

# **Optimización de un método de preparación de un radiohapteno- $^{125}\text{I}$ para RIA de alta actividad específica**

Suárez, C.  
Paz, D.  
Simón, M<sup>a</sup>. A.  
Romero del Hombrebueno, B.

**CENTRO DE INVESTIGACIONES  
ENERGÉTICAS, MEDIOAMBIENTALES Y TECNOLÓGICAS**

**MADRID, 1994**

CLASIFICACIÓN DOE Y DESCRIPTORES:

400600

RADIOCHEMISTRY

RADIOINMUNOASSAY

AMINES

ANHYDRIDES

ETHANOL

IODINE 125

Toda correspondencia en relación con este trabajo debe dirigirse al Servicio de Información y Documentación, Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas, Ciudad Universitaria, 28040-MADRID, ESPAÑA.

Las solicitudes de ejemplares deben dirigirse a este mismo Servicio.

Los descriptores se han seleccionado del Thesaurus del DOE para describir las materias que contiene este informe con vistas a su recuperación. La catalogación se ha hecho utilizando el documento DOE/TIC-4602 (Rev. 1) Descriptive Cataloguing On-Line, y la clasificación de acuerdo con el documento DOE/TIC.4584-R7 Subject Categories and Scope publicados por el Office of Scientific and Technical Information del Departamento de Energía de los Estados Unidos.

Se autoriza la reproducción de los resúmenes analíticos que aparecen en esta publicación.

Este trabajo se ha recibido para su impresión en Septiembre de 1993

Depósito Legal nº 14876-1994  
ISBN 84-7834-237-0  
ISSN 0214-087-X  
NIPO 238-94-015-5

IMPRIME CIEMAT



OPTIMIZACION DE UN METODO DE PREPARACION DE UN  
RADIOHAPTENO-<sup>125</sup>I PARA RIA DE ALTA ACTIVIDAD ESPECIFICA

1. INTRODUCCION.

El dietilestilbestrol (DES), estrógeno artificial ha sido utilizado en el sector ganadero para estimular el anabolismo proteico. Sin embargo su actividad, supuestamente cancerígena ha obligado a los distintos países a prohibir totalmente su empleo.

En la actualidad la CEE ha establecido los métodos que deberán utilizarse para la detección de anabolizantes (1), publicados en el Diario oficial de la CEE (87/410/CEE) (2), entre los que se encuentran los métodos inmunológicos, destacando el radioinmunoensayo (RIA), debido a su sensibilidad y especificidad, empleado sobre todo para el análisis de residuos de DES.

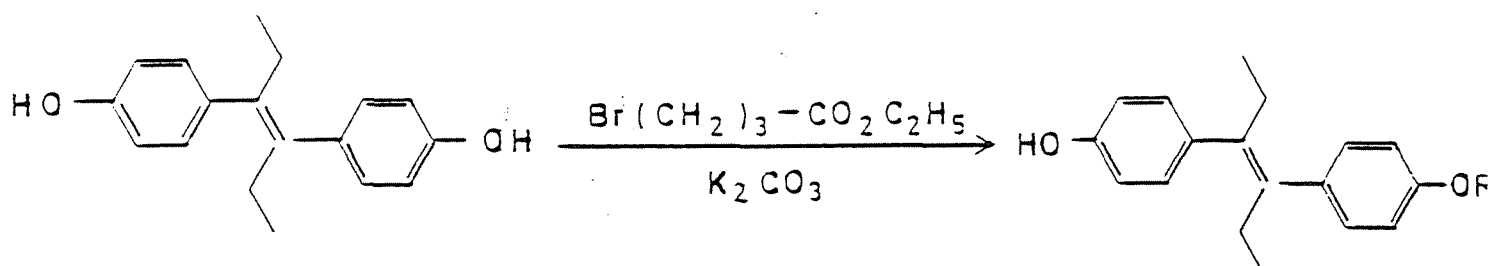
Dentro de los procedimientos de RIA del DES es de destacar la utilización de DES marcado con tritio (3). Sin embargo la purificación del DES tritiado es delicada debido a que sufre una radiólisis rápida si se conserva impuro o si se le purifica por cromatografía. También presenta problemas la yodación con I-125 del DES que resulta en la formación de dos productos marcados cuya relación no ha podido ser controlada (4) -incluso cuando se aplica el I-125 en cantidades subestequiométricas con respecto al DES- con el agravante de que se reduce tanto su inmunoreactividad como su actividad biológica.

Para obviar estos inconvenientes, se ha recurrido a incorporar el yodo radiactivo a una molécula fácilmente yodable, por ej. de

histamina, que, una vez yodada, se conjuga\* por el método del anhídrido mixto (5) con un derivado carboxílico del DES, con lo que se evita la introducción directa del yodo en los anillos aromáticos. Consiste el método en líneas generales en la condensación del  $\gamma$ -bromobutirato de etilo con el DES (I) en presencia de  $K_2CO_3$ , lo que permite obtener el monoéter (II) que, previa purificación, es saponificado al ácido correspondiente (III), el cual se fija al grupo amino de la 2-yodohistamina- $^{125}I$ , lo que da lugar a la correspondiente yodo-amida (IV), tal como se indica en el esquema siguiente:

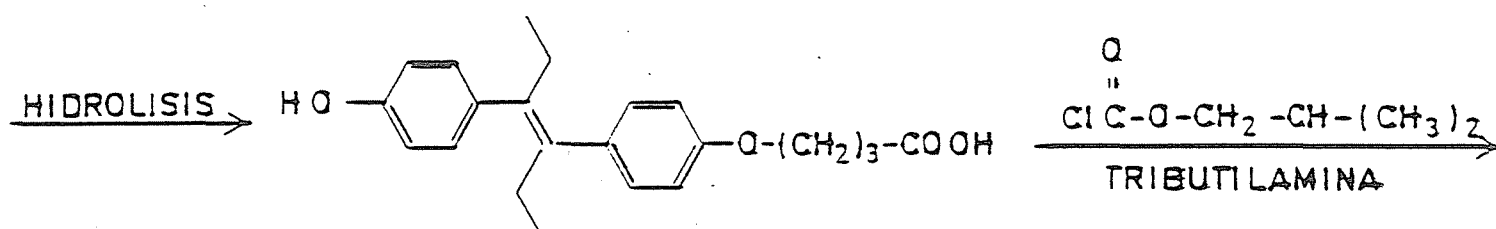
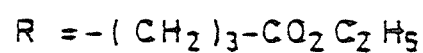
---

\* Cada vez es más frecuente la utilización de trazadores formados por un hapteno que se conjuga a una molécula previamente radioyodada sin detrimento de su reactividad inmunológica.

