

NOTES

Die polytope Markierung von Scopolamin mit Tritium

Eingegangen am 10. November 1966

Für Untersuchungen des Stoffwechsels von Scopolamin im tierischen Organismus hatten wir früher dieses Alkaloid und einige seiner Derivate in der N-Methylgruppe mit ^{14}C ⁽¹⁾ und Tritium ⁽²⁾ markiert. Um zu einem Präparat zu kommen, das im Tropasäure-Rest Tritium eingebaut hat, wählten wir den Weg über die Wilzbach-Tritierung ⁽³⁾ des Scopolamins, da die Veresterung von Scopin mit ^3H -Tropasäure eine schlechte Ausbeute erwarten liess.

Der wässrigen Lösung von 100 mg Scopolamin-HBr wurde in der für die Tritium-Exposition vorgesehenen Glasampulle durch Gefriertrocknung das Wasser entzogen, wodurch wegen der nunmehr gebildeten grossen Oberfläche des Alkaloid-Salzes eine intensivere Einwirkung des ^3H -Gases ($5\text{C}^3\text{H}_2$, 98-proz.; bei 400 mm Hg) erfolgen konnte. Das nach 30 Tagen Exposition gelblich gefärbte Präparat behandelten wir zur Entfernung des labil gebundenen Tritiums viermal mit Methanol und prüften hierauf mit der Dünnschichtchromatographie auf Nebenprodukte, die unter Einwirkung des Tritium-Gases entstanden waren. Neben ^3H -Scopolamin zeigte das Chromatogramm (gemessen mit dem Dünnschicht-Scanner LB 2720 der Fa. Berthold, Wildbad) eine hochaktive Substanz am Start und mehrere weniger aktive Stoffe, die aber alle mit Dragendorffs Reagens nicht mehr anfärbbar waren (Abb. 1a). Die weitere Reinigung erfolgte unter Anwendung der Dünnschichtchromatographie in der Weise, dass jeweils 25 mg des tritiierten Rohproduktes in methanolischer Lösung auf Dünnschichtplatten (20 cm \times 20 cm; Beschichtung 0.25 mm Kieselgel G *) strichförmig aufgebracht wurden. Als Laufmittel fand das Gemisch Chloroform (40 Vol.) + Cyclohexan (50 Vol.) + Diaethylamin (10 Vol.) Verwendung. Die Zone der Kieselgelschicht, die ^3H -Scopolamin enthielt, wurde von den einzelnen Platten entfernt und das Alkaloid danach mit Methanol vom Trägermaterial eluiert. Nach einmaliger Wiederholung der chromatographischen Reinigung (Abb. 1b), überführten wir anschliessend die markierte Scopolaminbase in das Hydrochlorid. Die Ausbeute betrug 79,5 mg (90% der Th.), die Aktivität 33 mC/mMol (97 $\mu\text{C}/\text{mg}$).

* Fa. E. Merck AG, Darmstadt.

