

Herzglykoside und Metaboliten — Probleme der Wiederfindung in Gewebsextrakten

Abtrennung sichtbarer Substanzflecke im Nanogrammbereich mittels HPTLC*

R. Aderjan, S. Doster, H. Petri und G. Schmidt

Institut für Rechtsmedizin der Universität Heidelberg, Voßstraße 2, D-6900 Heidelberg,
Bundesrepublik Deutschland

Cardiac Glycosides and Metabolites—Problems of Recovery in Tissue Extracts

Separation of Visible Substance Spots in the Nanogram Range

Summary. The recovery measurements in rat tissues performed via i.p. injected radioactive digoxin derivatives (^3H -digoxin, ^{125}J -digoxin derivative) showed that approximately 50% of the total glycoside content will be extracted. Thus, an addition of digoxin standards to drug-free tissues may lead to false negative determinations. By comparison of the radioactivity before and after extraction the following results were obtained:

Recovery from tissues	^3H -digoxin	50%
	^{125}J -digoxin	40%
from serum	^3H -digoxin	60%
added to drug free tissue homogenates	^3H -digoxin	85%

After i.p. application of 15 mg/kg of β -methyldigoxin to BD9 (Berlin)-rats the resulting tissue concentrations were extracted by Amberlite XAD-2. β -Methyldigoxin and its metabolites digoxin and digoxinbisdigoxide could be separated and distinguished from artifacts by fluorescence detection on HPTLC-plates with a detection limit of 60 ng/spot. Concentrations determined by radioimmunoassay are in satisfactory agreement with HPTLC results.

Key words: Digoxin – Digoxin metabolites – Radioimmunoassay, Digoxin and metabolites

* HPTLC = High Performance Thin Layer Chromatography = Hochleistungs-Dünnschicht-chromatographie

Sonderdruckanfragen an: Dr. R. Aderjan (Adresse siehe oben)

Zusammenfassung. Durch Wiederfindungsmessungen mit Hilfe von i.p. injiziertem ^3H -Digoxin und ^{125}J -markiertem Digoxin konnte gezeigt werden, daß Standardkonzentrationen von Digoxin, die arzneistofffreiem Gewebe zugesetzt werden, zu falsch negativen Bestimmungen führen können. Der Vergleich der Radioaktivität aus verschiedenen Geweben vor und nach Extraktion mit Amberlite XAD-2 ergab, daß nur um 50% der gesamten Glykosidmenge extrahiert wird:

		Wiederfindung
Aus verschiedenen Geweben:	^3H -Digoxin	50%
	^{125}J -digoxin	40%
Aus Serum:	^3H -Digoxin	60%
Gewebe homogenat. extern zugesetzt:	^3H -Digoxin	85%

BD9-(Berlin)-Ratten wurden 15 mg/kg Körpergewicht β -Methyldigoxin i.p. injiziert. Aus Extrakten mit Amberlite XAD-2 von Blut, Niere, Herz und Leber konnten außer β -Methyldigoxin dessen Metaboliten Digoxin und Digoxinbidigitoxose ab 60 ng/Fleck in prozentualen Anteilen als Fluoreszenzflecke sichtbar identifiziert werden, durch die Anwendung von HPTLC-Platten mit Fluoreszenzzusatz. Radioimmunologisch bestimmte Konzentrationen fanden sich in guter Übereinstimmung mit dünnschichtchromatographischen Ergebnissen.

Schlüsselwörter: Digoxin – Digoxinmetaboliten – Radioimmunoassay, Digoxin und Metaboliten

Zur Kontrolle der Digitalistherapie wird in der Klinik der Digitalisspiegel routinemäßig direkt aus Serum mittels Radioimmunoassay (RIA) bestimmt [12]. Wegen der hohen Empfindlichkeit (0,2 µg/l) wird der RIA mit gewissen Einschränkungen als indirekte Meßmethode [1, 9] auch in der forensischen Toxikologie benutzt [1, 8, 9]. Da hier Arzneistoffe meist aus hämolytischem Blut und Gewebe bestimmt werden, muß zur Beseitigung von Störfaktoren für den RIA eine Extraktion vorausgehen. Bisher wurden Wiederfindungsraten bei der Extraktion immer durch externe Zusätze zu glykosidfreien Gewebshomogenaten ermittelt [4, 7, 13]. Da nicht sicher war, inwieweit membran- und proteingebundenes Digoxin extrahiert wird, haben wir versucht, mit Hilfe von radioaktiv markiertem Digoxin in Ratten die in-vivo-Bedingungen zu simulieren.

