1525 binäre HPLC-Pumpe; 2489 UV-Detektor, Berthold LB 509 Radioaktivitätsdetektor, Breeze Auswertungssoftware V 3.20). Da die Antikörper sehr große Moleküle sind ( $M_w = 150$  kDa) können sie leicht mittels Größenausschlusschromatographie von der freien Aktivität getrennt werden. Hierzu wurde für analytische Zwecke zunächst eine Bio-Silect SEC 250-5 Säule (300 x 7,8 mm MWCO 10 - 300 kDa) verwendet. Diese hochauflösende Säule ermöglicht es auch den Antikörper z.B. von BSA ( $M_w = 68$  kDa) zu trennen. Als Laufmittel wurde PBS-Puffer (10 mM EDTA) bei einem Fluss von 1 ml / min verwendet. Für analytische Zwecke wurden 50 µl der markierten Verbindung auf die Säule aufgegeben und sowohl das UV-, als auch das Radioaktivitätssignal aufgenommen. Für eine reine Bestimmung der Markierungsausbeute erwies sich jedoch eine andere Säule als vorteilhaft. Dazu wurde eine HiTrap Desalting Säule (GE Healthcare, 5 ml, MWCO = 5 kDa, gefüllt mit Sephadex G-25 superfine) verwendet. Als Laufmittel wurde PBS-Puffer (10 mM EDTA) oder alternativ 0,9 %ige NaCl-Lösung bei einem Fluss von 0,5 ml / min verwendet. Aufgrund des Säulendesigns ist es möglich, neben analytischen Mengen (50 - 100 µl) auch die gesamte Antikörperlösung (1,25 mg in 1 - 2 ml) mittels

Gelfiltrations-HPLC aufzureinigen. In diesem Fall wurde der Radio-Detektor vom System abgetrennt und die gereinigte Lösung direkt hinter dem UV-Detektor aufgefangen.

#### 4.2.3 Bestimmung der radiochemischen Ausbeute und Isotopenreinheit mittels $\gamma$ -Spektroskopie

Für die Aufnahme von hochauflösenden  $\gamma$ -Spektren wurde ein HPGe-Detektorsystem von EG&G Ortec (GEM-25/85-P-Plus; Kristalldurchmesser: 56,5 mm, Kristalllänge: 59,1 mm; Auflösung (FWHM) bei 1,33 MeV ( $^{60}\text{Co}$ ): 1,69 keV) verwendet. Zur Aufnahme und Auswertung der Spektren wurde die „Genie 2000 Gamma Acquisition and Analysis Software“ V2.1 von Canberra eingesetzt. Der Detektor wurde mit einer zertifizierten Standard-Lösung (QCY48, R6/50/38 von Amersham) im Energiebereich von 59,54 keV ( $^{241}\text{Am}$ ) bis 1836 keV ( $^{88}\text{Y}$ ) in allen Messpositionen (0 bis 100 cm Abstand) mit 500  $\mu\text{l}$  Lösung in einem 2 ml Eppendorf Vial effizienzgeeicht. Die einzelnen für die Kalibrierung verwendeten Isotope und ihre  $\gamma$ -Linien finden sich in Tabelle 39.

**Tabelle 39: Im Kalibrierstandard QCY48 R6/50/38 enthaltenen Nuklide und  $\gamma$ -Linien**

<i>Isotop</i>	<i><math>\gamma</math>-Linien [keV]</i>
$^{241}\text{Am}$	59,54
$^{109}\text{Cd}$	88,03
$^{57}\text{Co}$	122,1
$^{139}\text{Ce}$	165,9
$^{203}\text{Hg}$	279,2
$^{113}\text{Sn}$	391,7
$^{85}\text{Sr}$	514,0
$^{137}\text{Cs}$	661,6
$^{88}\text{Y}$	898,0
$^{60}\text{Co}$	1173,0
$^{60}\text{Co}$	1333,0
$^{88}\text{Y}$	1836,0

Damit kann das Programm aus der Zählrate die Aktivität berechnen. Die dazu benötigte Nukliddatenbank wurde mit den Daten aus [135] erstellt (Halbwertszeit und  $\gamma$ -Emissionswahrscheinlichkeit). Alle erhaltenen Spektren wurden auf den Startpunkt der ersten Messung eines Tages normiert. Die Halbwertszeitkorrektur wurde direkt vom Auswertprogramm mittels der erstellten Nukliddatenbank durchgeführt. Alle Messungen einer Messreihe wurden in derselben Geometrie (500  $\mu\text{l}$  im 2 ml Eppendorf Vial) und soweit möglich im selben Einschub durchgeführt. Einzige Ausnahmen bildeten die festen Germaniumtargets, die direkt als Feststoff vermessen wurden und die in Abtrennungsmethode

MJ07 benutzen 1 ml Fraktionen der Anionenaustauschersäule. Es wurde darauf geachtet, dass die Totzeit des Detektors immer unterhalb 10 % lag und die Peakfläche der für die Ausbeutebestimmung wichtigen  $\gamma$ -Linien zwischen 1000 und 10.000 lagen. Bei der Bestimmung der Germaniumspuren nach der Abtrennung lagen die Peakflächen nach 12 h Messzeit teilweise darunter.

### 4.3 Abtrennungsmethoden für \*As aus Germaniumtargets

#### 4.3.1 Abtrennungsmethoden für \*As aus GeO<sub>2</sub>-Targets

##### 4.3.1.1 Abtrennung von <sup>72/74/77</sup>As aus einem GeO<sub>2</sub>-Target mittels Festphasenextraktion (MJ01)

Die gesamte Prozedur wird zum Einen wegen der Verwendung von GeO<sub>2</sub>-Pulver, zum Anderen wegen der Verwendung von HF<sub>konz</sub> als Lösungsmittel in einer Glovebox mit leichtem Unterdruck durchgeführt, um radioaktive Kontaminationen und Unfälle mit der HF<sub>konz</sub> zu vermeiden. 100 mg GeO<sub>2</sub> (99,999 %, Strem) werden nach erfolgter Bestrahlung durch Zugabe von 5 ml HF<sub>konz</sub> in einem Teflongefäß gelöst. Das verwendete GeO<sub>2</sub> löst sich dabei innerhalb von Sekunden vollständig auf. Das Target kann minimal in 500 µl HF<sub>konz</sub> gelöst werden, jedoch erwiesen sich zu geringe Volumina schwer zu handhaben. Parallel dazu wird eine zur Trennung von Ge und \*As benötigte Bond Elut ENV Kartusche (25 mg, Abbildung 74) konditioniert.

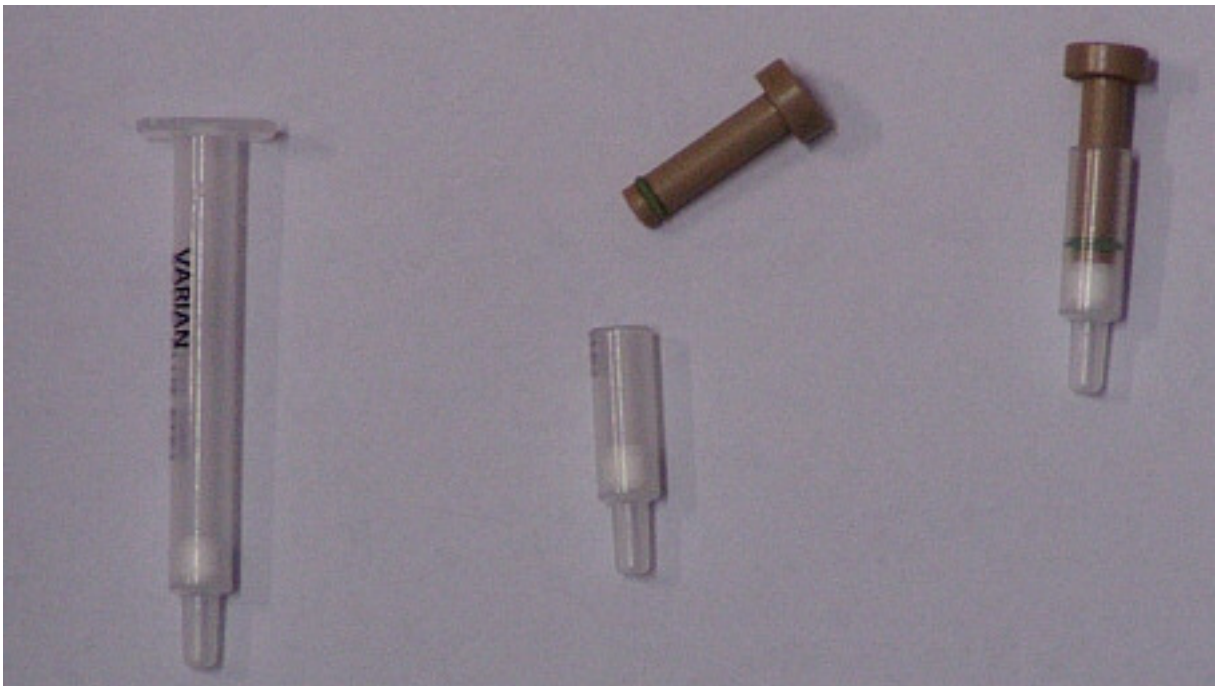


Abbildung 74: Varian Bond Elut ENV Kartusche (25 mg) mit PEEK-Adapter für Einwegspritze

Um die Säule zu konditionieren wurde diese bereits vor Beginn der Targetaufarbeitung gekürzt und mit einem PEEK-Adapter versehen, damit sie mit Einwegspritzen verbunden werden kann. Zur Konditionierung werden 5 ml HF<sub>konz</sub> mit 50 mg NaI versetzt und die Lösung langsam mit einer 5 ml Plastikspritze über die Säule gedrückt. Anschließend werden 100 mg NaI zur Targetlösung gegeben und diese durch Gravitation über die Kartusche gegeben. Dazu wird die Targetlösung in eine über den Adapter mit der Säule verbundene Plastikspritze (5 ml) gefüllt. Die Lösung kann somit langsam ohne Druck durch die Säule laufen. Dabei wird das \*As auf der Säule fixiert, während das makroskopisch vorhandene Germanium als GeF<sub>6</sub><sup>2-</sup> ohne Wechselwirkung durch die Säule läuft. Im Anschluss wird die Einwegspritze durch eine neue ersetzt und 5 ml HF<sub>konz</sub> mit 50 mg NaI zum Spülen über die Kartusche gegeben. Hierdurch werden Reste von GeF<sub>6</sub><sup>2-</sup> entfernt. Im Anschluss müssen alle Reste der HF<sub>konz</sub> von der Säule entfernt werden, da sie nicht mit biologischen Systemen kompatibel sind. Vorversuche zeigten, dass eine quantitative Entfernung nur möglich ist, wenn im Gegensatz zu der veröffentlichten Methode [120] ein starker Argonstrom für ca. 1 h durch die Kartusche geblasen wird. Dies ist insbesondere im Hinblick auf den pH-Wert sehr wichtig. Man muss sich darauf verlassen, am Ende einen neutralen pH-Wert zu erhalten, will man das \*As für Markierungen von Antikörpern einsetzen. Nach dem Trocknen der Säule ist die HF<sub>konz</sub> vollständig entfernt und die weiteren Arbeitsschritte können außerhalb der Glovebox durchgeführt werden. Das fixierte radioaktive Arsen wird daraufhin mit 500 µl Ethanol von der Bond Elut ENV Kartusche eluiert. Das Ethanol wird mit 500 µl PBS-Puffer (0,5 M Hydroxylamin, 25 mM EDTA) verdünnt, um das \*As zu \*As(III) zu reduzieren und um ein Ausfallen des zur Markierung verwendeten Antikörpers zu verhindern. Von allen Lösungen werden 500 µl Aliquots gammaspektroskopisch vermessen, um die Ausbeute und den Trennungsfaktor des Germaniums zu bestimmen. Von der organischen und der wässrigen Phase (nach verdünnen in PBS-Puffer) werden je 0,5 - 1 µl Lösung auf eine DC-Platte gespottet, um mittels Radio-DC den Oxidationszustand des <sup>72/74/77</sup>As zu bestimmen (Laufmittel: 0,01 M Natriumtartrat / Methanol (3 : 1)).

#### **4.3.1.2 Abtrennung von <sup>72/74/77</sup>As aus einem GeO<sub>2</sub>-Target mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion aus HF/NaI-Medium (MJ02)**

Die Aufarbeitung des bestrahlten GeO<sub>2</sub>-Targets wird in einer Glovebox mit leichtem Unterdruck durchgeführt, um radioaktive Kontaminationen und Unfälle mit der HF<sub>konz</sub> zu vermeiden. 100 mg GeO<sub>2</sub> werden nach erfolgter Bestrahlung in ein 15 ml Plastikvial gefüllt und unter Zugabe von 2 ml HF<sub>konz</sub> gelöst. Das Target löst sich mit leichtem Zischen innerhalb von Sekunden restlos auf. Dann werden 100 mg NaI zugegeben und die Lösung direkt für ca. 1 min mit 500 µl CCl<sub>4</sub> ausgeschüttelt. Nachdem sich die beiden Phasen getrennt haben, wird die organische Phase mit einer 200 µl Eppendorf-Pipette von der HF-Phase abgetrennt und die Prozedur mit weiteren 500 µl CCl<sub>4</sub> wiederholt. In der organischen Phase ist keine HF mehr enthalten, weshalb die weiteren Arbeitsschritte außerhalb der Glovebox durchgeführt

werden können. Die beiden organischen Phasen werden vereinigt und mit 500 µl PBS-Puffer (0,5 M Hydroxylamin, 25 mM EDTA) für ca. 1 min ausgeschüttelt, um das radioaktive Arsen in die wässrige Phase zu extrahieren. Die wässrige Phase wird nach dem Entmischen beider Phasen mit einer 200 µl Eppendorf-Pipette in ein 2 ml Eppendorf-Vial pipettiert und kann direkt zur Markierung von Antikörpern eingesetzt werden. Von allen Lösungen werden 500 µl-Aliquots gammaspektroskopisch vermessen, um die Ausbeute und den Trennungsfaktor des Germaniums zu bestimmen. Von der organischen und der wässrigen Phase werden je 0,5 - 1 µl Lösung auf eine DC-Platte gespottet, um mittels Radio-DC den Oxidationszustand des  $^{72/74/77}\text{As}$  zu bestimmen (Laufmittel: 0,01 M Natriumtartrat / Methanol (3 : 1)).

#### **4.3.1.3 Abtrennung von $^{72/74/77}\text{As}$ aus einem $\text{GeO}_2$ -Target mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion aus HF/HBr-Medium (MJ03)**

Die Aufarbeitung des bestrahlten  $\text{GeO}_2$ -Targets wird in einer Glovebox mit leichtem Unterdruck durchgeführt, um radioaktive Kontaminationen und Unfälle mit der  $\text{HF}_{\text{konz}}$  zu vermeiden. 100 mg  $\text{GeO}_2$  werden nach erfolgter Bestrahlung in ein 15 ml Plastikvial gefüllt und unter Zugabe von 500 µl  $\text{HF}_{\text{konz}}$  innerhalb von Sekunden vollständig gelöst. Dann werden 1,5 ml  $\text{HBr}_{\text{konz}}$  zugegeben und die Lösung direkt für ca. 1 min mit 500 µl  $\text{CCl}_4$  ausgeschüttelt. Nachdem sich die beiden Phasen getrennt haben, wird die organische Phase mit einer 200 µl Eppendorf-Pipette von der HF/HBr-Phase abgetrennt und die Prozedur mit weiteren 500 µl  $\text{CCl}_4$  wiederholt. In der organischen Phase ist keine Säure, insbesondere kein HF mehr enthalten, weshalb die weiteren Arbeitsschritte außerhalb der Glovebox durchgeführt werden können. Die beiden organischen Phasen werden vereinigt und mit 500 µl PBS-Puffer (0,5 M Hydroxylamin, 25 mM EDTA) für ca. 1 min ausgeschüttelt, um das radioaktive Arsen in die wässrige Phase zu extrahieren. Die wässrige Phase wird nach dem Entmischen beider Phasen mit einer 200 µl Eppendorf-Pipette in ein 2 ml Eppendorf-Vial pipettiert und kann direkt zur Markierung von Antikörpern eingesetzt werden. Von allen Lösungen werden 500 µl Aliquots  $\gamma$ -spektroskopisch vermessen um die Ausbeute, und den Trennungsfaktor des Germaniums zu bestimmen. Von der organischen und der wässrigen Phase werden je 0,5 - 1 µl Lösung auf eine DC-Platte gespottet, um mittels Radio-DC den Oxidationszustand des  $^{72/74/77}\text{As}$  zu bestimmen (Laufmittel: 0,01 M Natriumtartrat / Methanol (3 : 1)).

#### **4.3.1.4 Abtrennung von $^{72/74/77}\text{As}$ aus einem $\text{GeO}_2$ -Target mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion aus HF/HCl-Medium (MJ04)**

Die Aufarbeitung des bestrahlten  $\text{GeO}_2$ -Targets wird in einer Glovebox mit leichtem Unterdruck durchgeführt, um radioaktive Kontaminationen und Unfälle mit der  $\text{HF}_{\text{konz}}$  zu vermeiden. 100 mg  $\text{GeO}_2$  werden nach erfolgter Bestrahlung in ein 15 ml Plastikvial gefüllt

und unter Zugabe von 500  $\mu\text{l}$   $\text{HF}_{\text{konz}}$  innerhalb von Sekunden vollständig gelöst. Dann werden 3,5 ml 10 M HCl zugegeben und die Lösung direkt für ca. 1 min mit 500  $\mu\text{l}$   $\text{CCl}_4$  ausgeschüttelt. Nachdem sich die beiden Phasen getrennt haben, wird die organische Phase mit einer 200  $\mu\text{l}$  Eppendorf-Pipette von der HF/HCl-Phase abgetrennt und die Prozedur mit weiteren 500  $\mu\text{l}$   $\text{CCl}_4$  wiederholt. In der organischen Phase ist keine Säure, insbesondere kein HF mehr enthalten, weshalb die weiteren Arbeitsschritte außerhalb der Glovebox durchgeführt werden können. Die beiden organischen Phasen werden vereinigt und mit 500  $\mu\text{l}$  PBS-Puffer (0,5 M Hydroxylamin, 25 mM EDTA) für ca. 1 min ausgeschüttelt, um das radioaktive Arsen in die wässrige Phase zu extrahieren. Die wässrige Phase wird nach dem Entmischen beider Phasen mit einer 200  $\mu\text{l}$  Eppendorf-Pipette in ein 2 ml Eppendorf-Vial pipettiert und kann direkt zur Markierung von Antikörpern eingesetzt werden. Von allen Lösungen werden 500  $\mu\text{l}$  Aliquots  $\gamma$ -spektroskopisch vermessen, um die Ausbeute und den Abtrennungsfaktor des Germaniums zu bestimmen. Von der organischen und der wässrigen Phase werden je 0,5 - 1  $\mu\text{l}$  Lösung auf eine DC-Platte gespottet, um mittels Radio-DC den Oxidationszustand des  $^{72/74/77}\text{As}$  zu bestimmen (Laufmittel: 0,01 M Natriumtartrat / Methanol (3 : 1)).