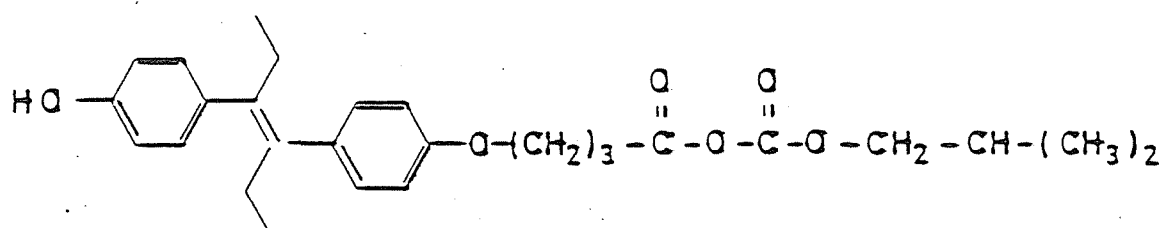


DES (I)

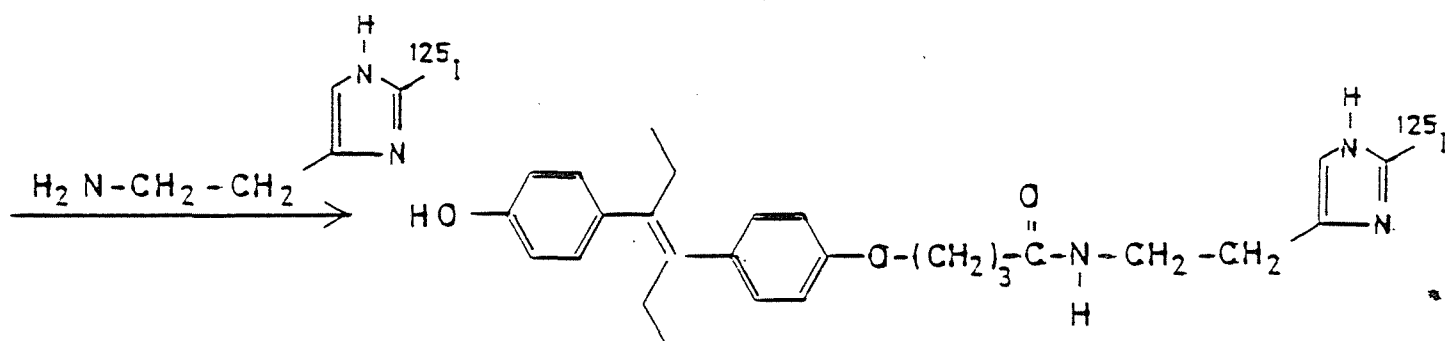
(II). PURIFICACION



(III)



ANHIDRIDO MIXTO



(IV)

PURIFICACION

Radiyodación del DES por conjugación con 2-I<sup>125</sup> histamina: Esquema de la formación de la amida de la histamina radiyodada del 4-O-(Carboxipropil)-diestilbestrol.

Se ha comprobado que esta amida radioyodada (IV), derivada del DES, se une a un suero anti-DES específico (5) lo que sumado a su estabilidad posibilita la aplicación eficaz del RIA en la determinación del DES, eliminando así los problemas asociados de análisis y autoradiolisis del compuesto tritiado.

## 2. OBJETIVO.

Se trata de completar y optimizar la síntesis del derivado yodado del DES (IV) (véase Esquema) propuesta por Johnson y colab. (5), dado que en su trabajo 1°) no se describe la purificación de (II) y se omite su rendimiento y 2°) no se indica el grado de incorporación del I-125 a la histamina, ni se consigna el rendimiento de la reacción de conjugación, ni la pureza química y radioquímica del producto radiactivo final 4-0-(Carboxipropil)-dietilestilbestrol-yodohistamina-<sup>125</sup>I obtenido.

Debido a que la síntesis del ester etílico del 4-0-(Carboxipropil)-dietilestilbestrol (II) en las condiciones descritas en la bibliografía (5), conducía a una mezcla de mono y diéteres con muy bajo rendimiento, se ha aplicado un procedimiento general de formación de éteres de fenoles que consiste en calentar a reflujo, durante unas horas el fenol\* disuelto en acetona -representado aquí por el compuesto (I)- con un ligero exceso del haluro de alquilo, el  $\gamma$ -bromobutirato de etilo, en presencia de carbonato potásico en cantidad estequiométrica, lo que permite obtener básicamente el monoéter (II) con buen rendimiento. Una primera separación del producto de reacción(II) del DES sin reaccionar (I) y del diéter se logra mediante recristalización de ciclohexano en

-----  
\* A las 4 horas se ha formado ya un 50 % del derivado monoalquilado. A partir de las 8 h se forma mayoritariamente el derivado dialquilado, a expensas del monoalquilado.



el que el DES es poco soluble, mientras que el diéter lo es bastante ya en frío. La purificación final del II se realizó por paso a través de una columna de gel de sílice, utilizando como eluyente benceno/acetato de etilo, 80:20.

El control de la pureza se llevó a cabo mediante cromatografía en capa fina de gel de sílice, utilizando el eluyente anterior. Los productos se visibilizaron irradiando 30' con luz ultravioleta de 254 nm, ó empleando placas con indicador fluorescente.

La hidrólisis del éster (II) se realizó refluyéndolo con potasa metanólica 0,3 N durante 2 horas. Se purificó por recristalización sucesiva de benceno y cloroformo.

El procedimiento de yodación de la histamina se ha basado en el método de la cloramina-T (6). La introducción del yodo en el anillo imidazólico de la histamina se favorece a pHs de 8-8,5 (7). En experiencias en frío, al poner en juego yodo e histamina en una relación molar 1:1 se monoyoda ésta parcialmente, pero al aumentar la proporción de yodo se formó también 2,5 diyodohistamina\*, todas ellas fácilmente separables por cromatografía en gel de sílice desarrollada bien con acetona-NH<sub>3</sub> 25 % (9:1 vol) ó con butanol-NH<sub>3</sub> 25 % (4:1) y visibilizadas con ninhidrina (la histamina tiene en estos eluyentes un R<sub>f</sub> inferior a la monoyodohistamina y ésta, a su vez, inferior a la diyodohistamina tal como se observa en la Tabla II).

En el caso de la radioyodación con I-125 libre de portador, la relación yodo:histamina empleada es muy baja, de 1:1.000, por lo

-----  
\* En el caso de la histidina al yodar con una relación entre 0,4-1 y 8-1 se formaron mezclas de 2-yodohistidina y 2,5-diyodohistidina y por encima de los 8 átomos por molécula se formó en exclusiva el derivado diyodado (8).

que al encontrarse el yodo en proporción altamente subestequiométrica, se produce en exclusiva el derivado monoyodado 2-yodohistamina- $^{125}\text{I}$ . Por otra parte en estas condiciones la incorporación del yodo radiactivo es muy alta, tal como puede apreciarse en las Figs. 1 y 2.

La conjugación de aminas yodadas con I-125 al hapteno generalmente utiliza el procedimiento del anhídrido mixto. Este tipo de reacción tiene la desventaja de que la reacción tiende a producir múltiples productos que tienen que separarse y purificarse después del marcaje. El conjugado radioyodado es entonces un componente minoritario de la mezcla de reacción y, salvo que se utilizaran altos niveles de radioactividad, se encuentra muy diluido.

