

EUR 510.d

REPRINT

EUROPÄISCHE ATOMGEMEINSCHAFT - EURATOM

**EINE MIKROMETHODE ZUR MARKIERUNG
VON STEROIDEN
UND VON ECDYSON MIT TRITIUM**

von

P. KARLSON, R. MAURER
(Universität München)
und **M. WENZEL**
(Freie Universität Berlin)

1964



Euratom - Freie Universität Berlin - Deutschland
Vertrag Nr. 021-62-4 RISD

Sonderdruck aus
ZEITSCHRIFT FÜR NATURFORSCHUNG
Band 18b, Heft 3 - 1963

HINWEIS

Das vorliegende Dokument ist im Rahmen des Forschungsprogramms der Kommission der Europäischen Atomgemeinschaft (EURATOM) ausgearbeitet worden.

Es wird darauf hingewiesen, dass die Euratomkommission, ihre Vertragspartner und alle in deren Namen handelnden Personen:

- 1° — keine Gewähr dafür übernehmen, dass die in diesem Dokument enthaltenen Informationen richtig und vollständig sind oder dass die Verwendung der in diesem Dokument enthaltenen Informationen oder der in diesem Dokument beschriebenen technischen Anordnungen, Methoden und Verfahren nicht gegen gewerbliche Schutzrechte verstößt;
- 2° — keine Haftung für die Schäden übernehmen, die infolge der Verwendung der in diesem Dokument enthaltenen Informationen oder der in diesem Dokument beschriebenen technischen Anordnungen, Methoden oder Verfahren entstehen könnten.

Die Namen der Autoren sind in alphabetischer Reihenfolge aufgeführt.

This reprint is intended for restricted distribution only. It reproduces, by kind permission of the publisher, an article from "ZEITSCHRIFT FÜR NATURFORSCHUNG", Band 18b, Heft 3 - 1963, 219-224. For further copies please apply to Verlag der Zeitschrift für Naturforschung — Tübingen (Deutschland).

Dieser Sonderdruck ist für eine beschränkte Verteilung bestimmt. Die Wiedergabe des vorliegenden in „ZEITSCHRIFT FÜR NATURFORSCHUNG“, Band 18b, Heft 3 - 1963, 219-224 erschienenen Aufsatzes erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Herausgebers. Bestellungen weiterer Exemplare sind an den Verlag der Zeitschrift für Naturforschung — Tübingen (Deutschland) zu richten.

Ce tiré-à-part est exclusivement destiné à une diffusion restreinte. Il reprend, avec l'aimable autorisation de l'éditeur, un article publié dans «ZEITSCHRIFT FÜR NATURFORSCHUNG», Band 18b, Heft 3 - 1963, 219-224. Tout autre exemplaire de cet article doit être demandé à Verlag der Zeitschrift für Naturforschung — Tübingen (Deutschland).

Questo estratto è destinato esclusivamente ad una diffusione limitata. Esso è stato riprodotto, per gentile concessione dell'Editore, da «ZEITSCHRIFT FÜR NATURFORSCHUNG», Band 18b, Heft 3 - 1963, 219-224. Ulteriori copie dell'articolo debbono essere richieste a Verlag der Zeitschrift für Naturforschung — Tübingen (Deutschland).

Deze overdruk is slechts voor beperkte verspreiding bestemd. Het artikel is met welwillende toestemming van de uitgever overgenomen uit „ZEITSCHRIFT FÜR NATURFORSCHUNG“, Band 18b, Heft 3 - 1963, 219-224. Meer exemplaren kunnen besteld worden bij Verlag der Zeitschrift für Naturforschung — Tübingen (Deutschland).

EUR 510.d

REPRINT

EINE MIKROMETHODE ZUR MARKIERUNG VON STEROIDEN UND VON ECDYSON MIT TRITIUM von P. KARLSON, R. MAURER (Universität München) und M. WENZEL (Freie Universität Berlin).

Europäische Atomgemeinschaft - EURATOM.

Vertrag EURATOM - Freie Universität Berlin Nr. 021-62-4 RISD.

Sonderdruck aus „Zeitschrift für Naturforschung“, Band 18b, Heft 3 - 1963, Seiten 219-224.

Zur Tritierung des Metamorphoschormons Ecdyson wurde ein modifiziertes Wilzbach-Verfahren ausgearbeitet. Als Modellsubstanzen dienten Polyhydroxysteroid- $(\Delta^1-5\alpha\text{-Pregnenndiol-(17\alpha,21)\text{-trion(3,11,20)-21-acetat}}$ und $5\alpha\text{-Pregnanndiol-(17\alpha,21)\text{-trion-(3,11,20)-21-acetat}}$. Die besten Ausbeuten und höchsten Aktivitäten erzielte man, indem man die Substanzen an granulierter Aktivkohle

EUR 510.d

REPRINT

A MICROMETHOD FOR THE TRITIUM MARKING OF STEROIDS AND ECDYSONE by P. KARLSON, R. MAURER (Universität München) and M. WENZEL (Freie Universität Berlin).

European Atomic Energy Community - EURATOM.

EURATOM contract with Freie Universität Berlin No. 021-62-4 RISD.

