

## Die polytope Markierung von (-)-Cocain mit Tritium

Eingegangen am 24. Februar 1969

Für Untersuchungen des Stoffwechsels von Cocain im tierischen Organismus hatten wir früher dieses Alkaloid und einige seiner Derivate an verschiedenen Molekülorten mit  $^{14}\text{C}$  markiert <sup>(1)</sup>. Zur Klärung einer speziellen Fragestellung benötigten wir ein polytop markiertes Präparat. Wir wählten hierzu den Weg über eine von Wenzel *et al.* <sup>(2)</sup> beschriebene modifizierte Wilzbach-Tritiierung <sup>(3)</sup>, bei der die Substanz nach Adsorption an Kohle bei  $-196^\circ\text{C}$  dem Tritium-Gas ausgesetzt wird. Diese Autoren erreichten durch Adsorption von Sulfanilamid an Kohle eine 40-fach höhere spezifische Aktivität mit grösserer Reinheit des tritiierten Präparates. Die Zahl der Spaltprodukte war gering.

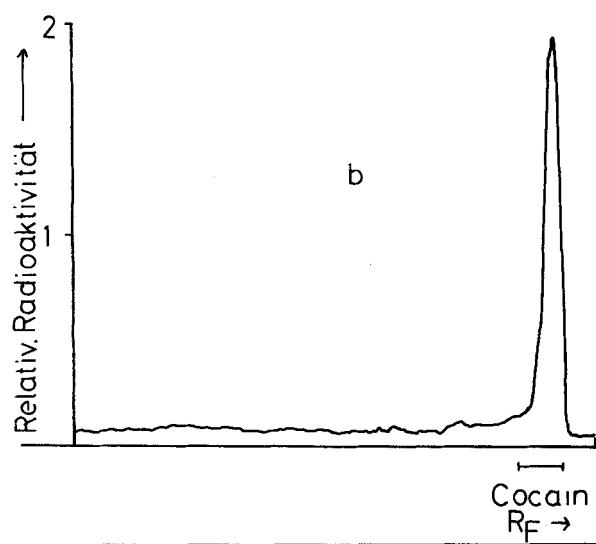
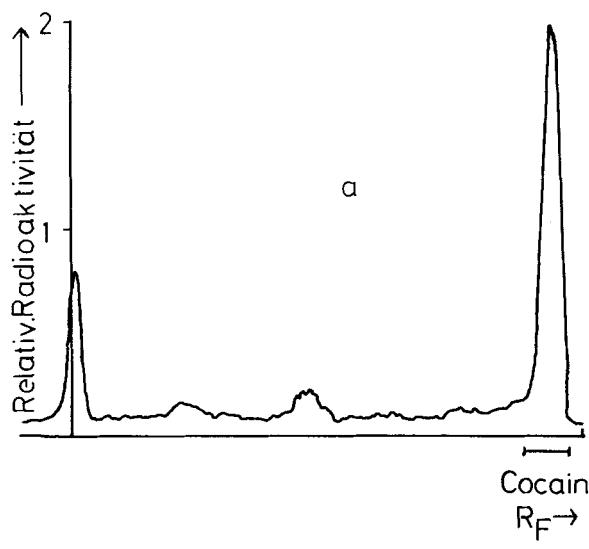
100 mg (-)-Cocain·HCl (Merck AG, Darmstadt) wurden in 15 ccm heissem Wasser ( $90^\circ\text{C}$ ) gelöst. Nach Zugabe von 1 g gekörnter Aktivkohle (Korndurchmesser 0,25 mm, Merck AG, Darmstadt) liessen wir unter Rühren innerhalb von 4 Stunden auf  $20^\circ\text{C}$  abkühlen. Nach Abnutschen der Kohle wurden im Filtrat nach Einengung zur Trockne 30 mg (-)-Cocain·HCl zurück erhalten, sodass also 70 mg von der Kohle adsorbiert worden waren.

Auf die getrocknete Aktivkohle mit dem adsorbierten (-)-Cocain·HCl liessen wir während 16 Tagen ca. 4 Ci (ca. 300 Torr)  $^3\text{H}_2$  bei  $-196^\circ\text{C}$  einwirken.

