

Ein Zuckerabbau zur Ermittlung der ^{14}C -Verteilung

VON FRIEDRICH WEYGAND*, KURT FEHR und JOHANN FRIEDRICH KLEBE

Aus dem Organisch-chemischen Institut der Universität Tübingen und dem
Organisch-chemischen Institut der Technischen Universität Berlin, Berlin-Charlottenburg
(Z. Naturforschg. **14b**, 217—220 [1959]; eingegangen am 31. Dezember 1958)

Es wird ein chemischer Abbau von ^{14}C -markierter Glucose beschrieben, der die Einzelbestimmung der Aktivitäten aller C-Atome gestattet. Der Abbau kann auf andere Hexosen und auf Pentosen übertragen werden.

Die Ermittlung der Isotopenverteilung eines mit ^{14}C markierten Zuckers kann durch Kombination mikrobiologischer und chemischer oder nach rein chemischen Methoden erfolgen¹. Es erschien uns nützlich, ein einfaches Abbauverfahren auszuarbeiten, mit dessen Hilfe die mit mikrobiologischen Methoden erhaltenen Resultate leicht kontrolliert werden können und das außerdem gestattet, die Aktivitätsverteilung solcher Zucker zu bestimmen, für die keine mikrobiologischen Verfahren bekannt sind.

Der nachstehend beschriebene Abbau ist auf alle Aldohexosen und Aldopentosen sinngemäß anwendbar. Er wurde an D-Glucose ausgearbeitet (vgl. das Formelschema). Die Aktivität aller Substanzproben wird durch Verbrennung zu Kohlendioxyd mittels Kaliumperchlorat + Kupferoxyd und Messung in Gaszählrohren im Proportionalbereich mit einer Genauigkeit von besser als $\pm 1\%$ nach H. SIMON² und Mitarb. bestimmt.

Bestimmung der Radioaktivität von

C^1 : Ein Anteil der Glucose wird in das Oxim verwandelt und nach WEYGAND und LÖWENFELD³ mit 2,4-Dinitro-fluorbenzol abgebaut. Die gebildete Blausäure wird als Silbercyanid gefällt. Das Silbercyanid wird auf die angegebene Weise² unter Zusatz von V_2O_5 in Kohlendioxyd verwandelt.

C^1 bis C^6 : Ein zweiter Glucoseanteil wird mit *p*-Toluidin der Amadori-Umlagerung unterworfen⁴, und die gebildete 1-Desoxy-1-*p*-toluidino-D-fructose (*p*-Tolyl-D-isoglucosamin) wird ohne Isolierung mit *o*-Phenylendiamin zum D-*arabo*-Tetrahydroxybutylchinoxalin⁵ umgesetzt.

Anschließend wird das Chinoxalin-Derivat mit Phenylhydrazin nach OHLE⁶ in das D-*erythro*-3-Trihydroxypropyl-1-phenyl-flavazol verwandelt. Sowohl das Chinoxalin- wie das Flavazol-Derivat liefern bei der Verbrennung die Gesamt-Radioaktivität der Glucose. Bei der Verwandlung in das Flavazol-Derivat findet eine weitere Reinigung statt, wodurch eine Kontrolle der Aktivität des Chinoxalin-Derivates gegeben ist. Durch Einbeziehung von C^3 der Zuckerkette in das Flavazolsystem ist es nunmehr leicht möglich, die Aktivitäten von C^4 , C^5 und C^6 getrennt zu bestimmen.

C^5 und C^6 : Mittels Natriumperjodat in schwach saurer Lösung wird das Trihydroxypropyl-phenyl-flavazol in 1-Phenyl-flavazol-aldehyd-3⁶, Ameisensäure (C^5) und Formaldehyd (C^6) gespalten. Der gelbe Flavazolaldehyd wird abgetrennt, die Lösung neutralisiert und der Formaldehyd mit Wasser abdestilliert und als Dimedonverbindung isoliert. Die Ameisensäure im Rückstand wird mit Quecksilberoxyd zu Kohlendioxyd (C^5) oxydiert.

C^4 : Der 1-Phenyl-flavazolaldehyd-3 wird mit Chromtrioxyd in Eisessig zur Carbonsäure oxydiert⁶, die durch Erhitzen auf 260° decarboxyliert wird ($\text{CO}_2 = \text{C}^4$).