Reprinted from "Zeitschrift für Naturforschung", Vol. 18b, No. 3 - 1963 pages 219-224.

For labelling of the metamorphosis hormone, with tritium, a modified Wilzbach technique has been worked out. Polyhydroxysteroids ($\Delta^1-5\alpha\text{-Pregnenndiol-(17\alpha,21)\text{-trion(3,11,20)-21-acetate}}$ and $5\alpha\text{-Pregnanndiol-(17\alpha,21)\text{-trion(3,11,20)-21-acetate}}$) were used as model substances. The best yields and highest activities were obtained by adsorbing the substances on granulated and activated charcoal, enclosing the absorbates in Nylon bags and exposing them to high doses of

EUR 510.d

REPRINT

A MICROMETHOD FOR THE TRITIUM MARKING OF STEROIDS AND ECDYSONE by P. KARLSON, R. MAURER (Universität München) and M. WENZEL (Freie Universität Berlin).

European Atomic Energy Community - EURATOM.

EURATOM contract with Freie Universität Berlin No. 021-62-4 RISD.

Reprinted from "Zeitschrift für Naturforschung", Vol. 18b, No. 3 - 1963 pages 219-224.

For labelling of the metamorphosis hormone, with tritium, a modified Wilzbach technique has been worked out. Polyhydroxysteroids ($\Delta^1-5\alpha\text{-Pregnenndiol-(17\alpha,21)\text{-trion(3,11,20)-21-acetate}}$ and $5\alpha\text{-Pregnanndiol-(17\alpha,21)\text{-trion(3,11,20)-21-acetate}}$) were used as model substances. The best yields and highest activities were obtained by adsorbing the substances on granulated and activated charcoal, enclosing the absorbates in Nylon bags and exposing them to high doses of

EUR 510.d

REPRINT

A MICROMETHOD FOR THE TRITIUM MARKING OF STEROIDS AND ECDYSONE by P. KARLSON, R. MAURER (Universität München) and M. WENZEL (Freie Universität Berlin).

European Atomic Energy Community - EURATOM.

EURATOM contract with Freie Universität Berlin No. 021-62-4 RISD.

Reprinted from "Zeitschrift für Naturforschung", Vol. 18b, No. 3 - 1963 pages 219-224.

For labelling of the metamorphosis hormone, with tritium, a modified Wilzbach technique has been worked out. Polyhydroxysteroids ($\Delta^1-5\alpha\text{-Pregnenndiol-(17\alpha,21)\text{-trion(3,11,20)-21-acetate}}$ and $5\alpha\text{-Pregnanndiol-(17\alpha,21)\text{-trion(3,11,20)-21-acetate}}$) were used as model substances. The best yields and highest activities were obtained by adsorbing the substances on granulated and activated charcoal, enclosing the absorbates in Nylon bags and exposing them to high doses of

absorbierte, die Adsorbate in Nylonsäckchen einschloss und sie bei Zimmer-temperatur mit hohen Tritiumdosen bestrahlte. Ein weiteres Ergebnis der Adsorptionsmethode war ein geringerer Anfall von radioaktiven Nebenprodukten. Die tritierten Substanzen wurden mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie gereinigt, wobei zur Messung der Aktivität auf den Chromatogramplatten ein besonderes Methanstromzählrohr Verwendung fand. Das beschriebene Verfahren empfiehlt sich besonders bei kleinen Mengen (5-20 mg). Bei den reinen Substanzen wurden spezifische Aktivitäten bis zu 250 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ erreicht.

tritium at room temperature. The adsorption resulted also in a decrease of radioactive by-products. The tritiated substances were purified by thin-layer chromatography, using a special flow-counter for activity measurements on the chromatoplates. The method described is especially valuable with small amounts (5-20mg). Specific activities up to 250 $\mu\text{C}/\text{mg}$ of the pure substances have been obtained.

tritium at room temperature. The adsorption resulted also in a decrease of radioactive by-products. The tritiated substances were purified by thin-layer chromatography, using a special flow-counter for activity measurements on the chromatoplates. The method described is especially valuable with small amounts (5-20mg). Specific activities up to 250 $\mu\text{C}/\text{mg}$ of the pure substances have been obtained.

tritium at room temperature. The adsorption resulted also in a decrease of radioactive by-products. The tritiated substances were purified by thin-layer chromatography, using a special flow-counter for activity measurements on the chromatoplates. The method described is especially valuable with small amounts (5-20mg). Specific activities up to 250 $\mu\text{C}/\text{mg}$ of the pure substances have been obtained.

Eine Mikromethode zur Markierung von Steroiden und von Ecdyson mit Tritium*

VON PETER KARLSON, RAINER MAURER
und MARTIN WENZEL

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität München
und dem Physiologisch-Chemischen Institut der Freien Universität Berlin
(Z. Naturforschg. 18 b, 219—224 [1963]; eingegangen am 16. Januar 1963)

Herrn Prof. A. BUTENANDT zum 60. Geburtstag

For labelling of the metamorphosis hormone, ecdysone, with tritium, a modified Wilzbach technique has been worked out. Polyhydroxysteroids (Δ^1 -5 α -Pregnendiol-(17 α ,21)-trion(3,11,20)-21-acetate and 5 α -Pregnandiol-(17 α ,21)-trion(3,11,20)-21-acetate) were used as model substances. The best yields and highest activities were obtained by adsorbing the substances on granulated and activated charcoal, enclosing the absorbates in Nylon bags and exposing them to high doses of tritium at room temperature. The adsorption resulted also in a decrease of radioactive by-products. The tritiated substances were purified by thin-layer chromatography, using a special flow-counter for activity measurements on the chromatoplates. The method described is especially valuable with small amounts (5–20 mg). Specific activities up to 250 μ C/mg of the pure substances have been obtained.