#### **4.3.1.5 Bestimmung des Oxidationszustandes von $^{77}\text{As}$ in $\text{GeO}_2$ nach erfolgter Bestrahlung am Kernreaktor durch Anionenaustauschchromatographie im HF/HCl-Medium**

Das Lösen des bestrahlten  $\text{GeO}_2$ -Targets wird in einer Glovebox mit leichtem Unterdruck durchgeführt, um radioaktive Kontaminationen und Unfälle mit der  $\text{HF}_{\text{konz}}$  zu vermeiden. Dazu werden 100 mg  $\text{GeO}_2$  nach erfolgter Bestrahlung am Kernreaktor in ein 15 ml Plastikvial gefüllt und unter Zugabe von 500  $\mu\text{l}$   $\text{HF}_{\text{konz}}$  vollständig gelöst. Diese Lösung wird dann außerhalb der Glovebox auf eine AG 1-X8 (200 - 400 mesh) Anionenaustauschersäule (0,9 x 6,5 cm) aufgegeben und in Fraktionen von 1 ml eluiert. Dazu werden zunächst vier Fraktionen mit 2 M HF/10 M HCl verwendet. Im Anschluss wird für die Fraktionen 6 bis 15 mit 10 M HCl verwendet. Man erhält in den Fraktionen 9 und 10 das  $^{77}\text{As(V)}$ . Ab Fraktion 16 wird 0,1 M HCl verwendet, um das  $^{77}\text{As(III)}$  von der Säule zu eluieren. Das gesamte  $^{77}\text{As(III)}$  befindet sich in den Fraktionen 17 und 18. Die Targetlösung und die einzelnen Fraktionen werden  $\gamma$ -spektroskopisch vermessen. Durch Integration beider Peakflächen kann der Anteil des in situ im Target gebildeten  $^{77}\text{As(V)}$  und  $^{77}\text{As(III)}$  bestimmt werden.

## 4.3.2 Abtrennungsmethoden für Germaniummetalltargets

### 4.3.2.1 Abtrennung von <sup>72/74/77</sup>As aus einem Germaniummetalltarget mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion aus HF/HI-Medium (MJ05)

Die Aufarbeitung des bestrahlten Germaniummetalltargets wird in einer Glovebox mit leichtem Unterdruck durchgeführt, um radioaktive Kontaminationen und Unfälle mit der HF<sub>konz</sub> zu vermeiden. 100 - 200 mg Germaniummetall werden nach erfolgter Bestrahlung in ein 15 ml Plastikvial gefüllt und durch Zugabe von 2 ml eines 1 : 1 Gemisches von HF<sub>konz</sub> (48 %) und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 %) innerhalb weniger Minuten unter Gasentwicklung (O<sub>2</sub>) restlos gelöst. Die Reaktion ist stark exotherm, weshalb es von Vorteil ist, das Lösungsmittel in Fraktionen à 500 µl zuzugeben. Nachdem die Reaktionslösung abgekühlt ist, werden 5 mg Pt/C-Pulver (10 %) dazugegeben. Das Pulver dient als Katalysator für die Aufspaltung des überschüssigen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in H<sub>2</sub>O und O<sub>2</sub>. Die Lösung wird zunächst ca. 15 min stehen gelassen damit das H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> abreagieren kann. Nachdem die Reaktion etwas an Stärke verloren hat wird die Lösung für ca. 1 h leicht auf einer Rüttelmaschine geschüttelt, bis keine Sauerstoffentwicklung mehr zu beobachten ist. Um die Aktivkohle wieder abzutrennen wird die Lösung in ein iCon Größenausschlussfilter (MWCO 20 kDa) von Pierce gefüllt und die aktive Lösung durch Abzentrifugieren von der Aktivkohle getrennt. Zu der klaren Lösung werden 1 ml HI<sub>konz</sub> (57 %) zugegeben. Direkt im Anschluss wird die Lösung mit 500 µl CCl<sub>4</sub> für ca. 1 min ausgeschüttelt. Nachdem sich die beiden Phasen getrennt haben, wird die organische Phase mit einer 200 µl Eppendorf-Pipette von der HF/HI-Phase abgetrennt und die Prozedur noch zweimal mit je 500 µl CCl<sub>4</sub> wiederholt. In der organischen Phase ist keine Säure, insbesondere kein HF mehr enthalten, weshalb die weiteren Arbeitsschritte außerhalb der Glovebox durchgeführt werden können. Die organischen Phasen werden vereinigt und mit 500 µl PBS-Puffer (0,5 M Hydroxylamin, 25 mM EDTA) für ca. 1 min ausgeschüttelt, um das radioaktive Arsen in die wässrige Phase zu extrahieren. Die wässrige Phase wird nach dem Entmischen beider Phasen mit einer 200 µl Eppendorf-Pipette in ein 2 ml Eppendorf-Vial pipettiert und kann direkt zur Markierung von Antikörpern eingesetzt werden. Von allen Lösungen werden 500 µl Aliquots  $\gamma$ -spektroskopisch vermessen, um die Ausbeute und den Trennungsfaktor des Germaniums zu bestimmen. Von der organischen und der wässrigen Phase wird je 0,5 - 1 µl Lösung auf eine DC-Platte gespottet, um mittels Radio-DC den Oxidationszustand des <sup>72/74/77</sup>As zu bestimmen (Laufmittel: 0,01 M Natriumtartrat / Methanol (3 : 1)).

#### 4.3.2.2 Abtrennung von $^{72/74/77}\text{As}$ aus einem Germaniummetalltarget durch Destillation von $\text{GeCl}_4$ und anschließender Aufreinigung mittels Anionenaustausch (MJ06)

Bei dieser Abtrennungsmethode kommen zwei Sorten von Germaniummetall zum Einsatz. Für Bestrahlungen am Kernreaktor wurden Germaniumstücke zwischen 100 und 200 mg eingesetzt (99,9999+ %, Chempur). Für am Zyklotron bestrahlte Targets wurden Germaniumscheiben von 9,9 mm Durchmesser und 500  $\mu\text{m}$  Dicke verwendet (99,999 % Goodfellow). Daraus ergibt sich eine gewisse Varianz in der Masse des Targetmaterials.

100 - 200 mg Germaniummetall werden nach erfolgter Bestrahlung in eine Destillationsapparatur (Abbildung 75) gegeben und mit 4 ml Königswasser ( $\text{HNO}_3 / \text{HCl}$  1 : 1) aufgefüllt.

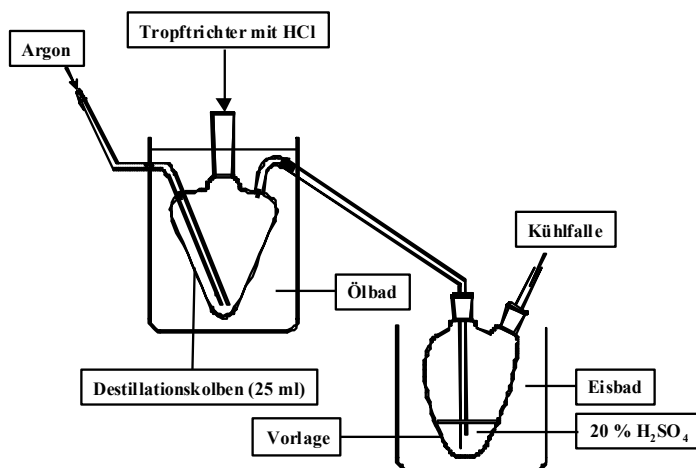
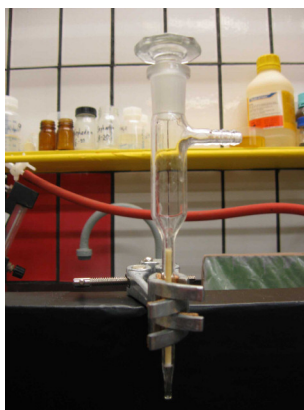


Abbildung 75: Schematische Zeichnung der Destillationsapparatur für Germaniummetalltargets

Die gesamte Prozedur wird in einem normalen Abzug und nicht in einer Glovebox durchgeführt, da das Germaniummetall als Stück vorliegt und keine  $\text{HF}_{\text{konz}}$  verwendet wird. Die Apparatur wird im Laufe von 30 min langsam bis auf 120 °C aufgeheizt (Ölbadtemperatur). Nachdem sich das Target vollständig in der Hitze gelöst hat wird ein leichter Argonstrom durch die Lösung geleitet, um die Destillation zu beschleunigen. Die Lösung wird fast bis zur Trockne (ca. 100 - 200  $\mu\text{l}$  Lösung) abdestilliert, bevor ca. 3 ml 10 M HCl zugegeben werden. Die genaue Menge sollte so bemessen sein, dass das gesamte an den Wänden des Destillationskolbens ausgefallene  $\text{GeO}_2$  wieder von HCl bedeckt ist. Die HCl wird wiederum fast bis zur Trockne abdestilliert und die Prozedur noch einmal wiederholt. Nachdem die Lösung nur noch aus ca. 100  $\mu\text{l}$  besteht wird die Destillation abgebrochen, die Lösung mit 400  $\mu\text{l}$  10 M HCl auf ca. 500  $\mu\text{l}$  aufgefüllt und aus der Destillationsapparatur mit einer Plastikpipette entnommen. Die Lösung wird auf eine vorher mit 10 M HCl

konditionierte Anionenaustauschersäule (AG 1-X8, 200 - 400 mesh) in den Dimensionen 3\*100 mm aufgegeben (Abbildung 76).



**Abbildung 76: Glassäule mit AG 1-X8 gefüllt**

Die Säule wird dabei mit einem leichten Überdruck von Argongas betrieben und die Fließgeschwindigkeit auf ca. 4 Tropfen pro Minute eingestellt. Die Säule wird mit Fraktionen zu je 500  $\mu\text{l}$  eluiert. Fraktion 1 entspricht der Probenlösung. Die Säule wird in den Fraktionen 2 bis 10 mit 10 M HCl eluiert. Im Anschluss daran wird nochmals mit 5 ml 0,1 M HCl gespült, bevor die Säule wieder mit 5 ml 10 M HCl für die weitere Verwendung konditioniert wird. Die Fraktionen mit dem radioaktiven Arsen (in der Regel Fraktion 2 und 3) werden in einem 2 ml Eppendorfgefäß vereinigt und mit 50 mg CuCl versetzt. Die Lösung wird im Wasserbad für 1 h bei 60 °C erhitzt. Im Anschluss wird die Lösung mit 500  $\mu\text{l}$  CCl<sub>4</sub> für ca. 1 min ausgeschüttelt. Nach dem Entmischen beider Phasen wird die organische Phase mit einer 200  $\mu\text{l}$  Eppendorf-Pipette von der HCl-Phase abgetrennt und die Prozedur noch einmal mit 500  $\mu\text{l}$  CCl<sub>4</sub> wiederholt. Die beiden organischen Phasen werden vereinigt und mit 500  $\mu\text{l}$  PBS-Puffer (0,5 M Hydroxylamin, 25 mM EDTA) für ca. 1 min ausgeschüttelt, um das radioaktive Arsen in die wässrige Phase zu extrahieren. Die wässrige Phase wird nach dem Entmischen beider Phasen mit einer 200  $\mu\text{l}$  Eppendorf-Pipette in ein 2 ml Eppendorf-Vial pipettiert und kann direkt zur Markierung von Antikörpern eingesetzt werden. Von allen Lösungen werden 500  $\mu\text{l}$  Aliquots  $\gamma$ -spektroskopisch vermessen um die Ausbeute und den Trennungsfaktor des Germaniums zu bestimmen. Von der organischen und der wässrigen Phase wird je 0,5 - 1  $\mu\text{l}$  Lösung auf eine DC-Platte gespottet, um mittels Radio-DC den Oxidationszustand des <sup>72/74/77</sup>As zu bestimmen (Laufmittel: 0,01 M Natriumtartrat / Methanol (3 : 1). Die gesamte Prozedur kann anstatt mit Germaniummetall auch mit GeO<sub>2</sub> durchgeführt werden, was jedoch nicht im Detail untersucht worden ist.

#### 4.3.2.3 Abtrennung von $^{72/74/77}\text{As}$ aus einem Germaniummetalltarget mittels Anionenaustauschchromatographie im HF/HCl-Medium (MJ07)

Bei dieser Abtrennungsmethode kommen analog MJ06 zwei Sorten von Germaniummetall zum Einsatz. Für Bestrahlungen am Kernreaktor wurden Germaniumstücke zwischen 100 und 200 mg eingesetzt (99,9999+ %, Chempur). Für am Zyklotron bestrahlte Targets wurden Germaniumscheiben von 9,9 mm Durchmesser und 500  $\mu\text{m}$  Dicke verwendet (99,999 % Goodfellow). Daraus ergibt sich eine gewisse Varianz in der Masse des Targetmaterials.

Die Auflösung des bestrahlten Germaniummetalltargets wird in einer Glovebox mit leichtem Unterdruck durchgeführt, um radioaktive Kontaminationen und Unfälle mit der  $\text{HF}_{\text{konz}}$  zu vermeiden. 100 - 200 mg Germaniummetall werden nach erfolgter Bestrahlung in ein 15 ml Plastikvial gefüllt und unter Zugabe von 2 ml eines 1 : 1 Gemisches von  $\text{HF}_{\text{konz}}$  und  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30 %) gelöst. Die Reaktion ist stark exotherm, weshalb es sich insbesondere bei am Zyklotron bestrahlten Targets (die Germaniumscheibe besitzt im Vergleich zu den Germaniumstücken eine große Oberfläche) als vorteilhaft erwiesen hat, das Lösungsmittel nur langsam in 200  $\mu\text{l}$  Portionen zuzugeben. Sonst kann die starke Blasenbildung ( $\text{O}_2$ ) dazu führen, dass ein Teil der Lösung verloren geht. Nach dem vollständigen Lösen des Targets und nachdem die Lösung etwas abgekühlt ist, werden 5 mg Pt/C (10 %) dazugegeben. Die Lösung wird zunächst etwas stehen gelassen damit das überschüssige  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{O}_2$  abreagieren kann. Nachdem die Reaktion etwas an Stärke verloren hat wird die Suspension noch für ca. 1 h auf einer Rüttelmaschine leicht geschüttelt, bis keine Sauerstoffentwicklung mehr zu beobachten ist. Die Suspension wird mit einer 1 ml Einweg Plastikspritze aufgenommen und über einen Spritzenfilter in ein 2 ml Eppendorf-Vial filtriert, um die Aktivkohle abzutrennen. Dabei gehen bis zu 10 % der Lösung verloren. Die Lösung wird außerhalb der Glovebox weiterverarbeitet. Zum Trennen von  $^*\text{As}$  und Ge wird die Lösung auf eine zuvor mit 2 M HF / 10 M HCl konditionierte Plastiksäule mit Anionenaustauscherharz (AG 1-X8, 200 - 400 mesh) in den Dimensionen 0,9 x 6,5 cm gegeben (Abbildung 77).



**Abbildung 77: Plastiksäule (0,9 x 6,5 cm) mit AG 1-X8 befüllt**

Die Säule wird mit Fraktionen zu je 1 ml eluiert. Fraktion 1 entspricht der Probenlösung. Die Säule wird in den Fraktionen 2 bis 5 mit 2 M HF / 10 M HCl eluiert. Danach wird für die Fraktionen 6 bis 11 zum Eluieren 10 M HCl verwendet. Im Anschluss daran wird nochmals mit 5 ml 0,1 M HCl gespült, bevor die Säule wieder mit 5 ml 2 M HF / 10 M HCl für die weitere Verwendung konditioniert wird. Die Fraktionen mit dem radioaktiven \*As(V) (in der Regel Fraktion 9 und 10) werden in einem 15 ml Plastikvial vereinigt und mit 1 ml HBr versetzt. Im Anschluss wird die Lösung mit 500 µl CCl<sub>4</sub> für ca. 1 min ausgeschüttelt. Nach dem Entmischen beider Phasen wird die organische Phase mit einer 200 µl Eppendorf-Pipette von der HCl/HBr-Phase abgetrennt und die Prozedur noch einmal mit 500 µl CCl<sub>4</sub> wiederholt. Die beiden organischen Phasen werden in einem 2 ml Eppendorf-Vial vereinigt und mit 500 µl PBS-Puffer (0,5 M Hydroxylamin, 25 mM EDTA) für ca. 1 min ausgeschüttelt, um das radioaktive Arsen in die wässrige Phase zu extrahieren. Die wässrige Phase wird nach dem Entmischen beider Phasen mit einer 200 µl Eppendorf-Pipette in ein 2 ml Eppendorf-Vial pipettiert und kann direkt zur Markierung von Antikörpern eingesetzt werden. Von allen Lösungen werden 500 µl Aliquots  $\gamma$ -spektroskopisch vermessen um die Ausbeute und den Trennungsfaktor des Germaniums zu bestimmen. Von der organischen und der wässrigen Phase wird je 0,5 - 1 µl Lösung auf eine DC-Platte gespottet, um mittels Radio-DC den Oxidationszustand des <sup>72/74/77</sup>As zu bestimmen (Laufmittel: 0,01 M Natriumtartrat / Methanol (3 : 1)). Die gesamte Prozedur kann ebenfalls analog mit GeO<sub>2</sub>-Targets durchgeführt werden. Hierbei ist es trotz der Löslichkeit von GeO<sub>2</sub> in HF<sub>konz</sub> nötig, das Wasserstoffperoxyd zuzugeben, damit das \*As vollständig zu \*As(V) oxidiert wird.

#### 4.3.2.4 Abtrennung von $^{72/74/77}\text{As}$ aus einem Germaniummetalltarget mittels Anionenaustausch im HF/HCl-Medium und Festphasenextraktion (MJ08)

Diese Methode beruht auf der Trennung von  $^*\text{As}$  und Ge mittels Anionenaustauschchromatographie (MJ07), die im vorigen Kapitel (4.3.2.3) beschrieben ist. Im Anschluss an die reine Trennung der Elemente wird das  $^*\text{As}$  jedoch nicht mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion in eine für radioaktive Markierungen geeignete Form überführt, sondern mittels der in Grundzügen in Kapitel 4.3.1.1 beschriebenen Festphasenextraktionsmethode weiterverarbeitet.

