

179. Ergocalciferol-[¹⁴C] hoher spezifischer Aktivität aus biologisch gleichförmig markiertem Ergosterol-[¹⁴C]

von H. Schaltegger

(9. IV. 60)

Über die Synthese von ¹⁴C-signierten D-Vitaminen von mittlerer spezifischer Aktivität ist bereits von verschiedenen Seiten berichtet worden¹⁾²⁾. Tracer-Untersuchungen über den Stoffwechsel der D-Vitamine erfordern indessen Substanzen von möglichst hoher spezifischer Aktivität. Damit ist es möglich, das Schicksal relativ geringer Vitamin-D-Dosen im Organismus selbst nach stärkster Isotopenverdünnung zu verfolgen.

Als Ausgangsmaterial standen 100 mg gleichförmig markiertes Ergosterin-[¹⁴C] mit einer spezifischen Aktivität von 10 μ C/mg zur Verfügung³⁾⁴⁾. Aus diesem Material konnten nach teils bekannten Verfahren⁵⁾⁶⁾⁷⁾ 12,6 mg kristallisiertes Vitamin D₂-[¹⁴C] mit der gleichen spezifischen Aktivität wie das Ausgangsmaterial synthetisiert werden⁸⁾. Als Bestrahlungsapparatur hat sich die von HAVINGA & BOTS¹⁾ entwickelte Kreislaufapparatur bestens bewährt. Als Filterlösung diente eine von diesen Autoren vorgeschlagene 0,4-proz. Natriumnitratlösung in Wasser. Das erhaltene Bestrahlungsprodukt wurde zur Abtrennung von nicht umgesetztem Ergosterin-[¹⁴C] an Aluminiumoxyd WOELM chromatographiert. Das Ergosterin ist erst viel später, und zwar erst mit Benzol/Äther 1:1 eluierbar. Die Kontrolle der Reihenfolge der eluierten Verbindungen bei allen chromatographischen Trennungen wurde mit Hilfe der Farbreaktion mit Vanillin-Perchlorsäure⁹⁾ vorgenommen.

Bei der Entwicklung des Aufbereitungsverfahrens der Bestrahlungsprodukte für kleine Mengen wurden nach Möglichkeit Ausschüttelungsoperationen vermieden. Die erste Fraktion des chromatographierten Bestrahlungsproduktes, welche als Hauptanteil das Vitamin D₂-[¹⁴C] enthielt, wurde mit 3,5-Dinitrobenzoylchlorid in Pyridin verestert⁵⁾⁶⁾ und das Estergemisch zwecks Abtrennung eventuell vorhandenen Tachysterol-dinitrobenzoates mit Maleinsäureanhydrid⁵⁾⁹⁾ behandelt¹⁰⁾. Ohne das

1) E. HAVINGA & I. P. L. BOTS, Rec. Trav. chim. Pays-Bas 73, 393 (1954).

2) F. HUNZIKER, Helv. 38, 917 (1955); E. KODICEK, Biochem. J. 60, XXV (1955).

3) Radiochemical Center, Amersham.

4) Über die Genese dieses Ergosterins-[¹⁴C] finden sich im experimentellen Teil nähere Angaben.

5) A. WINDAUS, A. LÜTTRINGHAUS & M. DEPPE, Liebigs Ann. Chem. 489, 252 (1931); A. WINDAUS, O. LINSERT, A. LÜTTRINGHAUS & G. WEIDLICH, *ibid.* 492, 226 (1932).

6) T. C. ANGUS, F. A. ASKEW, R. B. BOURDILLON, H. M. BRUCE, R. K. CALLOW, C. FISCHMANN, I. S. L. PHILPOT & T. A. WEBSTER, Proceed. Roy. Soc. 108, 340 (1931).

7) E. H. REERINK & A. VAN WIJK, Biochem. J. 23, 1294 (1929); 25, 1001 (1931).

8) Über die Bilanzversuche, welche mit diesem Präparat an Ratten und Rhesusaffen durchgeführt wurden, wird an anderer Stelle berichtet: A. BLUMBERG, H. AEBI, H. HURNI & G. SCHÖNHOLZER (Helv. physiol. pharmacol. Acta, 18, 56 (1960).

9) H. SCHALTEGGER, Helv. 29, 285 (1946).