Ecdyson ist das Häutungs- und Metamorphosehormon der Insekten¹. Zu seinem Wirkungsmechanismus ist von CLEVER und KARLSON² der interessante Befund erhoben worden, daß das Hormon bestimmte Veränderungen an den Chromosomen hervorruft: es induziert die Puff-Bildung. Wir haben daraus eine neue Hypothese über den Wirkungsmechanismus der Hormone abgeleitet³. Für die molekularbiologische Interpretation dieses Effekts ist es wichtig zu wissen, ob das Ecdyson selbst am Chromosom gebunden wird; ist dies der Fall, so wird man eine direkte Wechselwirkung zwischen dem Hormon und der Chromosomensubstanz annehmen müssen.

Um diese Frage zu prüfen, wollen wir tritiummarkiertes Ecdyson verwenden und dessen Lokalisierung mittels Autoradiographie untersuchen. In der vorliegenden Mitteilung beschreiben wir die Gewinnung tritiummarkierten Ecdysons; über die biochemischen Anwendungen werden wir später berichten.

Die bisherigen Methoden zur Tritierung von Naturstoffen sind für das Arbeiten mit 100–500 mg Substanz entwickelt worden. Das Ecdyson stand uns aber nur in sehr geringen Mengen zur Verfügung.

Für die Tritierung sollten 5 mg eingesetzt werden; wir mußten deshalb die Methode dem vorliegenden Problem anpassen. Da das Ecdyson (Summenformel $C_{27}H_{44}O_6$) nach unseren neueren Befunden⁴ zu den Steroiden gehört, war es naheliegend, für das Auffinden der besten Tritierungsbedingungen Polyhydroxy-Steroide als Modellsubstanzen heranzuziehen. Da die Markierung und radiochemische Reinigung solcher Substanzen im Mikromaßstab ein allgemeines Interesse beanspruchen kann, teilen wir unsere Erfahrungen hierbei mit.

Reaktionsbedingungen beim Tritium-Austausch

Als Tritierungsmethode kam nur die Wilzbach-Technik in Frage, da sie sich in chemisch-physikalischer Hinsicht als die schonendste erwiesen hat^{5,6}. Hierbei wird das Ausgangsmaterial mit Tritiumgas zusammengebracht; im Verlaufe längerer Zeit findet ein Austausch des im Molekül gebundenen Wasserstoffs gegen Tritium statt. Neben dieser Austauschreaktion kommen erhebliche Umwandlungen und Zersetzungen vor^{6–8}. Deshalb ist es bei

¹ P. KARLSON, *Vitamine u. Hormone* 14, 226 [1956].

² U. CLEVER u. P. KARLSON, *Exp. Cell Res.* 20, 623 [1960].

³ P. KARLSON, *Dtsch. med. Wschr.* 86, 668 [1961].

⁴ P. KARLSON, H. HOFFMEISTER, W. HOPPE u. R. HUBER, *Liebigs Ann. Chem.*, im Druck [1963].

* Teil der Dissertation von R. MAURER.

⁵ K. E. WILZBACH, *J. Amer. chem. Soc.* 79, 1013 [1957].

⁶ H. SIMON, *Angew. Chem.* 73, 481 [1961].

⁷ M. WENZEL u. P. E. SCHULZE, Tritiummarkierung, Walter De Gruyter & Co, Berlin 1962, p. 41.

⁸ M. W. LINDAUER u. H. A. SMITH, *J. org. Chemistry* 27, 2245 [1962].

solchen Versuchen notwendig, die markierten Verbindungen sorgfältig zu reinigen.

Als Vergleichssubstanzen wurden die sehr polaren Steroide Δ^1 -5 α -Pregnen-diol-(17 α .21)-trion-(3.11.20)-21-acetat und 5 α -Pregnan-diol-(17 α .21)-trion-(3.11.20)-21-acetat gewählt. * Daneben wurde eine Probe Ecdyson bei -196°C mit Tritium behandelt.

Für unser Problem schien am besten geeignet die Tritierung eines Kohle-Adsorbats, wie sie bereits WENZEL, WOLLENBERG und SCHULZE erprobt haben⁹. Sie ist nicht für jede Substanz mit gleichem Erfolg anwendbar¹⁰; man erreicht jedoch oft beim Tritieren von Kohle-Adsorbaten höhere spezifische Aktivitäten der gereinigten Substanzen bei verminderter Zersetzung, und die Reinigung wird deshalb einfacher. Nach unseren Erfahrungen ist es wichtig, die verwendete Aktivkohle von organischen Begleitstoffen zu befreien. Dies geschah durch Waschen mit Salzsäure, Wasser, Aceton und Benzol-Äthanol.