Dazu werden die Fraktionen von der Anionenaustauschersäule, die das  $^*\text{As(V)}$  in 10 M HCl enthalten (in der Regel Fraktion 9 und 10) vereinigt und mit 10 mg NaI versetzt. Eine Bond Elut ENV Kartusche (25 mg, Abbildung 74) wird mit 5 ml HCl (10 M), die mit 10 -20 mg NaI versetzt wurde, konditioniert, indem die Lösung mit einer Einweg-Plastikspritze über die Säule gedrückt wird. Danach wird das  $^*\text{As}$  auf der Säule fixiert, indem die Lösung mittels einer Einweg-Plastikspritze durch die Säule hindurch aufgezogen wird. Daraufhin wird die Säule auf die gleiche Art mit 5 ml 10 M HCl (mit 10 mg NaI versetzt) gespült. Im Anschluss daran wird die Säule für ca. 2 min im starken Argonstrom getrocknet. Dies führt jedoch zu keiner vollständigen Entfernung der HCl von der Säule. Deshalb werden eventuell noch vorhandene HCl-Tropfen durch Abzentrifugieren (ca. 5 min) entfernt. Dies hat sich als vorteilhafter gegenüber der in Kapitel 4.3.1.1 angewendeten Methode der einstündigen Trocknung im Argonstrom erwiesen. Um das  $^*\text{As}$  wieder in Lösung zu bringen, wird die Kartusche mit ca. 300  $\mu\text{l}$  Ethanol eluiert. Die 300  $\mu\text{l}$  werden mit 500  $\mu\text{l}$  PBS-Puffer (0,5 M Hydroxylamin, 25 mM EDTA) aufgefüllt, um das entstandene Iod und das  $^*\text{As(V)}$  zu  $^*\text{As(III)}$  zu reduzieren. Die Lösung kann direkt zur Markierung von Antikörpern eingesetzt werden. Von allen Lösungen werden 500  $\mu\text{l}$  Aliquots  $\gamma$ -spektroskopisch vermessen um die Ausbeute und den Trennungsfaktor des Germaniums zu bestimmen. Von der organischen und der wässrigen Phase (nach verdünnen in PBS-Puffer) wird je 0,5 - 1  $\mu\text{l}$  Lösung auf eine DC-Platte gespottet, um mittels Radio-DC den Oxidationszustand des  $^{72/74/77}\text{As}$  zu bestimmen (Laufmittel: 0,01 M Natriumtartrat / Methanol (3 : 1)).

#### 4.4 Vorversuche zur Reduktion von As(V) zu As(III) mit geträgertem $^{76}\text{As}_2\text{O}_5$

##### 4.4.1 Vorversuche mit NaI als Reduktionsmittel

50  $\mu\text{l}$  einer zuvor am Kernreaktor bestrahlten  $\text{As}_2\text{O}_5$ -Lösung (1,3  $\mu\text{mol}$   $^{76}\text{As(V)}$ ) werden mit 450  $\mu\text{l}$  HCl (10 M) aufgefüllt. Dann werden 20 mg NaI (130  $\mu\text{mol}$ ) zugegeben. Die Lösung

wird mit 500  $\mu\text{l}$   $\text{CCl}_4$  für ca. 1 min ausgeschüttelt. Nach dem Entmischen beider Phasen wird die organische Phase mit einer 200  $\mu\text{l}$  Eppendorf-Pipette in ein 2 ml Eppendorf-Vial pipettiert und mit 500  $\mu\text{l}$  PBS-Puffer (0,5 M Hydroxylamin, 25 mM EDTA) für ca. 1 min ausgeschüttelt, um das radioaktive Arsen in die wässrige Phase zu extrahieren. Die wässrige Phase wird mit einer 200  $\mu\text{l}$  Eppendorf-Pipette in ein 2 ml Eppendorf-Vial pipettiert. Von allen Lösungen werden 500  $\mu\text{l}$   $\gamma$ -spektroskopisch vermessen um die Extraktionsausbeute des Arsens zu bestimmen. Von der organischen und der wässrigen Phase wird je 0,5 - 1  $\mu\text{l}$  Lösung auf eine DC-Platte gespottet, um mittels Radio-DC den Oxidationszustand des  $^{76}\text{As}$  zu bestimmen (Laufmittel: 0,01 M Natriumtartrat / Methanol (3 : 1). Zur Bestimmung der Extraktion des Iods in die organische Phase wurde analog vorgegangen. Hierbei wurde jedoch nicht das  $\text{As}_2\text{O}_3$ , sondern das NaI vorher am Kernreaktor für 1 min bestrahlt und die Extraktionsausbeute mittels  $\gamma$ -Spektroskopie bestimmt.

#### **4.4.2 Vorversuche mit $\text{CuCl}$ als Reduktionsmittel**

50  $\mu\text{l}$  einer am Kernreaktor bestrahlten  $\text{As}_2\text{O}_5$ -Lösung (1,3  $\mu\text{mol}$   $^{76}\text{As}(\text{V})$ ) werden mit 450  $\mu\text{l}$  HCl (10 M) aufgefüllt. Dann wird 50 mg  $\text{CuCl}$  (505  $\mu\text{mol}$ ) zugegeben und die Lösung bei 60  $^\circ\text{C}$  für 1 h erhitzt. Nach dem Abkühlen wird die Lösung mit 500  $\mu\text{l}$   $\text{CCl}_4$  versetzt und für ca. 1 min ausgeschüttelt. Nach dem Entmischen beider Phasen wird die organische Phase mit einer 200  $\mu\text{l}$  Eppendorf-Pipette in ein 2 ml Eppendorf-Vial pipettiert und mit 500  $\mu\text{l}$  PBS-Puffer (0,5 M Hydroxylamin, 25 mM EDTA) für ca. 1 min ausgeschüttelt, um das radioaktive Arsen in die wässrige Phase zu extrahieren. Die wässrige Phase wird mit einer 200  $\mu\text{l}$  Eppendorf-Pipette in ein 2 ml Eppendorf-Vial pipettiert. Von allen Lösungen werden 500  $\mu\text{l}$   $\gamma$ -spektroskopisch vermessen, um die Extraktionsausbeute des Arsens zu bestimmen. Von der organischen und der wässrigen Phase wird je 0,5 - 1  $\mu\text{l}$  Lösung auf eine DC-Platte gespottet, um mittels Radio-DC den Oxidationszustand des  $^{76}\text{As}$  zu bestimmen (Laufmittel: 0,01 M Natriumtartrat / Methanol (3 : 1). Zusätzlich werden in Optimierungsexperimenten die Auswirkungen der Variation von Temperatur, Zeit und Menge an Reduktionsmittel auf die Extraktionsausbeuten untersucht.

#### **4.5 Markierung von Antikörpern mit Arsenisotopen**

Im Anschluss an eine Abtrennung von  $^*\text{As}$  aus Germaniumtargets erhält man entweder 1 ml PBS-Puffer (0,5 M Hydroxylamin, 25 mM EDTA)/Ethanol 1 : 1 (MJ01 + MJ08) oder 500  $\mu\text{l}$  PBS-Puffer (0,5 M Hydroxylamin, 25 mM EDTA) (MJ02 - MJ07). Diese Lösungen können direkt zur Markierung von Antikörpern eingesetzt werden. Die beiden möglichen Methoden (TCEP/SATA) werden im Anschluss beschrieben. Es handelt sich dabei jeweils um eine Standardprozedur, die für alle Experimente verwendet wurde.

#### 4.5.1 TCEP-Modifizierung von Antikörpern und Markierung mit <sup>72/74/77</sup>As

1,25 mg Bevacizumab (8,3 nmol) in 50 µl Lösung werden auf 500 µl mit PBS-Puffer oder 0,9 %iger NaCl-Lösung aufgefüllt. Dazu werden 10 µl einer TCEP-Lösung in Wasser (12 mg/ml, 410 nmol) gegeben und direkt mit den 500 - 1000 µl \*As(III)-Lösung in PBS-Puffer von den verschiedenen Abtrennungsmethoden (MJ01 - MJ08) vereinigt. Die Lösung reagiert 1 h bei Raumtemperatur. Danach wird das überschüssige TCEP mittels Gelfiltration über eine HiTrap Desalting Säule an der HPLC abgetrennt. Man erhält 1,5 ml Lösung (ca. 800 µg) in PBS-Puffer (10 mM EDTA) oder 0,9 %iger NaCl. Diese Lösung ist direkt injektionsfertig. Zu verschiedenen Zeitpunkten werden 0,5 - 1 µl Aliquots auf eine DC-Platte gespottet, um mittels Radio-DC die Markierungsausbeute zu bestimmen (Laufmittel: 0,01 M Natriumtartrat / Methanol (3 : 1)). Zusätzlich werden Aliquots mittels Gelfiltrations-HPLC analysiert.

#### 4.5.2 SATA-Modifizierung von Antikörpern und Markierung mit <sup>72/74/77</sup>As

1,25 mg Bevacizumab (8,3 nmol) in 50 µl Lösung werden auf 500 µl mit PBS-Puffer oder 0,9 %iger NaCl-Lösung aufgefüllt. Dazu werden 10 µl einer SATA-Lösung in DMSO (10 mg/ml, 430 nmol) gegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wird der Überschuss an nicht reagiertem SATA durch eine Gelfiltration über eine HiTrap Desalting Säule mittels HPLC abgetrennt. Man erhält 1 ml Lösung (ca. 800 µg/ml) in PBS (10 mM EDTA) oder 0,9 %iger NaCl. Diese 1 ml Lösung wird direkt mit der \*As-Lösung in PBS (0,5 M Hydroxylamin, 25 mM EDTA) aus den einzelnen Abtrennungsmethoden (MJ01 - MJ08) vereinigt und für 1 h reagieren gelassen. Zu verschiedenen Zeitpunkten werden 0,5 - 1 µl Aliquots auf eine DC-Platte gespottet, um mittels Radio-DC die Markierungsausbeute zu bestimmen (Laufmittel: 0,01 M Natriumtartrat / Methanol (3 : 1)). Zusätzlich werden Aliquots mittels Gelfiltrations-HPLC analysiert. Der markierte Antikörper kann nach 1 h über eine Gelfiltrationssäule (HiTrap Desalting) von kleinen Molekülen gereinigt oder direkt injiziert werden.

#### 4.5.3 Erstellen einer Kalibrationsgeraden zur Bestimmung der Antikörperkonzentration

Der kommerziell erhältliche Antikörper Bevacizumab bekannter Konzentration (25 mg/ml) wurde auf verschiedene Konzentrationen zwischen 1,25 mg/ml und 0,156 mg/ml verdünnt. 50 µl dieser Lösungen wurden mit je 1950 µl PBS Puffer zu einem Gesamtvolumen von 2 ml aufgefüllt und in Quarzküvetten (d=10 mm) die UV-Absorption bei 280 nm gemessen. Zuvor wurde eine mit 2 ml PBS Puffer gefüllte Küvette bei 280 nm gemessen, um den Nullwert zu bestimmen. Die Antikörperkonzentration von unbekanntem Proben wurde bestimmt, indem

50 µl der Lösung mit PBS auf 2 ml aufgefüllt und die UV-Absorption bei 280 nm gemessen wurde.

#### 4.5.4 Erstellen einer Kalibrationsgeraden zur Bestimmung der Anzahl der SH-Gruppen pro Antikörpermolekül

Durch Lösen von 26,34 mg Cysteinhydrochlorid ( $M_w=175,6$  g/mol) in 100 ml PBS-Puffer (1 mM EDTA, pH 8) wird eine 1,5 mM Lösung (A) hergestellt. Es werden Proben mit verschiedenen Konzentrationen hergestellt, um eine Verdünnungsreihe zu messen (Tabelle 40).

Tabelle 40: Verdünnung von 1,5 mM Cysteinhydrochlorid Lösung bis zu 0,25 mM

<i>Standard</i>	<i>Puffer [ml]</i>	<i>Menge A [ml]</i>	<i>mM</i>
A	100	26,34 mg Cystein	1,5
B	5	25	1,25
C	10	20	1,00
D	15	15	0,75
E	20	10	0,5
F	25	5	0,25
G	30	0	0

Aus jeder der Standardlösungen A - G werden 250 µl entnommen und mit 2,5 ml PBS-Puffer (1 mM EDTA, pH 8) verdünnt. Dazu werden 50 µl Ellmans Reagenz (4 mg/ml) zugegeben. Die Lösung wird 15 min stehen gelassen und dann die UV-Absorption bei 412 nm in Quarzküvetten (d = 10 mm) gemessen.

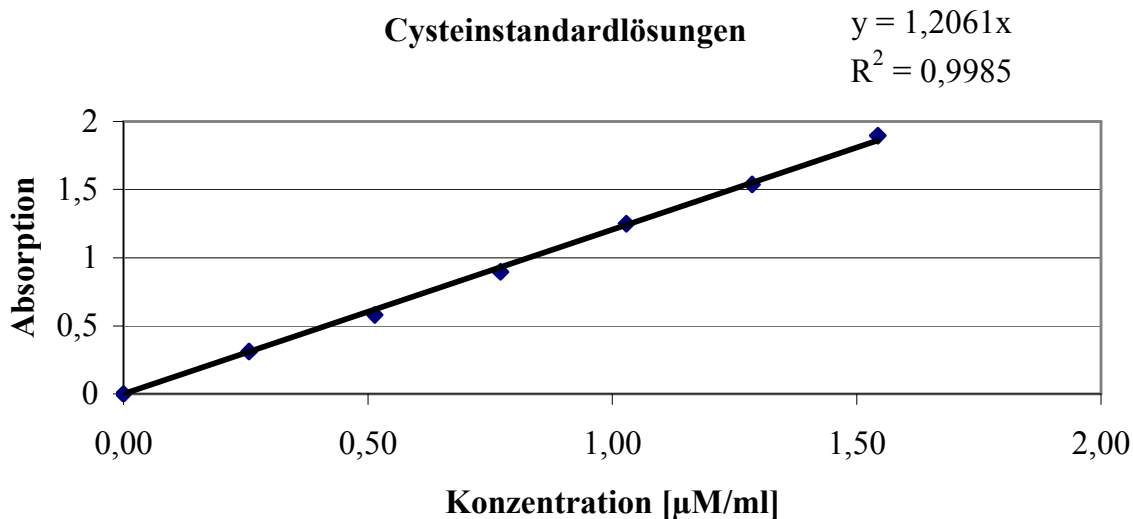


Abbildung 78: Verdünnungsreihe zur Bestimmung der Zahl der SH-Gruppen pro Antikörpermolekül

Mit dem Standard G wird der Nullwert bestimmt und von allen Messwerten abgezogen. Aus den Messwerten wird eine Kalibrationskurve erstellt. Mit einer unbekannt Probe wird analog verfahren. Aus den erhaltenen Konzentrationen kann bei bekannter Antikörperkonzentration dann die Zahl der SH-Gruppen pro Antikörper berechnet werden.

## 4.6 Phantommessungen mit $^{72/74}\text{As}$ und $^{18}\text{F}$ am Kleintier-PET-Scanner Focus 120

### 4.6.1 Herstellung der Plexiglasphantome

Für diese Arbeit wurden zwei verschiedene Plexiglasphantome in der mechanischen Werkstatt des Instituts für Kernchemie in Mainz hergestellt. Das Bohrlochphantom besteht aus einem Plexiglaszylinder (6,5 x 2,5 cm). In den Ecken eines gleichseitigen Dreiecks wurden jeweils Löcher mit absteigenden Durchmessern von 4, 3 und 2 mm in den Zylinder gebohrt (siehe Abbildung 79). Die Tiefe der einzelnen Bohrungen beträgt je 2 cm. Das Phantom besitzt ein Gesamtvolumen von ca. 1,5 ml und kann durch Aufschrauben einer Plexiglasscheibe verschlossen werden. Die radioaktive Lösung wird vor der Messung in die Bohrungen eingefüllt.



**Abbildung 79: Bohrlochphantom aus Plexiglas mit Bohrungen von 2, 3 und 4 mm Durchmesser**

Das 3-Stab-Phantom ist invers zu dem Bohrlochphantom konstruiert. Es besteht aus einem hohlen Plexiglaszylinder (8 cm hoch; 5 cm im Durchmesser). In diesem Zylinder sind drei Stäbe mit einem Durchmesser von 1 cm eingelassen. Ein Stab besteht aus massivem Teflon, während die beiden anderen aus 0,2 mm dickem Plexiglas bestehen. Einer der Stäbe ist mit Luft, der andere mit Wasser gefüllt (Abbildung 80). Die radioaktive Lösung kann in das Volumen zwischen den Stäben eingefüllt und mit einer Plexiglasschraube verschlossen werden. Das Phantom kann mit ca. 100 ml Lösung befüllt werden.

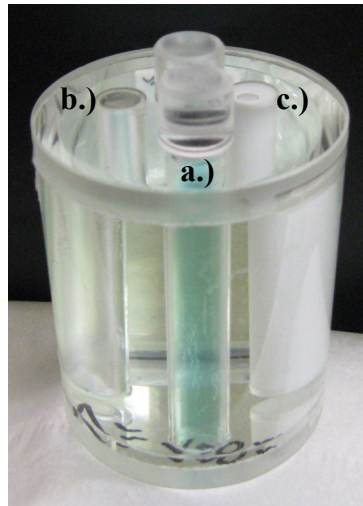


Abbildung 80: 3-Stab-Phantom aus Plexiglas a.) Wasser b.) Luft c.) Teflon

#### 4.6.2 Messung des mit $^{72}\text{As}$ , $^{74}\text{As}$ und $^{18}\text{F}$ befüllten Bohrlochphantoms am Kleintier-PET-Scanner Focus 120

Das Phantom wird kurz vor der Messung mit den entsprechenden Isotopen in 1,5 ml Lösung befüllt und zum Kleintier-PET transportiert. Eine Übersicht der eingesetzten Aktivität und Messdauer findet sich in Tabelle 41.

Tabelle 41: Aktivität und Messzeit der einzelnen im Bohrlochphantom vermessenen Isotope

<i>Isotop</i>	<i>Aktivität <math>^{18}\text{F}</math> [MBq]</i>	<i>Aktivität <math>^{74}\text{As}</math> [MBq]</i>	<i>Aktivität <math>^{72}\text{As}</math> [MBq]</i>	<i>Aktivität <math>^{76}\text{As}</math> [MBq]</i>	<i>Messzeit [h]</i>
$^{18}\text{F}$	10	-	-	-	1
$^{74}\text{As}$	-	0,75	-	-	10
$^{72}\text{As}$	0	2,1	6,9	2,5	1

Das  $^{18}\text{F}$  und das  $^{74}\text{As}$  wurden hierbei isotopenrein gemessen. Das  $^{72}\text{As}$  lag aufgrund der Bestrahlung von Germanium mit natürlicher Isotopenzusammensetzung im Gemisch mit  $^{74}\text{As}$  und  $^{76}\text{As}$  vor (siehe Tabelle 41).

