

## STABILITA RADIOAKTIVNĚ ZNAČENÝCH SLOUČENIN S VYSOKOU SPECIFICKOU AKTIVITOU

**TOMÁŠ ELBERT**

Ústav organické chemie a biochemie AVČR, v.v.i., Flemingovo nám. 542/2, 160 00 Praha 6  
elbert@uochb.cas.cz

Došlo 17.1.20, přijato 29.6.20.

Klíčová slova: radioaktivně značené sloučeniny, tritium, stabilita, radiolýza

### Obsah

1. Úvod
2. Procesy vedoucí k rozkladu radioaktivně značených sloučenin
3. Osud vazby C–<sup>3</sup>H po radioaktivním rozpadu tritia
4. Studie stability 9-([5'endo,6'endo-<sup>3</sup>H<sub>2</sub>]norborn-2-yl)-6-chloro-purinu (I)
5. Shrnutí

### 1. Úvod

Bezprostředním impulsem k napsání tohoto článku byla osobní zkušenost autora. Zavolał mi spolužák ze studií pracující na nejmenovaném ústavu AVČR, že by potřeboval ověřit radiochemickou čistotu ligandu značeného tritiem. Po vyjasnění, že se jedná o osm roků starý preparát s aktivitou 51 Ci/mmol, jsem se marně snažil dotyčného přesvědčit, ať ligand rovnou umístí do radioaktivního odpadu. V Průvodním listě radioaktivně značeného ligandu bylo uvedeno, že při skladování v originálním balení při –20 °C dochází k degradaci radiochemické čistoty o 1 % měsíčně, ale tomu kolega odmítal věřit. Na jeho úpěnlivé naléhání jsem vzorek nakonec analyzoval pomocí radio-HPLC. Jak se dalo očekávat, po původním značeném li-

gandu nezůstala ani stopa (viz obr. 1). Jiný nejmenovaný kolega si zase přál, aby námi na zakázku připravený substrát značený tritiem o specifické aktivitě 20 Ci/mmol mohl používat 5 let. Jak je to tedy se stabilitou radioaktivně značených sloučenin a jsou údaje o použitelnosti preparátu v Průvodním listě od výrobce jen marketingovým trikem, jak donutit zákazníka k nákupu vždy čerstvého produktu?

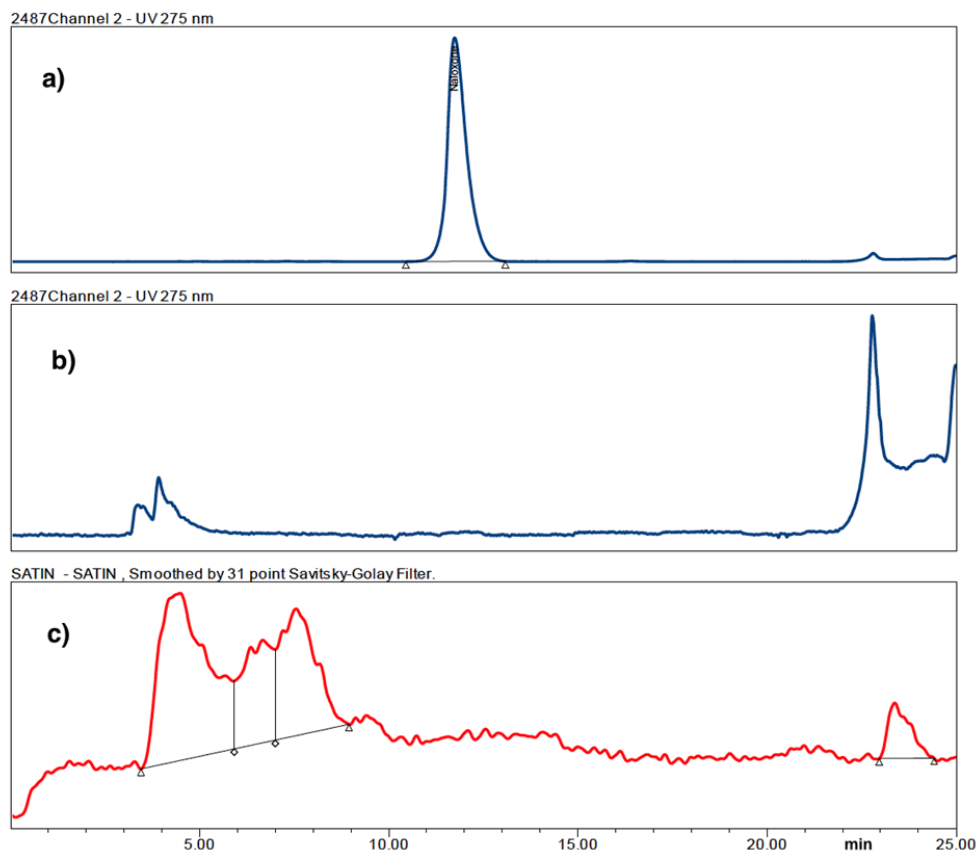
### 2. Procesy vedoucí k rozkladu radioaktivně značených sloučenin

První práci upozorňující na zvýšenou nestabilitu sloučenin značených radiouhlikem <sup>14</sup>C ve srovnání s jejich neznačenými analogy publikovali Calvin a spol.<sup>1</sup> v roce 1953. Bayly a Weigel rozdělili<sup>2</sup> procesy vedoucí k rozkladu radioaktivně značených sloučenin do čtyř skupin (viz tabulka I).

Rychlost, s níž dochází k rozkladu *primárním vnitřním procesem*, je daná poločasem rozpadu radioaktivní značky – připomeňme si na tomto místě, že poločas rozpadu radiouhliku <sup>14</sup>C je 5730 roků, poločas rozpadu tritia <sup>3</sup>H je 12,7 roků. Protože při experimentech s radioaktivně značenými sloučeninami je hlavní sledovanou veličinou aktivita (tedy počet radioaktivních rozpadů za jednotku času), je kritériem pro čistotu radioaktivně značených sloučenin tzv. radiochemická čistota (radiochemical purity, R.P.), která vyjadřuje v procentech obsah aktivity ve formě dané sloučeniny vzhledem k celkové aktivitě preparátu. Je-li tedy deklarována radiochemická čistota 97 % pro L-[<sup>3</sup>H]leucin, znamená to, že 3 % aktivity preparátu je v jiné, blíže nespecifikované, chemické formě než je L-[<sup>3</sup>H]leucin. Tento údaj se musí zohlednit při vyhodnocování experimentu. Pokud bude v molekule sloučeniny jen jeden radioaktivní atom, primární vnitřní proces nemá na radiochemickou čistotu vliv (fragmenty molekuly po radioaktivním rozpadu nejsou radioaktivní). Pokud bude značená sloučenina obsahovat dva a více atomů radiouhliku <sup>14</sup>C, tak po radioaktivní přeměně jednoho atomu <sup>14</sup>C na <sup>14</sup>N