Nun eluierten wir im Soxleth das (-)-Cocain·HCl mittels Methanol von der Kohle. Das Dünnschichtchromatogramm (Kieselgel G « Merck ») im Laufmittel : Methylacetat, *i*-Propanol, Ammoniak (25 %ige wässr. Lösung) (45 : 35 : 15 Vol.) zeigte neben markiertem Cocain drei radioaktive Stoffe, die mit Dragendorff-Reagens nicht anfärbbar waren (Abb. 1a).

Diese radioaktiven Nebenprodukte wurden mittels präparativer Dünnschichtchromatographie unter Verwendung des oben angegebenen Laufmittels abgetrennt (ca. 25 mg Substanz/Platte  $20 \times 20$  cm, Schichtdicke 0,25 mm Kieselgel G « Merck »). Zum gefahrlosen Absaugen der radioaktiven Zonen wurde das in Abb. 2 dargestellte Gerät verwendet. Die Elution des polytop markierten Cocain-( $^3\text{H}$ ) vom Kieselgel G erfolgte mit Methanol.

Anschliessend wurde die Base ins Hydrochlorid überführt (Ausbeute : 70 mg (-)-Cocain-( $^3\text{H}$ )·HCl. Die spez. Radioaktivität betrug  $3,6 \mu\text{Ci}/\text{mg}$  ( $1,2 \text{ mC/mMol}$ ). Die radioaktive Substanz zeigt im oben angegebenen Laufmittel ein radioaktives Maximum mit dem  $R_F$ -Wert von Cocain (Abb. 1b). Hinsichtlich der Höhe der spez. Aktivität wurden die in die Methode gesetzten Erwartungen bei der Tritiierung von (-)-Cocain·HCl nicht erfüllt.



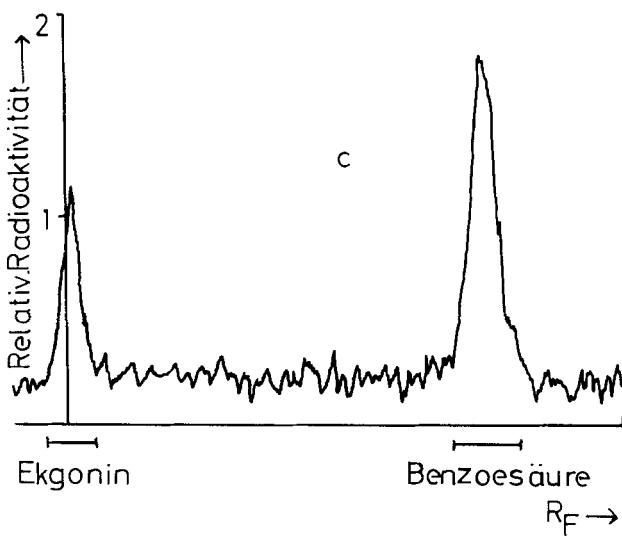


ABB. 1a, b, c. Verteilung der Radioaktivität und der mit Dragendorffs Reagens färbbaren Anteile auf Dünnschichtchromatogrammen von tritierten Cocain-Präparaten.

a) Rohprodukt nach der Tritiierung von (–)-Cocain;

b) Gereinigtes (–)-Cocain-( $^3$ H, p);

c) Hydrolysat von (–)-Cocain-( $^3$ H, p) mit NaOH.

Laufmittel für 1a und 1b : Methylacetat, i-Propanol, Ammoniak (25 %) (45: 35: 15 Vol.).

Laufmittel für 1c : Benzol, Dioxan, Eisessig (90: 25: 4 Vol.).

Um die Verteilung des Tritiums auf Ekgonin, Benzoesäure und die O-CH<sub>3</sub>-Gruppe (des Ekgoninmethylesters) feststellen zu können, hydrolysierten wir eine kleine Menge des gereinigten Präparates mit Natronlauge (1n-NaOH; 1,5 Stdn.; 110° C im Einschlusserohr). Einem aliquoten Teil des Hydrolysates wurde etwas Methanol als Träger für das aus der O-CH<sub>3</sub>-Gruppe gebildete Methanol zugesetzt, anschliessend das gesamte Methanol abdestilliert und die  $^3$ H-Aktivität eines aliquoten Teiles im Flüssig-Szintillations-Spektrometer (Tricarb 3375 der Fa. Packard Instrument Co., Downers Grove/Illinois/ USA) bestimmt. Für die O-CH<sub>3</sub>-Gruppe errechnete sich ein Anteil von 7 % an der Gesamtaktivität des (–)-Cocains.