Die Aktivität von C^4 kann auch aus der Differenz der Aktivitäten der 1-Phenyl-flavazol-carbonsäure-3 (C^1 bis C^4) und 1-Phenyl-flavazol (C^1 bis C^3) errechnet werden. Im allgemeinen stimmen die nach beiden Methoden bestimmten Werte überein.

C^1 bis C^3 : Durch Sublimation im Hochvakuum wird das anfallende 1-Phenyl-flavazol⁶ rein erhalten.

C^3 : Das Tetrahydroxybutyl-chinoxalin wird mit Wasserstoffsuperoxyd in alkalischem Medium zur

* Neue Anschrift: Organisch-chemisches Institut der Technischen Hochschule München, München 2.

¹ Vgl. die Zusammenstellung in S. ARONOFF, *Techniques in Radiobiochemistry*. The Iowa State College Press, Iowa, U.S.A. 1956.

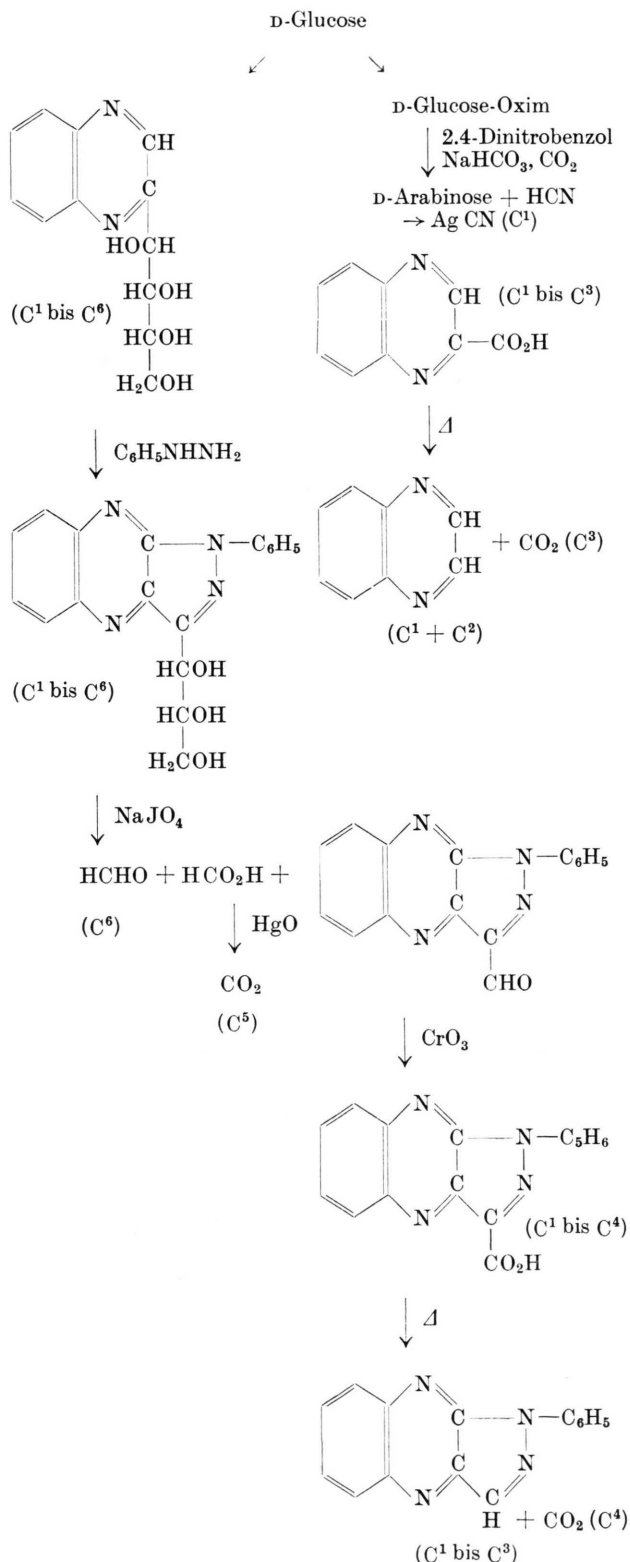
² H. SIMON u. Mitarb., *Angew. Chem.*, im Druck.

³ F. WEYGAND u. R. LÖWENFELD, *Chem. Ber.* **83**, 559 [1950].