Tabulka I  
Procesy vedoucí k rozkladu radioaktivně značených sloučenin

Rozkladný proces	Popis procesu
Primární (vnitřní)	radioaktivní rozpad atomu ve značené molekule
Primární (vnější)	přímá interakce radioaktivní částice z rozpadu se sousední intaktní molekulou
Sekundární	interakce excitovaných molekul prostředí (rozpouštědla, rozpuštěných plynů) vzniklých průletem radioaktivní částice s molekulami značené sloučeniny
Chemická	termodynamická nestabilita sloučeniny, nevhodný výběr rozpouštědla – v podstatě shodné s neznačenou sloučeninou



Obr. 1. Radio-HPLC  $[N\text{-allyl-}2,3\text{-}^3\text{H}]\text{naloxonu}$ ; a) neradioaktivní standard naloxonu (UV detektor), b) osm let starý preparát  $[N\text{-allyl-}2,3\text{-}^3\text{H}]\text{naloxonu}$  (UV detektor), c) osm let starý preparát  $[N\text{-allyl-}2,3\text{-}^3\text{H}]\text{naloxonu}$  (detektor radioaktivity)

už to chemicky není původní sloučenina (navíc dochází i k desintegraci vazeb) a výsledná molekula (molekuly) se tak stává (stávají) radiochemickou nečistotou. V případě radiouhlíku  $^{14}\text{C}$  je primární vnitřní proces v podstatě rovněž bez vlivu na radiochemickou čistotu – za 1 rok se rozpadne 0,001 % atomů, takže i když bude 10 atomů  $^{14}\text{C}$  v jedné výchozí molekule, tak za jeden rok se radiochemická čistota sníží o zanedbatelných 0,01 %. Při značení tritiem  $^3\text{H}$  je situace jiná – za 1 rok se rozpadne 5,5 % atomů. To znamená, že jen samotný primární vnitřní proces způsobí pokles radiochemické čistoty  $L\text{-}[^3\text{H}]\text{leucinu}$  o měrné aktivitě 58,2 Ci/mmol (tj. obsahujícího 2 atomy tritia  $^3\text{H}$  v molekule) z původních 97 % na 91,5 %. To je již hodnota většinou nepřijatelná, např. ve farmaceutickém výzkumu. Navíc dojde i k poklesu specifické aktivity procesy, ke kterým ještě dojdeme.

*Primární vnější proces* hraje roli v případě radioaktivně značených preparátů s nízkou měrnou aktivitou uchovávaných ve formě chemicky čistých sloučenin. Hmotnost značených sloučenin s vysokou měrnou aktivitou je natolik nízká, že je s nimi manipulováno jako s roztoky, a tak lze dostatečným naředěním tento proces potlačit.

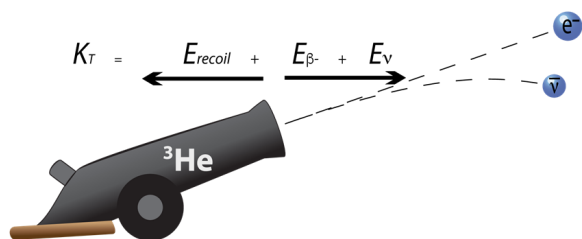
*Sekundární procesy* se podílejí největší měrou na poklesu radiochemické čistoty během skladování značených sloučenin značených radionuklidy. Zejména v případě nízkoenergetických  $\beta$ -zářičů, jako jsou  $^{14}\text{C}$  a  $^3\text{H}$ , je veškerá energie vyzářených elektronů spotřebována na velmi krátké dráze k excitaci molekul prostředí (doběh  $\beta$ -částic vyzářených radionuklidem  $^{14}\text{C}$  ve vodě je 0,3 mm, pro  $^3\text{H}$  je to jen 0,006 mm). Biologicky aktivní sloučeniny značené radionuklidy jsou většinou velmi polární a aplikují se do živých systémů – proto je voda nejčastěji používaným rozpouštědlem pro přípravu jejich roztoků. Excitace molekul vody  $\beta$ -částicemi je složitý proces. Z hlediska stability značených sloučenin je klíčový vznik  $\text{OH}^\bullet$  radikálů schopných jednak přímo hydroxylovat některé polohy v organických molekulách a dále i oxidovat již přítomné funkční skupiny jako např. hydroxy- či aminoskupiny.

*Chemické procesy* snižující radiochemickou čistotu radioaktivně značených sloučenin jsou stejné pro značené i nezačtené molekuly dané sloučeniny a nebudeme se jimi v tomto článku zabývat.

### 3. Osud vazby C–<sup>3</sup>H po radioaktivním rozpadu tritia

Celková kinetická energie  $K_T$  uvolněná během radioaktivního rozpadu atomu <sup>3</sup>H se rozdělí mezi odlétající  $\beta$ -částici, nově vzniklý atom <sup>3</sup>He<sup>+</sup> a antineutrino v. Energie  $\beta$ -částice je absorbována v prostředí za vzniku excitovaných molekul a podílí se na sekundárních procesech. Pravděpodobnost interakce antineutrína s prostředím je mizivá a nemusíme ji uvažovat. Důležitý je osud teoreticky velmi slabé vazby C–<sup>3</sup>He<sup>+</sup>. Nově vzniklý atom <sup>3</sup>He<sup>+</sup> má velkou kinetickou energii – ta je důsledkem principu akce a reakce. Stöcklin přirovnal emisi ionizující částice při radioaktivním rozpadu k výstřelu z děla<sup>3</sup> – přeměňující se atom je dělo a odlétající částice jsou projektily (obr. 2).

Kinetická energie  $E_{recoil}$  atomu <sup>3</sup>He<sup>+</sup> se pohybuje v rozmezí jednotek až stovek elektronvoltů (eV). Disociační energie vazby C–<sup>1</sup>H je mezi 4 až 5 eV. Disociační energie hypotetické C–<sup>3</sup>He<sup>+</sup> vazby je mnohem nižší než disociační energie C–<sup>1</sup>H vazby, a tedy energie nově vzniklého atomu <sup>3</sup>He<sup>+</sup> zcela postačuje k okamžitému štěpení C–<sup>3</sup>He<sup>+</sup>



Obr. 2. Rozdělení energie uvolněné radioaktivním rozpadem atomu tritia

vazby. Dva možné způsoby štěpení vazby C–<sup>3</sup>He<sup>+</sup> zobrazuje schéma 1. V případě A) kladný náboj zůstává na atomu uhlíku za vzniku karbokationtu, v případě B) kladný náboj odnáší odstupující heliový atom a vzniká tak radikál molekuly. Oba způsoby štěpení C–<sup>3</sup>He<sup>+</sup> vazby a různé způsoby stabilizace molekuly po radioaktivním rozpadu tritia byly pozorovány při studiu stability 9-([5'endo,6'endo-<sup>3</sup>H<sub>2</sub>]norborn-2-yl)-6-chloro-purinu (**I**) (<sup>3</sup>H]TNB-6-Cl-purinu **I**) popsánem v další části.