Da der dünnschichtchromatographischen Trennung von Digitalis-Glykosiden die gleichen Extraktionsschritte vorangehen müssen, treten auch hier entsprechende Verluste auf [6, 13].

Selbst bei Gewebespiegeln im toxischen Bereich konnte bisher Digoxin bzw. seine Metaboliten dünnschichtchromatographisch nicht ohne weiteres sichtbar gemacht werden [13] (Sichtbarkeitsgrenze mit Nachweisreagenzien ca. 500 ng/Fleck) [13]. Mit „HPTLC-Nanoplatten“ mit Fluoreszenzzusatz (siehe Material und Methode) [3] gelingt es, Digoxinkonzentrationen im Nanogramm-bereich

(30 ng/Fleck) nach dünnschichtchromatographischer Trennung sichtbar zu machen [3].

Wird für forensisch-toxikologische Untersuchungen der Radioimmunoassay (RIA) angewendet, läßt sich aus der ermittelten Glykosidkonzentration kein Hinweis auf die angewendete Substanz und den Beitrag von Metaboliten gewinnen. Da beim Menschen in den Geweben von Herz und Niere Gesamtkonzentrationen erreicht werden, die im therapeutischen Fall zwischen 0,05—0,15 mg/kg liegen [1, 5, 7], sollte es besonders bei tödlichen Vergiftungen möglich sein, das individuelle Glykosid und seine Metaboliten dünnschichtchromatographisch und quantitativ abzuschätzen.

Im Folgenden soll über unsere Ergebnisse von Wiederfindungsbestimmungen mit dem über die Blutbahn im Gewebe angereicherten radioaktiv markierten Glykoside sowie über dünnschichtchromatographische Fluoreszenz-Detektion von β -Methyldigoxin, Digoxin und Digoxinbidigitoxose aus Gewebsextrakten berichtet werden. Radioimmunologische Messungen der Gesamtkonzentrationen in Gewebsextrakten wurden zum Vergleich mitgeführt.

Material und Methoden

Wiederfindungsrate bei Geweben: Männliche Wistar-Ratten (Gewicht ca. 300 g) erhielten i.p. je 40 μ Ci 3 H-Digoxin (NEN) bzw. 0,03 μ Ci 125 J-Digoxin (NEN). Nach 150 min wurden die Tiere mit Diäthyläther getötet und die Gewebe sofort entnommen.

Während die „ 125 J-Digoxin-Gewebe“ direkt im γ -Counter gemessen werden können, mußten die „ 3 H-Digoxin-Gewebe“ zuerst in Methanol homogenisiert, mit Geweblöser behandelt und dann in Szintillationslösung (Unisolve 1, Koch-Light-laboratories) gemessen werden.

Entsprechende Gewebsmengen wurden nach Homogenisierung extrahiert und mit einem „Amberlite-XAD-2-Batch-Verfahren“ gereinigt [1]. Nach 2maligem Waschen mit 5% NH_3 -Wasser wurde vorgereinigtes Amberlite-XAD-2 mit Essigester ausgeschüttelt und der Esterextrakt eingeeengt. Der 125 H-Digoxin-Extrakt wurde direkt gemessen. Der 3 H-Digoxin-Extrakt wurde in Szintillationslösung mit der entsprechenden Menge homogenisiertem Leergewebe eingebracht und im β -Counter gezählt. Der Zusatz von Leergewebe bei Messung des Extraktes von 3 H-Digoxin sollte den β -Counter störende Faktoren gleich halten. β -Methyldigoxin- und -Metaboliten-Nachweis mit HPTLC-Platten: Männlichen BD9-(Berlin)-Ratten (Gewicht ca. 300 g) wurde eine Dosis von 5 mg β -Methyldigoxin (Boehringer, Mannheim) i.p. injiziert. Die LD_{50} bei Ratten beträgt 6,3 mg/kg Körpergewicht [2]. Die Gewebe wurden wieder sofort nach dem Tod entnommen und mit der Amberlite-XAD-2-Methode extrahiert.