Para la formación del compuesto conjugado de la 2-yodohistamina-I $^{125}$  con el DES se tuvieron en cuenta las directrices generales de Erlanger y colab. (9) que adaptaron la técnica del anhídrido mixto propuesta por Vaughan (10-12) para fijar el derivado del DES (III) a los grupos amino de la seroalbúmina bovina, lo que más tarde también llevó a cabo Rombauts (3). Esta técnica ha sido utilizada por Nars y Hunter (13) para la radioyodación de esteroides por conjugación con yodohistamina-I $^{125}$ .

El rendimiento global de incorporación del yoduro- $^{125}\text{I}$  en la reacción de conjugación ha sido, en nuestro caso, bastante alto, entre 70-80 %, siempre que se utilice una relación molar anhídrido mixto: histamina de 1:1, en contraposición con otros investigadores que incluso operando con una relación entre el correspondiente anhídrido mixto y la histamina de 100:1 (13) obtuvieron solamente un rendimiento respecto a la yodohistamina del 30 %. Respecto al trabajo (5) objeto de nuestra optimización, donde se operó con una relación anhídrido mixto:histamina de 5:1, a parte de no indicarse el rendimiento, no se justifican tampoco los inexplicables resultados obtenidos: así por ej. sin agregar portador de  $\text{I}^-$  u otros y partiendo de un  $\text{NaI-I}^{125}$  con una activi-

dad específica de  $\approx 2.000$  Ci/mmol, dicen obtener el radioyodohapteno con una As de 96 Ci/mmol. La confusión persiste con respecto a la purificación de la radioyodamida final (IV) que además no caracterizan.

Asimismo hemos verificado que el método propuesto por Johnson y colab. (5) consistente en cromatografiar el producto bruto (IV) en columna de Sephadex G-25 no permite la separación de amida y yodamida, que, al menos teóricamente, en su trabajo deberían encontrarse en una relación de 40:1. Más efectivo nos ha parecido el método de purificación del hapteno del estradiol-17 $\beta$  propuesto por Nars y Hunter (13). Se basa el procedimiento en una eliminación de los reactivos activos mediante acidificación con HCl de la mezcla y extracción de estos con tolueno, seguido por una alcalinización con NaOH y extracción del producto bruto con este mismo disolvente. La purificación final del extracto toluénico del radiohapteno conjugado la logran por TLC en placa de gel de sílice, utilizando como solución eluyente el sistema benceno:etanol:acético (75:24:1 v/v).

Obviamente los procedimientos de extracción y separación de los diversos haptenos marcados tienen que ser modificados para adaptarlos a la naturaleza de cada caso particular. Así la extracción en medio alcalino con acetato de etilo nos ha permitido separar el radiohapteno conjugado (IV) tanto de los compuestos inorgánicos como de la histamina y yodohistamina que no hubieran reaccionado.

Operando al abrigo de la luz\* se ha comprobado que la reacción de conjugación prácticamente no da lugar a impurezas radioquímicas, ya que son inferiores al 2 %, Fig. (3), pero al estar presentes junto con la radioyodoamida (IV) la amida, en una propor-

-----

\* Tanto el DES como sus derivados son fotosensibles.

ción con respecto a la yodamida altísima, y restos del derivado del DES (III), es necesario separarlos, lo que se ha llevado a cabo fácilmente por TLC en placa de gel de sílice eluyendo con una solución recién preparada de acetona:  $\text{NH}_3$  25 % (9:1 v/v), que separa mejor la yodamida que la solución de benceno:etanol:acético (75:24:1 v/v) (Tabla II). Dados los buenos resultados logrados no se ha ensayado la separación por HPLC\*.

La radiactividad de la placa se identificó por autorradiografía de una TLC analítica (Film X-OMAT S, Kodak). Como era previsible se apreció una única mancha.

El producto de conjugación se sometió a una cromatografía en capa fina de gel de sílice preparativa. Identificada la banda de radiactividad correspondiente a la yodamida- $^{125}\text{I}$ , se raspó y eluyó con metanol. La identidad química del radiohapteno ya purificado se ha establecido recromatografiando el material radiactivo extraído frente a una muestra de yodohistamida fría (Fig. 4).

### 3. MATERIALES Y METODOS.

Todos los reactivos utilizados han sido de calidad P.A. La solución de  $\text{Na}^{125}\text{I}$ , libre de portador, de 100 mCi/ml y  $\text{As}=2.200$  Ci/mAtom, procede de Amershan (Referencia IMS.30).

El gel de sílice empleado en la columna cromatográfica para la purificación del monoéter-II tiene un grosor de 70-325 mallas

-----  
\* Alternativamente, si bien con menos rendimiento, se puede también separar la yodamida de la amida y del ácido (III) por cromatografía en columna utilizando Sephadex LH-20, en línea con las investigaciones de Tóht (4). La elución se ha realizado con etanol acuoso 50 %, siendo el orden de elución: ácido (III), amida y yodamida (IV).

(Merck 7734). El control de la pureza de (II) se realizó analizando por TLC (gel de sílice 60 Merck, sin y con F-254), las fracciones eluidas. Como solución desarrolladora, una mezcla de benceno-acetato de etilo (80:20 v/v).

El control de la pureza química del ácido (III) y de los compuestos conjugados con histamina y 2-yodohistamina se realizó por TLC (gel de sílice 60 con ó sin F) utilizando como eluyentes acetona-NH<sub>3</sub> 25 % (9:1 v/v) y benceno-etanol-ácido acético (75:24:1 v/v).

La pureza radioquímica de la monoyodamida-I<sup>125</sup> conjugada (IV) se determinó por autorradiografía de las cromatografías desarrolladas con ambos eluyentes.

La actividad específica del compuesto conjugado radioyodado (IV) se calculó teóricamente basándose en la actividad específica del Na<sup>125</sup>I de partida.

El rendimiento radioquímico, desde el Na<sup>125</sup>I, o sea la eficiencia de utilización del I-125, se realizó por recuento  $\gamma$  de alícuotas apropiadas (Autogamma-500, Packard).

### 3.1. Procedimientos de síntesis.

#### 3.1.1. Síntesis del monoéter (II).

En un matraz de fondo redondo de 25 ml provisto de condensador de reflujo y tubo de cloruro cálcico, se disolvieron 2 mmoles de DES (536,7 mg), desecado durante 24 h en desecador a vacío con pentóxido de fósforo, en 6 ml de acetona secada sobre carbonato potásico. A continuación se añadieron 2,03 mmoles de carbonato potásico anhidro y seco y, seguidamente y bajo agitación, 2,2 mmoles de bromobutirato de etilo (0,33 ml). Se reflujo durante 6 h, al cabo de las cuales se separaron las sales por filtración y se lavaron con acetona. Al concentrar a sequedad la solución que-

dó un residuo pastoso que al recristalizar de ciclohexano dejó una parte insoluble (170 mg) que se filtró, constituida por DES que no había reaccionado, obteniéndose por recristalización 390 mg del derivado monoalquilado (II) ligeramente impurificado con el DES de partida y con algo de derivado dialquilado. Este producto, aún impuro, se disolvió en 0,6 ml de acetato de etilo; se agregaron 0,9 ml de benceno y se cromatografió en una columna (40 x 2,5 cm) de gel de sílice, 70-325 mallas, eluyendo con una disolución de benceno-acetato de etilo (80:20 v/v) a una velocidad de 0,5 ml/min. Se recogieron fracciones de 5 ml. En el perfil de elución apareció en el frente el diéter y en la cola, el DES. El monoéter (II) emergió puro entre las fracciones 21 a 29. Se recogieron 316 mg ( $P_f = 119^\circ - 121^\circ\text{C}$ ).

