

SHORT COMMUNICATIONS

Polytope Markierung von Digitoxin mit Tritium

(eingegangen am 22. Oktober 1965)

EINLEITUNG.

Digitoxin ist eine der ersten Substanzen gewesen, die nach der von WILZBACH entdeckten Methode ⁽¹⁾ tritiiert wurde. Das Tritium-exponierte Steroid wurde von SPRATT, OKITA und GEILING ⁽²⁾ durch Chromatographie an Aluminiumoxyd von den unter der Einwirkung des radioaktiven Tritium-Gases entstandenen Nebenprodukten gereinigt. RABITZSCH und HERZMANN ⁽³⁾ erzielten eine hohe spezifische Aktivität bei der Tritiiierung von Digitoxin, das an Kieselgel adsorbiert war.

Im einzelnen gingen wir folgendermassen vor, um aus den unter Einwirkung der β -Strahlen des Tritiums entstandenen Umwandlungs- und Zersetzungsprodukten das reine Steroid zu erhalten.

EXPERIMENTELLER TEIL.

93 mg Digitoxin (Merck)* wurden in Chloroform gelöst, durch Verdampfen des Lösungsmittels auf 70 mg Quarzwolle aufgebracht und nun in dünner Schicht der Einwirkung von Tritiumgas (ca. 2,5 C ³H₂; nicht trägerfrei; 200 Torr; 14 d) in einer von uns früher beschriebenen Apparatur ⁽⁴⁾ ausgesetzt. Das Präparat verfärbte sich während der ersten 8 Tage der Exposition bei Raumtemperatur grün; deshalb verwahrten wir es in der zweiten Woche bei —80°. Nach 14-tägiger Gesamt-Exposition lösten wir das Digitoxin mit Chloroform von der Quarzwolle, verdampften das Lösungsmittel und behandelten den Rückstand viermal mit Methanol, um das labil gebundene Tritium auszutauschen (ca. 65 mC Tritium wurden an Methanol gebunden).

Der braune Rückstand (siehe Dünnschichtchromatogramm Abb. 1a) wurde, wie im folgenden beschrieben, an Al₂O₃ chromatographiert (80 g Al₂O₃; Säulenlänge 80 cm).

Mit 200 ccm des Lösungsmittelgemisches Chloroform/Äthanol (98,3 : 1,7) ⁽⁵⁾ konnten mehrere, z. T. farbige Substanzen eluiert werden. Bei den dann durch Elution mit einem Gemisch von 250 ccm Chloroform/Äthanol (9 : 1) erhaltenen Fraktionen waren jedoch keine Beziehungen zwischen Radioaktivitäts-Maxima und färbbarer Substanz im Chromatogramm zu finden.

* Verunreinigt mit ca. 2 % Gitoxin.

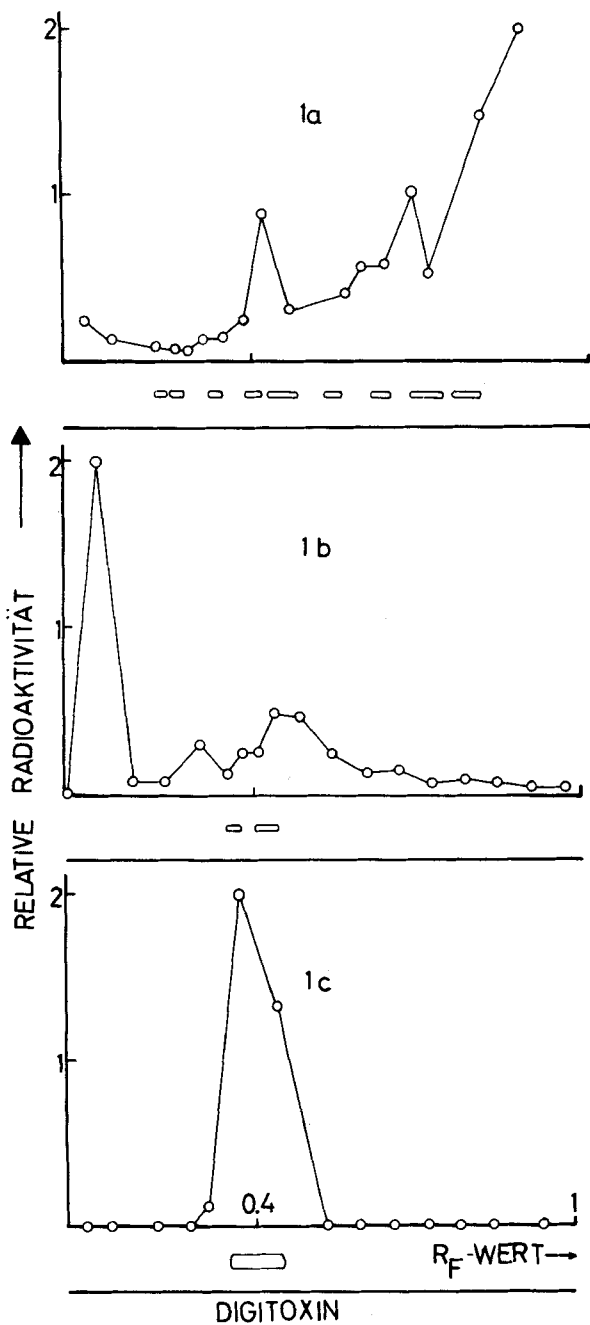


ABB. 1a, b, c. — Verteilung der Radioaktivität und der färbbaren Anteile auf Dünnschichtchromatogrammen von tritiierten Digitoxin-Präparationen verschiedener Reinigungsstufen :

- a) Rohprodukt nach der Tritiiierung an Quarzwolle (siehe Text),
- b) Rohprodukt nach der Tritiiierung von an Kohle adsorbiertem Digitoxin,
- c) Gereinigtes ³H-Digitoxin.