Die Beladungsdichte auf der Kohle bewegte sich zwischen 0,5 und 2 Prozent. Als Adsorbens wurde eine granuliert Aktivkohle verwendet, um das Aufwirbeln von Kohlenstaub beim Evakuieren der Tritierungsapparatur zu vermeiden¹¹. Besonders günstig erwies es sich, die beladene Kohle in Beuteln aus Nylongewebe einzuschließen. Damit wird die Diffusion des Tritiumgases wesentlich erleichtert, da die Oberfläche der Kohleschicht nun sehr groß ist; ferner können mehrere Präparate in einer Ampulle exponiert werden.

Da wahrscheinlich die Relation: Eingesetzte Tritium-Menge zur Gesamtmasse (Substanz + Kohle) in der Reaktionsampulle einen starken Einfluß auf die Höhe der erhaltenen spezifischen Aktivitäten hat¹², wurde eine sehr große Tritium-Menge (33 C) gewählt.

Vorversuche mit Cholesterin zeigten, daß eine Tritierungsdauer von ca. 4 Wochen erforderlich ist¹³. Als Reaktionstemperatur schien eine möglichst tiefe Temperatur (bei flüssigem Stickstoff: -196°C) Vorteile zu bieten¹⁴. Es wurden jedoch Parallelversuche bei Zimmertemperatur gleichzeitig angesetzt, um diesen Punkt nochmals zu überprüfen.

Nach der Exposition wurden die Kohleadsorbate im Soxhlet-Apparat mit Benzol-Äthanol bei 85°C extrahiert. Vorversuche hatten gezeigt, daß hiermit eine Rückgewinnung von 85–95% der eingesetzten Substanz zu erreichen ist, obwohl die adsorbierte Menge im Vergleich zum Adsorptionsmittel sehr gering ist. Wir haben damit den Einwand von CHADHA und Mitarbb.¹⁵ gegen die Adsorptionstechnik entkräften können.

Die Ausbeuten an Rohprodukten, die bei den verschiedenen Bedingungen erhalten wurden, sind in Tab. 1 zusammengestellt. Entgegen unserer Erwartung waren bei der Tieftemperatur-Tritierung die erhaltenen spezifischen Aktivitäten sehr viel geringer als bei Raumtemperatur. Wir führen dies hauptsächlich auf die geringe Beladungsdichte der Kohle zurück; WOLLENBERG und WENZEL¹⁰ hatten bei ihren Tieftemperaturversuchen eine 12-proz. Beladung bei

| Substanz | Vers. Nr. | Tritierungs-Methode | Temperatur d. Tritier. [$^\circ\text{C}$] | Adsorptionsdichte [%] | Eingesetzte Substanzmenge [mg] | Eluierte Substanz grav. spektrom. [mg] | | Spezif. Aktiv. des Rohproduktes [$\mu\text{C}/\text{mg}$]* |
|--|-----------|---------------------|---|-----------------------|--------------------------------|--|------|--|
| 5 α -Pregnan-diol-(17 α .21)-trion-(3.11.20)-21-acetat | 1 | Normal | + 20 | — | 11,1 | 10,8 | — | 2330 |
| | 2 | Kohle | + 20 | 1,35 | 11,3 | 10,8 | — | 3830 |
| | 3 | Kohle | — 196 | 1,35 | 13,0 | 13,1 | — | — |
| Δ^1 -5 α -Pregnen-diol-(17 α .21)-trion-(3.11.20)-21-acetat | 4 | Normal | + 20 | — | 11,5 | 11,7 | 11,4 | 2100 |
| | 5 | Kohle | + 20 | 1,46 | 14,0 | 10,3 | 9,7 | 1230 |
| | 6 | Kohle | — 196 | 1,46 | 14,4 | 15,6 | 14,2 | 91,8 |
| Ecdyson | 7 | Kohle | — 196 | 0,77 | 5,01 | 5,75 | 4,61 | 56,1 |

Tab. 1. Isolierung der ungereinigten Substanzen. * Von labilem ^3H befreit.

* Wir danken der Schering AG, Berlin, für die Überlassung der Steroide sowie Herrn Dr. P. E. SCHULZE für anregende Diskussionsbeiträge.

⁹ M. WENZEL, H. WOLLENBERG u. P. E. SCHULZE, IAEA Tritium-Symposium TTS/66, Wien 1961.

¹⁰ H. WOLLENBERG u. M. WENZEL, Z. Naturforsch. 18b, 8 [1963].

¹¹ Vgl. l. c. 7, p. 16 und l. c. 9.

¹² M. WENZEL u. R. MAURER, unveröffentlicht.

¹³ P. E. SCHULZE, M. WENZEL u. R. MAURER, unveröffentlichte Versuche.

¹⁴ M. WENZEL, H. WOLLENBERG u. E. SCHÜTTE, Ind. Chim. Belge T 27, Nr. 5, 553 [1962].

¹⁵ M. CHADHA, F. WOELLER u. R. LEMMON, UCRL-100 32 [1961].

geringerer Tritiummenge (3 C) und kürzerer Versuchszeit (6 Tage) angewendet. Vielleicht ist der Unterschied auch in der Natur der Substanz begründet; nach l. c.¹⁰ läßt sich z. B. Tyrosin nur schlecht in der Kälte tritieren.