### 4.6.3 Messung des mit $^{72}\text{As}$ , $^{74}\text{As}$ und $^{18}\text{F}$ befüllten 3-Stab-Phantoms am Kleintier-PET-Scanner Focus 120

Das Phantom wird kurz vor der Messung mit den entsprechenden Isotopen in 100 ml Lösung befüllt und zum Kleintier-PET transportiert. Eine Übersicht der eingesetzten Aktivität und Messdauer findet sich in Tabelle 42.

**Tabelle 42: Aktivität und Messzeit der einzelnen im 3-Stab-Phantom vermessenen Isotope**

<i>Isotop</i>	<i>Aktivität <math>^{18}\text{F}</math> [MBq]</i>	<i>Aktivität <math>^{74}\text{As}</math> [MBq]</i>	<i>Aktivität <math>^{72}\text{As}</math> [MBq]</i>	<i>Aktivität <math>^{76}\text{As}</math> [MBq]</i>	<i>Messzeit [h]</i>
$^{18}\text{F}$	20	-	-	-	1
$^{74}\text{As}$	-	3,7	0,3	0,1	2
$^{72}\text{As}$	-	4,5	7,9	2,8	1

Das  $^{18}\text{F}$  und das  $^{74}\text{As}$  wurden hierbei isotopenrein gemessen. Das  $^{72}\text{As}$  lag aufgrund der Bestrahlung von Germanium mit natürlicher Isotopenzusammensetzung im Gemisch mit  $^{74}\text{As}$  und  $^{76}\text{As}$  vor.

## 5 Zusammenfassung

Die Idee der Verwendung von Radioarsenisotopen zur molekularen Bildgebung stammt bereits aus der Anfangszeit der PET in den 50er bis 70er Jahren, als noch geträgertes anorganisches  $\text{Na}_3^{74}\text{AsO}_4$  zur Untersuchung des menschlichen Gehirns eingesetzt wurde. Danach verschwand dieses langlebige Isotop zunächst aus der Anwendung und dem Fokus der Forschung. Heutzutage besteht prinzipiell immer noch eine gewisse Lücke in der Verfügbarkeit von langlebigen Positronenemittern, die eine Beobachtung von radioaktiv markierten Substanzen über mehrere Tage hinweg möglich machen. Hier sind  $^{72}\text{As}$  und  $^{74}\text{As}$  bei der Entwicklung einer entsprechenden Markierungschemie potentielle Kandidaten, die sich durch eine lange Halbwertszeit kombiniert mit einer hohen Positronenemissionsrate auszeichnen.

Eine wichtige Anwendung von langlebigen Positronenemittern könnte in der Visualisierung der Anreicherung von Antikörpern in Tumorgewebe liegen. Dies ist im Allgemeinen ein sehr langsamer Prozess, der bis zu mehreren Tagen in Anspruch nimmt. Eine stabile Markierung vorausgesetzt, sind  $^{72/74}\text{As}$  durch ihre Zerfallscharakteristik sehr gut geeignet, diesen Prozess quantifizierbar zu beobachten. Eine Bindung von nca Arsenisotopen an Biomoleküle wie monoklonale Antikörper wurde bisher in der älteren Literatur nicht beschrieben.

Die Markierung von monoklonalen Antikörpern mit radioaktiven Arsenisotopen zur molekularen Bildgebung mittels PET wurde 2005 zum ersten mal ausserhalb der Mainzer Gruppe demonstriert [66, 155]. Zum Beginn dieser Arbeit war diese Methode jedoch nicht in Mainz etabliert, so dass aufbauend auf diesen ersten viel versprechenden Ergebnissen die gesamte Prozedur in Mainz etabliert werden sollte. Dazu mussten alle Bereiche von der Isotopenproduktion über die Targetaufarbeitung bis hin zur Markierungschemie entweder übernommen, oder dort wo Probleme auftraten, neue entwickelt werden.

### 1. Isotopenproduktion

Die Produktion der nca Arsenisotope wurde durch Bestrahlung von  $\text{GeO}_2$ -Targets mit Neutronen oder Protonen durchgeführt. Nca  $^{77}\text{As}$  wurde am Kernreaktor in Mainz hergestellt, während die Positronenemitter nca  $^{72/74}\text{As}$  am Zyklotron produziert wurden. Während die Bestrahlungen früher am Zyklotron in Brüssel durchgeführt wurden, konnte für diese Arbeit das Zyklotron des DKFZ in Heidelberg für eine Zusammenarbeit gewonnen werden. Es traten bei Bestrahlungen an den Hochflussreaktoren BER II und FRM II, in viel größerem Maße jedoch bei Bestrahlungen am Zyklotron durch thermische Effekte Veränderungen am Targetmaterial auf. Diese führten dazu, dass sich ein Teil der bestrahlten  $\text{GeO}_2$ -Targets nicht mehr in  $\text{HF}_{\text{konz}}$  löste, was zu einem effektiven Verlust an produzierter Aktivität von bis zu 50

% führte, die für die weitere Targetaufarbeitung verloren war. An Zyklotron waren diese Veränderungen am Targetmaterial hauptsächlich auf eine schlechte Kühlung zurückzuführen. Diese ist in der schlechten thermischen Leitfähigkeit des  $\text{GeO}_2$  und dem schlechten Kontakt der hergestellten  $\text{GeO}_2$ -Tablette begründet. Diese Kühlungsprobleme wurden gelöst, indem Germaniummetall als Targetmaterial für Bestrahlungen am Zyklotron verwendet wurde. Das Metall weist eine verbesserte thermische Leitfähigkeit gegenüber  $\text{GeO}_2$  auf und die glatte Oberfläche der 500  $\mu\text{m}$  dicken Germaniumscheibe garantiert einen guten Kontakt zu der Kühlung. Dazu hatte das Institut für Mikrotechnik in Mainz die einzige in der richtigen Geometrie erhältliche Germaniumplatte (5 x 5 x 0,5 cm) mit einem Lasersystem in Scheiben von 9,9 cm Durchmesser vereinzelt. Das neue Target konnte an einem anderen Strahlrohr des Zyklotrons mit optimierter Kühlung bestrahlt werden. Somit konnte der Strahlstrom im Vergleich zum  $\text{GeO}_2$ -Target von 5 auf 30  $\mu\text{A}$  und die Ladung von 20  $\mu\text{Ah}$  auf 200  $\mu\text{Ah}$  pro Bestrahlung gesteigert werden. Die Energie des Protonenstrahls wurde von 12 MeV bei  $\text{GeO}_2$ -Targets auf 15 MeV bei Metalltargets erhöht. Diese Energie ergab sich aus den in [141] gemessenen Werten der Anregungsfunktionen für die  $^{\text{nat}}\text{Ge}(\text{p},\text{xn})^{72/74}\text{As}$ -Reaktionen. Erst durch diese Optimierung stehen in Zukunft genug  $^{74}\text{As}$  und  $^{72}\text{As}$  (ca. 400 MBq und ca. 4 GBq  $^{72}\text{As}$  für eine 200  $\mu\text{Ah}$ -Bestrahlung bei Bestrahlungsende) für biologische Evaluierungen zur Verfügung. Die Optimierungen könnten in Zukunft auch noch auf die Variation der eingestrahlten Protonenenergie ausgeweitet werden, da sich die Ausbeute an  $^{72/74}\text{As}$  so eventuell noch erhöhen lässt. Am Mainzer TRIGA Mark II Reaktor wurde nca  $^{77}\text{As}$  routinemäßig durch Bestrahlung von  $\text{GeO}_2$ - und Germaniummetalltargets durchgeführt, um chemische Optimierungen an den Abtrennungs- und Markierungsmethoden durchzuführen. Dabei wurden im Schnitt mit 100 mg Germaniummetall nach 6 h Bestrahlung Ausbeuten von ca. 2 MBq  $^{77}\text{As}$  erzeugt.

## 2. Abtrennung der nca Arsenisotope aus dem Targetmaterial

Die Entwicklung der Abtrennungsmethoden gliedert sich in zwei Teile. Die ersten Abtrennungsmethoden wurden für  $\text{GeO}_2$ -Targets entwickelt und beruhten auf der Lösung des Targets in  $\text{HF}_{\text{konz}}$ . Danach wurde zur Verwendung von Germaniummetall als Targetmaterial übergegangen. Da sich Germaniummetall nicht in  $\text{HF}_{\text{konz}}$  löst, mussten hierfür neue Methoden entwickelt werden.

Zu Beginn dieser Arbeit wurde für die Trennung von  $^*\text{As}$  und Germanium aus bestrahlten  $\text{GeO}_2$ -Targets eine in einer Vorgängerarbeit entwickelte Festphasenextraktionsmethode verwendet [120]. Diese Methode konnte in einigen Parametern verbessert werden, was jedoch auf Kosten der Gesamtausbeute und der Dauer der gesamten Prozedur ging (MJ01). Deshalb wurde die Entwicklung schnellerer neuer Abtrennungsmethoden auf Basis der Flüssig-Flüssig-Extraktion vorangetrieben. Die Extraktion von  $^*\text{As}$  aus  $\text{HF}/\text{NaI}$ -,  $\text{HF}/\text{HBr}$ - und  $\text{HF}/\text{HCl}$ -Medium (MJ02 - MJ04) in  $\text{CCl}_4$  ist möglich, während das Germanium als  $\text{GeF}_6^{2-}$  in

der wässrigen Phase zurückbleibt. Die einzelnen Methoden unterscheiden sich nur in der Wahl des zugesetzten Reduktionsmittels (NaI, HBr, HCl). Das \*As wird aus der organischen Phase durch Rückextraktion in PBS-Puffer in eine markierungsfertige Lösung überführt. Während MJ02 (HF/NaI-Medium) nur eine Trennung von Ge und \*As ermöglicht, kann man mit MJ03 und MJ04 zusätzlich exzellente Markierungsausbeuten erhalten. Die einzelnen Abtrennungsmethoden für GeO<sub>2</sub>-Targets sind in Tabelle 43 gegenübergestellt.

**Tabelle 43: Vergleich der Abtrennungsausbeuten für GeO<sub>2</sub>-Targets mittels Festphasenextraktion (MJ01) und Flüssig-Flüssig-Extraktion (MJ02-MJ04)**

	<i>MJ01</i>	<i>MJ02</i>	<i>MJ03</i>	<i>MJ04</i>
	<i>Ausbeute [%]</i>	<i>Ausbeute [%]</i>	<i>Ausbeute [%]</i>	<i>Ausbeute [%]</i>
Extraktion <sup>77</sup> As in CCl <sub>4</sub>	---	102,03 ± 9,31	88,3 ± 1,6	47,5 ± 0,6
Extraktion <sup>77</sup> As in PBS	---	51,86 ± 28,68	58,2 ± 11,8	66,3 ± 4,2
Gesamtausbeute	39,6 ± 14,4	53,55 ± 29,21	51,4 ± 10,3	31,4 ± 1,6
Ge in PBS [µg]	60,1 ± 27	10,5 ± 6,9	16,9 ± 3,4	35,6 ± 0,3
Reinheit <sup>77</sup> As/ <sup>77</sup> Ge	99,93	99,99	99,98	99,95
Zeitlicher Aufwand [min]	90	15	15	15

Mit der Verwendung von Germaniummetalltargets ergaben sich andere Anforderungen an die Targetaufarbeitung, da es sich nicht wie das GeO<sub>2</sub> in HF löst. Es mehrere Methoden auf Ihre Eignung für Trennung und Markierung getestet.

Die erste eigene Idee bestand darin, die Flüssig-Flüssig-Extraktion von GeO<sub>2</sub>-Targets auch auf Germaniummetalltargets auszudehnen (MJ05). Dies gelingt nur, wenn man das Target in einer Mischung aus HF und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> löst und das überschüssige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> danach zerstört. Theoretisch sollte dies zu denselben Ausgangsbedingungen führen wie bei der Extraktion von \*As aus GeO<sub>2</sub>-Targets in HF/NaI-Medium. Der Umweg über die Verwendung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> führte zu ersten, wenn auch nicht sehr überzeugenden Ergebnissen. Zwar konnte eine bessere Trennung von Ge und \*As erreicht werden, jedoch war das in der finalen PBS-Phase enthaltene \*As nicht dazu geeignet, hohe Markierungsausbeuten zu erzielen. Im Zuge dieser ersten Versuche zur Aufarbeitung von Germaniummetalltargets kristallisierte sich jedoch Pt/C als Mittel der Wahl zur Zerstörung des überschüssigen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> heraus.

Einen alternativen Ansatz bietet die Aufarbeitung des Germaniummetalltargets durch Destillation und anschließendem Anionenaustausch (MJ06). Hierbei wird das Metall zunächst in Königswasser gelöst und das Germanium unter Zugabe von HCl als GeCl<sub>4</sub> aus der Lösung abdestilliert, während das \*As(V) als nicht flüchtiger Bestandteil in der Lösung zurückbleibt. Durch die anschließende Trennung auf einer Anionenaustauschersäule im HCl-Medium kann man die \*As(V)-Fraktion von den Resten des Germaniums, aber auch von während der Bestrahlung erzeugten Kontaminationen mit Gallium- und Zinkisotopen abtrennen. Die Methode liefert sehr sauberes \*As(V) in 10 M HCl, welches im Anschluss dann noch reduziert und in eine neutrale Lösung überführt werden muss.

Ein weiterer Ansatz der Trennung von Germanium und  $^{75}\text{As}$  besteht in einer direkten Trennung beider Elemente auf einer Anionenaustauschersäule (MJ07). Hierzu wurde das Germaniummetalltarget wegen der guten Erfahrungen analog MJ05 in  $\text{HF}/\text{H}_2\text{O}_2$  gelöst und das überschüssige  $\text{H}_2\text{O}_2$  durch Zugabe von Pt/C zerstört, damit kein Oxidationsmittel mehr in der Lösung zurückbleibt. Die Lösung wird dann auf einer Anionenaustauschersäule durch Elution mit  $\text{HF}/\text{HCl}$ -Lösungen getrennt. Hierbei laufen das Germanium und das als Nebenprodukt produzierte Gallium einfach durch die Säule, während das  $^{75}\text{As(V)}$  in späteren Fraktionen in 10 M HCl eluiert werden kann. Auch hier erhält man  $^{75}\text{As(V)}$  in 10 M HCl, muss es anschließend reduzieren und in eine neutrale Lösung überführen. Eine Übersicht über alle Abtrennungsmethoden für Germaniummetalltargets findet sich in Tabelle 44.

**Tabelle 44: Vergleich der Abtrennungsmethoden für Germaniummetalltargets (MJ05-MJ08)**

	<i>MJ05</i> <i>Ausbeute [%]</i>	<i>MJ06</i> <i>Ausbeute [%]</i>	<i>MJ07</i> <i>Ausbeute [%]</i>	<i>MJ08</i> <i>Ausbeute [%]</i>
Gesamtausbeute	44,2 ± 7,5	40,4 ± 1,7	45,3 ± 3,6	56,7 ± 14
Ge in PBS [µg]	2,2 ± 2,8	< Nachweisgrenze	7 ± 8,5	nicht bestimmt
Reinheit $^{77}\text{As}/^{77}\text{Ge}$	99,997	---	99,991	besser MJ07
Zeitlicher Aufwand [h]	1,5	5	5	5

### 3. Überführung des Radioarsens in eine zur Markierung von Proteinen geeignete Lösung und Speziation des Oxidationszustandes

Am Ende dieser Arbeit kann man zwei wichtige Randbedingungen für eine erfolgreiche Markierung von Antikörpern mit nca Arsenisotopen nennen. Zum einen ist das ein neutrales, wässriges Medium, zum Anderen der richtige Oxidationszustand des  $^{75}\text{As}$ . Mit SH-modifizierten Antikörpern reagiert ausschließlich das  $^{75}\text{As(III)}$ . Die Überführung des  $^{75}\text{As}$  aus einer konzentrierten Säure (je nach Abtrennungsmethode HF oder HCl) gelingt entweder durch Festphasenextraktion, oder durch Flüssig-Flüssig-Extraktion. Bei der Festphasenextraktion wird das  $^{75}\text{As}$  im ersten Schritt auf der Festphase fixiert, dann die Säure durch einen starken Argonstrom oder Zentrifugieren entfernt und das  $^{75}\text{As}$  schließlich mit EtOH wieder von der Säule eluiert. Bei der Flüssig-Flüssig-Extraktion wird das  $^{75}\text{As}$  aus der entsprechenden Säure zunächst in ein unpolares Lösungsmittel extrahiert, um die Säure abzutrennen. Im Anschluss kann das  $^{75}\text{As}$  dann wieder in eine neutrale wässrige Phase extrahiert werden.

Mit  $\gamma$ -Spektroskopie kann man zwar sehr genau die  $^{75}\text{As}$ -Ausbeute in den einzelnen Phasen bestimmen, jedoch lässt sich keine Aussage über den Oxidationszustand des  $^{75}\text{As}$  treffen. Es ist jedoch sehr wichtig den aktuellen Oxidationszustand einer  $^{75}\text{As}$ -Lösung zu kennen. Hierzu wurde eine Radio-DC-Methode entwickelt, mit der beide Oxidationszustände deutlich

voneinander zu trennen sind. Diese Methode kann zur Bestimmung des Oxidationszustandes in organischem Medium oder in neutralen wässrigen Lösungen angewendet werden. Für konzentrierte Säuren (HCl, HF) versagt diese Methode jedoch, da die DC-Platte hierbei beschädigt wird. Als Nebenprodukt der Säulentrennung in HCl, oder HF/HCl-Medium (MJ06 und MJ07) ergab sich jedoch die Möglichkeit,  $^{75}\text{As(V)}$  und  $^{75}\text{As(III)}$  aufgrund ihrer stark unterschiedlichen  $K_D$ -Werte in 10 M HCl zu trennen und somit den Oxidationszustand eindeutig zu bestimmen. Diese beiden Methoden brachten teilweise überraschende Erkenntnisse. So zeigte sich, dass NaI keineswegs wie in der Literatur beschrieben ein Reduktionsmittel für  $^{75}\text{As}$  ist. Vielmehr wirkt das gebildete Iod bei der Extraktion des  $^{75}\text{As}$  in die organische Phase als Oxidationsmittel und man erhält in der finalen PBS-Phase immer ein Gemisch beider Oxidationszustände. Dies erklärt die schlechten Markierungsausbeuten. Bis zu diesem Zeitpunkt wurde allgemein in der Literatur immer davon ausgegangen, dass man nur  $^{75}\text{As(III)}$  in organisches Medium extrahieren kann. Eine systematische Untersuchung der Reduktionsmittel NaI, HBr und CuCl mit der Radio-DC-Methode erbrachte die überraschende Erkenntnis, dass nur CuCl quasi quantitative Ausbeuten von  $^{75}\text{As(III)}$  nach Extraktion in  $\text{CCl}_4$  liefert. Beim Einsatz von HBr kann man durch Rückextraktion in PBS-Puffer vergleichbare Ausbeuten an  $^{75}\text{As(III)}$  erzielen. Mit den beiden Methoden zur Bestimmung des Oxidationszustandes konnte auch gezeigt werden, dass das  $^{75}\text{As}$  in am Kernreaktor bestrahlten  $\text{GeO}_2$ -Targets zunächst als  $^{75}\text{As(III)}$  vorliegt und dann erst im Laufe der Zeit zu  $^{75}\text{As(V)}$  oxidiert wird. Während diese Tatsache bereits in vorhergehenden Veröffentlichungen vermutet wurde [122, 124, 145, 146], konnte das Vorliegen von  $^{75}\text{As(III)}$  in dieser Arbeit bestätigt werden. Durch Lösen des  $\text{GeO}_2$ -Targets in HF/HCl-Medium anstatt in NaOH, wie es in der Literatur beschrieben ist, konnte das  $^{75}\text{As(III)}$  sogar ohne Zugabe von inaktivem Träger erhalten werden.