La pureza química se controló por TLC, en placas analíticas de gel de sílice; utilizando como eluyente, benceno-acetato de etilo (80:20 v/v). Los productos se visibilizaron irradiando las placas con UV a 254 nm durante 30 minutos. En estas condiciones el DES se convirtió en su derivado fenantrénico amarillo y el monoéter en un compuesto amarillo-anaranjado. El diéter se visibilizó a 356 nm. (En la Tabla I se consignan los correspondientes  $R_{fS}$ ).

### 3.1.2. Hidrólisis del monoéter: síntesis del 4-0-(carboxipropil)-dietilestilbestrol (III).

Se disolvieron 0,5 mmoles del monoéter (II) (191 mg) en 9 ml de una solución metanólica de hidróxido potásico 0,3 N. Se reflujo la disolución durante 2 horas y, una vez fría, se acidificó con ácido acético diluido hasta pH 5, y se concentró a sequedad en evaporador rotativo a vacío. Se formó un residuo amarillento que se disolvió en acetato de etilo y se lavó dos veces con agua. Se secó la disolución con sulfato sódico y nuevamente se llevó a sequedad. El residuo se recristalizó de benceno;  $P_f: 165^\circ\text{C}$ . Una recristalización ulterior de cloroformo condujo a 147 mg (rendimiento: 77 %) de un producto blanco,  $P_f: 166-167^\circ\text{C}$ . Las cromato-

grafías en placa fina, en benceno-acetato de etilo, (80:20 v/v) y en acetona-NH<sub>3</sub> 25 % (9:1 v/v) mostraron la presencia exclusiva del ácido (III) (R<sub>fS</sub>: 0,06 y 0,17 respectivamente).

### 3.1.3. Radioyodación del hapteno (III) por conjugación con 2-<sup>125</sup>I-histamina: Síntesis de (IV).

#### 3.1.3.1. Síntesis de la 2-yodohistamina <sup>125</sup>I.

En un tubo de vidrio provisto de tapón esmerilado se introdujo 1 mCi de Na<sup>125</sup>I (10 μl) (IMS 30. Amersham). Seguidamente se agregaron 25 μl (55,5 μg = 0,5 μmoles) de una solución de histamina disuelta en tampón (pH:8) de fosfato sódico 0,5 M y, bajo una suave agitación, 10 μl de una solución acuosa de cloramina-T (125 μg = 0,55 μmol). Transcurridos 2 minutos, se añadieron 10 μl (300 μg = 1,58 μmoles) de una solución de metabisulfito sódico. La mezcla de reacción se diluyó entonces con 50 μl de dioxano y se enfrió en baño de hielo a 0°C.

#### 3.1.3.2. Síntesis del anhídrido mixto.

En un tubo de vidrio provisto de tapón esmerilado se disolvieron 2,5 mg del ácido (III) (7 μmoles) en 200 μl de dioxano y se agregaron 17 μl de una solución de tributilamina en dioxano (1:10), equivalentes a 7 μmoles. Una vez enfriada la mezcla a 10°C, se agregaron bajo agitación 10 μl de una solución de cloroformiato de isobutilo en dioxano (1:10) equivalentes a 7,25 μmoles. Se mantuvo la mezcla de reacción a 10°C durante veinte minutos, transcurridos los cuales se diluyó con 470 μl de dioxano frío. (Esta nueva solución contiene 0,01 μmoles/μl de anhídrido mixto).

#### 3.1.3.3. Síntesis de la yodamida-<sup>125</sup>I (IV).

A la solución de la 2-yodohistamina-<sup>125</sup>I anterior (3.1.3.1.), previamente enfriada a 0°C, se añadió bajo agitación una alícuota

de 50  $\mu\text{l}$  (0,5  $\mu\text{moles}$ ) del anhídrido mixto recién preparado (3.1.3.2.), y seguidamente, 10  $\mu\text{l}$  de una solución de NaOH 0,1 M. La solución se mantuvo con agitación a 0°C durante 2 horas, transcurridas las cuales se agregó 1 ml de NaOH 0,2 M. La mezcla de reacción se extrajo con acetato de etilo agitando en un vortex con 3 ml del mismo. Se separó el extracto orgánico, se lavó dos veces con 1 ml de agua y se concentró a vacío. El residuo se disolvió en 50  $\mu\text{l}$  de dioxano y se aplicó en una placa de gel de sílice-60 Merck sin F que se desarrolló con acetona-NH<sub>3</sub> 25 % (9:1 v/v) (Fig. 3).

La radioactividad de la placa se identificó por autoradiografía con Film X-OMAT S, Kodak.

Una vez identificada la banda de radiactividad del conjugado marcado con I-125 sobre la TLC, mediante radiografía, se raspó la placa con las correspondientes precauciones para evitar el polvo y se eluyó por tratamiento con metanol durante media hora. A continuación se filtró y se evaporó a vacío. Finalmente se redisolvió el residuo en etanol.

La pureza radioquímica de la radioyodamida (IV), determinada por radiocromatoscanner, fué superior al 99 %. Su actividad específica de 3.850  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$  se calculó teóricamente basándose en la actividad específica del Na<sup>125</sup>I de partida. El rendimiento global de la radiosíntesis remontándose al Na<sup>125</sup>I alcanzó el 75 %. Almacenada la yodamida-<sup>125</sup>I en solución etanólica en la oscuridad a -20°C durante un mes se ha mantenido estable.



**BIBLIOGRAFIA**

- (1) Reuvers, Th., Perogordo, E. y Jiménez, R.  
"Control del Empleo de Anabolizantes en España".  
Alimentaria, 35 (1.988).
- (2) Decisión de la Comisión 87/410/CEE, del 14-7-1.987 publicada  
en el Diario Oficial de las Comunidades Europeas, nº L 223  
del 11-8-1.987.
- (3) Rombauts, R., Pierdet, A. y Jouquey, A.  
"Preparation et propriétés d'immunsérums anti-diethyl-stil-  
bestrol".  
C.R. Acad. Sc. Paris, t. 277. Serie D, 1921 (1.973).
- (4) Tóth, G.  
"Adsorption Chromatographic Behaviour of  $^{125}\text{I}$ -labelled  
Diethylstilbestrol".  
J. Chromat. 358, 264 (1.986).
- (5) Johnson, H.J., Cernosek, S.F. y Gutiérrez-Cernosek, R.M.  
"Preparation of the Radioiodinated Histamine Amide of  
4-0-(Carboxipropil)-diethylstilbestrol".  
J. Lab. Comp. vol. XVI, Nº 3, 501 (1.978).
- (6) Bolton, A.E.  
"Radioiodination techniques".  
Review 18. Amersham (1.985).
- (7) Knight, L.C. y Welch, M.J.  
"Sites of direct and indirect halogenation of albumin".  
Biochimica et Biophysica. Acta 534, 185 (1.978).
- (8) Roche, J., Lissitzky, S., Michel, O. y Michel, R.  
Biochim. and Biophys. Acta 7, 439 (1.951).