Im Falle des gesättigten Modellsteroids war die nach der Adsorbat-Methode (Versuch 2) erhaltene spezifische Aktivität des Rohprodukts größer als im Parallelversuch ohne Träger (Versuch 1). Beim Pregnenderivat war sie geringer, vermutlich weil bei der trägerfreien Tritierung viel Additionsprodukt hoher Aktivität entstand. Der „Schutzeffekt der Kohle“ ist besonders deutlich zu erkennen, wenn man die Verhältnisse bei der Reinigung vergleicht (s. u.). In Abb. 1 sind die Radio-Dünnschicht-

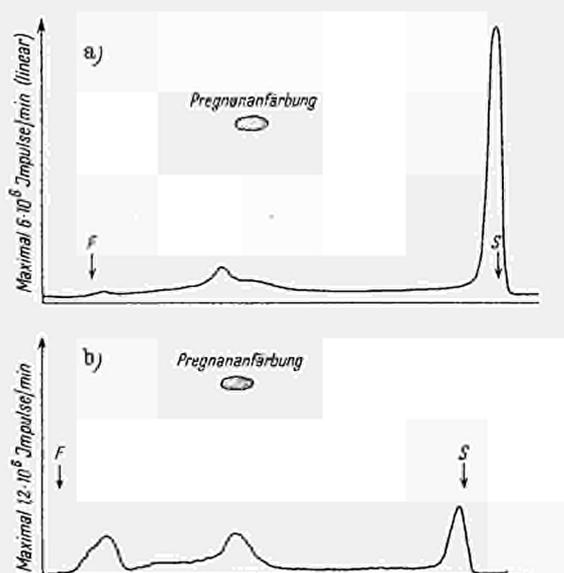


Abb. 1. Aktivitätsverteilung der Dünnschichtchromatogramme der bei 20 °C tritiierten Pregnanderivate. Aufgetragen wurden die ungereinigten, aber von labilem Tritium befreiten Substanzen. a) Kontrollsubstanz (normale Wilzbach-Technik), b) Kohleadsorbat.

Chromatogramme der Rohprodukte von Versuch 1 und 2 gegenübergestellt. Man erkennt, daß bei der Kohleadsorbat-Tritierung der Gipfel des „Hauptproduktes“ sehr viel stärker in Erscheinung tritt als bei der trägerfreien Tritierung. Da weniger Nebenprodukte entstehen, wird auch die nachfolgend beschriebene Reinigung einfacher.

Reinigung der tritiierten Substanzen

Zur Reinigung und Entfernung der radioaktiven Verunreinigungen, die bei der Wilzbach-Methode gewichtsmäßig gering sind, aber eine hohe spezifische Aktivität besitzen, wurde die Dünnschichtchromatographie herangezogen. Nach zahlreichen Vorversuchen erwiesen sich die in Tab. 4 aufgeführten Lösungsmittelsysteme als am besten geeignet. Besondere Schwierigkeiten machte die Rückgewinnung der Substanzen, da deren Menge sehr gering war (0,1–10 mg). Bei der üblichen Elution des herausgeschabten Kieselgeladsorbates gingen stets geringe Anteile der organischen Bindemittel und Gips aus dem verwendeten Kieselgel G (Merck) in Lösung, was sich bei unserem präparativen Mikroverfahren sehr störend bemerkbar machte. Durchschnittlich extrahierten wir 2 mg Verunreinigungen pro g Adsorbens, obwohl das Kieselgel vor dem Auftragen auf die Glasplatte 8 Stdn. im Soxhlet-Apparat mit Methanol vorextrahiert worden war. Wir können daher die von K. RANDEATH¹⁶ zitierten Angaben nicht bestätigen. Das neue Kieselgel H (Merck) dürfte hier vorteilhaft sein.

Hinsichtlich des Trenneffekts lieferte die Dünnschichtchromatographie recht gute Ergebnisse. Die Trennungen wurden durch Messung der Radioaktivität auf den Chromatogramplatten kontrolliert; hierzu hat sich das von SCHULZE und WENZEL konstruierte Methanstromzählrohr* gut bewährt¹⁸. Die Radioaktivität wurde mittels eines Zählgeräts registriert und in Abhängigkeit vom R_f -Wert mit einem Schreiber aufgezeichnet. Beispiele für derartige Aktivitätsverteilungen auf den Dünnschichtchromatogrammen sind in Abb. 1 wiedergegeben.

Wie die Abb. 1 zeigt, blieb der Hauptteil der radioaktiven Verunreinigungen in der Nähe der Startlinie liegen. Durch mehrmalige Rechromatographie der am gewünschten Maximum abgeschabten und eluierten Verbindung konnte ein radiochemisch reines Produkt mit dem richtigen R_f -Wert erhalten werden. Das Kohle-Adsorbat des Ecdysons wurde in analoger Weise aufgearbeitet.