Die Flüssig-Flüssig-Extraktion aus HF/HCl-Medium führte zu den höchsten Ausbeuten an  $^{75}\text{As(III)}$ . Dies war möglich, obwohl HCl keine reduzierenden Eigenschaften für  $^{75}\text{As(V)}$  besitzt. Analog wurde herausgefunden, dass bei der Festphasenextraktion von  $^{75}\text{As}$  aus HF/NaI- und HCl/NaI-Medium (MJ01 und MJ08) in EtOH zunächst  $^{75}\text{As(V)}$  erhalten wird, was durch Zugabe von PBS-Puffer (0,5 M Hydroxylamin, 25 mM EDTA) zu  $^{75}\text{As(III)}$  reduziert werden kann. Alle entwickelten Abtrennungsmethoden liefern das  $^{75}\text{As}$  am Ende in 500  $\mu\text{l}$  PBS-Puffer (0,5 M Hydroxylamin, 25 mM EDTA), im Falle der Festphasenextraktionsmethoden sind noch 300 - 500  $\mu\text{l}$  EtOH in der Lösung enthalten. Diese Lösungen können direkt zur standardisierten Markierung von Antikörpern eingesetzt werden. Ein Vergleich aller Abtrennungsmethoden findet sich in Tabelle 45 und Tabelle 46.

**Tabelle 45: Vergleich des \*As(III)-Gehalts der Abtrennungsmethoden für GeO<sub>2</sub>-Targets mittels Festphasenextraktion (MJ01) und Flüssig-Flüssig-Extraktion (MJ02-MJ04)**

	<i>MJ01</i> <i>Ausbeute [%]</i>	<i>MJ02</i> <i>Ausbeute [%]</i>	<i>MJ03</i> <i>Ausbeute [%]</i>	<i>MJ04</i> <i>Ausbeute [%]</i>
Gesamtausbeute	39,6 ± 14,4	53,55 ± 29,21	51,4 ± 10,3	31,4 ± 1,6
*As(III) in PBS	98,5 ± 0,7	49,38 ± 3,82	93,4 ± 2,7	97,8 ± 0,3

**Tabelle 46: Vergleich des \*As(III)-Gehalts der Abtrennungsmethoden für Germaniummetalltargets (MJ05-MJ08)**

	<i>MJ05</i> <i>Ausbeute [%]</i>	<i>MJ06</i> <i>Ausbeute [%]</i>	<i>MJ07</i> <i>Ausbeute [%]</i>	<i>MJ08</i> <i>Ausbeute [%]</i>
Gesamtausbeute	44,2 ± 7,5	40,4 ± 1,7	45,3 ± 3,6	56,7 ± 14
*As(III) in PBS	48	96,7 ± 1,1	95,6 ± 2,6	95,6 ± 2,2

#### 4. Markierung von Proteinen am Beispiel von monoklonalen Antikörpern

Während dieser Arbeit wurden viele verschiedene Methoden zur Aufarbeitung von bestrahlten Germaniumtargets entwickelt. Um zu testen, ob die entsprechende Methode das \*As in einer Form liefert, die für Markierungen von Antikörpern geeignet ist, wurden Markierungsexperimente mit Antikörpern durchgeführt. Antikörper sind allgemein sehr teuer. Da für die Neuentwicklungen der Markierungschemie sehr viele Versuche notwendig waren (insgesamt wurden ca. 200 mg Antikörper verbraucht), musste zunächst ein Modellprotein gefunden werden, das sich zuallererst durch einen geringen Preis auszeichnet. Dieser Antikörper wurde in dem kommerziell verfügbaren Bevacizumab (Avastin<sup>®</sup>) gefunden, welches sich ebenfalls durch eine hohe Verfügbarkeit auszeichnet.

Die Markierungsversuche wurden sowohl mit SATA-modifiziertem als auch mit TCEP-modifiziertem Bevacizumab durchgeführt. Beide Methoden liefern freie SH-Gruppen an der Oberfläche des Antikörpers, so dass das \*As(III) mit ihnen reagieren kann. Eine realistische Chance auf eine Anwendung für *in vivo*-Experimente besteht für die beiden Abtrennungsmethoden MJ06 und MJ07. Sie liefern für beide Methoden der Antikörpermodifizierung sehr hohe Ausbeuten und der notwendigen Stabilität. MJ06 ist hierbei im Prinzip zu bevorzugen, wenn es gelingt, einige kleinere Schwachstellen, wie beispielsweise eine nicht immer quantitative Abtrennung überschüssiger HNO<sub>3</sub>, erfolgreich zu beheben. Es konnten jedoch auch einige fundamentale Daten erhalten werden. So steht nun einwandfrei fest, dass nur \*As(III) geeignet ist, Antikörper zu markieren. Liegt \*As(V) in der Lösung vor, so reagiert es nicht. Die geringe Zahl der gebildeten freien SH-Gruppen (SATA 3 – 4, TCEP 5 – 8 SH-Gruppen/mab; Gesamtprobe niedriger nannomolarer Bereich) reichen nicht aus, um das \*As(V) zu \*As(III) zu reduzieren. Dies wird nur bei einigen Thiolen wie z.B. Thiophenol in deutlich höheren Konzentrationen beobachtet. Eine Übersicht der mit den

einzelnen Abtrennungsmethoden erzielten Markierungsausbeuten findet sich in Tabelle 47 und Tabelle 48.

**Tabelle 47: Vergleich der Abtrennungsmethoden für GeO<sub>2</sub>-Targets mittels Festphasenextraktion (MJ01) und Flüssig-Flüssig-Extraktion (MJ02-MJ04)**

	<i>MJ01</i> <i>Ausbeute [%]</i>	<i>MJ02</i> <i>Ausbeute [%]</i>	<i>MJ03</i> <i>Ausbeute [%]</i>	<i>MJ04</i> <i>Ausbeute [%]</i>
Markierungsausbeute TCEP [1 h]	> 90	56,6	90 ± 1,2	95,4 ± 0,3

\* 1,25 mg Bevacizumab mit \*As-Lösung und TCEP für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert

**Tabelle 48: Vergleich der Abtrennungsmethoden für Germaniummetalltargets (MJ05-MJ08)**

	<i>MJ05</i> <i>Ausbeute [%]</i>	<i>MJ06</i> <i>Ausbeute [%]</i>	<i>MJ07</i> <i>Ausbeute [%]</i>	<i>MJ08</i> <i>Ausbeute [%]</i>
Markierungsausbeute TCEP [1 h]	18	Quantitativ (HPLC)	Quantitativ (HPLC)	Quantitativ (HPLC)
Stabilität	nicht bestimmt	> 8 Tage stabil	Nicht bestimmt	nicht bestimmt
Markierungsausbeute SATA [1 h]	---	Quantitativ (HPLC)	84,7 ± 0,77	44 % (HPLC)
Stabilität	---	> 1 Tag*	Nicht bestimmt	nicht bestimmt

\* Wegen der zu geringen Aktivität konnte die Stabilität nicht über einen längeren Zeitraum bestimmt werden

## 5. Phantommessungen von <sup>72</sup>As, <sup>74</sup>As und <sup>18</sup>F an der Kleintier-PET-Kamera Fokus 120 der Universität Mainz

Da <sup>72/74</sup>As keine Standardisotope sind, liegen auch keinerlei Daten über ihre Eignung als PET Isotope an einem Kleintier-PET-Scanner vor. Diese Lücke wurde nun in einigen ersten Experimenten zumindest etwas geschlossen. Dazu konnten die drei Isotope <sup>72</sup>As, <sup>74</sup>As und zum Vergleich <sup>18</sup>F als Referenz in einem Bohrloch- und einem 3-Stub-Phantom am Kleintier-PET-Scanner in Mainz gemessen werden. Die Messungen zeigen, dass <sup>74</sup>As im Bohrlochphantom eine ähnliche Auflösung wie <sup>18</sup>F liefert, während <sup>72</sup>As nur eine geringere Auflösung liefern kann. Dies liegt zum Einen an dessen deutlich höherer β<sup>+</sup>-Energie und zum Anderen an der durch die Nuklidproduktion bedingte Verunreinigung mit <sup>74</sup>As und <sup>76</sup>As, deren zusätzlicher γ-Untergrund mitten im Energiefenster der PET-Kamera liegt. Zum Vergleich stand isotonenreines <sup>72</sup>As während dieser Arbeit nicht zur Verfügung, so dass die Effekte des γ-Untergrundes nicht abgeschätzt werden können.

Dieser Befund bestätigt sich noch deutlicher im 3-Stub-Phantom, wo mit <sup>72</sup>As viel mehr Artefakte und eine schon rein optisch wahrnehmbare schlechtere Auflösung erhalten werden. Aus den erhaltenen Daten kann man resümieren, dass <sup>74</sup>As trotz der geringeren Positronenemissionswahrscheinlichkeit das deutlich bessere PET-Nuklid für Messungen am Kleintier-PET sind.

Im Human-PET, wo die zu untersuchenden Strukturen deutlich größer sind und die Ortsauflösungen prinzipiell etwas schlechter sind (ca. 1,8 mm im  $\mu$ -PET vs. 3 - 4 mm im Human-PET-CT-Scanner), könnten sich die Nachteile des  $^{72}\text{As}$  jedoch relativieren.

Will man hochaufgelöste PET-Bilder erhalten, sollte man bei der gewählten Produktionsroute für  $^{74}\text{As}$  über die (p,n)-Reaktion an natürlichem Germanium das bestrahlte Target ca. 1 Woche abklingen lassen, damit die kurzlebigen Isotope  $^{72}\text{As}$  und  $^{76}\text{As}$  abgeklungen sind, bevor die PET-Messungen starten.

## 6 Ausblick

Nachdem diese Arbeit einen großen Überblick über die prinzipiellen Möglichkeiten der Abtrennung von  $^{76}\text{As}$  aus Germaniumtargets und die Möglichkeit der Markierung von Antikörpern mit den erhaltenen  $^{76}\text{As}$ -Lösungen geliefert hat, muss nun eine Entscheidung getroffen werden, auf welche der Abtrennungsmethoden in Zukunft der Fokus gelegt werden soll. Hierbei stehen bei der Verwendung von Germaniummetall als Targetmaterial für Zyklotronbestrahlungen nun MJ06 - MJ08 zur Auswahl. Im Falle des besseren Zugriffs auf ein Zyklotron lohnt es sich auf jeden Fall, über die Verwendung von  $\text{GeO}_2$  als Targetmaterial nachzudenken, da mit MJ03 und MJ04 zwei sehr schnelle Abtrennungsmethoden für  $^{76}\text{As(III)}$  aus  $\text{GeO}_2$ -Targets zur Verfügung stehen. Hierzu ist es jedoch nötig, sich intensiv um das Problem der Targetkühlung zu kümmern, was in der vorliegenden Arbeit leider nicht möglich war.

Neben der reinen Stabilität der markierten Antikörper in der Markierungslösung muss in Zukunft auch die Stabilität der  $^{76}\text{As}$ -Protein-Bindung *in vivo* getestet werden, was während dieser Arbeit nicht möglich war. Abhängig von dem Ergebnis müssen dann weitere Schritte wie z.B. die gesamte Evaluierung von  $^{76}\text{As}$ -markierten Antikörpern *in vivo* mittels PET erfolgen. Sollten die Verbindungen sich *in vivo* nicht als über einen langen Zeitraum stabil erweisen, muss über ein neues Konzept der Bindung des  $^{76}\text{As}$  an den Antikörper nachgedacht werden. Das aktuell verwendete Konzept der Reaktion von  $^{76}\text{As(III)}$  mit freien SH-Gruppen krankt im vorliegenden Fall der SATA- und TCEP-modifizierten Antikörper daran, dass das  $^{76}\text{As(III)}$  wahrscheinlich nur mit einer SH-Gruppe reagiert und noch zwei freie Valenzen aufweist. Diese können theoretisch weiterreagieren. Die Synthese eines dreizähligen SH-Liganden (z.B.  $\text{NS}_3$  [166]), der analog DOTA für  $\text{Me}^{3+}$  alle Valenzen des  $^{76}\text{As(III)}$  absättigen würde, erscheint präparativ sehr schwierig, da SH Gruppen zur Autooxidation neigen. Eine Alternative würde sich im Design eines alternativen Markierungssynthons wie z.B.  $(\text{CH}_3)_2\text{AsOH}$  oder  $(\text{CH}_3)_2\text{AsCl}$  bieten. Letzteres wurde bereits in geträgerter Form aus  $^{76}\text{As}_2\text{O}_3$  hergestellt und die Reaktion mit freien SH-Gruppen nachgewiesen [64, 65]. Da die zugrunde liegende Chemie auf Stöchiometrie beruht, erscheint eine einfache Übertragung auf das nca-As-System nicht möglich, allerdings wurden auf diesem Gebiet bisher keinerlei eigene Versuche unternommen. Es existiert eine Vielzahl von metallorganischen Arsenverbindungen, deren radioaktive Synthese prinzipiell möglich erscheint [167] und deren Eignung als Markierungssynthon evaluiert werden könnte. Im Fall einer erfolgreichen Evaluierung kann über den Einsatz von  $^{77}\text{As}$  als therapeutisches Nuklid nachgedacht werden.

Neben dieser, den aktuellen Forschungsgegenstand dieser Arbeit betreffenden Fragen, kann man sich noch eine ganze Reihe von anderen Möglichkeiten vorstellen, Radioarsenisotope in der molekularen Bildgebung einzusetzen. Die Markierung von Antikörpern stellt gewissermaßen eine Art „Königsdisziplin“ dar, da diese Biomoleküle extrem empfindlich

gegenüber äußeren Einflüssen wie Temperatur, pH-Wert, oder dem Vorhandensein von organischen Lösungsmitteln sind. Auch muss bei den Antikörpern darauf geachtet werden, dass nicht zu viele SH-Gruppen im Antikörpermolekül generiert werden, da dies seine Eigenschaften stark verändern kann. Viel einfacher sollte die Markierung von unempfindlicheren Molekülen wie beispielsweise synthetischen Polymeren sein, da diese sowohl organische Lösungsmittel als auch bei höheren Temperaturen stabil sind. Ihre Affinität *in vivo* zu soliden Tumoren beruht einzig und allein auf ihrer Größe (ca. 100 - 500 nm), dem von Nanopartikeln her bekannten EPR-Effekt (enhanced permeability and retention). Da die den Tumor mit Nährstoffen versorgenden Blutgefäße nicht vollständig mit Epithelzellen ausgekleidet sind, können die großen Partikel in den interzellulären Raum diffundieren und sich dort anreichern. Sind die Polymere radioaktiv markiert, kann man somit den Tumor sichtbar machen. Man kann sich also Polymere mit sehr viel mehr SH-Gruppen vorstellen, die dann z.B. mit  $^{75}\text{As}$  leicht zu markieren sein sollten. Da es sich um große Moleküle handelt, kann auch auf das im Zusammenhang mit Antikörpern erworbene know-how der Gelfiltration zur Aufreinigung der markierten Substanzen zurückgegriffen werden. Erste Versuche auf dem Gebiet der Markierung von Polymeren wurden bereits mit  $^{18}\text{F}$  durchgeführt [165]. Erste Versuche der  $^{75}\text{As}$ -Markierung von SH-Gruppen tragenden Polymeren wurden ebenfalls durchgeführt und zeigten, dass die prinzipielle Machbarkeit des Konzepts durchaus gegeben ist. Es konnten aber bisher relativ geringe Ausbeuten von ca. 15 % erzielt werden und da die Markierung im organischen Medium durchgeführt werden muss, sind noch viele offene Fragen zu beantworten.

Eine Anwendung von freiem  $^{75}\text{As(III)}$  könnte auch in der näheren Untersuchung verschiedener Formen der Leukämie liegen (APL, CML). Das Medikament Trisenox<sup>®</sup> ist seit einigen Jahren auf dem Markt [47] und besteht im Prinzip aus einer Lösung von  $\text{As}_2\text{O}_3$  (ATO) in Wasser. Das aus den Abtrennungsmethoden gewonnene  $^{75}\text{As(III)}$  sollte ein nca Äquivalent dieses Medikaments sein und dessen Verteilung *in vivo* wiedergeben können, wenn entsprechende Tiermodelle vorhanden sind. Dies könnte zu neuen Erkenntnissen über die Wirkung von ATO führen.