a) Für die Dünnschichtchromatographie wurde der Extrakt in 50 μ l Methanol aufgenommen und mit einer Mikrospritze 10 μ l auf die HPTLC-Platten aufgetragen. Nach der Methode von Bottler [3] (Fließmittel: Chloroform/Aceton/Methanol 32:14:4) wurde das Chromatogramm weiterbehandelt und im UV-Licht bei 365 nm betrachtet.

b) Für die vergleichende Gewebskonzentrationsbestimmung wurde ein Teil des Extraktes dem 3 H-Digoxin-Radioimmunoassay (NEN, Dreieichenhain, BRD) zugeführt.

Ergebnisse und Diskussion

Bei den Wiederfindungsversuchen mit radioaktiv markiertem Digoxin, deren Ergebnisse in Tabelle 1 zusammengefaßt sind, wurde aus folgenden Gründen 3 H-Digoxin und 125 J-Digoxin verwendet:

Das ^3H -Digoxinmolekül unterscheidet sich in seiner Struktur nicht von unmarkiertem Digoxin und ist daher im physiologischen Verhalten therapeutisch angewandtem Digoxin gleichzusetzen. Andererseits ist ^3H -Digoxin nur ein weicher β -Strahler und wird daher in Gewebshomogenaten stark absorbiert, so daß in Szintillationslösung direkt eingegeben nur ein Teil der Strahlung registriert wird. Daher muß versucht werden, den Quench-Effekt bei allen Messungen gleichzuhalten.

^{125}J -Digoxin enthält dagegen einen harten γ -Strahler, der vom Gewebe kaum absorbiert wird und deshalb auch in Gewebestücken ohne Quench-Effekt direkt gemessen werden kann. Trotzdem erhielten wir nach ^{125}J -Digoxinaufarbeitung eine um ungefähr 10% niedrigere Ausbeute. Der Grund hierfür dürfte in der Molekülveränderung von ^{125}J -Digoxin liegen, bei dem das radioaktive Jod mit Hilfe eines Histaminrestes an den letzten der drei Digitoxosereste des Glykosids gekoppelt ist.

Da einmal durch die Metabolisierung Zuckerreste abgespalten werden (Tabelle 2) und andererseits der Histaminrest allein durch Esterasen abgespalten werden kann, ist ein solcher Verlust durchaus erklärbar. Geringe Beachtung ist dabei der sicherlich nicht repräsentativen Körperverteilung zu schenken. Mit beiden Methoden war jedoch eine ausreichende Übereinstimmung zu erreichen, so daß eine Wiederfindung nach Aufarbeitung nur in der Größenordnung von 50%, statt von 85%, angenommen werden kann.

Deshalb führt die bisherige Methode in der Praxis, bei der radioimmunologisch bestimmte, unbekannte Gewebsspiegel mit bekannten, extern zugesetzten Digoxinkonzentrationen verglichen werden, zu falsch niedrigen Ergebnissen [4—7]. Die in der Tabelle 2 angegebenen radioimmunologischen Meßwerte müssen daher noch auf die Wiederfindung bezogen werden. Der Vergleich radioimmunologischer Meßwerte mit quantitativen Abschätzungen der dünn-schicht-chromatographisch getrennten Glykosidmengen über die Fluoreszenzintensität (Abb. 1) führt zu übereinstimmenden Größenordnungen.

Die anteiligen Verhältnisse von β -Methyldigoxin zu zwei seiner in vivo entstandenen Metaboliten sind für verschiedene Probenmaterialien in Tabelle 2 wiedergegeben.

Die Fluoreszenzdetektion von β -Methyldigoxin und dessen Metaboliten aus den Gewebsextrakten entsprechend Tabelle 2, nach Trennung auf HPTLC-Platten, ist in Abbildung 1 gezeigt.

Mit HPTLC-Platten ist es zwar möglich, bereits mit 30 ng/Fleck eine Fluoreszenz zu erhalten [3], doch können körpereigene Steroide, die mit Amberlite-XAD-2 mitextrahiert werden, im Gegensatz zum RIA, als Störfaktoren wirken. Allerdings besitzen Steroidhormone andere R_f -Werte als Herzglykoside und zeigen ein spektral verändertes Fluoreszenzverhalten (Abb. 1). Um die Fluoreszenz der Herzglykoside gegenüber Steroidhormonen und anderen Störfaktoren sicher abgrenzen zu können, erscheint uns der Nachweis einer Konzentration unter 60 ng/Fleck als unsicher (Abb. 1).