⁴ F. WEYGAND, *Ber. dtsh. chem. Ges.* **73**, 1284 [1940].

⁵ F. WEYGAND u. A. BERGMANN, *Chem. Ber.* **80**, 255 [1947]; H. OHLE u. R. LIEBIG, *Ber. dtsh. chem. Ges.* **75**, 1536 [1942].

⁶ O. OHLE u. M. HIELSCHER, *Ber. dtsh. chem. Ges.* **74**, 13 [1941]; H. OHLE u. G. A. MELKONIAN, *Ber. dtsh. chem. Ges.* **74**, 279, 398 [1941].



Chinoxalin-carbonsäure-2 oxydiert, deren Decarboxylierung das C³ als Kohlendioxyd liefert. Da diese Carbonsäure vielfach nicht ganz rein zu erhalten ist, empfiehlt es sich, zur Bestimmung der Aktivität von C³ die Differenz der Aktivitäten von 1-Phenyl-flavazol (C¹ bis C³) und Chinoxalin (C¹ + C²) zu nehmen. Wegen der hohen angewandten Meßgenauigkeit ist dieses Verfahren sicher.

C¹ + C²: Das bei der Decarboxylierung der Chinoxalincarbonsäure zurückbleibende Chinoxalin wird durch Destillation im waagerechten Rohr mit Temperaturgefälle rein erhalten und zur Analyse in das Pikrat überführt.

C²: Die Aktivität von C² ergibt sich aus der Differenz der Aktivitäten von Chinoxalin (C¹ + C²) und Silbercyanid (C¹).

Kontrollversuche

Um zu prüfen, ob bei der Bestimmung von C¹ auch Radioaktivität von C² als Silbercyanid infolge Umoximierung zwischen Glucoseoxim und der gebildeten Arabinose und Abbau des Arabinose-oxims mit 2,4-Dinitrofluorbenzol erfaßt wird, wurde D-Glucose-[2-¹⁴C]-oxim dem Abbau unterworfen. Nur 1% der Aktivität von C² wurde im Silbercyanid erhalten. — Ferner wurde an der gleichen Glucose geprüft, ob Übereinstimmung zwischen D-Glucose-[2-¹⁴C] und dem über das Tetrahydroxybutyl-chinoxalin erhaltenen Chinoxalin besteht. Die Werte stimmten auf 1% genau überein. Schließlich wurden bei der Decarboxylierung der Chinoxalincarbonsäure aus D-Glucose-[2-¹⁴C] 0,7% der Aktivität von C² als CO₂ (C³) beobachtet.

Abbau von D-Glucose aus *E. coli* und aus *Chlorella*

PALMSTIERNA und EHRENSVÄRD⁷ haben aus Natriumhydrogencarbonat-¹⁴C mit *E. coli* über Glykogen eine D-Glucose isoliert, die nach einer mikrobiologischen Bestimmungsmethode in C³ + C⁴ 97% der Aktivität enthielt. Die nach unserem Verfahren bestimmten Aktivitäten an einer von Herrn Prof. EHRENSVÄRD erhaltenen Probe gibt Tab. 1 wieder. Zunächst zeigte sich, daß die Aktivität der mit nicht-radioaktiver Glucose verdünnten Probe etwa viermal so hoch war, wie sich sodann aus den Chinoxalin- und

⁷ H. PALMSTIERNA u. G. EHRENSVÄRD, Acta chem. scand. 10, 691 [1956].

Flavazol-Derivaten ergab. Die ursprüngliche Glucose enthielt also noch erhebliche Mengen an radioaktiven Verunreinigungen.

	%	
C ¹	4,7	einzelns bestimmt
C ²	3,4	Differenz zwischen (C ¹ +C ²) und C ¹
C ³	38,6	Differenz zwischen (C ¹ bis C ³) und (C ¹ +C ²)
C ⁴	49,3	Differenz zwischen (C ¹ bis C ⁴) und (C ¹ bis C ³)
C ⁵	2,3	einzelns bestimmt
C ⁶	2,3	einzelns bestimmt
Summe	100,6	

Tab. 1. Abbau von D-Glucose aus *E. coli*

Wir haben ferner eine D-Glucose abgebaut, die wir Herrn Doz. Dr. O. KANDLER, München, verdanken und die aus einem Stärkehydrolysat von *Chlorella* stammt (10 Min. Photosynthese mit $^{14}\text{CO}_2$, Zugabe von Cyanid, 30 Sek. Verdunkelung und 30 Sek. Licht, eingießen in heißen Alkohol).