## 7 Anhang

### 7.1 Verwendete Chemikalien

Für die radiochemische Aufarbeitung und die Markierungsreaktionen wurden folgende Chemikalien verwendet:

**Tabelle 49: Aufstellung der verwendeten Chemikalien**

	<i>Chemikalie</i>	<i>Reinheit</i>	<i>Firma</i>
1	Fluorwasserstoffsäure (49 %)	TraceSelect Ultra (0,1 µg/kg As)	Sigmaaldrich
2	Bromwasserstoffsäure (47 %)	Suprapur (<0,5 ppb As)	VWR/Merck
3	Salzsäure (30 %)	Suprapur (<1 ppb As)	VWR/Merck
4	Salpetersäure (65 %)	Suprapur (<0,5 ppb As)	VWR/Merck
5	Natriumiodid	99,999 % trace metal basis (0,2 ppm As)	Sigmaaldrich
6	Kupfer(I)chlorid	99,995+ % trace metal basis	Sigmaaldrich
7	Hydroxylamin hydrochlorid	99,9999 %	Sigmaaldrich
8	Germanium für Zyklotron	99,999 % (0,1 ppm As)	Goodfellow
9	Germanium für Reaktor	99,9999+ %	Chempur
10	Germanium(IV)oxid	99,999 %	Strem
11	PBS-Puffer		Pierce
12	NaCl-Lösung (0,9 %)		Braun
13	CCl <sub>4</sub>		Sigmaaldrich
14	HI		Riedel de Häen
15	TCEP		Pierce
16	Pt/C (10 %)		Fluka
17	As <sub>2</sub> O <sub>5</sub>		Fluka
18	Ethanol		Acros

## 7.2 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Metabolismus des Arsens im Menschen [48].....	16
<b>Abbildung 2:</b> Qualitative Darstellung des Verteilungskoeffizienten von Ge(IV) und As(V) auf dem Anionenaustauscherharz Dowex 1-X10 [69] in HCl-Lösungen.....	21
<b>Abbildung 3:</b> Ausschnitt aus der Karlsruher Nuklidkarte mit allen relevanten Arsenisotopen.....	22
<b>Abbildung 4:</b> Struktureller Aufbau eines IgG-Antikörpers und von Antikörperfragmenten [131].....	29
<b>Abbildung 5:</b> a.) GeO <sub>2</sub> Zyklotrontarget nach Bestrahlung b.) GeO <sub>2</sub> Zyklotrontarget nach Lösen in HF <sub>konz.</sub> .....	35
<b>Abbildung 6:</b> a.) Zyklotron Germaniumtargets b.) Germaniumplatte c.) Reaktor Germaniumtarget.....	36
<b>Abbildung 7:</b> Anregungsfunktionen für <sup>nat</sup> Ge(p,x)*As-Reaktionen [141].....	39
<b>Abbildung 8:</b> Zeitlicher Verlauf der Aktivität (a.) und der Positronenemission (b.) der am Zyklotron erzeugten Radioarsenisotope (E <sub>p</sub> = 15 MeV, 20 µA, 5 h) .....	42
<b>Abbildung 9:</b> Gammaskpektrum von <sup>76</sup> As a.) logarithmische Darstellung b.) lineare Darstellung.....	44
<b>Abbildung 10:</b> Gammaskpektrum von <sup>77</sup> As a.) logarithmische Darstellung b.) lineare Darstellung.....	45
<b>Abbildung 11:</b> Gammaskpektrum von <sup>77</sup> Ge a.) logarithmische Darstellung b.) lineare Darstellung.....	47
<b>Abbildung 12:</b> Gammaskpektrum von <sup>74</sup> As a.) logarithmische Darstellung b.) lineare Darstellung.....	48
<b>Abbildung 13:</b> Gammaskpektrum von <sup>72</sup> As a.) logarithmische Darstellung b.) lineare Darstellung.....	49
<b>Abbildung 14:</b> Gammaskpektrum von <sup>67</sup> Ga a.) logarithmische Darstellung b.) lineare Darstellung.....	50
<b>Abbildung 15:</b> Pe-pH-Diagramm von Arsen in Wasser bei 25 °C [142] und Eh-pH-Diagramm von Arsen .....	51
<b>Abbildung 16:</b> <sup>77</sup> As(V), <sup>77</sup> As(III), <sup>77</sup> As markierter Antikörper Bevacizumab und Standardmarkierungen zur Bestimmung der Rf-Werte. Laufmittel: 0,01 M Natriumtartrat / Methanol (3 : 1).....	52
<b>Abbildung 17:</b> Exemplarisches Elutionsprofil von <sup>77</sup> Ge, <sup>77</sup> As(V) und <sup>77</sup> As(III) auf dem Anionenaustauscher AG 1-X8.....	54
<b>Abbildung 18:</b> Modifizierung eines Antikörpers mit SATA.....	56
<b>Abbildung 19:</b> Entschützung eines SATA-modifizierten Antikörpers mit Hydroxylamin.....	57
<b>Abbildung 20:</b> Reduktion von Disulfidbrücken mit TCEP.....	58
<b>Abbildung 21:</b> Eichgerade zur Bestimmung der Antikörperkonzentration mittels UV-Vis-Spektroskopie.....	59
<b>Abbildung 22:</b> Verwendung von Ellman's Reagenz zur Bestimmung der SH-Gruppen Konzentration.....	60
<b>Abbildung 23:</b> Schematische Darstellung der Abtrennung von *As aus GeO <sub>2</sub> -Targets mittels Festphasenextraktion.....	61
<b>Abbildung 24:</b> Radio-DC zur Bestimmung des Oxidationszustandes: a.) Ethanol; b.) PBS-Puffer.....	64
<b>Abbildung 25:</b> Stabilität von <sup>77</sup> As-VG76e 100 h nach Markierung mit SEC-HPLC a.) UV (280 nm) b.) Radiodetektor.....	67
<b>Abbildung 26:</b> Stabilität von <sup>77</sup> As-VG76e in 1 mg BSA 64 h nach Markierung mit SEC-HPLC a.) UV (280 nm) b.) Radiodetektor.....	67
<b>Abbildung 27:</b> Schematische Darstellung der Abtrennung von *As aus GeO <sub>2</sub> -Targets mittels Flüssig-Flüssig-Extraktion nach Zugabe von NaI.....	69
<b>Abbildung 28:</b> Radio DC zur Bestimmung des Oxidationszustandes: a.) CCl <sub>4</sub> ; b.) PBS-Puffer.....	71
<b>Abbildung 29:</b> Reaktionsverlauf der Markierung von Bevacizumab mit <sup>77</sup> As unter Verwendung von TCEP bei Raumtemperatur mittels Radio-DC bestimmt.....	73
<b>Abbildung 30:</b> Radiosignal der Gelfiltrations-HPLC 1 h nach Reaktionsbeginn.....	74
<b>Abbildung 31:</b> Schematische Darstellung der Abtrennung von *As aus GeO <sub>2</sub> -Targets mittels LLE nach Zugabe von HBr.....	74
<b>Abbildung 32:</b> Radio-DC zur Bestimmung des Oxidationszustandes von *As: a.) CCl <sub>4</sub> b.) PBS.....	76
<b>Abbildung 33:</b> Reaktionskinetik von <sup>77</sup> As-Bevacizumab bei Raumtemperatur.....	78
<b>Abbildung 34:</b> <sup>77</sup> As-Bevacizumab mit Radio-HPLC a.) UV 280 nm b.) Radio-Detektor.....	79
<b>Abbildung 35:</b> Schematische Darstellung der Abtrennung von *As aus GeO <sub>2</sub> -Targets mittels LLE nach Zugabe von HCl.....	79
<b>Abbildung 36:</b> Radio-DC zur Bestimmung des Oxidationszustandes von <sup>77</sup> As: a.) CCl <sub>4</sub> b.) PBS.....	81
<b>Abbildung 37:</b> Reaktionskinetik von <sup>77</sup> As-Bevacizumab (*As mit MJ04 abgetrennt) bei Raumtemperatur mittels Radio-DC bestimmt.....	83
<b>Abbildung 38:</b> Markierungsausbeute <sup>77</sup> As-Bevacizumab nach 1 h mit Radio-HPLC bestimmt a.) UV 280 nm b.) Radio-Detektor.....	84
<b>Abbildung 39:</b> Schematische Darstellung der Abtrennung von *As aus Germaniummetalltargets mittels LLE aus HF/HI-Medium.....	84
<b>Abbildung 40:</b> Radio-DC zur Bestimmung des Oxidationszustandes in Germaniumtargets a.) CCl <sub>4</sub> ; b.) PBS-Puffer.....	87
<b>Abbildung 41:</b> Markierungsausbeute <sup>74</sup> As-Bevacizumab (GeO <sub>2</sub> -Target mit MJ05 abgetrennt) nach 4 h mit Radio-HPLC bestimmt a.) UV 280 nm b.) Radio-Detektor; Flow: 1 ml/min.....	89
<b>Abbildung 42:</b> Radio-DC zur Bestimmung des Oxidationszustandes: a.) CCl <sub>4</sub> b.) PBS.....	91

<b>Abbildung 43:</b> Extraktion von $^{76}\text{As(III)}$ in $\text{CCl}_4$ und Rückextraktion in PBS-Puffer nach Reduktion mit $\text{CuCl}$ bei $60^\circ\text{C}$ .....	94
<b>Abbildung 44:</b> Radio-DC zur Bestimmung des Oxidationszustandes nach Reduktion mit $\text{CuCl}$ : a.) $\text{CCl}_4$ b.) PBS.....	95
<b>Abbildung 45:</b> Qualitative Darstellung der Verteilungskoeffizienten von $\text{Zn(II)}$ , $\text{Ga(III)}$ , $\text{Ge(IV)}$ , $\text{As(III)}$ und $\text{As(V)}$ auf dem Anionenaustauscher Dowex 1-X10 in $\text{HCl}$ -Lösungen [69].....	100
<b>Abbildung 46:</b> Elutionsprofil von $^{77}\text{As(V)}$ auf AG 1-X8. F1-F9: 10 M $\text{HCl}$ , F9-F16 7 M $\text{HCl}$ , ab F17 0,1 M $\text{HCl}$ .....	101
<b>Abbildung 47:</b> Typisches Elutionsprofil für $^{77}\text{As(V)}$ , $^{72}\text{Ga(III)}$ und $^{69\text{m}}\text{Zn(II)}$ auf AG 1-X8 in 10 M $\text{HCl}$ . Ab F11 Elution mit 0,1 N $\text{HCl}$ .....	102
<b>Abbildung 48:</b> Typisches Elutionsprofil für $^{72}\text{As(V)}$ und $^{67}\text{Ga(III)}$ AG 1-X8 in 10 M $\text{HCl}$ . Ab F11 Elution mit 0,1 N $\text{HCl}$ .....	103
<b>Abbildung 49:</b> Radio-DC zur Bestimmung des Oxidationszustandes von *As nach Reduktion mit $\text{CuCl}$ : a.) $\text{CCl}_4$ b.) PBS.....	106
<b>Abbildung 50:</b> Reaktionskinetik $^{77}\text{As}$ -Bevacizumab bei Raumtemperatur, mittels Radio-DC bestimmt.....	108
<b>Abbildung 51:</b> Markierungsausbeute $^{77}\text{As}$ -Bevacizumab nach 1 h mit Gelfiltrations-HPLC bestimmt a.) UV 280 nm b.) Radio-Detektor.....	108
<b>Abbildung 52:</b> Stabilität von $^{74}\text{As}$ -Bevacizumab 8 Tage nach Synthese mittels Gelfiltrations-HPLC bestimmt a.) UV 280 nm b.) Radio-Detektor.....	109
<b>Abbildung 53:</b> Markierungsausbeute $^{77}\text{As}$ -SATA-Bevacizumab nach 1 h mit Gelfiltrations-HPLC bestimmt a.) UV 280 nm b.) Radio-Detektor.....	110
<b>Abbildung 54:</b> Qualitative Darstellung der Verteilungskoeffizienten von $\text{Zn(II)}$ , $\text{Ga(III)}$ , $\text{Ge(IV)}$ , $\text{As(III)}$ und $\text{As(V)}$ auf dem Anionenaustauscher Dowex 1-X10 in $\text{HCl}$ -Lösungen mit 1 M $\text{HF}$ .....	111
<b>Abbildung 55:</b> Typisches Elutionsprofil für in $\text{HF}/\text{H}_2\text{O}_2$ gelöste Germaniumtargets auf AG 1-X8.....	113
<b>Abbildung 56:</b> Schematische Darstellung der Abtrennung von *As aus Germaniummetalltargets mittels Anionenaustausch und Flüssig-Flüssig-Extraktion.....	113
<b>Abbildung 57:</b> Elutionsprofil von $^{77}\text{Ge(IV)}$ , $^{72}\text{Ga(III)}$ und $^{77}\text{As(V)}$ auf dem Anionenaustauscher AG 1-X8 F2 - F5 2 M $\text{HF}/10$ M $\text{HCl}$ , F6 - F11 10 M $\text{HCl}$ , F12 - F16 0,1 M $\text{HCl}$ .....	115
<b>Abbildung 58:</b> Elutionsprofil von $^{67}\text{Ga(III)}$ und $^{72}\text{As(V)}$ auf dem Anionenaustauscher AG 1-X8 F2 - F5 2 M $\text{HF}/10$ M $\text{HCl}$ , F6 - F11 10 M $\text{HCl}$ , F12 - F16 0,1 M $\text{HCl}$ .....	116
<b>Abbildung 59:</b> Radio-DC zur Bestimmung des Oxidationszustandes von *As nach Reduktion mit $\text{HBr}$ : a.) $\text{CCl}_4$ b.) PBS.....	118
<b>Abbildung 60:</b> Reaktionskinetik $^{77}\text{As}$ -SATA-Bevacizumab bei Raumtemperatur mittels Radio-DC bestimmt.....	120
<b>Abbildung 61:</b> Markierungsausbeute $^{77}\text{As}$ -SATA-Bevacizumab nach 1 h mit Gelfiltrations-HPLC bestimmt a.) UV 280 nm b.) Radio-Detektor.....	120
<b>Abbildung 62:</b> Schematische Darstellung der Abtrennung von *As aus Germaniummetalltargets mittels Anionenaustausch und Festphasenextraktion.....	121
<b>Abbildung 63:</b> Radio-DC zur Bestimmung des Oxidationszustandes von *As nach SPE aus $\text{HCl}/\text{NaI}$ -Medium a.) $\text{EtOH}$ b.) $\text{EtOH} + \text{PBS}$ .....	123
<b>Abbildung 64:</b> Reaktionskinetik $^{74}\text{As}$ -SATA-Bevacizumab bei Raumtemperatur mittels Radio-DC bestimmt.....	125
<b>Abbildung 65:</b> Markierungsausbeute $^{74}\text{As}$ -SATA-Bevacizumab nach 1 h mit Gelfiltrations-HPLC bestimmt a.) UV 280 nm b.) Radio-Detektor.....	125
<b>Abbildung 66:</b> Reaktionskinetik $^{77}\text{As}$ -Bevacizumab bei Raumtemperatur mittels Radio-DC bestimmt.....	126
<b>Abbildung 67:</b> Markierungsausbeute $^{77}\text{As}$ -Bevacizumab nach 1 h mit Gelfiltrations-HPLC bestimmt a.) UV 208 nm b.) Radio-Detektor.....	126
<b>Abbildung 68:</b> Berechnete mittlere absorbierte Positronenenergie von $^{18}\text{F}$ , $^{72}\text{As}$ und $^{74}\text{As}$ in Wasser .....	131
<b>Abbildung 69:</b> PET-Bild der coronalen und sagittalen Ansicht des mit $^{74}\text{As}$ befüllten Bohrlochphantoms.....	133
<b>Abbildung 70:</b> Transmissionsmessung 3-Stab-Phantom mit $^{57}\text{Co}$ a.) transversal b.) coronal c.) sagittal.....	134
<b>Abbildung 71:</b> Mit $^{18}\text{F}$ gefülltes 3-Stab-Phantom a.) ohne b.) mit Streu- und Schwächungskorrektur.....	135
<b>Abbildung 72:</b> Mit $^{74}\text{As}$ gefülltes 3-Stab-Phantom a.) ohne b.) mit Streu- und Schwächungskorrektur.....	135
<b>Abbildung 73:</b> Mit $^{72}\text{As}$ gefülltes 3-Stab-Phantom a.) ohne b.) mit Streu- und Schwächungskorrektur.....	135
<b>Abbildung 74:</b> Varian Bond Elut ENV Kartusche (25 mg) mit PEEK-Adapter für Einwegspritze.....	141
<b>Abbildung 75:</b> Schematische Zeichnung der Destillationsapparatur für Germaniummetalltargets.....	146
<b>Abbildung 76:</b> Glassäule mit AG 1-X8 gefüllt.....	147
<b>Abbildung 77:</b> Plastiksäule (0,9 x 6,5 cm) mit AG 1-X8 befüllt.....	149
<b>Abbildung 78:</b> Verdünnungsreihe zur Bestimmung der Zahl der SH-Gruppen pro Antikörpermolekül.....	153
<b>Abbildung 79:</b> Bohrlochphantom aus Plexiglas mit Bohrungen von 2, 3 und 4 mm Durchmesser.....	154
<b>Abbildung 80:</b> 3-Stab-Phantom aus Plexiglas a.) Wasser b.) Luft c.) Teflon.....	155

