

FRIEDHELM KORTE, HORST WEITKAMP und HANS-GERD SCHICKE

Heterocyclen im Stoffwechsel, III<sup>1)</sup>

UMWANDLUNG VON PURINEN-[5-<sup>14</sup>C] UND PTERIDINEN-[8a-<sup>14</sup>C]  
DURCH MIKROORGANISMEN

Aus dem Chemischen Institut der Universität Bonn

(Eingegangen am 11. Februar 1957)

*Herrn Professor Dr. B. Helferich zum 70. Geburtstag gewidmet*

Isoxanthopterin-carbonsäure-[8a-<sup>14</sup>C] und Xanthopterin-[8a-<sup>14</sup>C] werden durch *Streptococcus faecalis* R, *Pichia membranaefaciens* und *Candida albicans* aufgenommen. Nach oxydativem Abbau läßt sich markierte 2-Amino-4-hydroxy-pteridin-carbonsäure-(6), die unter diesen Bedingungen aus Folsäure entsteht, chromatographisch nachweisen. Aus Guanin-[5-<sup>14</sup>C] entsteht Adenin, aus Xanthin-[5-<sup>14</sup>C] Guanin und Adenin.

Zur Abgrenzung der Synthesefähigkeit von Mikroorganismen untersuchten wir die gegenseitige Umwandlung von Pteridinen, Purinen und Flavinen. Erfahrungen über derartige Reaktionen liegen bisher nur wenig vor<sup>2,3)</sup>. Wir benutzten für unsere Versuche an der Ringverknüpfung <sup>14</sup>C-markierte Pteridine und Purine<sup>1)</sup>, da das C-Atom in 2-Stellung leicht ausgetauscht wird<sup>2,4)</sup>.

Zunächst ersetzten wir im Teply-Elvehjem-Nährmedium<sup>5)</sup> Folsäure durch Isoxanthopterin-carbonsäure-[8a-<sup>14</sup>C]. Läßt man auf diesem Substrat *Str. faecalis* R wachsen, so kann in den abzentrifugierten Bakterien Folsäure nachgewiesen werden. Eine Isolierung der Folsäure in Substanz ist bei Einsatz nicht markierter Isoxanthopterin-carbonsäure möglich. Bei der radioaktiven Verbindung haben wir aus Kostengründen darauf verzichtet und die Umwandlungsprodukte durch Papierchromatographie in verschiedenen Lösungsmitteln charakterisiert.

Da man als biologisches Endprodukt der Folsäure das dem Citrovorumfaktor<sup>6)</sup> nahestehende Coenzym F<sup>7)</sup> annehmen muß, sollten alle Folgeprodukte der Folsäure (Formyl-tetrahydro-, Polyglutamylderivate) zu einem einheitlichen Produkt abgebaut werden. Wir benutzten dazu ein Verfahren, welches gestattet, Folsäure und deren Polyglutamylderivate quantitativ zu 2-Amino-4-hydroxy-pteridin-carbonsäure-(6) zu oxydieren<sup>8)</sup>. Bei reiner 10(N)-Formyl-tetrahydro-folsäure gelingt diese Reaktion im Mikromaßstab nur in etwa 50-proz. Ausbeute<sup>9)</sup>. In einer Mischung von

<sup>1)</sup> I. Mittel.: F. KORTE und H. BARKEMEYER, Chem. Ber. **89**, 2400 [1956]; II. Mittel.: F. KORTE und H. BARKEMEYER, ebenda **90**, 392 [1957].

<sup>2)</sup> T. W. GOODWIN und S. PENDLINGTON, Biochem. J. **57**, 631 [1954].

<sup>3)</sup> I. ZIEGLER-GÜNDER, H. SIMON und A. WACKER, Z. Naturforsch. **11b**, 82 [1956].

<sup>4)</sup> E. E. HALEY und J. P. LAMBOOY, J. Amer. chem. Soc. **76**, 2926 [1954].