Die Ergebnisse der einzelnen Dünnschichtchromatographien sind in Tab. 2 zusammengefaßt. Mit der Entfernung der sehr hoch markierten Umwandlungsprodukte nimmt die spezifische Aktivität der

¹⁶ K. RANDEATH, Dünnschichtchromatographie, Weinheim, 1962, p. 118, vgl. auch l. c.¹⁷

¹⁷ H. GÄNSHIRT, in: E. STAHL, Dünnschichtchromatographie, Springer-Verlag, Berlin 1962, p. 56 f.

¹⁸ P. E. SCHULZE u. M. WENZEL, Angew. Chem. 74, 777 [1962].

* Ein entsprechendes Zählrohr mit Zubehör wird von der Fa. Prof. Dr. Berthold, Wildbad (Schwarzwald) hergestellt.

| Vers. Nr. | Spezifische Aktiv. des Rohprodukts [$\mu\text{C}/\text{mg}$]* | 1. Chromatogramm | | 2. Chromatogramm | | 3. Chromatogramm | |
|-----------|---|--|---|--|---|--|---|
| | | Nebenprodukte in % der aufgetragenen Aktivität | Spez. Akt. der Hauptfr. [$\mu\text{C}/\text{mg}$] | Nebenprodukte in % der aufgetragenen Aktivität | Spez. Akt. der Hauptfr. [$\mu\text{C}/\text{mg}$] | Nebenprodukte in % der aufgetragenen Aktivität | Spez. Akt. der Hauptfr. [$\mu\text{C}/\text{mg}$] |
| 1 | 2330 | 90 | 220 | 81 | 47,1 | 2 | 45,8 |
| 2 | 3830 | 72 | 431 | 17 | 256 | 14 | 252 |
| 3 | — | 66 | 9,85 | 25 | 3,59 | — | — |
| 4 | 2100 | 92 | 162 | 78 | 47,4 | 13 | 44,1 |
| 5 | 1230 | 78 | 225 | 25 | 169 | 6 | 161 |
| 6 | 91,8 | 89 | 5,35 | 58 | 1,96 | 9 | 1,92 |
| 7 | 56,1 | 77 | 9,98 | 29 | 4,9 | 12 | 2,75 |

Tab. 2. Reinigung der tritiierten Substanzen. * Von labilem ^3H befreit.

Hauptfraktion ab. Nach der 3. Chromatographie dürfte eine konstante spezifische Aktivität erreicht sein, denn die Menge an Nebenprodukten, die in diesem letzten Schritt abgetrennt werden, ist mit 2–14% sehr viel geringer als bei den ersten beiden Chromatographien und die Eluate aus der 3. Chromatographie erwiesen sich einheitlich und radiochemisch rein, wie die in Abb. 2 wiedergegebene

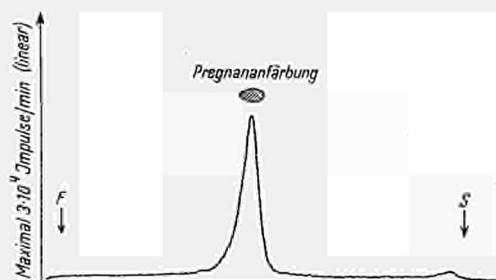


Abb. 2. Aktivitätsverteilung eines Dünnschichtchromatogramms der Kontrollsubstanz nach dem dritten Reinigungsschritt. Ausgangssubstanz vgl. Abb. 1 a.

Aktivitätsverteilung auf der Platte zeigt. Bei diesem Versuch handelt es sich um die trägerfreie Tritierung des Pregnanderivates, bei der der Anteil der Verunreinigungen besonders hoch war. Damit ist gezeigt, daß die hier angewendete Reinigungsmethode schnell und schonend zu radiochemisch einheitlichen Produkten führt und für die Reinigung kleinster Mengen besonders geeignet ist.

Diskussion

Die Vorteile der Kohle-Adsorptionsmethode werden durch unsere Ergebnisse bestätigt. Die Tab. 3 gibt einen Vergleich der trägerfreien Tritierung nach Wilzbach mit der hier verwendeten Methode. Die spezifische Aktivität wird auf das drei- bis fünf-fache gesteigert, die Menge hochmarkierter Neben-

| Vers. Nr. | Tritierungsbedingungen | [$^{\circ}\text{C}$] | Faktor | Erhaltene Aktivität des Reinproduktes in % der des einges. Rohproduktes |
|-----------|------------------------|------------------------|--------|---|
| 1 | Normal | + 20 | 1 | 1,9 |
| 2 | Kohle | + 20 | 5,5 | 21,6 |
| 3 | Kohle | - 196 | (0,08) | — |
| 4 | Normal | + 20 | 1 | 1,1 |
| 5 | Kohle | + 20 | 3,6 | 15,6 |
| 6 | Kohle | - 196 | 0,04 | 4,3 |
| 7 | Kohle | - 196 | — | 14,7 |

Tab. 3. Vergleich der spezifischen Aktivität der chromatographisch reinen Substanzen.

produkte ist geringer (Tab. 2) (Schutzeffekt der Kohle). Damit wird nicht nur die Reinigung vereinfacht, sondern auch die Ausbeute an tritiiertem Material, bezogen auf die eingesetzte Aktivität, verbessert (Tab. 3). Bei den Tieftemperaturversuchen waren die spezifischen Aktivitäten sehr viel geringer als bei den Tritierungen bei Zimmertemperatur (vgl. Tab. 2).