## 7.3 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Zerfallseigenschaften von Arsenisotopen [72, 73].....	22
<b>Tabelle 2:</b> Auswahl einiger langlebiger Positronenemitter [135] .....	31
<b>Tabelle 3:</b> Produktionsraten bei einer 6 h Bestrahlung von 100 mg Ge-Metall im ZB am TRIGA.....	37
<b>Tabelle 4:</b> Kernreaktionen von <sup>nat</sup> Ge mit thermischen Neutronen [138].....	38
<b>Tabelle 5:</b> Kernreaktionen von <sup>nat</sup> Ge mit schnellen Neutronen [138] .....	38
<b>Tabelle 6:</b> Gemessene Produktionsausbeuten für Arsenisotope bei Bestrahlungsende (EOB) (E <sub>p</sub> = 15 MeV, 30 μA, 1 h) .....	40
<b>Tabelle 7:</b> Berechnete Aktivität bei EOB und zeitlicher Aktivitätsverlauf der am Zyklotron produzierten Radioarsenisotope (E <sub>p</sub> = 15 MeV, 20 μA, 5 h) .....	43
<b>Tabelle 8:</b> Wichtige Gammalinien vom <sup>76</sup> As [135] .....	45
<b>Tabelle 9:</b> Wichtige Gammalinien vom <sup>77</sup> As [135] .....	46
<b>Tabelle 10:</b> Wichtige Gammalinien vom <sup>77</sup> Ge [135] .....	47
<b>Tabelle 11:</b> Wichtige Gammalinien vom <sup>74</sup> As [135] .....	48
<b>Tabelle 12:</b> Wichtige Gammalinien vom <sup>72</sup> As [135] .....	49
<b>Tabelle 13:</b> Wichtige Gammalinien vom <sup>71</sup> As [135] .....	49
<b>Tabelle 14:</b> Wichtige Gammalinien vom <sup>67</sup> Ga [135] .....	50
<b>Tabelle 15:</b> Oxidationszustand von *As in Ethanol und PBS-Puffer mit Hydroxylamin .....	64
<b>Tabelle 16:</b> Ergebnisse der Abtrennung von <sup>77</sup> As aus <sup>77</sup> GeO <sub>2</sub> -Targets mittels Festphasenextraktion .....	65
<b>Tabelle 17:</b> Ergebnisse der Abtrennung von <sup>77</sup> As aus <sup>77</sup> GeO <sub>2</sub> -Targets mittels LLE in HF/NaI-Medium .....	70
<b>Tabelle 18:</b> Oxidationszustand von <sup>77</sup> As in CCl <sub>4</sub> und PBS nach Reduktion mit NaI.....	71
<b>Tabelle 19:</b> Ergebnisse der Abtrennung von <sup>77</sup> As aus <sup>77</sup> GeO <sub>2</sub> -Targets mittels LLE in HF/HBr-Medium .....	75
<b>Tabelle 20:</b> Oxidationszustand von <sup>77</sup> As in CCl <sub>4</sub> und PBS nach Reduktion mit HBr.....	76
<b>Tabelle 21:</b> Ergebnisse der Abtrennung von <sup>77</sup> As aus <sup>77</sup> GeO <sub>2</sub> -Targets mittels LLE in HF/HCl-Medium .....	80
<b>Tabelle 22:</b> Oxidationszustand von <sup>77</sup> As in CCl <sub>4</sub> und PBS im HF/HCl-Medium .....	81
<b>Tabelle 23:</b> Ergebnisse der Abtrennung von <sup>77</sup> As aus <sup>77</sup> Ge-Targets mittels LLE in HF/Hi-Medium.....	86
<b>Tabelle 24:</b> Oxidationszustand von <sup>77</sup> As in CCl <sub>4</sub> und PBS im HF/Hi-Medium.....	87
<b>Tabelle 25:</b> Extraktionsausbeuten von geträgertem <sup>76</sup> As in CCl <sub>4</sub> und PBS mit NaI als Reduktionsmittel .....	91
<b>Tabelle 26:</b> Oxidationszustand von geträgertem <sup>76</sup> As in CCl <sub>4</sub> und PBS-Puffer mit Hydroxylamin .....	91
<b>Tabelle 27:</b> Einfluss der Menge an CuCl auf die Extraktionsausbeute (nach 30 min auf 60°C erhitzen).....	93
<b>Tabelle 28:</b> Oxidationszustand von geträgertem <sup>76</sup> As in CCl <sub>4</sub> und PBS-Puffer mit Hydroxylamin nach Reduktion mit CuCl.....	95
<b>Tabelle 29:</b> Übersicht der Extraktionsausbeuten von *As nach Zugabe diverser Reduktionsmittel (1 h Inkubation bei 60 °C).....	96
<b>Tabelle 30:</b> Ergebnisse der Abtrennung von *As aus Ge-Targets mittels LLE aus HCl nach Destillation und Anionenaustausch.....	105
<b>Tabelle 31:</b> Oxidationszustand von *As in CCl <sub>4</sub> und PBS nach Reduktion mit CuCl.....	106
<b>Tabelle 32:</b> Ergebnisse der Abtrennung von *As aus Germaniumtargets mittels LLE aus HCl nach Anionenaustausch.....	117
<b>Tabelle 33:</b> Oxidationszustand von *As in CCl <sub>4</sub> und PBS nach Reduktion mit HBr .....	118
<b>Tabelle 34:</b> Oxidationszustand von *As in EtOH und PBS nach SPE aus HCl/NaI-Medium .....	123
<b>Tabelle 35:</b> Vergleich der Abtrennungsmethoden für GeO <sub>2</sub> -Targets mittels Festphasenextraktion (MJ01) und Flüssig-Flüssig-Extraktion (MJ02-MJ04) .....	127
<b>Tabelle 36:</b> Vergleich der Abtrennungsmethoden für Germaniummetalltargets (MJ05-MJ08) .....	129
<b>Tabelle 37:</b> Positronenenergien und theoretische Reichweiten einiger Positronenemitter in Wasser.....	132
<b>Tabelle 38:</b> Vergleich der Auflösung von <sup>18</sup> F, <sup>74</sup> As und <sup>72</sup> As am Focus 120 PET Scanner .....	133
<b>Tabelle 39:</b> Im Kalibrierstandard QCY48 R6/50/38 enthaltenen Nuklide und γ-Linien.....	140
<b>Tabelle 40:</b> Verdünnung von 1,5 mM Cysteinhydrochlorid Lösung bis zu 0,25 mM .....	153
<b>Tabelle 41:</b> Aktivität und Messzeit der einzelnen im Bohrlochphantom vermessenen Isotope.....	155
<b>Tabelle 42:</b> Aktivität und Messzeit der einzelnen im 3-Stab-Phantom vermessenen Isotope.....	156
<b>Tabelle 43:</b> Vergleich der Abtrennungsausbeuten für GeO <sub>2</sub> -Targets mittels Festphasenextraktion (MJ01) und Flüssig-Flüssig-Extraktion (MJ02-MJ04) .....	159
<b>Tabelle 44:</b> Vergleich der Abtrennungsmethoden für Germaniummetalltargets (MJ05-MJ08) .....	160
<b>Tabelle 45:</b> Vergleich des *As(III)-Gehalts der Abtrennungsmethoden für GeO <sub>2</sub> -Targets mittels Festphasenextraktion (MJ01) und Flüssig-Flüssig-Extraktion (MJ02-MJ04).....	162
<b>Tabelle 46:</b> Vergleich des *As(III)-Gehalts der Abtrennungsmethoden für Germaniummetalltargets (MJ05-MJ08).....	162
<b>Tabelle 47:</b> Vergleich der Abtrennungsmethoden für GeO <sub>2</sub> -Targets mittels Festphasenextraktion (MJ01) und Flüssig-Flüssig-Extraktion (MJ02-MJ04) .....	163

<b>Tabelle 48:</b> Vergleich der Abtrennungsmethoden für Germaniummetalltargets (MJ05-MJ08).....	163
<b>Tabelle 49:</b> Aufstellung der verwendeten Chemikalien.....	167

## 7.4 Literatur

1. Petzold, W., *Zur Entdeckung der Röntgenstrahlung vor 90 Jahren*. Physik in unserer Zeit, 1985. **16**(6): p. 191-193.
2. Genet, M., *The Discovery of Uranic Rays: A Short Step for Henri Becquerel but a Giant Step for Science*. Radiochimica Acta, 1995. **70/71**: p. 3-12.
3. Staiger, C., *"Strahlende Gesundheit" Zur Geschichte der Radiopharmazie*. Pharmazie in unserer Zeit, 2005. **34**(6): p. 454-459.
4. Becquerel, H., *Sur les radiations émises par phosphorescence*. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences, 1896. **122**: p. 420-421.
5. Becquerel, H., *Sur les radiations invisibles émises par les corps phosphorescents*. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences, 1896. **122**: p. 501-503.
6. Schmidt, G.C., *Sur les radiations émises par le thorium et ses composés*. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences, 1898. **126**: p. 1264.
7. Sklodowska Curie, M., *Rayons émis par les composés de l'uranium et du thorium*. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences, 1898. **126**: p. 1101-1103.
8. Badash, L., *The discovery of thorium's radioactivity*. Journal of Chemical Education, 1966. **43**(4): p. 219-220.
9. Adloff, J.P. and H.J. MacCordick, *The Dawn of Radiochemistry*. Radiochimica Acta, 1995. **70/71**: p. 13-22.
10. Curie, P. and S. Curie, *Sur une substance nouvelle radio-active contenue dans la pechblende*. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences, 1898. **127**: p. 175-178.
11. Curie, P., P. Curie, and G. Bémont, *Sur une nouvelle substance fortement radio-active, contenue dans la pechblende*. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences, 1898. **127**: p. 1215-1217.
12. Newton, G.W.A., *History of the Unraveling of the Natural Decay Series*. Radiochimica Acta, 1995. **70/71**: p. 31-37.
13. Chadwick, J., *Possible Existence of a Neutron*. Nature, 1932. **129**(3252): p. 312.
14. Curie, I. and F. Joliot, *Un nouveau type de radioactivité*. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences, 1934. **198**: p. 254-256.
15. Curie, I. and F. Joliot, *Séparation chimique des nouveaux radioéléments émetteurs d'électrons positifs*. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences, 1934. **198**: p. 559-561.
16. Guillaumont, R. and D. Trubert, *On the Discovery of Artificial Radioactivity*. Radiochimica Acta, 1995. **70/71**: p. 39-49.
17. Herrmann, G., *The Discovery of Nuclear Fission - Good Solid Chemistry Got Things on the Right Track*. Radiochimica Acta, 1995. **70/71**: p. 51-67.
18. Hahn, O. and F. Strassmann, *Über den Nachweis und das Verhalten der bei der Bestrahlung des Urans mittels Neutronen entstehenden Erdalkalimetalle*. Naturwissenschaften, 1939. **27**: p. 11-15.
19. Hahn, O. and F. Strassmann, *Nachweis der Entstehung aktiver Bariumisotope aus Uran und Thorium durch Neutronenbestrahlung; Nachweis weiterer aktiver Bruchstücke bei der Uranspaltung*. Naturwissenschaften, 1939. **27**: p. 89-95.
20. Meitner, L. and O.R. Frisch, *Disintegration of Uranium by Neutrons: a New Type of Nuclear Reaction*. Nature, 1939. **143**(3615): p. 239-240.

21. Seaborg, G.T., *Transuranium Elements: The Synthetic Actinides*. Radiochimica Acta, 1995. **70/71**: p. 69-90.
22. Stöcklin, G., S.M. Qaim, and F. Roesch, *The Impact of Radioactivity on Medicine*. Radiochimica Acta, 1995. **70/71**: p. 249-272.
23. Chievitz, O. and G. Hevesy, *Radioactive Indicators in the study of Phosphorus Metabolism in Rats*. Nature, 1935. **136**(3445): p. 754-755.
24. Jones, A.G., *Technetium in Nuclear Medicine*. Radiochimica Acta, 1995. **70/71**: p. 289-297.
25. Sweet, W.H. and G.L. Brownell, *Localization of intracranial lesions by scanning with positron-emitting arsenic*. J Am Med Assoc, 1955. **157**(14): p. 1183-1188.
26. Cullen, W.R., *Is Arsenic an Aphrodisiac? The Sociochemistry of an Element*. 2008, Cambridge: The Royal Society of Chemistry.
27. Zhu, J., et al., *How acute promyelocytic leukaemia revived arsenic*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(9): p. 705-13.
28. Cullen, W.R. and K.J. Reimer, *Arsenic speciation in the environment*. Chem Rev, 1989. **89**: p. 713-764.
29. Bentley, R. and T.G. Chasteen, *Arsenic Curiosa and Humanity*. Chem. Educator, 2002. **7**: p. 51-60.
30. Andreas, H., *Schweinfurter Grün - das brillante Gift*. Chemie in unserer Zeit, 1996. **30**(1): p. 23-31.
31. Challenger, F., C. Higginbottom, and L. Ellis, *The Formation of Organo-metalloidal Compounds by Microorganisms. Part I. Trimethylarsine and Dimethylethylarsine*. J. Chem. Soc., 1933. **(Resumed)**: p. 95-101.
32. Challenger, F. and C. Higginbottom, *The production of trimethylarsine by Penicillium brevicaulis (Scopulariopsis brevicaulis)*. Biochem J, 1935. **29**(7): p. 1757-78.
33. Keynes, M., *The death of Napoleon*. J. R. Soc. Med., 2004. **97**(10): p. 507-508.
34. Keynes, M., *Did Napoleon die from arsenical poisoning?* Lancet, 1994. **344**(8917): p. 276.
35. Forshufvud, S., H. Smith, and A. Wassen, *Arsenic content of Napoleon's hair probably taken immediately after his death*. Nature, 1961. **192**: p. 103-5.
36. Forshufvud, S., H. Smith, and A. Wassen, *Napoleon's Illness 1816-1821 in the Light of Activation Analyses of Hairs from Various Dates*. Arch Toxikol, 1964. **20**: p. 210-9.
37. Kintz, P., et al., *Arsenic speciation of two specimens of Napoleon's hair*. Forensic Sci Int, 2007. **170**(2-3): p. 204-6.
38. Mohan, D. and C.U. Pittman, Jr., *Arsenic removal from water/wastewater using adsorbents--A critical review*. J Hazard Mater, 2007. **142**(1-2): p. 1-53.
39. Lech, T. and F. Trela, *Case report: Massive acute arsenic poisonings*. Forensic Science International, 2005. **151**: p. 273-277.
40. Horn, J., et al., *Akute Arsentrioxid-Intoxikation - blander Verlauf nach hochdosierter Chelat-Therapie*. Intensivmed, 2002. **39**: p. 246-253.
41. Miller, W.H., Jr., et al., *Mechanisms of action of arsenic trioxide*. Cancer Res, 2002. **62**(14): p. 3893-903.
42. Kwong, Y.L. and D. Todd, *Delicious poison: arsenic trioxide for the treatment of leukemia*. Blood, 1997. **89**(9): p. 3487-8.
43. Niu, C., et al., *Studies on treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide: remission induction, follow-up, and molecular monitoring in 11 newly diagnosed and 47 relapsed acute promyelocytic leukemia patients*. Blood, 1999. **94**(10): p. 3315-24.
44. Peters, H.D. and R. Kath, *Neue(re) Therapiekonzepte, z.T. mit neuen Technologien, beim hämatologischen Malignomen und Lymphomen*. Der Onkologe, 2000. **6**(12): p. 1209-1212.

45. Ravandi, F., *Arsenic trioxide: expanding roles for an ancient drug?* Leukemia, 2004. **18**(9): p. 1457-9.
46. Wang, Z.Y., *Arsenic compounds as anticancer agents.* Cancer Chemother Pharmacol, 2001. **48 Suppl 1**: p. S72-6.
47. List, A., et al., *Opportunities for Trisenox (arsenic trioxide) in the treatment of myelodysplastic syndromes.* Leukemia, 2003. **17**(8): p. 1499-507.
48. Sur, R., et al., *Arsen-Metabolismus im Menschen: Kopplung von Festphasenmikroextraktion und GC-MS.* Chemie in unserer Zeit, 2003. **37**(4): p. 248-256.
49. Whittier, J.R., L.E. Jacobson, and A. Dhrymiotis, *Age Differences in Routine Scans of Human Brain with Arsenic-74.* J Nucl Med, 1964. **5**: p. 134-8.
50. Burnham, C.A., S. Aronow, and G.L. Brownell, *A hybrid positron scanner.* Phys Med Biol, 1970. **15**(3): p. 517-28.
51. Leicester, J. and G.K. Vanderfield, *The detection of cerebral lesions by the newer forms of encephalography: positron scanning and echoencephalography.* Med J Aust, 1966. **2**(15): p. 680-3.
52. Wilcke, O., *Isotopendiagnostik in der Neurochirurgie.* Acta Neurochir (Wien), 1966. **15**: p. 1-138.
53. Wasserman, L.R. and J.L. Glass, *The present status of therapy with radioactive isotopes.* Prog At Med, 1968. **2**: p. 113-67.
54. Mealey, J., Jr., *Radioisotopic Localization in Subdural Hematomas. An Experimental Study with Arsenic-74 and Radioiodinated Human Serum Albumin in Dogs.* J Neurosurg, 1963. **20**: p. 770-6.
55. Bencko, V., B. Benes, and M. Cikrt, *Biotransformation of As(III) to As(V) and arsenic tolerance.* Arch Toxicol, 1976. **36**(2): p. 159-62.
56. Hughes, M.F., et al., *Accumulation and metabolism of arsenic in mice after repeated oral administration of arsenate.* Toxicol Appl Pharmacol, 2003. **191**(3): p. 202-10.
57. Brunet, C., M. Luyckx, and M. Cazin, *[Topographic distribution of arsenous anhydride in pregnant mice using macroscopic autoradiography].* Toxicol Eur Res, 1983. **5**(2): p. 55-61.
58. Lindgren, A., M. Vahter, and L. Dencker, *Autoradiographic studies on the distribution of arsenic in mice and hamsters administered <sup>74</sup>As-arsenite or -arsenate.* Acta Pharmacol Toxicol (Copenh), 1982. **51**(3): p. 253-65.
59. Kimpe, J.D., et al., *Basal metabolism of intraperitoneally injected carrier-free <sup>74</sup>As-labeled arsenate in rabbits.* Fundam Appl Toxicol, 1996. **34**(2): p. 240-8.
60. Mego, J.L. and Q.J. Mc, *The uptake of As<sup>74</sup>-labeled arsonoazoproteins in tissues of tumor-bearing mice.* Cancer Res, 1963. **23**: p. 523-30.
61. Goetz, L. and H. Norin, *Synthesis of <sup>73</sup>As-radiolabelled arsenobetaine and arsenocholine for metabolic studies and their fate and distribution in laboratory animals.* Int J Appl Radiat Isot, 1983. **34**(11): p. 1509-17.
62. Anghileri, L.J., *Radioarsenic labelling of chromium compounds.* Int J Appl Radiat Isot, 1969. **20**(10): p. 738-42.
63. Anghileri, L.J., R.C. Reba, and H.N. Wagner, Jr., *Uptake of radioarsenic-labeled chromic beta-glycerophosphate by experimental brain tumors.* Invest Radiol, 1969. **4**(2): p. 91-6.
64. Hosain, F., et al., *Synthesis of Radioarsenic Labeled Dimethylchloroarsine for Derivation of a New Group of Radiopharmaceuticals.* Int J Appl Radiat Isot, 1982. **33**: p. 1477-1478.
65. Emran, A., et al., *Synthesis and biodistribution of radioarsenic labeled dimethylarsinothiols: derivatives of penicillamine and mercaptoethanol.* Int J Nucl Med Biol, 1984. **11**(3-4): p. 259-61.