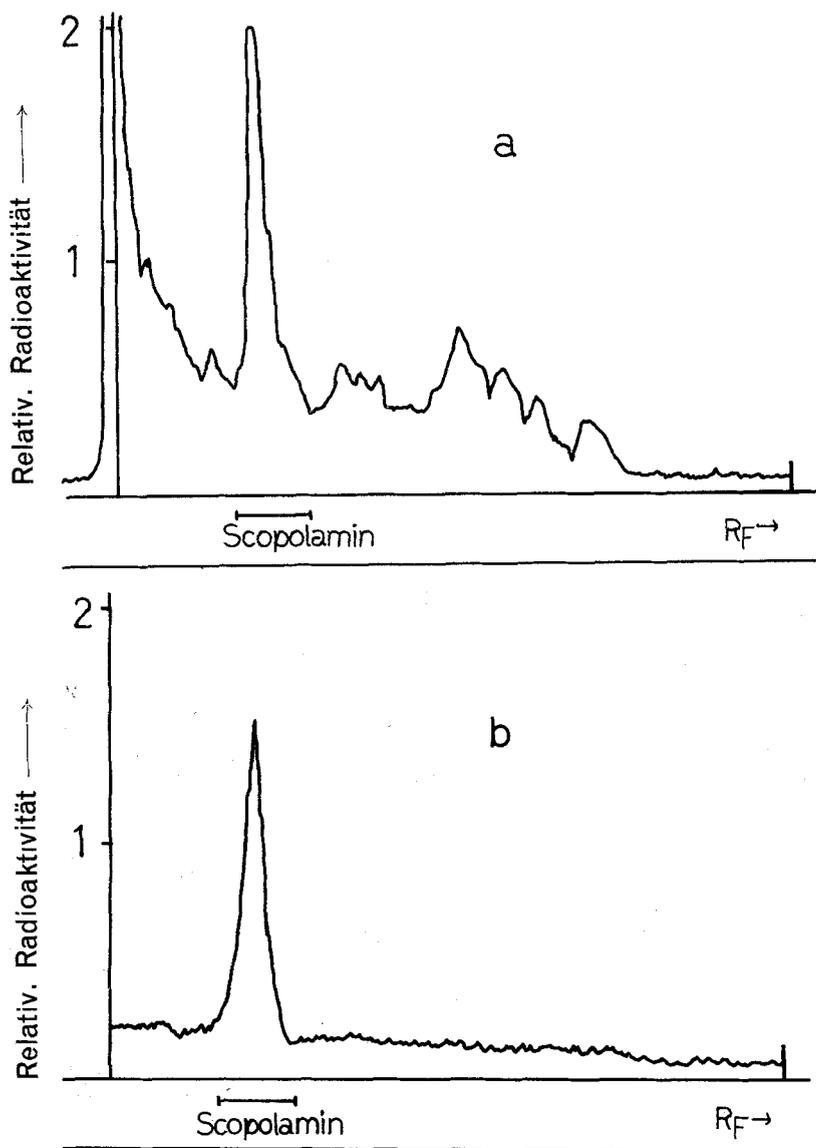
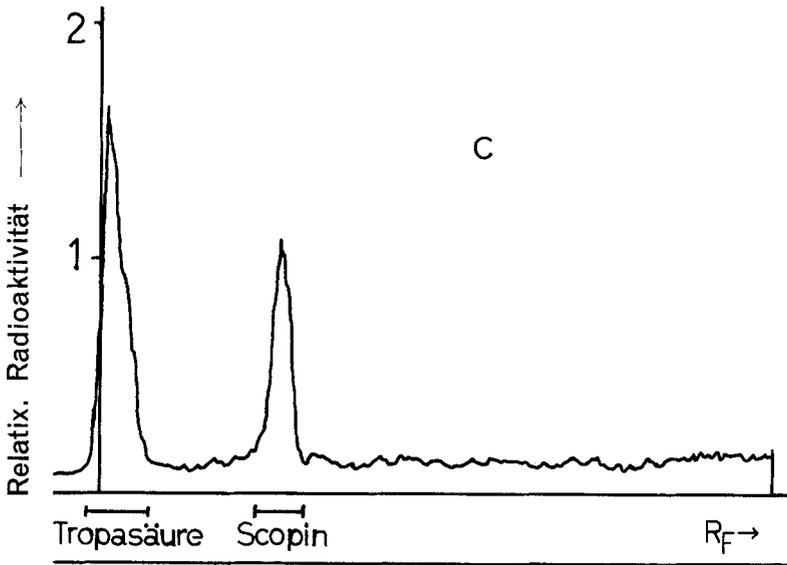


ABB. 1a,b,c.— Verteilung der Radioaktivität und der färbbaren Anteile (Dragendorff) auf Dünnschichtchromatogrammen von tritiierten Scopolamin-Präparationen verschiedener Reinigungsstufen und nach alkalischer Hydrolyse.

- a) Rohprodukt nach der Tritiierung von Scopolamin;
- b) Gereinigtes ³H-Scopolamin;
- c) Hydrolysat von ³H-Scopolamin mit Ba(OH)₂.

Laufmittel für 1a, 1b : Chloroform/Cyclohexan/Diaethylamin (4 : 5 : 1 Vol.).

Laufmittel für 1c : Chloroform/Diaethylamin (9 : 1 Vol.).