Die Reinigung der tritiierten Rohprodukte ist mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie relativ einfach, falls man die Radioaktivitäts-Verteilung direkt auf den Dünnschichtplatten messen kann. Wie bereits SCHULZE und Mitarbb.^{7,18} gezeigt haben, können durch Dünnschichtchromatographie oft auch Produkte der Tritiumaddition an eine Doppelbindung, die sonst recht schwer zu entfernen sind, abgetrennt werden. Dies konnten wir bestätigen.

Ein weiterer Vorteil der Dünnschichtchromatographie stellt die Trennmöglichkeit von nur geringen Substanzmengen (z. B. 20–0,5 mg) dar. Im Hinblick auf die kleine zur Verfügung stehende Menge des Ecdysons (5 mg) bot sie sich als vorzügliche Mikromethode an. Die Probe Ecdyson, die gleichzeitig eingesetzt wurde, war bei -196°C tritiiert

| Substanz | 1. Chromatogramm | | | 2. Chromatogramm | | | 3. Chromatogramm | | |
|--|------------------|-----|-------------|------------------|-----|-------|------------------|-----|-------|
| | Gemisch | V/V | R_f | Gemisch | V/V | R_f | Gemisch | V/V | R_f |
| 5 α -Pregnan- diol-(17 α .21)tri- on-(3.11.20)21- acetat | Cyclohexan | 30 | 0,56 | Cyclohexan | 30 | 0,50 | Cyclohexan | 30 | 0,53 |
| | Chloroform | 70 | | Chloroform | 70 | | Chloroform | 70 | |
| | Diäthylamin | 10 | | Pyridin | 7 | | Methanol | 10 | |
| 4 ¹ .5 α -Pregnen- diol-(17 α .21)- trion-(3.11.20)- 21-acetat | Cyclohexan | 30 | 0,50 | Cyclohexan | 30 | 0,35 | Cyclohexan | 30 | 0,56 |
| | Chloroform | 70 | | Chloroform | 70 | | Chloroform | 70 | |
| | Diäthylamin | 10 | | Pyridin | 7 | | Methanol | 10 | |
| Ecdyson | Benzol | 100 | 0,26 bis | Benzol | 100 | 0,33 | Chloroform | 90 | 0,30 |
| | Propanol | 35 | | Propanol | 35 | | Propanol | 55 | |
| | Methanol | 20 | | Methanol | 20 | | | | |

Tab. 4. Laufmittelgemische für die Dünnschichtchromatographie.

worden. Die hierbei erreichte spezifische Aktivität ist erheblich geringer als die der bei Zimmertemperatur tritiierten Vergleichssubstanzen. Sobald aus einer neuen Aufarbeitung wieder Ecdyson zur Verfügung steht, werden wir den Markierungsversuch mit einem Kohle-Adsorbat bei 20 °C Tritierungstemperatur wiederholen. Immerhin zeigen die Ergebnisse, daß sowohl die Tritierungs- als auch die beschriebene Reinigungsmethode schonend genug ist, um das empfindliche Hormon markiert, aber unzerstört zu erhalten.

Das markierte Hormon zeigte nach der Reinigung bei der Radio-Papierchromatographie ein einheitliches Maximum und beim biologischen Test an *Calliphora* seine volle hormonale Wirksamkeit.

Ein Vergleich mit den in der Literatur¹⁹ angegebenen, spezifischen Aktivitäten der gereinigten Produkte zeigt, daß die erhaltenen Ergebnisse (161 bis 250 μ C/mg) als sehr befriedigend zu bezeichnen sind. Nur von wenigen Autoren wurden höhere spezifische Aktivitäten erreicht.

Wir danken Euratom für die im Rahmen des Forschungsprogramms „Markierte Moleküle“ gewährte Unterstützung der Arbeit, der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der chemischen Industrie für Sachbeihilfen.

Experimenteller Teil

1. Reinigung der Aktivkohle

Aktivkohle (Merck) zur Gaschromatographie Nr. 9624, auf Teilchengröße 0,2–0,1 mm eingestellt, wurde mit 20-proz. Salzsäure ca. 15 Min. erhitzt, abfiltriert und mit dest. Wasser solange gewaschen, bis das Filtrat neutral reagierte und chloridfrei war. Dann

¹⁹ Vgl. l. c. ⁷, p. 72.

wurde das Wasser mit warmem Aceton verdrängt, dieses wiederum mit warmem Benzol. Anschließend wurde mit dem Gemisch Benzol–Äthanol 2:1 (V/V) 36 Stdn. im Soxhlet-Apparat extrahiert.

2. Adsorption der Steroide an die Aktivkohle

Die äthanolischen Substanzlösungen (30 mg/10 ml) wurden mit der Aktivkohle (2 g) 2 Stdn. geschüttelt. Die Adsorptionsdichten wurden gravimetrisch und im Falle des Pregnens (λ_{\max} 228 $m\mu$) und des Ecdysons (λ_{\max} 242 $m\mu$) auch spektrometrisch aus der nicht adsorbierten Substanzmenge und der eingesetzten Kohlemenge bestimmt. Die Adsorbate wurden durch vorsichtiges Evakuieren und Erwärmen von anhaftendem Lösungsmittel befreit.