Im Falle einer suicidalen Vergiftung mit β -Methyldigoxin [1] waren von uns Nieren-Konzentrationen von 1,4 $\mu\text{g/g}$ festgestellt worden. Konzentrationsbereiche dieser Art werden zukünftig auch hinsichtlich des Anteils an Stoffwechsel-

Tabelle 1. Wiederfindungsraten aus Geweben, die bei Ratten über i.p. Applikation mit radioaktiv markierten Glykosidkonzentrationen angereichert wurden. Im Vergleich dazu Wiederfindung von extern zu gleichartigen Gewebehomogenisaten zudosiertem ³H-Digoxin

	Gewebeart						Serum
	Herz	Niere	Leber	Skelett-muskel	Gehirn	durchschnittl. Ausbeute	
Digoxin, ¹²⁵ J-markiert	vor Extraktion	100%	100%	100%	—	—	—
	nach Extraktion	31%	35%	55%	—	40,3%	—
Digoxin, ³ H-markiert	vor Extraktion	100%	100%	—	100%	100%	100%
	nach Extraktion	41,5%	45,5%	—	59,5%	49,2%	62,5%
Externer ³ H-Digoxin-Zusatz	nach Extraktion	85%	85%	85%	85%	85%	85%

Tabelle 2. Anteiliges Verhältnis von β -Methyldigoxin, Digoxin und Digoxinbidigitoxose in Blut, Urin und Gewebe nach Trennung auf HPTLC-Platten und Vergleich der Fluoreszenzen mit Standardflecken, in Verbindung mit den radioimmunologisch bestimmten (nicht auf Wiederfindung korrigierten) Glykosidkonzentrationen bei einer mit 5 mg β -Methyldigoxin vorbehandelten Ratte

	Bestimmung aus						
	Blut	Niere	Skelett-muskulatur	Herz	Leber	Gehirn	Urin
Aufgetragene Menge/Punkt entsprechend	0,3 ml	0,2 g	0,15 g	0,15 g	0,3 g	0,2 g	0,03 ml
β -Methyldigoxin	45%	45%	45%	30%	25%	—	—
Digoxin	45%	45%	45%	55%	55%	—	70%
Digoxinbidigitoxose	10%	10%	10%	15%	20%	—	30%
Radioimmunol. ermittelte Gesamtkonz.	1,0 ug/ml	2,0 ug/g	2,0 ug/g	0,75 ug/g	0,75 ug/g	0,125 ug/g	2,50ug/ml