10) Versuche, die Maleinsäureanhydrid-Behandlung wegzulassen, ergaben auch nach Chromatographie nur schwer kristallisierbare Produkte.

entstandene Maleinsäure-Addukt und das überschüssige Maleinsäureanhydrid durch Ausschütteln abzutrennen, wurde das gesamte Material erneut chromatographiert. Die Benzoleluate lieferten sofort 36,5 mg reines Vitamin D₂-[¹⁴C]-dinitrobenzoat vom Smp. 142–145°. Nach Verseifen des kristallisierten Esters wurde das freie Vitamin D₂ nicht durch Ausschütteln abgetrennt, sondern es wurde das gesamte Material inklusive überschüssigem Kaliumhydroxyd und Kaliumdinitrobenzoat direkt durch Aluminiumoxyd filtriert. Das farblose Benzoleluat von 23,0 mg ergab aus Aceton-Wasser ein erstes Kristallisat, das nach nochmaliger Chromatographie schliesslich 12,6 mg kristallisiertes Ergocalciferol-[¹⁴C] vom Schmelzpunkt 113–115° lieferte, $\lambda_{\max} = 265 \text{ m}\mu$, $\epsilon \sim 18000$ (das Spektrum zeigte keine Fremdabsorptionen). Auch radio-papierchromatographisch schien das Präparat einheitlich⁸). Aus den verschiedenen Chromatographie-Nebenfraktionen und Kristallisationsmutterlaugen konnten noch 4,4 mg Ergosterin-[¹⁴C] vom Schmelzpunkt 150–151° und 2,8 mg Ergocalciferol-[¹⁴C] vom Smp. 105–107° gewonnen werden.

Experimenteller Teil

Vorbereitungsarbeiten. – *Bestrahlungsapparatur.* Inhalt 177 ml, Montage mit Stickstoff- und Vakuumzuleitungen. Der wirksame Bestrahlungsraum hatte die Form eines 4 cm hohen Hohlzylinders, in dessen zentraler Achse ein PHILLIPS Hochdruckbrenner Typ Biosol A montiert worden war. Vor Bestrahlung des Ergosterins-[¹⁴C] wurde die Apparatur zweimal mit peroxyd-freiem Äther gespült und anschliessend auf $5 \cdot 10^{-3}$ Torr evakuiert. Nach Löschen des Vakuums mit reinem Stickstoff (99,99-proz.) wurde die Apparatur unter Aufheizen auf ca. 200° erneut evakuiert und unter Stickstoff erkalten gelassen.

Filterlösung. 0,4-proz. wässrige Natriumnitratlösung.

Peroxydfreier absoluter Äther. Dieser wurde unmittelbar vor Verwendung zweimal über blankem Natrium in Stickstoffatmosphäre destilliert.

Benzol. «Benzol *puriss.* MERCK».

Aceton. Über Kaliumpermanganat destilliert.

Dioxan. Über Natrium stehengelassen und jeweils frisch über Kaliumhydroxyd destilliert.

Pyridin. Zweimal über Kaliumhydroxyd destilliert.

3,5-Dinitrobenzoylchlorid. Das käufliche Produkt (FLUKA) wurde mit Thionylchlorid 15 Min. unter Rückfluss gekocht und der nach Abdampfen des Thionylchlorids im Vakuum erhaltene Rückstand bei 10^{-1} Torr destilliert.

Maleinsäureanhydrid. Über Phosphorpentoxyd im Vakuum frisch destilliert.

Aluminiumoxyd zur Chromatographie. – Al_2O_3 a: «WOELM alkalifrei, annähernd neutral». 10 g wurden 1 Std. bei Raumtemperatur an der Laboratoriumsluft umgewälzt.

Al_2O_3 b: «WOELM sauer». Ca. 10 g 1 Std. bei Raumtemperatur an der Luft liegen gelassen.

Die beiden Aluminiumoxydpräparate wurden hierauf in einem Rundkolben durch abwechselndes Evakuieren und Löschen des Vakuums mit Stickstoff vom okkludierten Sauerstoff befreit und unter Stickstoff aufbewahrt.

Farbreaktion mit Perchlorsäurereagens und Vanillin zur Kontrolle der Chromatogrammfraktionen. – a) *Reagens.* Man gibt zu einer Mischung von 2 ml Essigsäureanhydrid und 2,5 ml Eisessig langsam unter Schütteln 0,5 ml 65–70-proz. Perchlorsäure. Die schwach gelbliche Lösung erwärmt man eine halbe Stunde auf 95–100° (für qualitative Versuche ist das Reagens ca. 3 Wochen brauchbar).

b) *Nachweis des Vitamins D₂* in den einzelnen Chromatogrammfraktionen. Jeweils 3 Tropfen der aus dem Chromatographierohr austretenden Benzollösung werden mit einigen Kriställchen Vanillin und dann mit ca. 0,2–0,5 ml Benzol versetzt. Man kocht die farblose Lösung kurz auf, gibt nun einen kleinen Tropfen Perchlorsäurereagens zu und erhitzt nochmals kurz zum Sieden. Die Vitamine D₂ und D₃ geben eine tiefblaue Färbung. Ergosterin, Lumisterin und die Suprasterine geben eine rote Lösung. Die Farbintensität der D-Vitamine ist bei gleicher Konzentration etwa 10mal so gross wie diejenige der Rotfärbung bei den übrigen Sterinen.