	%	
C ¹	12,7	einzelns bestimmt
C ²	10,6	Differenz zwischen (C ¹ +C ²) und C ¹
C ³	31,9	Differenz zwischen (C ¹ bis C ³) und (C ¹ +C ²)
C ⁴	25,2	Einzelbestimmung (25,25%) und Differenz zwischen (C ¹ bis C ⁴) und (C ¹ bis C ³) = 25,2%
C ⁵	6,8	einzelns bestimmt
C ⁶	11,5	einzelns bestimmt
Summe	98,7	

Tab. 2. Abbau von D-Glucose aus *Chlorella*

Beschreibung des Abbaus

1. *D-Glucoseoxim und Abbau mit 2,4-Dinitrofluorbenzol*: 300 mg D-Glucose werden in 4 cm³ 2,7-proz. alkoholischer Hydroxylaminlösung (aus Hydroxylaminhydrochlorid + Natriumäthylat; die Lsg. darf gegen Phenolphthalein nicht alkalisch reagieren) heiß gelöst, und nach 3 Tagen wird der Alkohol im Vakuum abdestilliert, und überschüssiges Hydroxylamin wird durch 2-stdg. Evakuieren auf 10^{-2} Torr bei 90° entfernt. Das Oxim braucht nicht in krist. Form vorzuliegen. Es wird in 20 cm³ Wasser gelöst, mit 500 mg Natriumhydrogencarbonat versetzt und durch Zugabe von 600 mg 2,4-Dinitrofluorbenzol in 10 cm³ Isopropanol abgebaut⁸. Die Entwicklung der durch einen CO₂-Strom ausgetriebenen Blausäure, die in Silbernitrat aufgefangen wird, beginnt nach 2 Min., innerhalb 2 Stdn. werden ca. 120 mg Silbercyanid erhalten.

2. *D-arabo-Tetrahydroxybutyl-chinoxalin*: 1,5 g D-

Glucose (8,3 mMole) werden mit 1,2 g im Vakuum dest. *p*-Toluidin (11,2 mMole), 0,37 cm³ Wasser und 0,075 cm³ 2-n. Essigsäure versetzt und auf dem siedenden Wasserbad erhitzt. Nach ca. 5 Min. wird das Gemisch homogen. Nach weiteren 20 Min. im siedenden Wasserbad werden dem braunen Sirup 0,75 cm³ Hydrizinhydrat (14 mMole), 0,92 g *o*-Phenylendiamin (8,5 mMole) und 6 cm³ 2-n. Essigsäure zugefügt. Sodann wird 30 Min. weiter erhitzt. Nach dem Abkühlen und 12-stdg. Stehen im Eisschrank wird das Reaktionsprodukt abgesaugt und mit Methanol/Äther (1 : 1 vol.) gewaschen. Ausbeute 1,2 g (58% d. Th.), Schmp. 182 bis 184°.

3. *D-erythro-3-Trihydroxypropyl-1-phenylflavazol*: 600 mg (2,4 mMole) *D-arabo*-Tetrahydroxybutyl-chinoxalin (Rohprodukt) werden in 12 cm³ Wasser gelöst, und nach Zugabe von 790 mg Phenylhydrazin (7,3 mMole), 8,0 cm³ 1-n. HCl und 2,2 cm³ 50-proz. Essigsäure wird unter Einleiten eines schwachen CO₂-Stromes 40 Stdn. im Ölbad auf 125° erhitzt. Der gelbe Niederschlag wird abgesaugt und mit Methanol/Äther (1 : 1 vol.) gewaschen. Ausbeute 650 mg (80% d. Th.) an Rohprodukt, nach Umkrist. aus 80 cm³ *n*-Propanol 550 mg (68% d. Th.), Schmp. 212–213°.

4. *1-Phenyl-flavazolaldehyd-3*: 500 mg umkrist. Trihydroxypropylflavazol werden in 60 cm³ gereinigtem Dioxan gelöst. Nach Zugabe von 470 mg Natriumhydrogencarbonat in 60 cm³ Wasser und 24 cm³ 0,3-m. NaJO₄ wird 72 Stdn. stehen gelassen, wobei der Aldehyd ausfällt. Nach Umkrist. aus abs. Alkohol 332 mg (81% d. Th.), Schmp. 144–146°.