### 4. Studie stability 9-([5'endo,6'endo-<sup>3</sup>H<sub>2</sub>]-norborn-2-yl)-6-chloro-purinu (**I**)

[<sup>3</sup>H]TNB-6-Cl-purin **I** byl připraven katalytickou tritiací nenasyceného prekurzoru, 9-(norborn-5-en-2-yl)-6-chloro-purinu, beznosičovým tritiem na 10% Pd/C v ethyl-acetátu<sup>4</sup>. Struktura látky **I** byla potvrzena <sup>1</sup>H NMR a <sup>3</sup>H NMR, radiochemická čistota po izolaci pomocí radio-HPLC byla > 99 %, měrná aktivita byla 47,5 Ci/mmol (1,76 TBq/mmol). Roztok látky **I** ve směsi ethanol–voda

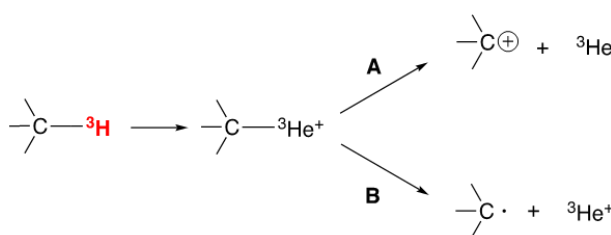
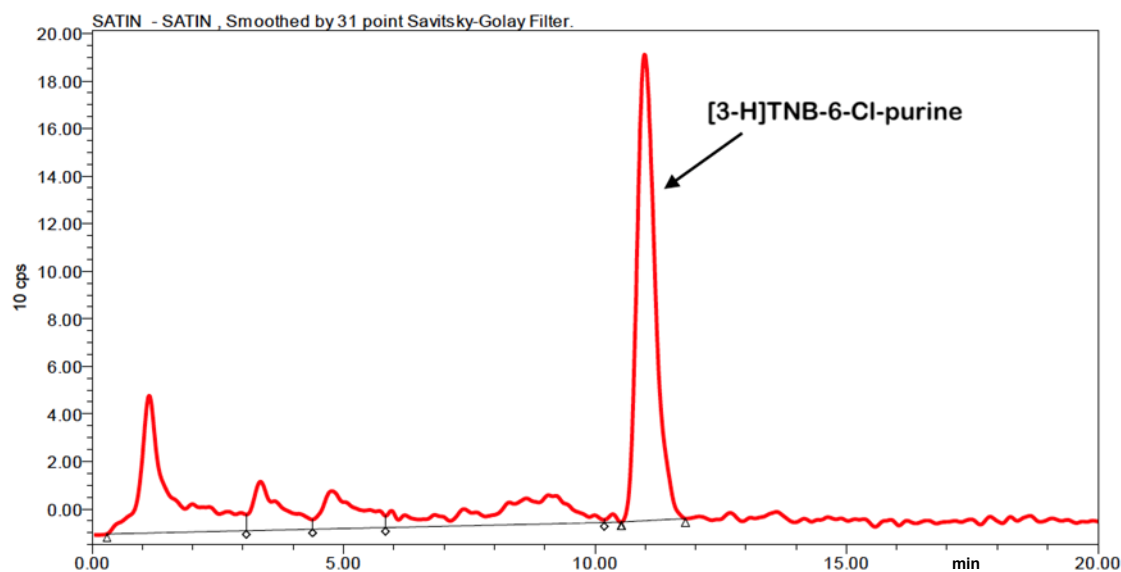
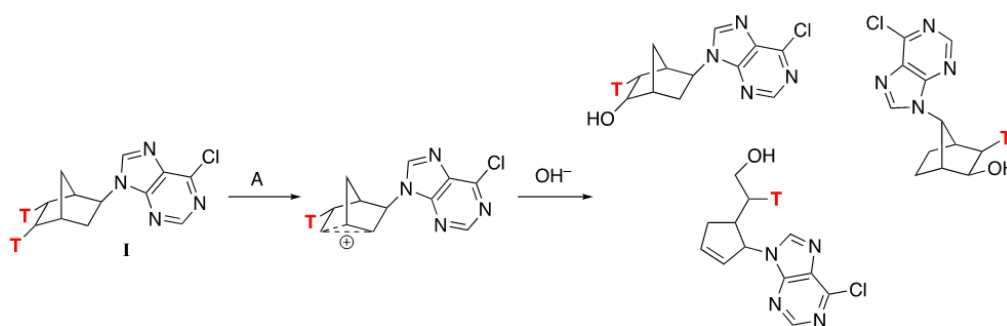


Schéma 1. Štěpení vazby C–<sup>3</sup>He<sup>+</sup>



Obr. 3. Radio-HPLC [<sup>3</sup>H]TNB-6-Cl-purinu **I** skladovaného 3 roky a 10 měsíců v kapalném dusíku

Schéma 2. Štěpení vazby C–<sup>3</sup>He<sup>+</sup> v [<sup>3</sup>H]TNB-6-Cl-purinu I způsobem A

1:1 (v/v) o koncentraci 1 mCi/ml (37 MBq/ml) byl skladován 3,8 roku při –196 °C v kapalném dusíku. Radiochemická čistota po rozmražení byla stanovena 47 % pomocí radio-HPLC (obr. 3).

Výsledek štěpení vazby C<sub>5<sup>endo</sup></sub>–<sup>3</sup>He<sup>+</sup> způsobem A) za vzniku neklasického norbornylového karbokationtu<sup>5</sup> a neutrálního atomu <sup>3</sup>He je shrnut ve schématu 2. Reakce tohoto kationtu s hydroxidovým aniontem vede ke směsi produktů, které jsou polárnější než výchozí látka a mají tak kratší retenční čas při radio-HPLC na reverzní fázi (srovnej obr. 3). Štěpení vazby C<sub>6<sup>endo</sup></sub>–<sup>3</sup>He<sup>+</sup> vede k obdobné směsi produktů. Všechny tyto radioaktivní nečistoty lze snadno odstranit pomocí preparativní radio-HPLC a nemají tedy vliv na vlastnosti přečištěného [<sup>3</sup>H]TNB-6-

-Cl-purinu I.