66. Jennewein, M., et al., *Vascular Imaging of Solid Tumors in Rats with a Radioactive Arsenic-Labeled Antibody that Binds Exposed Phosphatidylserine*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(5): p. 1377-85.
67. Samuelson, O., *Ion Exchange Separations in Analytical Chemistry*. 1963, Stockholm: Almqvist & Wiksell.
68. Hudgens, J.E. *Ion Exchange in Analytical and Radiochemistry*. in *Symposium on Ion Exchange and Chromatography in Analytical Chemistry*. 1956. Atlantic City: American Society For Testing Materials, 59. Annual Meeting.
69. Kraus, K.A. and F. Nelson. *Metal Separations by Anion Exchange*. in *Symposium on Ion Exchange and Chromatography in Analytical Chemistry*. 1956. Atlantic City: American Society For Testing Materials, 59. Annual Meeting.
70. Marhol, M., *Ion Exchangers in Analytical Chemistry Their Properties and Use in Inorganic Chemistry*. 1982: Czechoslovak Academy of Sciences.
71. Korkisch, J., *Handbook of Ion Exchange Resins: Their Application to Inorganic Analytical Chemistry*. Vol. 1-6. 1989, Boca Raton, Florida: CRC Press Inc.
72. *National Nuclear Data Center, Brookhaven National Laboratory*. 2004, <http://www.nndc.bnl.gov/nudat2/index.jsp>.
73. Browne, E. and R.B. Firestone, *Table of Radioactive Isotopes*, ed. V.S. Shirley. 1986, New York: John Wiley & Sons.
74. Jennewein, M., et al., *A no-carrier-added  $^{72}\text{Se}/^{72}\text{As}$  radionuclide generator based on solid phase extraction*. Radiochimica Acta, 2005.
75. Jennewein, M., et al., *A new  $^{72}\text{Se}/^{72}\text{As}$  Isotope Generator based on Solid Phase Extraction*. Annual Report, Institute of Nuclear Chemistry, University of Mainz, 2002.
76. Jennewein, M., et al., *A new  $^{72}\text{Se}/^{72}\text{As}$  isotope generator based on solid phase extraction*. J Lab Comp Radiopharm, 2003. **46**(S1): p. 282.
77. Novgorodov, A.F., et al., *A no carrier-added  $^{72}\text{Se}/^{72}\text{As}$  isotope generator*. Annual Report, Institute of Nuclear Chemistry, University of Mainz, 2000.
78. Novgorodov, A.F., et al., *A no-carrier-added  $^{72}\text{Se}/^{72}\text{As}$  isotope generator*. J Lab Comp Radiopharm, 2001. **44**(S1): p. 778-780.
79. Waters, S.B., et al., *Glutathione modulates recombinant rat arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase-catalyzed formation of trimethylarsine oxide and trimethylarsine*. Chem Res Toxicol, 2004. **17**(12): p. 1621-9.
80. Zalutsky, M.R., *Radionuclide Therapy*, in *Handbook of Nuclear Chemistry*, A. Vertés, et al., Editors. 2003, Kluwer Academic Publishers.
81. Beard, H.C., *The radiochemistry of arsenic*. Nuclear Science Series. 1960, Washington: National Academy of Sciences.
82. Beard, H.C. and J.G. Cuninghame, *Radiochemistry of Arsenic*. Nuclear Science Series. 1965, Washington: National Academy of Science.
83. Marinsky, J.A., *The radiochemistry of germanium*. Nuclear Science Series. 1961, Washington: National Academy of Sciences.
84. Ward, T.E., et al., *Radiochemical procedure for arsenic and germanium*. Radiochimica Acta, 1970. **14**(2): p. 70-72.
85. Beard, H.C. and L.A. Lyerly, *Separation of Arsenic from Antimony and Bismuth by Solvent Extraction*. Analytical Chemistry, 1961. **33**(12): p. 1781-1782.
86. Brink, G.O., et al., *Solvent Extraction Systems. I. As(III) and Ge(IV) in Hydrochloric Acid and As(III) in Hydriotic Acid with Several Solvents*. J Am Chem Soc, 1957. **79**(6): p. 1303-1305.
87. Fischer, W. and W. Harre, *Bestimmung von Arsen und Germanium nach ihrer Abtrennung durch Verteilen*. Angew. Chem., 1954. **66**(6): p. 165-188.
88. Morrison, G.H. and H. Freiser, *Solvent Extraction in Analytical Chemistry*. Wiley, London. 1957.

89. Mirzadeh, S. and R.M. Lambrecht, *Radiochemistry of Germanium*. J Radioanal Nuc Chem, 1996. **202**(1-2): p. 7-102.
90. Green, M. and J.A. Kafalas, *Preparation and Isolation of Carrier-Free As<sup>74</sup> from Germanium Cyclotron Targets*. Journal of Chemical Physics, 1954. **22**: p. 760.
91. Gruverman, I.J. and P. Kruger, *Cyclotron-produced carrier-free radioisotopes; thick target yield data and carrier-free separation procedures*. Int J Appl Radiat Isot, 1959. **5**(1): p. 21-31.
92. Saito, K., S. Ikeda, and M. Saito, *Separation of Radioactive Arsenic from Germanium Irradiated with Protons*. Bull Chem. Soc. Japan; Vol: 33, 1960: p. Pages: 884-7.
93. Guin, R., S.K. Das, and S.K. Saha, *Separation of carrier-free arsenic from germanium*. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry, 1998. **227**(1-2): p. 181-182.
94. Byrne, A.R., *Simple production of <sup>77</sup>As from reactor irradiated germanium*. Int Conf on Nuc Radiochem, 1984: p. 239.
95. Chattopadhyay, S., et al., *A versatile technique for radiochemical separation of medically useful no-carrier-added (nca) radioarsenic from irradiated germanium oxide targets*. Appl Radiat Isot, 2007. **65**(11): p. 1202-7.
96. Byrne, A.R. and D. Gorenc, *The toluene extraction of some elements as iodides from sulphuric acid-potassium iodide media. Application to neutron activation analysis. I. Extraction behaviour of As, Au, Bi, Br, Cd, Cu, Ga, Ge, In, Hg, Mo, Pb, Sb, Se, Sn, W, and Zn*. Anal Chim Acta, 1972. **59**(1): p. 81-9.
97. Billingham, M.W., D.N. Abrams, and S. Cantor, *Separation of Radioarsenic from a Germanium Dioxide Target*. Appl. Radiat. Isot., 1990. **41**(5): p. 501-507.
98. Mukhopadhyay, K., D. Nayak, and S. Lahiri, *Separation of no-carrier-added As and Se produced in <sup>16</sup>O irradiated cobalt target*. J Radioanal Nuc Chem, 2002. **251**(1): p. 159-162.
99. Nelson, F. and D.C. Michelson, *IX. Cation Exchange in HBr Solutions*. J Chromatogr, 1966. **25**: p. 414-441.
100. Nelson, F., T. Murase, and K.A. Kraus, *Ion Exchange Procedures. I. Cation Exchange in Concentrated HCl and HClO<sub>4</sub> Solutions*. J Chromatogr, 1964. **13**: p. 503-35.
101. Strelow, F.W.E., et al., *Distribution Coefficients and Cation Exchange Behavior of Elements in Hydrochloric Acid-Acetone*. Analytical Chemistry, 1971. **43**(7): p. 870-876.
102. Nelson, F. and K.A. Kraus, *Anion-exchange Studies. XVIII. Germanium and Arsenic in HCl Solutions*. J Am Chem Soc, 1955. **77**(17): p. 4508-4509.
103. Yoshino, Y., *Anion Exchange Separation of Arsenic (V) and Phosphorus (V) from Arsenic (III) and Germanium (IV)*. Bull Chem. Soc. Japan, 1955. **28**(5): p. 382-383.
104. Kraus, K.A. and F. Nelson, *Anion Exchange Studies of the Fission Products*. Proc. 1st. U.N. Int. Conf. Peaceful Uses Atomic Energy, Geneva, 1956. **7**: p. 113-125.
105. Nelson, F., R.M. Rush, and K.A. Kraus, *Anion-exchange studies. XXVII. Adsorbability of a number of elements in HCl-HF Solutions*. J Am Chem Soc, 1960. **82**: p. 339-348.
106. Peters, J.M. and G. del Fiore, *Distribution Coefficients for 52 Elements in Hydrochloric Acid-Water-Acetone Mixture on Dowex IX8*. Radiochem Radioanal Letters, 1975. **21**(1-2): p. 11-21.
107. Van den Winkel, P., F. De Corte, and J. Hoste, *Anion Exchange in Acetic Acid Solutions*. Anal Chim Acta, 1971. **56**: p. 241-259.
108. Van den Winkel, P., et al., *Adsorption of some elements in acetic acid medium on Dowex I-X8*. Anal Chim Acta, 1968. **42**(2): p. 340.
109. Korkisch, J. and F. Feik, *Anion-Exchange Separation of Germanium from Arsenic (III and V) and Other Elements in Hydrochloric Acid-Acetic Acid Medium*. Separation Science, 1967. **2**(1): p. 1-9.

110. De Corte, F., et al., *Distribution Coefficients for Twelve Elements in Oxalic Acid Medium on a Strong Anion-Exchange Resin*. Anal. Chim. Acta, 1968. **42**: p. 67-77.
111. Faris, J.P., *Adsorption of the Elements from Hydrofluoric Acid by Anion Exchange*. Anal Chem, 1960. **32**(4): p. 520-522.
112. Danielsson, L., *Adsorption of a Number of Elements from Sulfuric Acid Solutions by Anion Exchange*. Acta Chem. Scand., 1965. **19**(3): p. 670-678.
113. Faix, W.G., R. Caletka, and V. Krivan, *Element Distribution Coefficients for Hydrofluoric Acid/Nitric Acid Solutions and the Anion Exchange Resin Dowex IX8*. Anal Chem, 1981. **53**(11): p. 1719-1721.
114. Danielsson, L., *Adsorption of a Number of Elements from HNO<sub>3</sub>-HF and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-HF Solutions by Cation and Anion Exchange*. Acta Chem. Scand., 1965. **19**(8): p. 1859-1874.
115. Caletka, R., R. Hausbeck, and V. Krivan, *Anion-Exchange Behaviour of 12 Elements in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and HF-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> Medium*. J. Radioanal. Nucl. Chem., 1990. **142**(2): p. 383-391.
116. Caletka, R. and V. Krivan, *Anion-Exchange Behaviour of some Elements in HF-HCl Medium*. J. Radioanal. Nucl. Chem., 1990. **142**(2): p. 373-382.
117. Caletka, R. and V. Krivan, *Behaviour of 18 Elements in HF and HF-NH<sub>4</sub>F Media on Anion Exchanger in Various Ionic Forms*. J. Radioanal. Nucl. Chem., 1990. **142**(2): p. 259-371.
118. Schindewolf, U. and J.W. Irvine, *Preparation of carrier-free Vanadium, Scandium and Arsenic Activities from Cyclotron Targets by ion exchange*. Anal Chem, 1958. **30**: p. 906-907.
119. Basile, D., et al., *Excitation functions and production of arsenic radioisotopes for environmental toxicology and biomedical purposes*. Int J Appl Radiat Isot, 1981. **32**(6): p. 403-10.
120. Jennewein, M., et al., *A new method for radiochemical separation of arsenic from irradiated germanium oxide*. Appl Radiat Isot, 2005. **63**(3): p. 343-51.
121. Tolmachev, V. and H. Lundqvist, *Separation of arsenic from germanium oxide targets by dry distillation*. J Radioanal Nuc Chem, 2001. **247**(1): p. 61-66.
122. Maki, Y. and Y. Murakami, *The Separation of Arsenic-77 in a Carrier-Free State from the Parent Nuclide Germanium-77 by a Thin-Layer Chromatographic Method*. J Radioanal Chem, 1974. **22**: p. 5-12.
123. Miketukova, V., J. Kohlicek, and K. Kacel, *Separation of arsenite and arsenate ions by paper chromatography. Study of a methanol-ammonia-water solvent systems*. J Chromatogr, 1968. **34**(2): p. 284-288.
124. Genet, M. and C. Ferrandi, *Séparation par Électrophorèse sur papier de Ge<sup>IV</sup>, As<sup>III</sup>, As<sup>V</sup> et de Ge<sup>IV</sup>, <sup>77</sup>As<sup>III</sup>, <sup>77</sup>As<sup>V</sup> Étude cinétique de l'oxydation du radioarsenic par le peroxyde d'hydrogène*. J Chromatogr, 1968. **37**: p. 527-532.
125. Caletka, R. and P. Kotas, *Separation of germanium from some elements by adsorption on silica gel*. J. Radioanal. Nucl. Chem., 1974. **21**: p. 349-353.
126. Chappell, J., B. Chiswell, and H. Olszowy, *Speciation of arsenic in a contaminated soil by solvent extraction*. Talanta, 1995. **42**(3): p. 323-9.
127. Maher, W.A., *Determination of Inorganic and Methylated Arsenic Species in Marine Organisms and Sediments*. Anal Chim Acta, 1981. **126**: p. 157-165.
128. Takamatsu, T., H. Aoki, and T. Yoshida, *Determination of Arsenate, Arsenite, Monomethylarsonate and Dimethylarsinate in Soil Polluted with Arsenic*. Soil Science, 1982. **133**(4): p. 239-246.
129. Becker, A. and R. Neumeier, *Monoklonale Antikörper*. Biologie in unserer Zeit, 1984. **14**(3): p. 72-77.

130. Dübel, S., P. Rohrbach, and A. Schmiedel, *Rekombinante Antikörper*. Biologie in unserer Zeit, 2004. **34**(6): p. 372-379.
131. Schirmann, T., M. Hust, and S. Dübel, *Die Antikörperfabrik: Antikörper für jedes Protein*. Biologie in unserer Zeit, 2007. **37**(6): p. 348-351.
132. Neumeier, R., *Monoklonale Antikörper in Biologie und Medizin*. Biologie in unserer Zeit, 1984. **14**(4): p. 97-102.
133. Hurwitz, H., et al., *Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer*. N Engl J Med, 2004. **350**(23): p. 2335-42.
134. Sandler, A., et al., *Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer*. N Engl J Med, 2006. **355**(24): p. 2542-50.
135. *National Nuclear Data Center, Brookhaven National Laboratory*. 2008, <http://www.nndc.bnl.gov/nudat2/index.jsp>.
136. Jennewein, M., et al., *A new method for the labelling of proteins with radioactive arsenic isotopes*. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment, 2006. **569**(2): p. 512-517.
137. Zhernosekov, K.P., et al., *Processing of Generator-Produced <sup>68</sup>Ga for Medical Application*. J Nucl Med, 2007. **48**(10): p. 1741-1748.
138. Erdtmann, G., *Neutron Activation Tables*. Kernchemie in Einzeldarstellungen, ed. K.H. Lieser. Vol. 6. 1976, Weinheim, New York: Verlag Chemie.
139. Horiguchi, T., et al., *Excitation Functions of Ge(p,xnpy) Reactions and Production of <sup>68</sup>Ge*. Int J Appl Radiat Isot, 1983. **34**(11): p. 1531-1535.
140. Johnson, C.H., C.C. Trail, and A. Galonsky, *Thresholds for (p,n) Reactions on 26 Intermediate-Weight Nuclei*. Physical Review Part B Condensed Matter, 1964. **136**(6 B): p. 1719-1729.
141. Spahn, I., et al., *Excitation functions of natGe(p,xn)<sup>71,72,73,74</sup>As reactions up to 100 MeV with a focus on the production of <sup>72</sup>As for medical and <sup>73</sup>As for environmental studies*. Appl Radiat Isot, 2007. **65**(9): p. 1057-64.
142. Kumaresan, M. and P. Riyazuddin, *Overview of speciation chemistry of arsenic*. Current Science, 2001. **80**(7): p. 837-846.
143. Schmidt, A., J. Brockmann, and F. Rösch, *Chromatographische Trennung von As<sup>III</sup>, As<sup>V</sup> und 2-Nitrophenylarsonsäure*. Annual Report, Institute of Nuclear Chemistry, University of Mainz, 2000.
144. *Gmelins Handbuch der Anorganischen Chemie*. Arsen, System-Nummer 17. 1952, Weinheim: Verlag Chemie GmbH.
145. Genet, M. and C. Ferrandi, *Effets chimiques associés à l'émission β I. Etude de l'arsenic 77 formé par désintégration β de <sup>77m</sup>Ge et <sup>77</sup>Ge dans GeO<sub>2</sub> irradié au réacteur nucléaire*. Radiochimica Acta, 1969. **11**(1): p. 19-25.
146. Genet, M. and C. Ferrandi, *Effets chimiques associés à l'émission β II. Etude de l'arsenic 77 formé par désintégration β de <sup>77</sup>Ge dans <sup>76,77</sup>GeO<sub>2</sub> de synthèse*. Radiochimica Acta, 1969. **11**(1): p. 25-30.
147. Pierce-Biotechnology, *SATP, SATA*. Instruction Files, 2009. **26100, 26102**.
148. Pierce-Biotechnology, *Ellman's reagent*. Instruction Files, 2009. **22582**.
149. Pierce-Biotechnology, *TCEP*. Instruction Files, 2009. **20490, 20491**.
150. *Encyclopedia of Inorganic Chemistry*, ed. R.B. King. 1994, New York: John Wiley & Sons.
151. Hollemann, A.F. and E. Wiberg, *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*. 101 ed. 1995, Berlin, New York: Walter de Gruyter.
152. Münz, H. and W. Lorenzen, *Differenzierte Bestimmung von anorganischem und organischem Arsen in Lebensmitteln mit Hilfe der Atomabsorptions-Spektroskopie*. Fresenius Z Anal Chem, 1984. **319**: p. 395-398.

153. Kjelberg, A. and A.C. Pappas, *Fast Radiochemical Isolation of Fission Product Arsenic and the Independent Yield of Arsenic-78 in Thermal Neutron Fission of Uranium-235*. J Inorg Nucl Chem, 1959. **11**: p. 173-180.
154. Bartusek, M., *Die Reaktion zwischen Hydroxylamin und drei- und fünfwertigem Arsen, Antimon und Wismut in saurem und alkalischem Medium*. Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, 1965. **207**(3): p. 197-198.
155. Jennewein, M., *Production, Radiochemical Separation and Chemical Coupling of Radioactive Arsenic Isotopes to Synthesize Radiopharmaceuticals for Molecular Imaging*. 2005, <http://ubm.opus.hbz-nrw.de/volltexte/2005/772/>.
156. Paganì, M., S. Stone-Elander, and S.A. Larsson, *Alternative positron emission tomography with non-conventional positron emitters: effects of their physical properties on image quality and potential clinical applications*. Eur J Nucl Med, 1997. **24**(10): p. 1301-27.
157. Phillips, D.R., et al., *Generator-Produced Arsenic-72 in Positron Emission Tomography*. Radioact Radiochem, 1992. **3**: p. 53-58.
158. Le Loirec, C. and C. Champion, *Track structure simulation for positron emitters of physical interest. Part III: The case of the non-standart radionuclides*. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A, 2007. **582**: p. 665-672.
159. Le Loirec, C. and C. Champion, *Track structure simulation for positron emitters of medical interest. Part I: The case of the allowed decay isotopes*. Nuclear Instruments and Methods in Physics Research A, 2007. **582**: p. 644-653.
160. Champion, C. and C. Le Loirec, *Positron follow-up in liquid water: I. A new Monte Carlo track-structure code*. Phys Med Biol, 2006. **51**(7): p. 1707-23.
161. Buchholz, H.G., et al., *PET imaging with yttrium-86: comparison of phantom measurements acquired with different PET scanners before and after applying background subtraction*. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2003. **30**(5): p. 716-20.
162. Herzog, H., et al., *Assessment of the short-lived non-pure positron-emitting nuclide (<sup>120</sup>I) for PET imaging*. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2006. **33**(11): p. 1249-57.
163. Jennewein, M., et al., *A no-carrier-added Se-72/As-72 radionuclide generator based on solid phase extraction*. Radiochimica Acta, 2005. **93**(9-10): p. 579-583.
164. Jennewein, M., et al., *A no-carrier-added <sup>72</sup>Se/<sup>72</sup>As radionuclide generator based on distillation*. Radiochimica Acta, 2004. **92**: p. 245-249.
165. Herth, M., et al., *Radioactive labeling of defined HPMA based polymeric structures: Using [<sup>18</sup>F]FETos for in vivo imaging by Positron Emission Tomography (PET)*. Biomacromolecules, 2009. **submitted for publication**.
166. Cutler, C.S., et al., *Evaluation of gallium-68 tris(2-mercaptobenzyl)amine: a complex with brain and myocardial uptake*. Nucl Med Biol, 1999. **26**(3): p. 305-16.
167. Cullen, W.R., *Organoarsenic Chemistry*. Advances in Organometallic Chemistry, 1966. **4**: p. 145-242.