- (9) Erlanger, B.F., Borek, F., Beiser, S.M. y Liebermans.  
"Preparation and characterization of conjugates of Bovine serum Albumin with Testosterone and with Cortisone".  
J. Biol. Chem., 228, 713 (1.957).
- (10) Vaughan, J.R.  
"Acylalkylcarbonates as Acylating Agents for the Synthesis of Peptides".  
J. Am. Chem. Soc. 73, 3547 (1.951).
- (11) Vaughan, J.R. Jr. y Osato, R.L.  
"Preparation of Peptides Using Mixed carboxylic Acid Anhydrides".  
J. Am. Chem. Soc. 73, 5553 (1.951)
- (12) Vaughan, J.R. Jr. y Osato, R.L.  
"The Preparation of Peptides Using Mixed Carbonic-Carboxylic Acid Anhydrides".  
J. Am. Chem. Soc. 74, 676 (1.952).
- (13) Nars, P.W. y Hunter, W.M.  
"A Method for Labelling Oestradiol-17 $\beta$  with Radioiodine for Radioimmunoassays".  
Journal of Endocrinology 57, pág. XIVii (1.973).

TABLA I

 $R_{fS}$  DE DES (I), MONOETER (II) Y DIETER

COMPUESTO	$R_{fS} \times 100$
Cis-DES (I)	23
Trans-DES (I)	38
Monoéter (II)	46
Diéter	56

Eluyente: Benceno-Acetato de etilo (80:20 v/v).

Gel de sílice 60

Recorrido: 15 cm

Detección: Irradiación con lámpara de ultravioleta a 254 nm durante 30 minutos y visualización con luz de 366 nm.

TABLA II

$R_{fS}$  DE HISTAMINA, 2-YODOHISTAMINA Y 2,5-DIYODOHISTAMINA

COMPUESTO	$R_{fS} \times 100$	
	A	B
Histamina	0,48	0,31
2-Yodohistamina	0,73	0,47
2,5-Diyodohistamina	0,80	0,59

Sistema A: Eluyente: Acetona-NH<sub>3</sub> 25 % (9:1 v/v).

Sistema B: Eluyente: Butanol-NH<sub>3</sub> 25 % (8:2 v/v).

Gel de sílice 60 Merck analítica.

Cantidades aplicadas: 1-5  $\mu$ g.

Recorrido: 15 cm.

Revelador: Ninhidrina.

TABLA III

$R_{fs}$  DE 4-0-(CARBOXIPROPIL)-DIETILESTILBESTROL, (III),  
 AMIDA CON HISTAMINA DE III (V) Y AMIDA DE  
 2-YODOHISTAMINA DE III (IV)

COMPUESTO	$R_{fs} \times 100$	
	A	C
III	9	52
IV	65	35
V	53	3

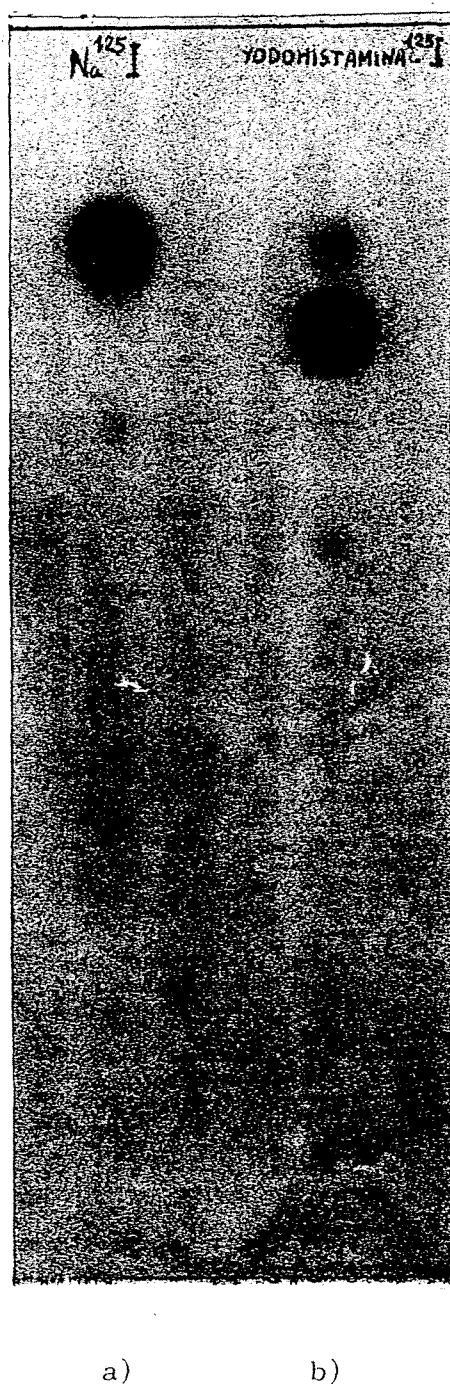
Sistema A: Eluyente: Acetona-NH<sub>3</sub> 25 % (9:1 v/v).

Sistema C: Eluyente: Benceno-Etanol-Ac. Acético (75:24:1 v/v).

Gel de sílice 60 F Merk.

Recorrido: 15 cm.





a)

b)

Fig. 1. Autorradiografía de las TLC de

a). Na <sup>125</sup>I

b). Producto bruto de radioyodación de histamina.

Gel de sílice 60 Merck. Recorrido: 15 cm. Sistema A.