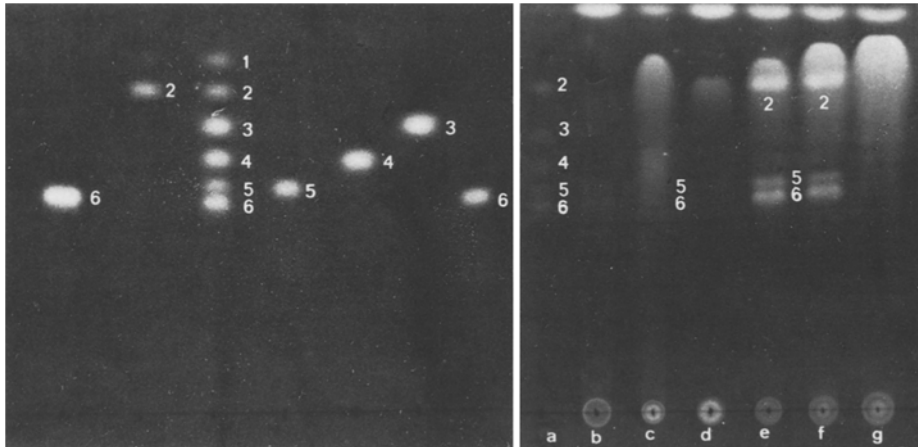


Abb. 1. HPTLC von verschiedenen Digoxin-Derivaten und -Metaboliten. *Links:* Standards (ca. 500 ng/Fleck) von -Acetyldigoxin (1), β -Methyldigoxin (2), Digoxingenin (3), Digoxingenin-monodigitoxose (4), Digoxingenin-bidigitoxose (5) und Digoxin (6). *Rechts:* 60 ng Standards von 2, 3, 4, 5, 6 (a) und Trennungsbeispiele von Extrakten von Urin (b), Blut (e) und Niere (f) entsprechend den Geweben von Tabelle 2, sowie von Extrakten von glykosidfreien Proben von Blut (c), Serum (d), Niere (g) von Ratten. Der Urin war nicht mit β -Glucoronidase vorbehandelt

produkten leicht analysiert werden können, was für den Zeitablauf einer Vergiftung und für die Beurteilung der Ausscheidungssituation im Urin von erheblicher Bedeutung sein kann, da je nach Zeitpunkt und Dosis der letztmaligen Zufuhr mit geänderten Substanz- und Metabolitenmustern gerechnet werden muß. Somit erscheint uns eine Methode gegeben zu sein, die radioimmunologisch gefaßten Werte in Konzentrationsbereichen bis etwa 200 ng/g Feuchtgewebe auch hinsichtlich der individuellen Glykosidanteile zu verifizieren. Wie sich relative Anteile von Muttersubstanzen und Metaboliten im Verlaufe einer Vergiftung auch dosierungsabhängig verschieben, ist für die verschiedenen Körpergewebe und -flüssigkeiten beim Menschen noch weitgehend unbekannt.

Literatur

1. Aderjan, R., Buhr, H., Schmidt, G.: Investigation of cardiac levels in human post mortem blood and tissues determined by a special radioimmunoassay procedure. *Arch. Toxicol.* (1979, im Druck)
2. Boehringer, Mannheim: Lanitop and Lanitop mite. Zur Behandlung aller Formen und Grade der Herzinsuffizienz, S. 35
3. Bottler, R.: Quantitative HPTLC: Bestimmung von Pyrrithioxin und Digoxin in Encephabol-Digoxin-Dragees. *Kontakte (Fa. Merck, Darmstadt)* 2, 36—39 (1978)
4. Brock, A.: A radioimmunoassay for digoxin in serum, urine and myocardial tissue. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 34, 198—204 (1974)
5. Haasis, R., Larbig, D., Stunkat, R., Bader, H., Seboldt, H.: Radioimmunologische Bestimmung der Glykosidkonzentration im menschlichen Gewebe. *Klin. Wschr.* 55, 23—30 (1977)

6. Jelliffe, R. W., Stephenson, R. G.: A fluorimetric determination of myocardial digoxin at autopsy with identification of digitalis leaf, digoxin, and gitoxin. *Am. J. Clin. Pathol.* **51**, 347—357 (1969)
7. Karjalainen, J., Ojala, K., Reissell, P.: Tissue concentrations of digoxin in an autopsy material. *Acta Pharmacol. Toxicol.* **34**, 385—390 (1974)
8. Moffat, A. C.: Interpretation of post mortem serum levels of cardiac glycosides after suspected overdose. *Acta Pharmacol. Toxicol.* **35**, 386—394 (1974)
9. Mulé, J. S., Sunshine, I., Brande, M., Willette, R. E. (Eds.): *Immunoassays for drugs subject to abuse*, CRC, p. III. Ohio: Press Cleveland 1974
10. Philipps, A. J.: Case experience with digoxin analysis of post mortem blood. *J. Forens. Sci. Soc.* **14**, 1—142 (1974)
11. Rietbrock, N., Wojahn, H., Weinmann, J., Hasford, J., Kuhlmann, J.: Tödlich verlaufende β -Methyldigoxin-Intoxikation in suizidaler Absicht. *Dtsch. Med. Wochenschr.* **103**, 1841—1844 (1978)
12. Smith, T. W., Butler, V. P., Haber, E.: Determination of therapeutic and toxic serum digoxin concentrations by radioimmunoassay. *New Engl. J. Med.* **281**, 1212—1216 (1969)
13. Steentoft, A.: Fatal digitalis poisoning. *Acta Pharmacol. Toxicol.* **32**, 253—257 (1973)

Eingegangen am 20. Februar 1979