Laufmittel : Chloroform/Methylenchlorid/Methanol (5 : 4 : 1),
Anfärbung der Chromatogramme mit Trichloressigsäure/Chloramin T.

Die einzelnen, Digitoxin enthaltenden Fraktionen wurden in gleicher Weise wieder mehrfach fraktioniert, dann vereinigt und durch Verteilungschromatographie an Kieselgel ⁽⁶⁾ gereinigt [24 g Kieselgel (Merck); Korn-Durchmesser 0,2-0,5 mm; Laufmittel: Benzol/Essigester/Wasser (10 : 8 : 1) — obere Phase].

Das aus allen diesen Reinigungsschritten angefallene unreine Digitoxin wurde abschliessend nochmals durch Adsorptions-Chromatographie an Al_2O_3 (wie oben beschrieben) gereinigt.

Wir erhielten 6 mg (6,5 %) Digitoxin (Abb. 1c); Aktivität : 27,5 mC/mMol (36 μ C/mg).

Tritiumierung von an Kohlepulver adsorbiertem Digitoxin.

Um eine eventuell höhere Einbaurate von Tritium in Digitoxin zu erreichen, adsorbierten wir das Steroid an Kohlepulver ⁽⁷⁾ und setzten es dann der Einwirkung von Tritium aus.

730 mg Tierkohle (Carboraffin, Merck), an welcher 45 mg Digitoxin* (Merck) adsorbiert waren (aus 1-proz. methanolischer Lösung hatte die Kohle das Glykosid quantitativ aufgenommen), wurden Tritium exponiert [ca. 2,5 C ³H₂ (trägerfrei); 220 Torr; 34 d]. Danach wurde die Kohle mit Methylenchlorid/Methanol (3 : 1) und anschliessend mit Chloroform**/Methanol (1 : 1) extrahiert.

Labiles Tritium entfernten wir von dem Eindampfrückstand, indem wir diesen zweimal in je 5 ccm Methanol lösten und dieses jeweils i. Vak. abdampften. Den in Chloroform gelösten Rückstand [er zeigte im Dünnschichtchromatogramm (Abb. 1b) eine recht gute Übereinstimmung von Aktivitäts- und Färbemaxima] chromatographierten wir über Al_2O_3 [20 g Al_2O_3 (Merck); aktiv; neutral] in einer Säule mit 200 ccm Chloroform**/Äthanol (98,3 : 1,7) ⁽⁶⁾, das kein Digitoxin aus der Säule eluierte, jedoch Radioaktivität enthielt.

Nach Elution mit Chloroform**/Äthanol (9 : 1) prüften wir die Fraktionen sowohl auf Digitoxin (mittels Dünnschichtchromatographie) als auch auf Radioaktivität (im Szintillationsspektrometer). Die Digitoxin enthaltenden Fraktionen chromatographierten wir nochmals in der gleichen Weise und konnten nun eine totale Übereinstimmung von Aktivitäts- und Färbemaximum feststellen (Abb. 1c).

Die Ausbeute an kristallinem Digitoxin betrug 35,3 mg (78 %), die Radioaktivität 2,5 mC/mMol (3,3 μ C/mg); sie war somit geringer als bei der Einwirkung von Tritium ohne Verwendung von Tierkohle.

Zur analytischen Kontrolle bei der Aufarbeitung der Digitoxin-Präparate benutzten wir die Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel G (Merck) ⁽⁸⁾.

* Verunreinigt mit ca. 2 % Gitoxin.

** Absolut HCl-frei.

Ein für unsere Zwecke geeignetes Laufmittel fanden wir in dem Gemisch Chloroform/Methylenchlorid/Methanol (5 : 4 : 1).

Die Anfärbung der Dünnschichtchromatogramme geschah mit Trichloressigsäure/Chloramin T ⁽⁹⁾. Die Verteilung der Radioaktivität auf den Dünnschichtplatten bestimmten wir in abgeschabten Zonen der Gelschicht mit einem Szintillations-Spektrometer.

H.-L. SCHMIDT

G. WERNER

Max-Planck-Institut für Hirnforschung, Arbeitsgruppe Neurochemie,
Frankfurt/Main, Deutschordenstrasse 46, Deutschland.

LITERATURVERZEICHNIS

1. WILZBACH, K. E. — *J. Amer. chem. Soc.*, **79** : 1013 (1957).
2. SPRATT, J. R., OKITA, G. T. und GEILING, E. M. K. — *Int. J. appl. Radiat. Isotopes*, **2** : 167 (1957).
3. RABITZSCH, G. und HERZMANN, H. — *Liebigs Ann. Chem.*, **685** : 261 (1965).
4. SCHMIDT, H.-L. und WERNER, G. — *Liebigs Ann. Chem.*, **656** : 149 (1962).
5. OKITA, G. T., KELSEY, F. E., WALASZEK, E. J. und GEILING, E. M. K. — *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, **110** : 244 (1954).
6. STOLL, A., ANGLIKER, E., BARFUSS, F., KUSSMAUL, W. und RENZ, J. — *Helv. chim. Acta*, **34** : 1460 (1951).
7. WOLLENBERG, H. und WENZEL, M. — *Naturf.*, **18b** : 8 (1963).
8. STAHL, E. und KALTENBACH, U. — *J. Chromatogr.*, **5** : 458 (1961).
9. KAISER, F. — *Chem. Ber.*, **88** : 556 (1955).