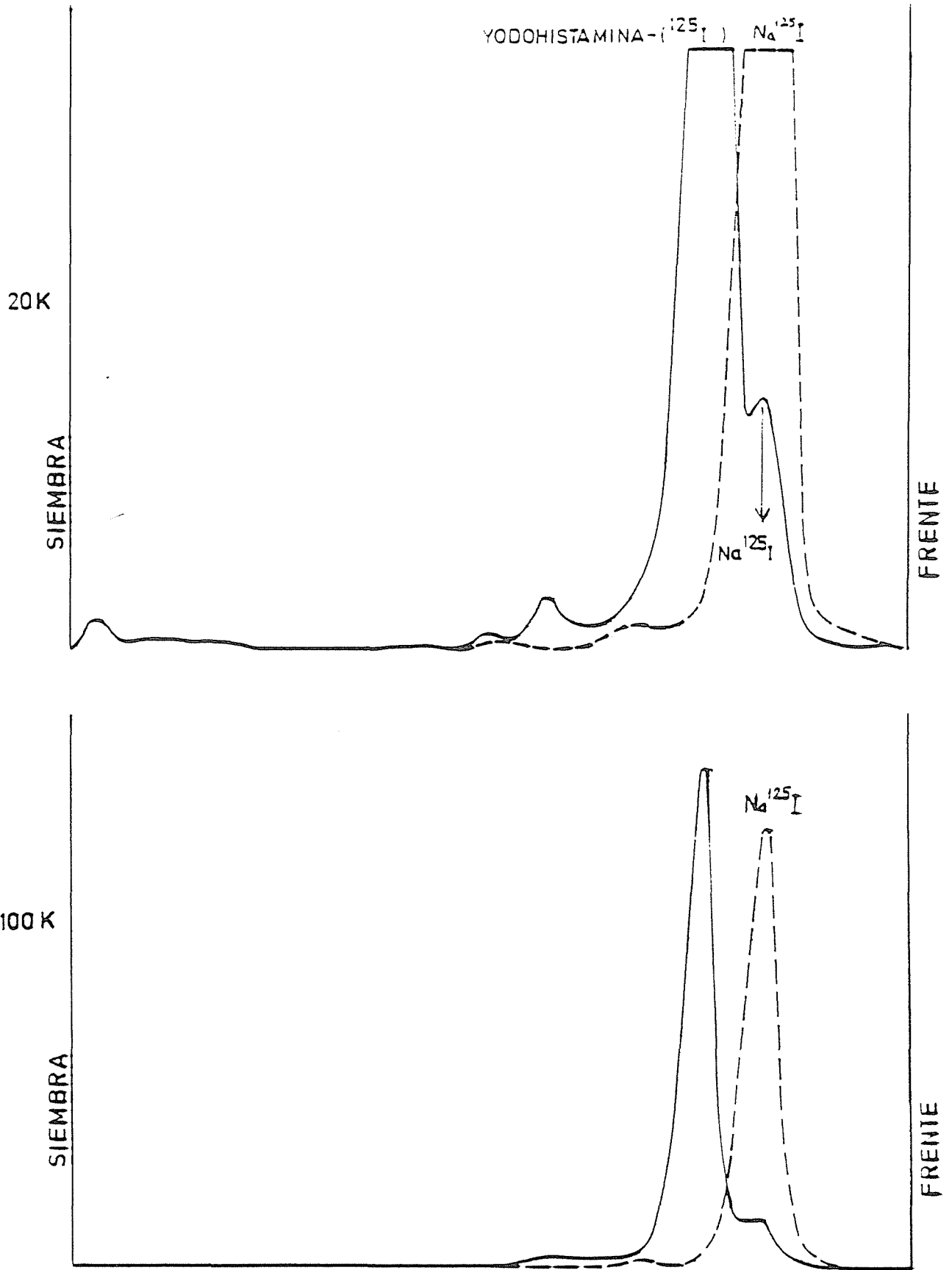


Fig. 2. Radiocromatoscanners superpuestos de  $Na^{125}I$  y de histamina marcada con I-125 bruta. Gel de sílice 60 Merck. Recorrido 15 cm. Eluyente A.



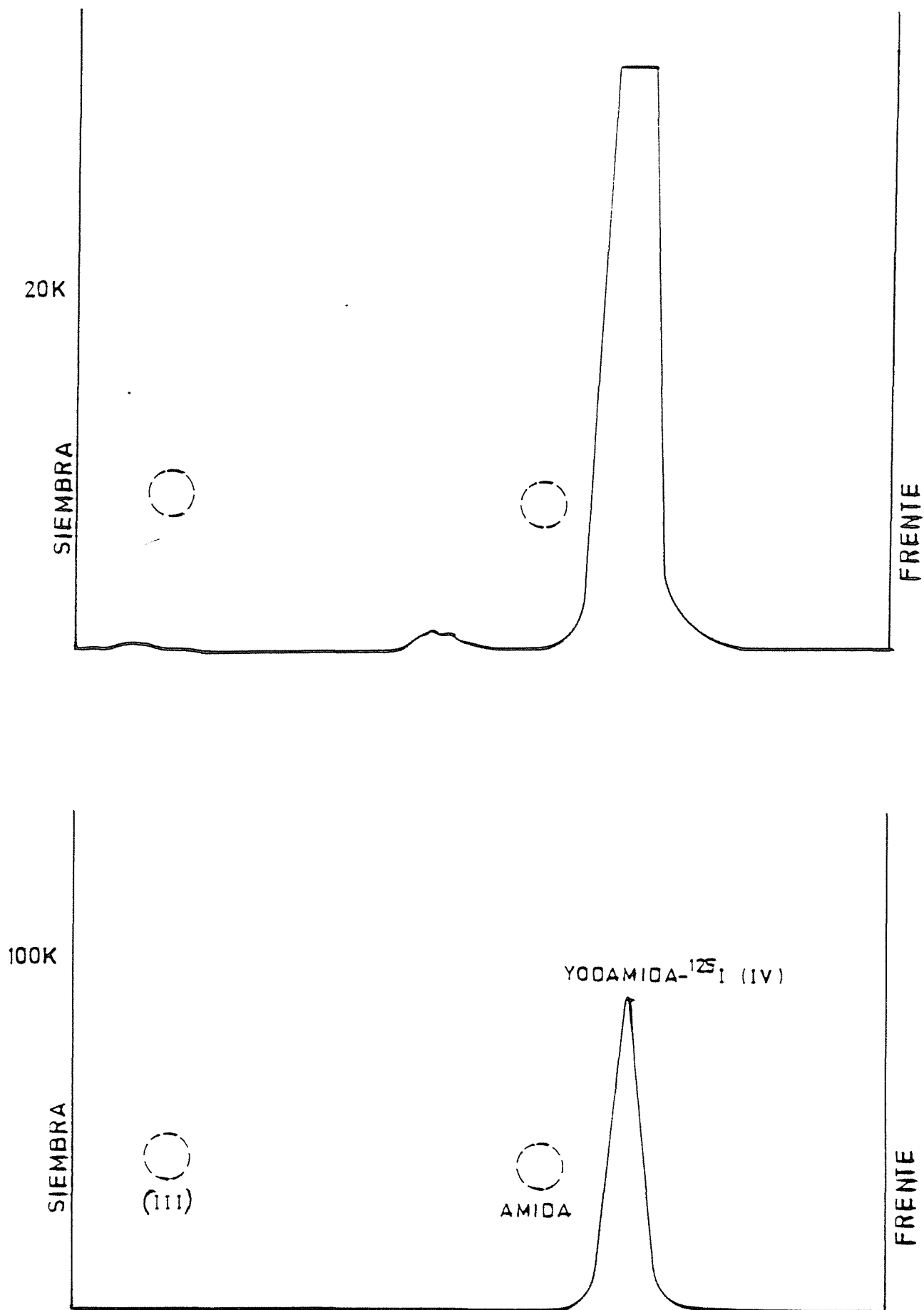


Fig. 3. Radiocromatoscanner de la solución orgánica (acetato de etilo) del hapteno marcado con I-125.  
Gel de sílice 60 F. Merck. Recorrido 15 cm. Eluyente A.