<sup>5)</sup> L. J. TEPLY und A. C. ELVEHJEM, J. biol. Chemistry **157**, 303 [1945].

<sup>6)</sup> J. C. KERESZTESY und M. SILVERMAN, J. Amer. chem. Soc. **73**, 5510 [1951].

<sup>7)</sup> G. R. GREENBERG, J. Amer. chem. Soc. **76**, 1458 [1954].

<sup>8)</sup> V. ALLFREY, L. J. TEPLY, C. GEFFEN und C. G. KING, J. biol. Chemistry **178**, 465 [1949].

<sup>9)</sup> D. B. COSULICH, B. ROTH, J. M. SMITH jr., M. E. HULTQUIST und R. P. PARKER, J. Amer. chem. Soc. **74**, 3252 [1952].

Folsäure, Polyglutamylfolsäure und Formyl-tetrahydro-folsäure \*) erfaßt man jedoch lediglich die beiden ersten Komponenten, auch wenn man das Oxydationspotential durch einen automatischen Titrator konstant hält. Die entstehende 2-Amino-4-hydroxy-pteridin-carbonsäure-(6) wird papierchromatographisch identifiziert, eine Gehaltsbestimmung gelingt durch Ausmessen der Fluoreszenz. Die Nachweisbarkeitsgrenze beträgt im Eppendorf-Photometer 0,05  $\gamma$ /ccm.

Durch die Identifizierung der 2-Amino-4-hydroxy-pteridin-carbonsäure-(6) ist gezeigt, daß Isoxanthopterin-carbonsäure-[8a-<sup>14</sup>C] in Folsäure übergehen kann. Die gleiche Verbindung entsteht aus Xanthopterin-[8a-<sup>14</sup>C]. Durch diese Befunde werden frühere Ergebnisse der Wuchsstoffanalyse und eine Vorstellung über die Biosynthese der Folsäure gestützt <sup>10)</sup>.

Neben der 2-Amino-4-hydroxy-pteridin-carbonsäure-(6) ist eine markierte Verbindung (A) nachweisbar, die sich papierchromatographisch in allen Lösungsmitteln wie Uracil verhält. Das Verhältnis der Radioaktivität beider Verbindungen beträgt etwa 2:1. Gibt man zu dem Nährmedium mit Isoxanthopterin-carbonsäure-[8a-<sup>14</sup>C] Uracil, so findet trotzdem eine Umwandlung des Pteridins in diese Verbindung statt. Diese Reaktion ist interessant, weil ein chemischer Abbau von Pteridinen zu 4,5-unsubstituierten Pyrimidinen bisher unbekannt ist. Normalerweise erfolgt der Angriff am Pyrimidinring, unter Bildung von Pyrazinderivaten <sup>11)</sup>. Die gleichen Ergebnisse werden erhalten, wenn man an Stelle von *Str. faecalis* R die Hefen *Pichia membranaefaciens* und *Candida albicans* als Testorganismen verwendet. Die Umwandlungen stellen also keinen Sonderfall dar. Daneben ist in allen Fällen eine dritte Verbindung (B) nachweisbar.