Ergocalciferol-[^{14}C]. – *Ergosterin*-[^{14}C] (Ausgangsmaterial)³⁾. Vorgeschichte. Das vom Radiochemical Center, Amersham, gelieferte Ergosterin-[^{14}C] ist aus dem Schimmelpilz *Carpentiles brefeldianum* DODGE isoliert worden. Der Pilz war auf einem Medium gewachsen, dessen Hauptkohlenstoffquelle aus universell markiertem Invertzucker-[^{14}C] bestand. Nach mechanischer Zerstörung des Organismus wurden die Lipide mit Äther extrahiert und das Ergosterin-[^{14}C] durch Chromatographie an Aluminiumoxyd isoliert. Nach Verdünnen mit reinem Träger wurde das Ergosterin-[^{14}C] in Benzol gelöst und diese Lösung unter Vakuum abgeschmolzen. Totale Aktivität: 1,0 mC. Totalgewicht des Ergosterins-[^{14}C]: 100 mg; spezifische Aktivität: 10 $\mu\text{C}/\text{mg}$ = 3,9 mC/mMol.; Datum der Analyse: 20. 7. 1956 (Amersham).

Bestrahlung von Ergosterin-[^{14}C] und Abtrennung des Bestrahlungsproduktes vom nicht umgesetzten Ergosterin-[^{14}C]. Die benzolische Lösung des Ergosterins-[^{14}C] wurde im Vakuum abgedampft, der schwach gelbliche Rückstand von 100,0 mg in 150 ml Äther gelöst und die Lösung hierauf in die Apparatur eingesaugt. Nach mehrmaligem Entlüften der Lösung in der Apparatur wurde die im Kreislauf bewegte Lösung $7\frac{1}{2}$ Min. bestrahlt. Nach dem Abdampfen des Äthers im Vakuum hinterblieben 99,5 mg Bestrahlungsprodukt. Zur quantitativen Abtrennung von nicht umgesetztem Ergosterin-[^{14}C] wurde das Material in 1 ml Benzol gelöst und an 3 g Al_2O_3 chromatographiert. Die Säule wurde solange mit Benzol eluiert, bis im Eluat mit Vanillin-Perchlorsäure-Reagens nur noch eine sehr schwache Blaufärbung auftrat. Nach Wechsel der Vorlage eluierte man das in der Säule verbliebene Ergosterin-[^{14}C] mit Benzol/Äther 1:1. Es sind folgende Fraktionen erhalten worden: 1. Fraktion: 36 ml Benzol mit 73,5 mg ergosterinfreiem Bestrahlungsprodukt; 2. Fraktion: 48 ml Benzol/Äther mit 7,6 mg Ergosterin-[^{14}C]. Der Rest auf 99,5 mg (= 18,4 mg) konnte auch mit Methanol/Äther 1:1 nicht eluiert werden¹¹⁾. Das Material befand sich als sehr fest haftende gelbliche Zone am oberen Rand der Säule.

Bereitung der Dinitrobenzoesäureester der Fraktion 1. Die 73,5 mg ergosterinfreies Bestrahlungsprodukt wurden in 0,5 ml Pyridin gelöst und unter Rühren mit 75 mg 3,5-Dinitrobenzoylchlorid versetzt. Die Lösung wurde 10 Min. bei 50° gehalten und 12 Std. bei Raumtemperatur verschlossen stehengelassen. Nach Aufnehmen in Äther, sechsmaligem Waschen mit Wasser, einmal Waschen mit 2-proz. Essigsäure und dreimal Waschen mit Wasser trocknete man die Ätherlösung mit Natriumsulfat. Der Ätherrückstand ergab 105,0 mg Dinitrobenzoesäuregemisch, das zur Entfernung des sauerstoffempfindlichen und kristallisationsstörenden Tachysterinesters nach Lösen in 1 ml Benzol mit 10 mg Maleinsäureanhydrid 45 Min. unter Rückfluss gekocht wurde. Das benzolische Reaktionsgemisch filtrierte man sofort durch eine Säule von 3 g Al_2O_3 b. Die Entwicklung und Elution mit Benzol ergab 10,5 ml Lösung, welche das gesamte Vitamin D_2 -[^{14}C] enthielt. Das darauffolgende Eluat zeigte mit Vanillin-Perchlorsäure keine Blaufärbung mehr. Nach dem Abdampfen der benzolischen Lösung im Vakuum wurde der 75,5 mg betragende Rückstand im Spitzröhrchen mit ganz wenig Aceton angerührt, worauf das gelbe Harz sofort kristallisierte. Inverse Filtration, Nachwaschen mit Aceton und Trocknen im Vakuum ergaben 36,5 mg kristallisiertes Dinitrobenzoat vom Vitamin D_2 -[^{14}C], Smp. 142–145°.