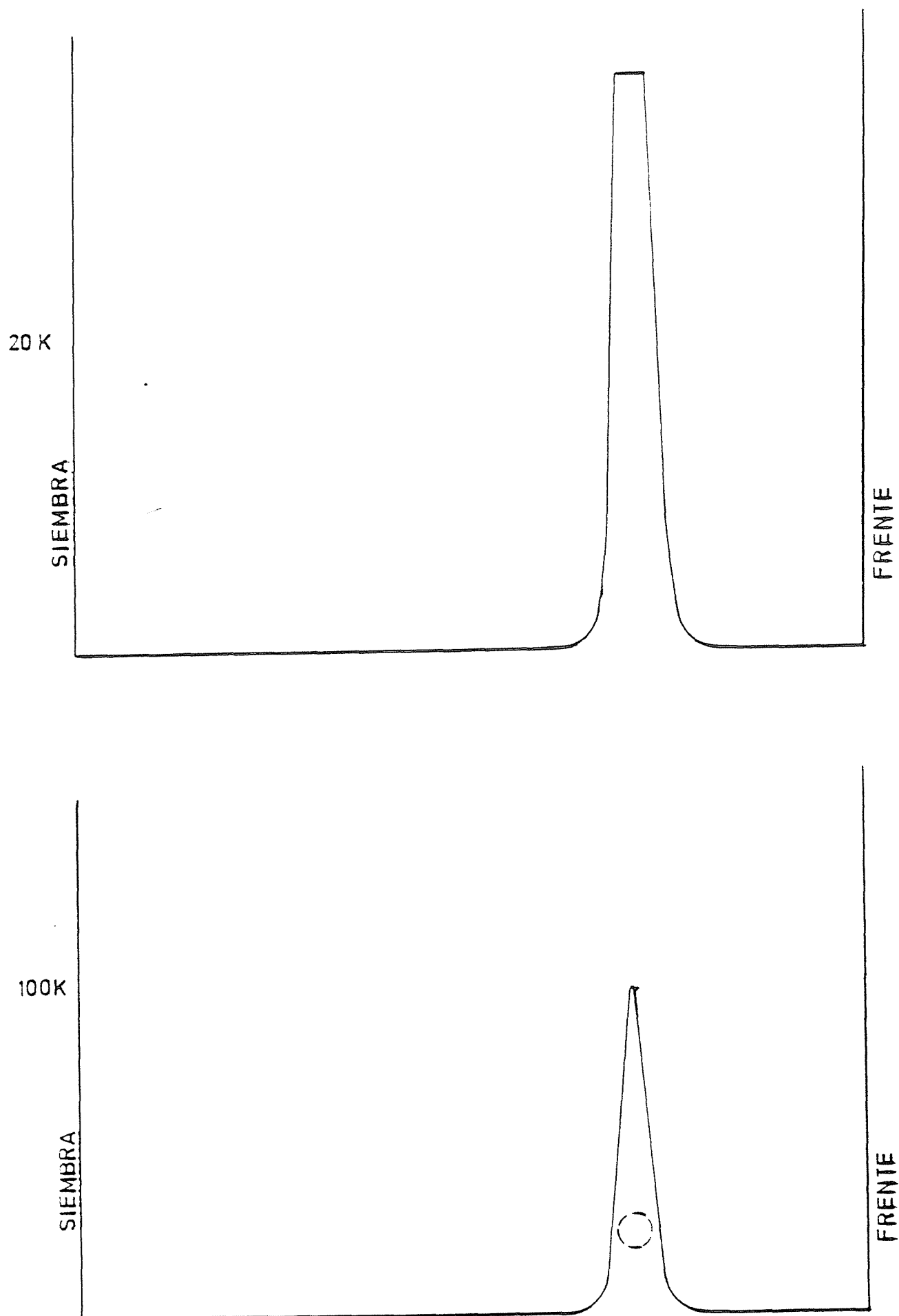


Fig. 4. Radiocromatoscanner de la radioyamida (IV) purificada por TLC gel de silice 60 F Merck. Recorrido 15 cm. Eluyente a. (Se incorporó portador de yodamida5.

#### CIEMAT-734

Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas.  
Dirección de Tecnología.

### "Optimización de un método de preparación de un radiohapteno-<sup>125</sup>I para ría de alta actividad específica".

SUÁREZ, C., PAZ, D., SIMÓN, M<sup>a</sup>. a., ROMERO DEL HOMBREBUENO, B.  
(1994) 29 pp.; 4 figs.; 13 refs.

En este primer trabajo se describe con detalle la síntesis, aislamiento y purificación de la amida de 2-yodohistamina-<sup>125</sup>I del 4-0-(carboxipropil)-dietilestilbestrol obtenida por conjugación de un derivado del dietilestilbestrol con 2-yodohistamina-<sup>125</sup>I mediante la técnica del anhídrido mixto.

El rendimiento de la radiosíntesis con respecto al Na<sup>125</sup>I de partida fue alto, de un 75%, para una relación anhídrido mixto:histamina de 1:1; la pureza radioquímica, comprobada por radiocromatografía, superior al 99% y la actividad específica de 3850  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ .

La estabilidad del radiohapteno-<sup>125</sup>I es buena ya que disuelto en etanol y almacenado en la oscuridad a -20 °C experimentó, al cabo de un mes, una descomposición inferior al 1%.

DOE CLASSIFICATION AND DESCRIPTORS: 400600. Radiochemistry. Radioimmunoassay. Amines. Anhydrides. Ethanol. Iodine 125.

#### CIEMAT-734

Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas.  
Dirección de Tecnología.

### "Optimización de un método de preparación de un radiohapteno-<sup>125</sup>I para ría de alta actividad específica".

SUÁREZ, C., PAZ, D., SIMÓN, M<sup>a</sup>. a., ROMERO DEL HOMBREBUENO, B.  
(1994) 29 pp.; 4 figs.; 13 refs.

En este primer trabajo se describe con detalle la síntesis, aislamiento y purificación de la amida de 2-yodohistamina-<sup>125</sup>I del 4-0-(carboxipropil)-dietilestilbestrol obtenida por conjugación de un derivado del dietilestilbestrol con 2-yodohistamina-<sup>125</sup>I mediante la técnica del anhídrido mixto.

El rendimiento de la radiosíntesis con respecto al Na<sup>125</sup>I de partida fue alto, de un 75%, para una relación anhídrido mixto:histamina de 1:1; la pureza radioquímica, comprobada por radiocromatografía, superior al 99% y la actividad específica de 3850  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ .

La estabilidad del radiohapteno-<sup>125</sup>I es buena ya que disuelto en etanol y almacenado en la oscuridad a -20 °C experimentó, al cabo de un mes, una descomposición inferior al 1%.

DOE CLASSIFICATION AND DESCRIPTORS: 400600. Radiochemistry. Radioimmunoassay. Amines. Anhydrides. Ethanol. Iodine 125.

#### CIEMAT-734

Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas.  
Dirección de Tecnología.

### "Optimización de un método de preparación de un radiohapteno-<sup>125</sup>I para ría de alta actividad específica".

SUÁREZ, C., PAZ, D., SIMÓN, M<sup>a</sup>. a., ROMERO DEL HOMBREBUENO, B.  
(1994) 29 pp.; 4 figs.; 13 refs.