5. *Isolierung des bei der Perjodatspaltung entstehenden Formaldehyds*: Das Filtrat des 1-Phenyl-3-flavazolaldehyds wird mit Salzsäure angesäuert und mit arseniger Säure titriert, um überschüssiges Perjodat zu reduzieren. Sodann wird mit verd. Natronlauge auf pH 7 gebracht und der Formaldehyd bei 80 Torr abdestilliert. Der Salzrückstand wird noch dreimal mit je 10 cm³ Wasser versetzt, worauf die Destillationen wiederholt werden. Das in einer eisgekühlten Vorlage aufgefangene Destillat wird mit 30 cm³ einer 4-proz. Dimedonlösung und 1 g Natriumacetat versetzt und auf dem Wasserbad erhitzt. Nach Umkristallisieren aus Alkohol liegen 365 mg Formaldimedon vom Schmp. 188–189° vor.

6. *Oxydation der bei der Perjodatspaltung entstehenden Ameisensäure (C⁵) zu Kohlendioxyd⁸*: Zum Rückstand der Perjodatspaltung werden 10 cm³ Wasser gegeben. Nach Filtration werden 20 g rotes Quecksilberoxyd zugegeben und nach Verdrängung der Luft durch reinsten Stickstoff wird im Stickstoffstrom 15 Min. zum Sieden erhitzt. Das gebildete Kohlendioxyd wird in verd. Natronlauge (1 cm³ CO₂-freie Öllauge mit 20 cm³ frisch ausgekochtem dest. Wasser verdünnt) aufgenommen. Die Lauge wird anschließend in eine siedende Lösung von 1 g Ammoniumchlorid p. a. in 100 cm³ Wasser, dem 2 cm³ 1-m. BaCl₂ zugesetzt worden waren, eingegossen, worauf noch 1 Min. weiter erhitzt wird. Ausbeute 120 mg BaCO₃ (40% d. Th.).

7. *1-Phenyl-flavazol-carbonsäure-3 aus 1-Phenyl-flavazol-aldehyd-3*: 300 mg 1-Phenyl-flavazol-aldehyd-3

⁸ O. L. OSBORN, H. G. WOOD u. C. H. WERKMAN, Analytic Chem. 5, 247 [1933].

werden in 3 cm³ Eisessig mit 250 mg Chromtrioxyd in 6 cm³ heißem Eisessig auf dem siedenden Wasserbad portionsweise versetzt. Es wird noch 15 Min. bei 100° gehalten und 12 Std. im Eisschrank stehen gelassen. Die Carbonsäure wird aus 4 cm³ Eisessig umkristallisiert. Ausbeute 180 mg (57% d. Th.), Schmp. 239 bis 242°.

8. *1-Phenyl-flavazol aus 1-Phenyl-flavazol-carbonsäure-3*: Die Decarboxylierung wird in der von WEYGAND und SCHÄFER⁹ angegebenen Decarboxylierungs-Apparatur vorgenommen. 150 mg Carbonsäure werden in einem Strom von Reinststickstoff in einem Metallbad 1 Stde. auf 260° erhitzt. Das gebildete Kohlendioxyd wird wie unter 6. in Bariumcarbonat überführt. Ausbeute 75 mg (83% d. Th.).

Der zur Brenzreaktion benutzte Kolben wird nach Abschluß der Decarboxylierung unter 12 Torr noch einige Zeit weiter auf 260° erhitzt. Dabei kondensiert das gelbe 1-Phenyl-flavazol am Kühler. Nach Umkrist. aus 50-proz. Essigsäure liegen 110 mg (79% d. Th.) vor, Schmp. 150–151°.

9. *Chinoxalin-carbonsäure-2*: 1 g Tetrahydroxybutyl-chinoxalin werden in 60 cm³ 6-proz. Wasserstoffsuperoxyd im Wasserbad auf 60° erwärmt und mit 2,4 g Natriumhydroxyd in Plättchenform nach und nach versetzt, so daß die Temperatur nicht über 70° ansteigt. Gegen Ende der Reaktion wird durch gelegentliches

Eintauchen des Kolbens in ein heißes Wasserbad dafür gesorgt, daß die Temperatur nicht unter 65° abfällt. Nach 45 Min. ist alles Tetrahydroxybutyl-chinoxalin in Lösung gegangen. Die gelb gefärbte heiße Lösung wird mit konz. Salzsäure auf pH 2 gebracht. Nach Stehen über Nacht werden 550 mg (79% d. Th.) Chinoxalin-carbonsäure-2 abgesaugt, aus Äthanol umkrist., Schmp. 204 bis 205°.