Nižší měrná aktivita přečištěného [<sup>3</sup>H]TNB-6-Cl-purinu I ve srovnání s čerstvě připraveným produktem svědčí o tom, že alternativně dochází i k homolytickému štěpení vazeb C<sub>5<sup>endo</sup></sub>–<sup>3</sup>He<sup>+</sup> a C<sub>6<sup>endo</sup></sub>–<sup>3</sup>He<sup>+</sup> za vzniku příslušných C-radikálů a kladně nabitých atomů <sup>3</sup>He. Hlavní reakcí těchto radikálů je odtržení vodíkového radikálu z molekuly rozpouštědla za vzniku C–<sup>1</sup>H vazby (viz schéma 3). Symboly T–2, T–1 a T–0 ve schématu 3 označují molekuly TNB-6-Cl-purinu I se dvěma, jedním či žádným atomem tritia.

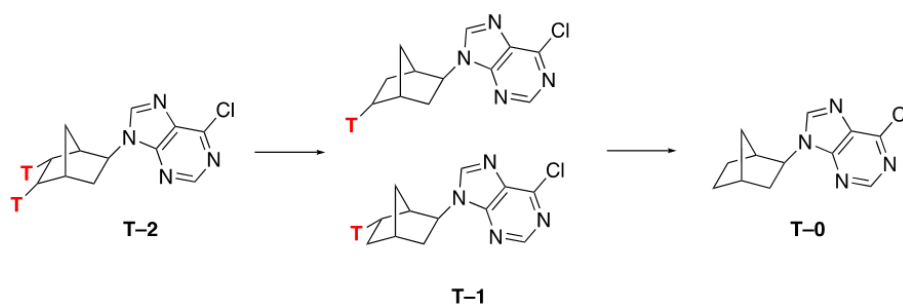
V tabulce II je porovnáno procentuální zastoupení jednotlivých typů těchto molekul v čerstvě připraveném [<sup>3</sup>H]TNB-6-Cl-purinu I a v [<sup>3</sup>H]TNB-6-Cl-purinu I přečiš-

Tabulka II

Procentuální zastoupení T–2, T–1 a T–0 v [<sup>3</sup>H]TNB-6-Cl-purinu I

Vzorek	% T–2	% T–1	% T–0	Měrná aktivita <sub>UV</sub> <sup>a</sup> [Ci/mmol]	Měrná aktivita <sub>MS</sub> <sup>b</sup> [Ci/mmol]
Čerstvě připravený	78,4	6,3	15,3	47,5	–
Skladovaný 3 r 10 m přečištěný	61,7	14,2	24,1	40,8	40
Vypočteno pro 3 r 10 m	51	28	21		37,8 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> Hmotnost byla stanovena pomocí HPLC s UV detektorem, <sup>b</sup> obsah tritia v molekule byl stanoven pomocí hmotnostní spektrometrie, <sup>c</sup> vypočteno na základě procentuálního zastoupení T–2, T–1 a T–0

Schéma 3. Snížení měrné aktivity [<sup>3</sup>H]TNB-6-Cl-purinu I způsobené štěpením vazby C–<sup>3</sup>He<sup>+</sup> způsobem B

těném po 3,8 rocích skladování. Zastoupení bylo vypočítáno na základě změřených měrných aktivit a  $^3\text{H}$  NMR spekter. Ve třetím řádku tabulky je uvedeno zastoupení jednotlivých typů molekul vypočtené pomocí rovnic pro kinetiku konsektivních radioaktivních přeměn<sup>6,7</sup> za předpokladu, že 100 % rozpadů vazeb  $\text{C}-^3\text{He}^+$  probíhá homolyticky způsobem B) a C radikál se stabilizuje za vzniku vazby  $\text{C}-^1\text{H}$ . Třikrát nižší nárůst skutečného zastoupení molekul T-1 v porovnání s teorií dokumentuje, že  $\text{C}-^3\text{He}^+$  vazby v molekulách T-2 se štěpí za následného vzniku  $\text{C}-^1\text{H}$  jen v jedné třetině případů. Zbytek připadá na polární štěpení za vzniku neklasického karbokationtu, popřípadě na stabilizaci C-radikálu jinou reakcí, než je odtržení vodíku z molekuly rozpouštědla.

## 5. Shrnutí

Radioaktivním rozpadem tritia ve vazbě  $\text{C}-^3\text{H}$  se vazba změní na  $\text{C}-^3\text{He}^+$  a ta se okamžitě rozpadá dvěma možnými způsoby – způsobem A) za vzniku neutrálního  $^3\text{He}$  a karbokationtu anebo způsobem B) za vzniku kladně nabitého  $^3\text{He}^+$  a C-radikálu. To vede k pestré směsi produktů. V případě, že ve výchozí radioaktivně značené molekule je více než jeden atom tritia, jsou i produkty vzniklé rozpadem jednoho atomu tritia radioaktivní a stávají se tak radioaktivní nečistotou. Rozpad vazby  $\text{C}-^3\text{He}^+$  za vzniku karbokationtu vede k radioaktivním nečistotám s podstatně odlišnými vlastnostmi než má původní sloučenina, které se dají snadno oddělit při přečištění pomocí radio-HPLC. Naproti tomu výsledkem stabilizace C-radikálu odtržením atomu vodíku z molekuly prostředí za vzniku stabilní  $\text{C}-^1\text{H}$  vazby je substituce  $^3\text{H}$  za  $^1\text{H}$  ve výchozí značené sloučenině, a tím i pokles měrné aktivity výchozí sloučeniny. Lze proto jen doporučit dbát pokynů dodavatele tritiem značené sloučeniny, týkajících se způsobu jejího skladování a expirační doby (tj. poklesu radiochemické čistoty pod stanovenou mez). Sloučeniny značené tritiem lze skladovat po rychlém zamrazení roztoků o koncentraci aktivity 1 mCi/ml (37 MBq/ml) v kapalném dusíku. Je-li doba skladování jeden rok a více, musí se po rozmrazení ověřit radiochemická čistota. Klesne-li radiochemická čistota pod 97 %, lze látku přečistit pomocí radio-HPLC, je ale nutné u takto přečištěné značené sloučeniny znovu změřit měrnou aktivitu, která bude díky záměně tritia za vodík  $^1\text{H}$  vždy nižší než výchozí.

Radiochemická čistota sloučenin značených radio-nuklidem  $^{14}\text{C}$  klesá v čase pomaleji, než je tomu u tritiových sloučenin. Radiochemické nečistoty lze snadno oddělit pomocí radio-HPLC a měrná aktivita po přečištění je pak stejná jako měrná aktivita původního preparátu.