3. Exposition der Adsorbate in Nylonsäckchen

Die Nylonsäckchen wurden aus dem Nylongewebe MOnyl 37 F (Maschenweite 0,037 mm) der Firma MOnyl, Züricher Beuteltuchfabrik AG Zürich 40, folgendermaßen hergestellt: Gewebestückchen der Größe 40·40 mm wurden einmal gefaltet, die Ränder an 2 Seiten mittels einer Pinzette zusammengehalten und in der Sparflamme eines Bunsenbrenners verschweißt. Nach Einfüllen der Kohleadsorbate wurde die letzte Seite in gleicher Weise verschlossen.

4. Reaktionsgefäße und Tritierbedingungen

An eine Ampulle aus Duranglas, deren „Bauch“ 18·35 mm und deren „Hals“ 11·40 mm groß waren, wurde nach Einbringen der gefüllten Nylonsäckchen ein Kapillarrohr angeschmolzen (1 mm ϕ , 130 mm lang), das in ein Glasrohr von 6 mm Stärke auslief. Durch einen vom *Radiochemical Centre, Amersham, England*, angeschmolzenen Vakuummhahn wurde die Ampulle evakuiert und mit 33 C Tritium beschickt (13 ml), das nach 29 Tagen durch Brechsiegel wieder abgepumpt wurde. Der Tritiumgasdruck betrug 600 mm Hg. Isotopenreinheit des Gases zu Beginn: 98% ³H₂. Im Falle des Tieftemperatur-Versuches (–196 °C)

wurden 23 C $^3\text{H}_2$ zurückgewonnen; Isotopenreinheit 96,3% $^3\text{H}_2$, was nach Auskunft von Dr. E. A. EVANS (Radiochemical Centre) auf eine bevorzugte Addition hinweist. Im Falle des Raumtemperatur-Versuches wurden 22 C $^3\text{H}_2$ zurückgewonnen; Isotopenreinheit 82,8% $^3\text{H}_2$, was mehr Austausch als Addition bedeuten dürfte.

5. Elution der an Aktivkohle adsorbierten Substanzen

Mit dem azeotropischen Gemisch Benzol-Äthanol (1:1 v/v) wurden die Adsorbate bei 85 °C 100 Min. lang im Soxhlet-Apparat extrahiert. Als Heizquelle empfahl sich ein Wasserbad.

6. Bestimmung der spezifischen Aktivitäten

Die geringen Fraktionsmengen der Chromatogramme wurden gravimetrisch, korrigiert auf den entsprechenden Kieselgel-Blindwert, und im Falle der α,β -ungesättigten Ketone (Pregnenderivate und Ecdyson) spektrometrisch, gleichfalls auf den entsprechenden Kieselgel-Blindwert korrigiert, bestimmt. Die Radioaktivitäten wurden aus aliquoten Teilen der Eluate auf Aluminiumschälchen bei einer Schichtdicke von 0,1 μcm^2 in einem Methanstromzähler FH 407 nach RYDBERG gemessen²⁰. Die Zählausbeute beträgt dabei 44 Prozent. Der bei dieser Methode resultierende mittlere Fehler beträgt ± 6 Prozent. Die spezifischen Aktivitäten der von labilem Tritium befreiten Rohprodukte

²⁰ I. RYDBERG, Acta chem. scand. 12, 399 [1958].

wurden nach dreimaligem Auflösen der von der Kohle eluierten Substanzen in Methanol und Wiedereinigungen ermittelt.

Die Aktivitätsverteilung auf den Dünnschichtplatten wurde mit dem von SCHULZE und Mitarbb.¹⁸ entwickelten Spezialzählrohr erhalten; die Papierchromatogramme wurden mit einem Doppelzählrohr nach WENZEL⁷ ausgemessen.

Die in den Spalten der Tab. 2 aufgeführten prozentualen Verunreinigungen wurden planimetrisch aus den Radio-Dünnschichtchromatogrammen errechnet.

7. Chromatographie

Die konzentrierten Lösungen der Substanzen in Chloroform-Methanol wurden mittels Kapillarröhrchen (0,4 mm ϕ) Punkt neben Punkt zu einem 11 cm breiten Startband auf 0,7 mm dicken Kieselgel-G-Schichten aufgetragen und in gesättigten Trennkammern bei 22 °C chromatographiert. Zur Identifizierung der radioaktiven Fraktionen wurden die inaktiven Steroide am Rande der Platten mitchromatographiert und im Falle der Modellsteroide nach Anfärbung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin mit den aktiven verglichen. Im Falle des Ecdysons hat sich das Leuchtpigment ZS Super (Riedel de Haen AG) für die Identifizierung bewährt; das Hormon gibt sich durch seine blauviolette Absorption im UV-Licht (254 m μ) empfindlich zu erkennen. Die mit den entsprechenden Aktivitätsmaxima übereinstimmenden Hauptfraktionen wurden abgeschabt und im Mikro-Soxhlet-Apparat mit dem Gemisch Chloroform-Methanol bei 75 °C (Wasserbad) eluiert.

CDNA00510DEC