Verseifung des Dinitrobenzoates vom Ergocalciferol-[^{14}C]. Die 36,5 mg Ester wurden in 0,9 ml Dioxan gelöst und mit 0,11 ml 5-proz. frisch bereiteter äthanolischer Kalilauge 15 Min. bei 70° Blocktemperatur und 2 Std. bei Raumtemperatur verseift. Nach Verdampfen des Lösungsmittels im Stickstoffstrom und Trocknen des Rückstandes im Vakuum wurde das Vitamin D_2 -[^{14}C] durch Zugabe von 1 ml Benzol unter häufigem Aufrühren 45 Min. bei 60° aus dem Kaliumdinitrobenzoat-KOH-Gemisch extrahiert und die schwarze Suspension ohne vorherige Filtration direkt auf eine Säule mit 0,6 g Al_2O_3 a gegossen. Es wurde mit Benzol eluiert. Die erste Fraktion von 16 ml ergab nach Abdampfen 23,0 mg Vitamin D_2 -[^{14}C] als farbloses Harz, das auf Zusatz von wenig Aceton kristallisierte. Da der Smp. von 107–109° noch zu tief war, wurde das ganze Material nochmals an 0,7 g Al_2O_3 a chromatographiert. Elution mit Benzol (14,5 ml aufgefangen) lieferte nach dem Abdampfen und Kristallisieren durch Aufnehmen in Aceton und Zugabe von Wasser bis zur Sättigungsgrenze bei Raumtemperatur 12,6 mg Ergocalciferol-[^{14}C] vom Smp. 113–115°¹²⁾, λ_{max} = 265 μ , ϵ ~ 18000. Totalaktivität 126 μC . Die vereinigten Mutterlaugen

¹¹⁾ Auch die Versuche mit gewöhnlichem Ergosterin zeigten alle die gleiche Erscheinung.

¹²⁾ Drei vorgängige Versuche mit gewöhnlichem Ergosterin lieferten 7,6; 11,8 und 10,6 mg Vitamin D_2 .

und Chromatographie-Nebenfraktionen lieferten noch 2,8 mg kristallisiertes Vitamin D₂-[¹⁴C] vom Smp. 105–107°.

Die zweite Fraktion des ersten Chromatogrammes (48 ml Benzol/Äther mit 7,6 mg Ergosterin-[¹⁴C]) wurde nach Abdampfen des Lösungsmittels im Vakuum aus Methanol umkristallisiert. Es konnten so noch 4,4 mg Ergosterin-[¹⁴C] vom Smp. 150–151° zurückerhalten werden.

ZUSAMMENFASSUNG

Aus 100 mg universell markiertem Ergosterin-[¹⁴C] wurden auf bekannte Weise 12,6 mg kristallisiertes Ergocalciferol-[¹⁴C] mit einer spezifischen Aktivität von 10 mC/g bereitet.

Forschungsinstitut Dr. A. WANDER AG, Bern,
Institut für Organische Chemie der Universität Bern

Errata

Helv. 42, 2382 (1959), mémoire No. 257 de P. LÄUGER, M. PROST & R. CHARLIER. L'*erratum* figurant sous ce titre dans Helv. 42, 2827 (1959) est à annuler.

Helv. 43, 1086 (1960), Abh. Nr. 137 von J. URECH, E. VISCHER & A. WETTSTEIN (Summary). Auf Zeile 5–6 lies «11β,15α-Dihydroxy-Δ⁴-androstene-3,17-dione» an Stelle von «15α-Hydroxy-Δ⁴-androstene-3,17-dione».

Helv. 43, 330 (1960), Abhandlung Nr. 42 von H. DAHN, LOTTE LOEWE & C. A. BUNTON. Die Konzentrationsangaben unter der Figur sollten heissen: [Asc] = 0,2 · 10⁻³ M, [HNO₂] = 10⁻³ M.

V. Europäischer Kongress für Molekülspektroskopie

Der fünfte Europäische Kongress für Molekülspektroskopie wird vom 29. Mai bis 3. Juni 1961 in Amsterdam stattfinden. Für Auskünfte sich bitte wenden an D. H. ZIJP, Sekretär des Organisationskomitees, Anorganisch-Chemisches Laboratorium, Nieuwe Achtergracht 123, Amsterdam (Niederlande).