*Tato práce byla podpořena z prostředků na rozvoj výzkumných organizací RVO č. 61388963.*

## LITERATURA

1. Tolbert B. M., Adams P. T., Bennett E. L., Hughes A. M., Kirk M. R., Lemmon R. M., Noller R. M., Oswald R., Calvin M.: *J. Am. Chem. Soc.* 75, 1867 (1953).
2. Bayly R. J., Weigel H.: *Nature* 188, 384 (1960).
3. Stöcklin G., v knize: *Chemistry of Hot Atoms*. Verlag Chemie GmbH, Weinheim 1969.
4. Nencka R., Šála M., Hřebabecký H., Elbert T.: *The Synthesis and Applications of Isotopes and Isotopically Labelled Compounds. 19<sup>th</sup> Workshop, September 26–27, 2013*, Bad Soden, Germany (CED-IIS, ed.), str. 11.
5. March J., v knize: *Advanced Organic Chemistry*, str. 272, 280. J. Wiley, New York 1985.
6. Majer V., Cabicar J., Černík V., Kačena V., Starý J., Svoboda K., Zeman A.: *Základy jaderné chemie*, str. 151. SNTL, Praha 1981.
7. Loveland W. D., Morrissey D. J., Seaborg G. T.: *Modern Nuclear Chemistry*, 2. vyd., str. 57, J. Wiley, Hoboken 2017. doi:10.1002/9781119348450.ch3

**T. Elbert** (*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of the Czech Academy of Sciences, Prague*): **The Stability of Radioisotopically Labelled Compounds with High Specific Activity**

The purpose of the paper is to draw readers' attention to the low stability of radioactively labelled compounds and its potential to distort experimental results. Different modes of decay of radioactively labelled compounds with the high specific activity are discussed. Attention is drawn to the decrease of the specific activity, compared to the freshly synthesized preparation, of the compounds multi-labelled by tritium and repurified after several years of storage at  $-196\text{ }^\circ\text{C}$  in liquid nitrogen. The possible pathways of decay are illustrated by the stability study of 9-([5'-endo,6'-endo- $^3\text{H}_2$ ]norborn-2-yl)-6-chloro-purine.

Full text English translation available in the on-line version.

Keywords: labelled compounds, tritium, stability, radiolysis

### Acknowledgements

*This work was supported by the grant RVO No. 61388963 from Czech Academy of Sciences.*

# THE STABILITY OF RADIOISOTOPICALLY LABELLED COMPOUNDS WITH HIGH SPECIFIC ACTIVITY

TOMÁŠ ELBERT

*Institute of Organic Chemistry and Biochemistry of Czech Academy of Sciences, v.v.i., Flemingovo nám. 2, 166 10 Praha 6, Czech Republic  
elbert@uochb.cas.cz*

Keywords: labelled compounds, tritium, stability, radiolysis

## 1. Introduction

The motivation to write this paper came from my personal opinion of the lack of knowledge about the stability of radioactively labelled compounds in the research community. A university fellow of mine who works in one of the life-science institutes of Czech Academy of Sciences asked me to verify the radiochemical purity of a ligand labelled by tritium to be used in his experiment. As soon as it emerged that the sample was an eight years old preparation with specific activity 51 Ci/mmol, I tried to persuade my friend to put it directly to the radioactive waste and order a fresh one but in vain. It was stated in the Certificate attached to the preparation that during the storage in the original package at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  the radiochemical purity decreases by 1% monthly. But my friend did not believe it and continued to beg me to analyse his labelled ligand by radio-HPLC. The result of the radio-HPLC analysis was precisely as I expected – not even a trace of the tritiated ligand (see Fig. 1). Another colleague from our institute frankly believed that the labelled compound having the Specific Activity (S.A.) 20 Ci/mmol prepared in our laboratory can be used even after 5 years after the preparation day. That said, we can ask what is the real stability of radioactively labelled compounds? Is the information about the expiry date in the Certificate attached by the manufacturer only a marketing trick how to force the customer to purchase always a fresh preparation?

## 2. How and Why Do Radioisotopically Labelled Compounds Decompose

The first paper concerning the lower stability of compounds labelled by radiocarbon  $^{14}\text{C}$  in comparison with their nonlabelled counterparts was published by Calvin *et al.*<sup>1</sup> in 1953. Bayly and Weigel<sup>2</sup> have sorted the processes leading to decomposition of radioisotopically labelled compounds to four groups (see Table I.)

The rate of decomposition *via* primary internal mode is given by the half-life of the radioactive label; e.g., tritium  $^3\text{H}$  has a half-life 12.7 years and radiocarbon  $^{14}\text{C}$  has a half-life 5 730 years. Activity (i.e., the number of radioactive decays per unit of time) of the sample is the value measured in experiments with the radioactively labelled compounds. Therefore, the purity of radioactively labelled compounds is characterised by the so-called Radiochemical Purity (R.P.) expressed in per cents. For instance, R.P. = 97% for L- $^3\text{H}$ ]leucine indicates that 97% of activity are in the form of L- $^3\text{H}$ ]leucine and 3% of activity are in the other, not specified, form. This fact must be considered during evaluation of the particular experiment. If a molecule is labelled by only one radioactive atom, primary internal process does not affect R.P. (fragments of the molecule after radioactive decay are non-radioactive). If in the molecule labelled by radiocarbon  $^{14}\text{C}$  there are two or more radiocarbons, then, after radioactive decay of  $^{14}\text{C}$  to  $^{14}\text{N}$ , the resulting (still radioactive) molecule is not chemically identical with the original one and becomes a radiochemical impurity. For radiocarbon  $^{14}\text{C}$ , the primary internal process in principle does not affect the R.P. – during one year only 0.001% of  $^{14}\text{C}$  atoms disintegrates, i.e., even if original labelled compound has 10 radiocarbons in its molecule, then during one year the R.P. deteriorates by a negligible amount of 0.01%. The situation is completely different for the compounds labelled by tritium  $^3\text{H}$ . During one year 5.5% of tritium atoms disintegrates. From it follows that the primary internal process leads to deterioration of R.P. of L- $^3\text{H}$ ]leucine with S.A. = 58.2 Ci/mmol (i.e., 2 tritium atoms are present in each molecule) from

Table I  
Mode of Decomposition of Labelled Compounds

Mode of Decomposition	Cause
Primary (internal)	Natural isotopic decay
Primary (external)	Direct interaction of the radioactive emission (alpha, beta or gamma) with molecules of the compound
Secondary	Interaction of excited products with molecules of the compound
Chemical	Thermodynamic instability of compounds and poor choice of environment