En este primer trabajo se describe con detalle la síntesis, aislamiento y purificación de la amida de 2-yodohistamina-<sup>125</sup>I del 4-0-(carboxipropil)-dietilestilbestrol obtenida por conjugación de un derivado del dietilestilbestrol con 2-yodohistamina-<sup>125</sup>I mediante la técnica del anhídrido mixto.

El rendimiento de la radiosíntesis con respecto al Na<sup>125</sup>I de partida fue alto, de un 75%, para una relación anhídrido mixto:histamina de 1:1; la pureza radioquímica, comprobada por radiocromatografía, superior al 99% y la actividad específica de 3850  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ .

La estabilidad del radiohapteno-<sup>125</sup>I es buena ya que disuelto en etanol y almacenado en la oscuridad a -20 °C experimentó, al cabo de un mes, una descomposición inferior al 1%.

DOE CLASSIFICATION AND DESCRIPTORS: 400600. Radiochemistry. Radioimmunoassay. Amines. Anhydrides. Ethanol. Iodine 125.

#### CIEMAT-734

Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas.  
Dirección de Tecnología.

### "Optimización de un método de preparación de un radiohapteno-<sup>125</sup>I para ría de alta actividad específica".

SUÁREZ, C., PAZ, D., SIMÓN, M<sup>a</sup>. a., ROMERO DEL HOMBREBUENO, B.  
(1994) 29 pp.; 4 figs.; 13 refs.

En este primer trabajo se describe con detalle la síntesis, aislamiento y purificación de la amida de 2-yodohistamina-<sup>125</sup>I del 4-0-(carboxipropil)-dietilestilbestrol obtenida por conjugación de un derivado del dietilestilbestrol con 2-yodohistamina-<sup>125</sup>I mediante la técnica del anhídrido mixto.

El rendimiento de la radiosíntesis con respecto al Na<sup>125</sup>I de partida fue alto, de un 75%, para una relación anhídrido mixto:histamina de 1:1; la pureza radioquímica, comprobada por radiocromatografía, superior al 99% y la actividad específica de 3850  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ .

La estabilidad del radiohapteno-<sup>125</sup>I es buena ya que disuelto en etanol y almacenado en la oscuridad a -20 °C experimentó, al cabo de un mes, una descomposición inferior al 1%.

DOE CLASSIFICATION AND DESCRIPTORS: 400600. Radiochemistry. Radioimmunoassay. Amines. Anhydrides. Ethanol. Iodine 125.



CIEMAT-734

Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas.  
Dirección de Tecnología.

**"Optimization of the synthesis of a high specific activity  $^{125}\text{I}$ -labelled hapten for radioimmunoassays".**

SUÁREZ, C., PAZ, D., SIMÓN, M<sup>a</sup>. a., ROMERO DEL HOMBREBUENO, B.  
(1994) 29 pp.; 4 figs.; 13 refs.

In this first report it is described the synthesis, separation and purification of the 2-radioiodinated histamine- $^{125}\text{I}$ -labelled histamine by a mixed anhydride reaction.

About 75% incorporation of  $\text{I}^{125}$ , from  $\text{Na}^{125}\text{I}$ , was achieved with a molecular ratio of 1:1 mixed anhydride:histamine.

The radiochemical purity of the conjugate by TLC was > 99% and its theoretical specific activity, 3850  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ .

Dissolved in ethanol and held at -20 °C under darkness decomposition on storage didn't exceed 1% per month.

DOE CLASSIFICATION AND DESCRIPTORS: 400600. Radiochemistry. Radioimmunoassay. Amines. Anhydrides. Ethanol. Iodine 125.

CIEMAT-734

Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas.  
Dirección de Tecnología.

**"Optimization of the synthesis of a high specific activity  $^{125}\text{I}$ -labelled hapten for radioimmunoassays".**

SUÁREZ, C., PAZ, D., SIMÓN, M<sup>a</sup>. a., ROMERO DEL HOMBREBUENO, B.  
(1994) 29 pp.; 4 figs.; 13 refs.

In this first report it is described the synthesis, separation and purification of the 2-radioiodinated histamine- $^{125}\text{I}$ -labelled histamine by a mixed anhydride reaction.

About 75% incorporation of  $\text{I}^{125}$ , from  $\text{Na}^{125}\text{I}$ , was achieved with a molecular ratio of 1:1 mixed anhydride:histamine.

The radiochemical purity of the conjugate by TLC was > 99% and its theoretical specific activity, 3850  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ .

Dissolved in ethanol and held at -20 °C under darkness decomposition on storage didn't exceed 1% per month.

DOE CLASSIFICATION AND DESCRIPTORS: 400600. Radiochemistry. Radioimmunoassay. Amines. Anhydrides. Ethanol. Iodine 125.

CIEMAT-734

Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas.  
Dirección de Tecnología.

**"Optimization of the synthesis of a high specific activity  $^{125}\text{I}$ -labelled hapten for radioimmunoassays".**

SUÁREZ, C., PAZ, D., SIMÓN, M<sup>a</sup>. a., ROMERO DEL HOMBREBUENO, B.  
(1994) 29 pp.; 4 figs.; 13 refs.

In this first report it is described the synthesis, separation and purification of the 2-radioiodinated histamine- $^{125}\text{I}$ -labelled histamine by a mixed anhydride reaction.

About 75% incorporation of  $\text{I}^{125}$ , from  $\text{Na}^{125}\text{I}$ , was achieved with a molecular ratio of 1:1 mixed anhydride:histamine.

The radiochemical purity of the conjugate by TLC was > 99% and its theoretical specific activity, 3850  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ .

Dissolved in ethanol and held at -20 °C under darkness decomposition on storage didn't exceed 1% per month.

DOE CLASSIFICATION AND DESCRIPTORS: 400600. Radiochemistry. Radioimmunoassay. Amines. Anhydrides. Ethanol. Iodine 125.

CIEMAT-734

Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas.  
Dirección de Tecnología.

**"Optimization of the synthesis of a high specific activity  $^{125}\text{I}$ -labelled hapten for radioimmunoassays".**

SUÁREZ, C., PAZ, D., SIMÓN, M<sup>a</sup>. a., ROMERO DEL HOMBREBUENO, B.  
(1994) 29 pp.; 4 figs.; 13 refs.

In this first report it is described the synthesis, separation and purification of the 2-radioiodinated histamine- $^{125}\text{I}$ -labelled histamine by a mixed anhydride reaction.

About 75% incorporation of  $\text{I}^{125}$ , from  $\text{Na}^{125}\text{I}$ , was achieved with a molecular ratio of 1:1 mixed anhydride:histamine.

The radiochemical purity of the conjugate by TLC was > 99% and its theoretical specific activity, 3850  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ .

Dissolved in ethanol and held at -20 °C under darkness decomposition on storage didn't exceed 1% per month.

DOE CLASSIFICATION AND DESCRIPTORS: 400600. Radiochemistry. Radioimmunoassay. Amines. Anhydrides. Ethanol. Iodine 125.