10. *Chinoxalin aus Chinoxalin-carbonsäure-2*: Die Decarboxylierung wird in der beschriebenen Apparatur⁹ vorgenommen. 180 mg Chinoxalin-carbonsäure-2 werden im Reinststickstoff-Strom 30 Min. im Metallbad auf 230–240° erhitzt. Am Kühler kondensiert Chinoxalin. Es werden 110 mg Bariumcarbonat (54% d. Th.) erhalten. Das Chinoxalin wird mit Äther in ein langes Rohr gebracht und der Äther verdampft. Das Rohr (Ø 1 cm) wird in einem Ofen mit Temperaturgefälle (100° am mit der Substanz beschickten Ende und 20° am anderen Ende) gebracht. Im Vakuum einer Ölpumpe wird das Chinoxalin destilliert. Da es sich wegen seines tiefen Schmp. schlecht handhaben läßt, wird es aus dem herausgeschnittenen Rohrteil mit Äther herausgelöst und in das Pikrat verwandelt. Ausbeute an Chinoxalin-pikrat nach Umkrist. aus Äthanol 56 mg (15% d. Th.), Schmp. 161–162°.

⁹ F. WEYGAND u. G. SCHÄFER, Chem. Ber. **85**, 307 [1952].

DNS - Aufnahme ruhender Bakterienzellen

VON ADOLF WACKER UND DÖRTHE PFAHL

Aus dem Organisch-chemischen Institut der Technischen Universität Berlin, Berlin-Charlottenburg
(Z. Naturforschg. **14 b**, 220–222 [1959]; eingegangen am 12. Dezember 1958)

An Desoxyribonucleinsäure verarmte Zellen von *Lb. leichmannii* 313 und *Lb. acidophilus* R₂₆ nehmen ein Vielfaches ihres eigenen Desoxyribonucleinsäure-Gehaltes an fremder Desoxyribonucleinsäure auf.

Durch Einwirkung von Desoxyribonucleinsäure (DNS) kann man die Eigenschaften eines Bakteriums ändern. Für derartige Transformations-Versuche eignen sich Pneumokokken besonders gut. Wie Untersuchungen mit ³²P-markierter DNS zeigten, kann dies mit der vergleichsweise großen DNS-Aufnahme der Pneumokokken zusammenhängen¹. — Im Laufe von Untersuchungen über die Biosynthese der DNS fanden wir, daß der DNS-Gehalt einer Bakterienzelle von *Lb. leichmannii* 313 davon abhängt, ob die Zellen mit oder ohne Vitamin B₁₂ gewachsen sind². So enthalten die Zellen in Anwesenheit von Vitamin B₁₂ mehr als 2% DNS, mit

Desoxyribosiden als Wuchsstoff dagegen weniger als 1 Prozent. — Es war nun interessant, die DNS-Aufnahme ruhender Zellen von *Lb. leichmannii* 313, die ohne und mit Vitamin B₁₂ gewachsen waren, zu untersuchen. Vergleichsweise dazu haben wir auch die DNS-Aufnahme anderer Bakterien sowie die wachsender Zellen geprüft.

Methodik

Die Kultivierung der Bakterien und die Zusammensetzung der Nährmedien ist bereits beschrieben; *Lb. leichmannii* 313³, *Lb. acidophilus* R₂₆³, *E. coli* 9637⁴,

¹ L. S. LERMAN u. L. J. TOLMACH, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] **26**, 68 [1957].

² A. WACKER, D. PFAHL u. I. SCHRÖDER, Z. Naturforschg. **12 b**, 510 [1957]; A. WACKER u. L. TRÄGER, Z. Naturforschg., im Druck.

³ A. WACKER, A. TREBST u. F. WEYGAND, Z. Naturforschg. **11 b**, 7 [1956].

⁴ A. WACKER, M. EBERT u. H. KOLM, Z. Naturforschg. **13 b**, 141 [1958].