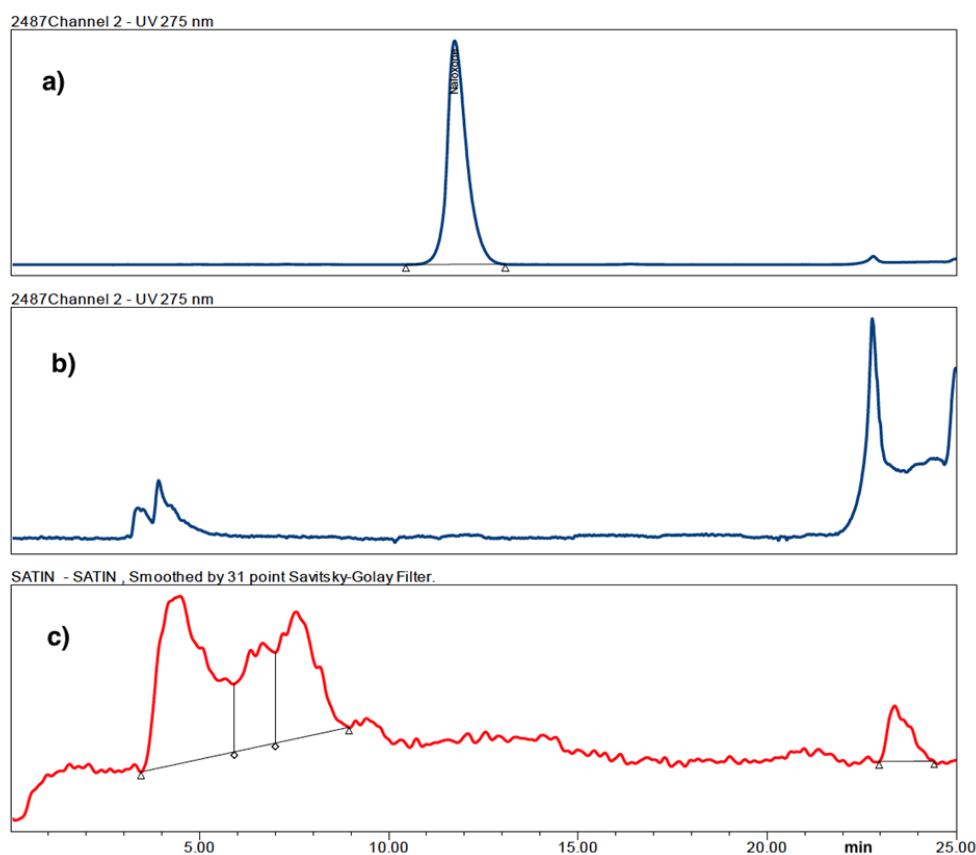


Fig. 1. Radio-HPLC of [N-allyl-2,3- $^3\text{H}$ ]naloxone; a) non-radioactive standard of naloxone (UV detector), b) 8 years old sample of [N-allyl-2,3- $^3\text{H}$ ]naloxone (UV detector), c) 8 years old sample of [N-allyl-2,3- $^3\text{H}$ ]naloxone (radioactivity detector)

the starting 97% to 91.5% during one year of storage. This last value is mostly unacceptable in the drug research. Moreover, the S.A. is diminishing, too, as will be discussed below.

*Primary external* process is important for radioactively labelled compounds with low S.A. stored as chemically pure compounds. The mass of labelled compounds with high S.A. is so low that they are handled exclusively in the form of a solution and the sufficient dilution almost eliminates this process.

*Secondary processes* are the main reason of the deterioration of R.P. during the storage of the radioactively labelled compounds. Especially in the case of low energy  $\beta$ -emitters, such as  $^{14}\text{C}$  and  $^3\text{H}$ , all energy of emitted electrons is utilised in the excitation of the molecules of the environment (in water, the range of  $\beta$ -particles emitted by  $^{14}\text{C}$  is 0.3 mm, those emitted by  $^3\text{H}$  have range only 0.006 mm). Biologically active compounds labelled by radionuclides are predominantly very polar and they are applied to living systems. Therefore, the solvent most often used for these compounds is water. Excitation of water molecules

by  $\beta$ -particles is a very complex process. From the point of view of the potential damage of the labelled compounds, the most important process is generation of  $\text{OH}^\bullet$  radicals. These radicals have not only the capability of a direct hydroxylation of specific positions in organic molecules, e.g. aromatic rings, but also to oxidize functional groups, e.g. amino or hydroxy groups.

*Chemical processes* having a negative influence on R.P. of radioactively labelled compounds are the same for both labelled and nonlabelled compounds and therefore will not be discussed in this paper.

### 3. The fate of C- $^3\text{H}$ bond after the radioactive decay of tritium

The total kinetic energy released during the radioactive decay of  $^3\text{H}$  atom is partitioned among  $\beta$ -particle, just created  $^3\text{He}^+$  atom and antineutrino  $\bar{\nu}$ . Energy of  $\beta$ -particle is absorbed in the environment while creating excited molecules acting in secondary processes. The probability of the interaction of neutrino with the environment is almost

negligible and it need not be concerned. On the other hand, what is important is the fate of the theoretically very weak C– $^3\text{He}^+$  bond. The created  $^3\text{He}^+$  atom has high kinetic energy as the consequence of the action–reaction principle. Stöcklin compared the emission of ionising particle during the radioactive decay to the shot from a cannon<sup>3</sup> – decaying atom is the cannon and leaving particles are the shells (Fig. 2).

Kinetic energy  $E_{\text{recoil}}$  of  $^3\text{He}^+$  atom varies from units to hundreds of electronvolts (eV). Dissociation energy of the C– $^3\text{H}$  bond is in the range of 4 to 5 eV. Dissociation energy of the hypothetical C– $^3\text{He}^+$  bond is many times lower than that of C– $^3\text{H}$  bond and from it follows that the kinetic energy of the just created  $^3\text{He}^+$  atom is more than sufficient to cause the splitting of the C– $^3\text{He}^+$  bond. Two possible modes of the C– $^3\text{He}^+$  bond splitting are depicted in Scheme 1. In one of them (A), the positive charge stays on carbon atom resulting in carbocation, whereas in the other (B), the positive charge stays on the leaving helium atom and the rest of the molecule becomes a radical. Both of these two modes of C– $^3\text{He}^+$  bond splitting were observed during the

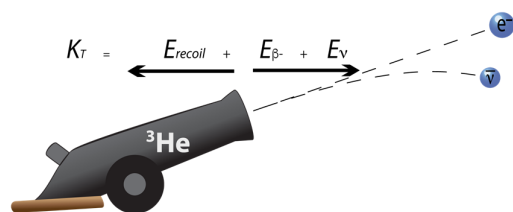
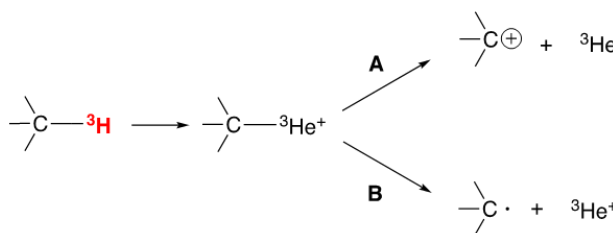


Fig. 2. Partition of kinetic energy released by radioactive decay or tritium atom

study of decomposition of 9-([5'endo,6'endo- $^3\text{H}_2$ ]norborn-2-yl)-6-chloro-purine (**I**) (further abbreviated as [ $^3\text{H}$ ]TNB-6-Cl-purine **I**); the results are described in the next section.