Zur Bestimmung der Aktivitätsverteilung auf Ekgonin und Benzoesäure wurde eine Probe des Hydrolysates durch Dünnschichtchromatographie aufgetrennt (Kieselgel G « Merck ») und nach Ausmessen des Chromatogramms planimetrisch ausgewertet. Für Ekgonin ergab sich ein Aktivitätsanteil von 28 %, für Benzoesäure ein solcher von 65 % (Abb. 1c). Die Benzoesäure war also relativ zum Verhältnis der H-Atome stärker markiert als die übrigen Spaltstücke des Cocain-Moleküls. Das Aktivitätsverhältnis von Benzoesäure : Ekgonin : O-CH<sub>3</sub> betrug 65: 28: 7, das Verhältnis der H-Atome jedoch

5 : 12 : 3 (Carboxyl- und Hydroxyl-Wasserstoff wurde nicht mitgerechnet). Ekgonin und die O-CH<sub>3</sub>-Gruppe hingegen zeigten eine Isotopenverteilung im Verhältnis ihrer H-Atome.

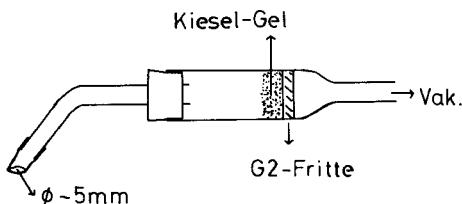


ABB. 2. Gerät zum gefahrlosen Absaugen radioaktiver Zonen eines Dünnschichtchromatogramms.

Ähnliche Effekte eines stärkeren Austausches von aromatisch gebundenem Wasserstoff beobachteten wir auch früher bei der *Wilzbach*-Tritiierung von Scopolamin <sup>(4)</sup>.

In einem Tritiierungsversuch der Fa. RCC-Amersham/England wurden 100 mg (-)-Cocain-HCl 3 Wochen mit 7 Ci <sup>3</sup>H<sub>2</sub> bei Raumtemperatur und 65 mm/Hg exponiert.

Nach Entfernung des labil gebundenen <sup>3</sup>H<sub>2</sub> durch mehrmaliges Auflösen in Methanol wurde von uns eine Aktivität des Präparates von 820  $\mu$ Ci/mg gemessen. Mittels Dünnschichtchromatographie (Kieselgel G « Merck », 0,25 mm) wurden in 4 verschiedenen Laufmitteln 4 radioaktive Stoffe nachgewiesen. Keiner war jedoch mit Cocain und dessen Hydrolysenprodukten (Ekgoninmethylester, Ekgonin, Benzoylekgonin, Benzoësäure) identisch. Die radioaktiven Verunreinigungen liessen sich mit Dragendorffs Reagens *nicht* anfärben.

G. WERNER, K.-H. SCHMIDT

Max-Planck-Institut für Hirnforschung, Arbeitsgruppe Neurochemie, 6, Frankfurt/Main, Deutscheschordenstr. 46, West-Deutschland.

#### LITERATURVERZEICHNIS

1. SCHMIDT, H.-L. und WERNER, G. — *Liebigs Ann. Chem.*, **653** : 184 (1962).
2. WENZEL, M. und SCHULZE, P. E. — Tritium-Markierung; Darstellung, Messung und Anwendung nach Wilzbach <sup>3</sup>H-markierter Verbindungen. Walter de Gruyter and Co., Berlin (1962).
3. WILZBACH, K. E. — *J. Amer. Chem. Soc.*, **79** : 1013 (1957).
4. WERNER, G und SCHMIDT, K.-H — *J. Labelled Comp.*, Vol III, 1, 47 (1966)