Um die Verteilung des Tritiums auf Scopin- und Tropasäure-Rest feststellen zu können, hydrolysierten ** wir eine geringe Menge des markierten Scopolamins mit $\text{Ba}(\text{OH})_2$ [1 mg Scopolamin·HCl in 0,15 ccm Wasser + 2,5 mg $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ in 0,3 ccm Wasser (pH 12,1) 140 Min. bei Raumtemperatur]. Das Dünnschichtchromatogramm [Laufmittel : Chloroform (90 Vol.) + Diäthylamin (10 Vol.)] dieses Hydrolysates (Abb. 1c) liess erkennen, dass Base und Säure tritiert waren. Die isolierte Tropasäure war jedoch (relativ zur Anzahl der H-Atome in Base oder Säure) doppelt so aktiv als Scopin. Das Aktivitätsverhältnis von Tropasäure zu Scopin betrug ca. 2 : 1, die Relation der Zahl der Wasserstoffatome 0,67 : 1 (OH- und COOH-Wasserstoffatome wurden nicht berücksichtigt, da Austausch des Tritiums gegen H_2 bei der Behandlung mit Methanol stattgefunden hatte). Dieser Effekt ist offensichtlich auf den intensiveren Austausch von Tritium im aromatischen Ring des Tropasäure-Restes bei der Wilzbach-Tritierung zurückzuführen.

Wir danken für die finanzielle Förderung dieser Untersuchungen durch Mittel des "Bundesministeriums für wissenschaftliche Forschung".

G. WERNER
K.-H. SCHMIDT

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

** Tetrahedron Letters (1967) i. Druck.

LITERATURVERZEICHNIS

1. SCHMIDT, H.-L., WERNER, G. und KUMPE, G. — *Liebigs Ann. Chem.*, **688** : 228 (1965).
2. WERNER, G. und MOHAMMAD, NEK. — *Liebigs Ann. Chem.*, **694** : 157 (1966).
3. WILZBACH, K. E. — *J. Amer. Chem. Soc.*, **79** : 1013 (1957).

Preparation of Cyanates- ^{14}C by an Exchange Reaction with $^{14}\text{CO}_2$

The existing methods of preparation of cyanates- ^{14}C proceed from various types of chemical transformation of the starting ^{14}C -labelled derivatives, such as oxidation of cyanides- ^{14}C ($^{1-3}$) and, synthesis from urea- ^{14}C and potassium carbonate ($^{4-6}$).

All these methods have the experimental drawback in requiring isolating procedures for purification of the product, these being frequently quite laborious and resulting in a decrease of the final yield. In addition, one must use aqueous solutions in which the cyanate are unstable.

Therefore, we applied the previously described method for preparing salts of aromatic carboxylic acids labelled with ^{14}C in the carboxyl groups by an exchange reaction with $^{14}\text{CO}_2$ ($^{7-10}$) to the preparation of cyanates labelled with ^{14}C ($^{11, 12}$). It was found that during the reaction the ^{14}C is randomly distributed between the molecules of cyanate and carbon dioxide in the reaction atmosphere and, at the same time, that no chemical interaction between the various components of the reaction mixture takes place as might give rise to new products so that it is simple to isolate the two components, viz. the solid cyanate- ^{14}C and the gaseous $^{14}\text{CO}_2$ with remaining activity. The chemical purity of both radioactive products is the same as that of the reactants as was confirmed by chemical analysis, comparison of IR spectra of cyanate before and after reaction and by determination of radioactivity of incorporated ^{14}C . Carbon dioxide- ^{14}C was frozen out after reaction with liquid nitrogen and its amount as determined volumetrically agreed with the amount used for the reaction. The sum of radioactivities of cyanate and CO_2 after reaction was equal to the radioactivity of carbon dioxide used for the reaction.

EXPERIMENTAL

Exchange Reaction between KCNO and $^{14}\text{CO}_2$

A thick-walled glass ampoule of 5 ml volume contained 40.5 mg (0.5 mmol) potassium cyanate and the sample was dried at 230°C in vacuo (0.01 mm Hg) for 2 h. After drying, 0.5 mmol $^{14}\text{CO}_2$ (8.4 nCi) was introduced into the ampoule by the freezing-out method⁸ and the ampoule was heat-sealed. It was then heated in an electrically heated quartz tube to $325\text{--}440^\circ\text{C}$ for 0.5 to 120 min (Table I). The reaction time was measured from the moment of melting of cyanate. After cooling, the ampoule was connected to a vacuum line; carbon dioxide- ^{14}C with the remaining activity was regenerated