#### 4. Study of the decomposition of 9-([5'endo,6'endo- $^3\text{H}_2$ ]norborn-2-yl)-6-chloro-purine (**I**)

[ $^3\text{H}$ ]TNB-6-Cl-purine **I** was prepared by catalytic tritiation of unsaturated precursor, namely 9-(norborn-5-ene-2-yl)-6-chloropurine, by carrier free tritium on 10% Pd/C in ethyl acetate<sup>4</sup>. Structure of the product **I** was confirmed by  $^1\text{H}$  and  $^3\text{H}$  NMR, R.P. after purification by radio-HPLC was >99%, S.A. was 47.5 Ci/mmol (1,76 TBq/mmol). The solution of **I** in the ethanol–water 1:1 (v/v) mixture with a concentration 1 mCi/mL (37 MBq/mL) was stored 3 years and 10 months at  $-196\text{ }^\circ\text{C}$  in liquid nitrogen. The R.P. assayed by radio-HPLC after thawing was 47% (Fig. 3).



Scheme 1. Splitting of the C– $^3\text{He}^+$  bond

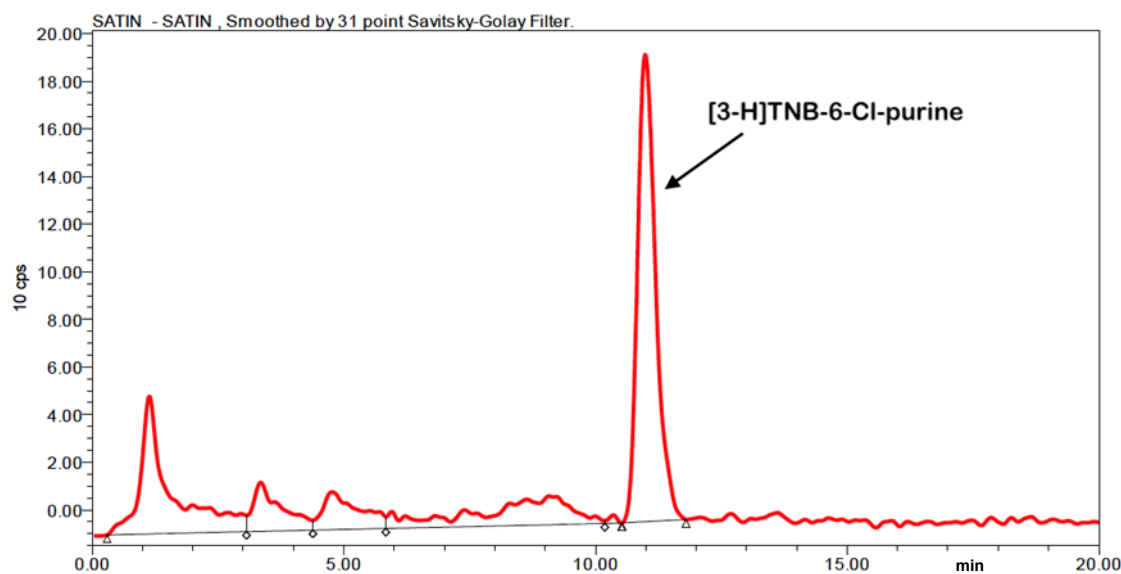
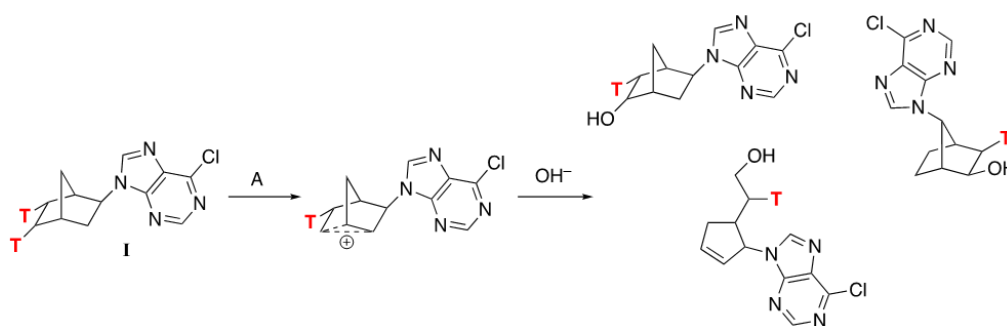


Fig. 3. Radio-HPLC of [ $^3\text{H}$ ]TNB-6-Cl-purine **I** stored 3.8 years in liquid nitrogen



Scheme 2. Splitting of C-<sup>3</sup>He<sup>+</sup> bond in [<sup>3</sup>H]TNB-6-Cl-purine I by the mode A

The products resulting from the C<sub>5'endo</sub>-<sup>3</sup>He<sup>+</sup> bond splitting by the mode A under formation of the non-classical norbornyl cation<sup>5</sup> and neutral <sup>3</sup>He are summarised in Scheme 2. Reaction of this cation with hydroxide anion gives the mixture of products that are more polar than the original compound and thus these products have shorter retention times during the reverse phase radio-HPLC (compare Fig. 3). Splitting of the C<sub>6'endo</sub>-<sup>3</sup>He<sup>+</sup> bond gives analogous mixture of more polar products. All these radioactive impurities are easily separable by preparative radio-HPLC and do not affect the qualities of repurified [<sup>3</sup>H]TNB-6-Cl-purine I.

Lower S.A. of repurified [<sup>3</sup>H]TNB-6-Cl-purine I in comparison with freshly synthesized product represents

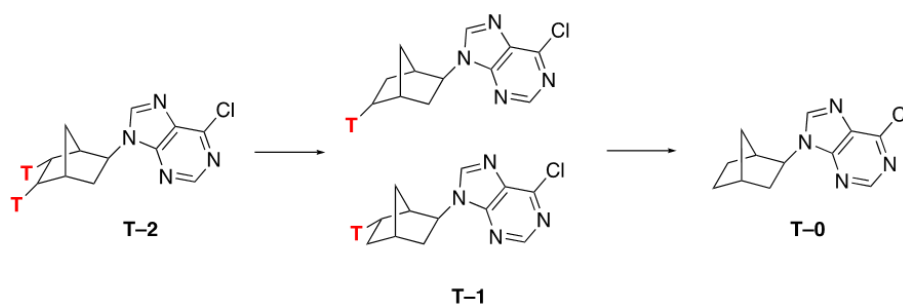
a proof of the B-type splitting of C<sub>5'endo</sub>-<sup>3</sup>He<sup>+</sup> and C<sub>6'endo</sub>-<sup>3</sup>He<sup>+</sup> bonds giving rise to C radicals and positively charged <sup>3</sup>He atoms. The principal reaction of these radicals is detaching the hydrogen radical from the solvent molecule yielding C-<sup>1</sup>H bond (see Scheme 3). Symbols T-2, T-1 and T-0 in the Scheme 3 denote the TNB-6-Cl-purine I molecules with two, one and zero atoms of tritium, respectively.

Table II presents percentages of T-2, T-1 and T-0 in freshly synthesized [<sup>3</sup>H]TNB-6-Cl-purine I and in the product repurified after 3 years and 10 months of storage. These percentages were calculated from corresponding S.A. and <sup>3</sup>H NMR spectra. In the third row there are percentages calculated from those obtained for the freshly

Table II  
Percentages of T-2, T-1 and T-0 in [<sup>3</sup>H]TNB-6-Cl-purine I

	% T-2	% T-1	% T-0	S.A. <sub>UV</sub> <sup>*</sup> [Ci/mmol]	S.A. <sub>MS</sub> <sup>**</sup> [Ci/mmol]
Freshly synthesized	78.4	6.3	15.3	47.5	–
Stored 3y 10m, repurified	61.7	14.2	24.1	40.8	40
Calculated for 3y 10m	51	28	21		37.8 <sup>***</sup>

\* Mass assayed using HPLC UV detector, \*\* tritium content in molecule assayed using MS, \*\*\* calculated from the percentages T-2, T-1 and T-0

Scheme 3. Products of C-<sup>3</sup>He<sup>+</sup> bond splitting in [<sup>3</sup>H]TNB-6-Cl-purine I by the mode B

synthesized [ $^3\text{H}$ ]TNB-6-Cl-purine **I** using equations for the kinetics of consecutive radioactive transmutations<sup>6,7</sup> under the presumption that C– $^3\text{He}^+$  bonds splitting proceeds exclusively by the mode **B** and the resulting C radical is stabilised solely by the formation of C– $^1\text{H}$  bond. The real increase of percentage of the T–1 molecules is three times lower than the theoretical one from which it follows that only 1/3 of the splittings of the C– $^3\text{He}^+$  bonds in molecules T–2 and T–1 leads to C– $^1\text{H}$  bonds. Prevailing mechanism is the polar splitting by the mode **A** and recombination of the C–radicals by other pathways than detachment of hydrogen from the solvent molecules.

## 5. Summary

The consequence of the radioactive decay of tritium in the C– $^3\text{H}$  bond is a creation of the highly unstable C– $^3\text{He}^+$  bond that immediately splits by two possible modes. The mode **A** leads to neutral  $^3\text{He}$  and carbocation, while the mode **B** gives  $^3\text{He}^+$  cation and C–radical. The result is a rich mixture of products. When in the radioactively labelled compound there are two or more hydrogen atoms replaced by tritium, then the products resulting from the radioactive decay of one of them are still radioactive and become radioactive impurities. In contrast, the stabilisation of C–radical by detaching the hydrogen atom from the molecules of the solvent results effectively in a substitution of  $^3\text{H}$  by  $^1\text{H}$  in the starting labelled compound; consequently, the S.A. of the repurified labelled compound stored for longer time periods is lower than that of the freshly labelled compound. It is recommended to observe the hints of the suppliers concerning the storage and the expiration time of the labelled compounds (i.e. the period, during which the radiochemical purity drops below the acceptable value). It is possible to store compounds labelled by tritium by quick freezing of their solutions with activity concentration about 1 mCi/mL (37 MBq/mL) in liquid nitrogen and keep them in liquid nitrogen. If the storage is longer than one year, then, after thawing, the R.P. must be checked by radio–HPLC. If the R.P. drops below 97%, it is possible to repurify the labelled compound by radio–HPLC. However, the S.A. of the repurified compound labelled by tritium must always be assayed *de novo* since it is always lower than that of the freshly synthesized compound due to substitution of  $^3\text{H}$  by  $^1\text{H}$ . The decrease of the radiochemical purity of compounds labelled by the radionuclide  $^{14}\text{C}$  is slower than for tritiated compounds. Radiochemical impurities are readily separated by radio–HPLC and the specific activity after repurification is the same as the specific activity of the original preparation.

*This work was supported by the grant RVO No. 61388963 from Czech Academy of Sciences.*

## REFERENCES

1. Tolbert B. M., Adams P. T., Bennett E. L., Hughes A. M., Kirk M. R., Lemmon R. M., Noller R. M., Ostwald R., Calvin M.: *J. Am. Chem. Soc.* 75, 1867 (1953).
2. Bayly R. J., Weigel H.: *Nature* 188, 384 (1960).
3. Stöcklin G., in the book: *Chemistry of Hot Atoms*. Verlag Chemie GmbH, Weinheim 1969.
4. Nencka R., Šála M., Hřebabeký H., Elbert T.: *The Synthesis and Applications of Isotopes and Isotopically Labelled Compounds. 19<sup>th</sup> Workshop, September 26–27, 2013*, Bad Soden, Germany (CED-IIS, ed.), p. 11.
5. March J., in the book: *Advanced Organic Chemistry*, p. 272, 280. J. Wiley, New York 1985.
6. Majer V., Cabicar J., Čermík V., Kačena V., Starý J., Svoboda K., Zeman A.: *Základy jaderné chemie*, p. 151. SNTL, Praha 1981.
7. Loveland W. D., Morrissey D. J., Seaborg G. T.: *Modern Nuclear Chemistry*, 2nd Edition, p. 57, J. Wiley, Hoboken 2017.  
doi:10.1002/9781119348450.ch3

## Abstract

The purpose of the paper is to draw readers' attention to the low stability of radioactively labelled compounds and its potential to distort experimental results. Different modes of decay of radioactively labelled compounds with the high specific activity are discussed. Attention is drawn to the decrease of the specific activity, compared to the freshly synthesized preparation, of the compounds multi-labelled by tritium and repurified after several years of storage at  $-196\text{ }^\circ\text{C}$  in liquid nitrogen. The possible pathways of decay are illustrated by the stability study of 9-([5'endo,6'endo- $^3\text{H}_2$ ]norborn-2-yl)-6-chloro-purine.