Verwendet man an Stelle der markierten Pteridine bei den gleichen Organismen und in entsprechenden Nährmedien Guanin-[5-<sup>14</sup>C] und Xanthin-[5-<sup>14</sup>C], so ergibt sich nach einer modifizierten Aufarbeitung <sup>12)</sup> der Nucleinsäurefraktion, daß diese Purine nicht in Uracil oder Folsäure umgewandelt werden. *Str. faecalis* R nimmt etwa 70% des Guanin-[5-<sup>14</sup>C] auf und wandelt es in Adenin um. Beim Xanthin-[5-<sup>14</sup>C], das zu etwa 40% aufgenommen wird, entsteht neben Adenin noch Guanin. Von *P. membranaefaciens* und *C. albicans* werden ebenfalls etwa 70% des Guanin-[5-<sup>14</sup>C] aufgenommen, aber trotz deutlichen Wachstums innerhalb von 3 Tagen nicht umgewandelt. Erst nach 6-tägiger Bebrütungsdauer ist Adenin nachweisbar. Beim Einsatz von Xanthin-[5-<sup>14</sup>C], das zu 80% aufgenommen wird, entsteht neben Adenin ebenfalls noch Guanin. Das Verhältnis der Konzentrationen der Umwandlungsprodukte ist abhängig vom Alter der Kulturen. Mit zunehmender Bebrütungsdauer steigt der Gehalt an markiertem Adenin. Im Gegensatz zu den Befunden an *Lactobacillus leichmannii* <sup>13)</sup> konnten wir kein Hypoxanthin nachweisen. Die Umwandlungsprodukte der Purine wurden durch Papierchromatographie und UV-Spektren identifiziert. Isoxanthopterin-carbonsäure-[8a-<sup>14</sup>C] wird von *Str. faecalis* R zu weniger als

\*) Herrn Doz. Dr. A. WACKER, Berlin, danken wir für eine Vergleichsprobe.

<sup>10)</sup> R. TSCHESCHE und F. KORTE, Z. Naturforsch. 8b, 87 [1953].

<sup>11)</sup> A. ALBERT, Fortschr. Chem. org. Naturstoffe [Wien] 11, 355 [1954].

<sup>12)</sup> A. MARSHAK und H. J. VOGEL, J. biol. Chemistry 189, 597 [1951]; F. WEYGAND, A. WACKER und H. DELLWEG, Z. Naturforsch. 7b, 156 [1952].

<sup>13)</sup> F. WEYGAND, H. KLEBE, A. TREBST und H. SIMON, Z. Naturforsch. 9b, 450, [1954].

5%, Xanthopterin-[8a-<sup>14</sup>C] zu weniger als 1% aufgenommen und umgewandelt. Die gleichen Verhältnisse werden bei *P. membranaefaciens* und *C. albicans* gefunden.

Der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT danken wir für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

## BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

### *Kultur und Züchtung der Hefen und Bakterien*

*Organismen*: Bakterien und Hefen werden in Schrägkultur gehalten, *Streptococcus faecalis* R auf Difco-Dextrose-Agar<sup>\*)</sup>, *Pichia membranaefaciens* und *Candida albicans* auf Bierwürzeagar. Überimpfung: alle 14 Tage.

### *Nährlösungen*

a) für *Streptococcus faecalis* R: 12 g Bacto-Casitone<sup>\*)</sup>, 40 g Bacto-Dextrose<sup>\*)</sup>, 20 g Natriumcitrat, 0.2 g L-Cystin, 0.2 g DL-Tryptophan, 0.002 g Thiamin-hydrochlorid, 0.004 g Pyridoxin-hydrochlorid, 0.002 g Riboflavin, 0.002 g Nicotinsäure, 0.0002 g *p*-Aminobenzoesäure, 0.8γ Biotin, 0.0004 g Calciumpantothenat, 1 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.4 g MgSO<sub>4</sub>, 0.02 g NaCl, 0.02 g FeSO<sub>4</sub>, 0.02 g MgSO<sub>4</sub> werden mit dest. Wasser auf 1 l aufgefüllt; *p*<sub>H</sub> 6.8.

b) für *Pichia membranaefaciens* und *Candida albicans*: 10 g Glucose, 6 g NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.25 g MgSO<sub>4</sub>, 1 g Natriumcitrat, 1 g L-Asparagin, 40γ Biotin, 0.004 g Calciumpantothenat, 0.01 g Inosit, 0.004 g Aneurin, 0.004 g Pyridoxin werden mit Leitungswasser auf 1 l aufgefüllt und mit H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> auf *p*<sub>H</sub> 5.0 eingestellt.

*Sterilisation*: 10 Min., 1.2 atü, 121°.

Die Flüssigkeitskulturen (50ccm) werden aus 12–20 Stdn. alten Vorpässagen mit 2 Ösen (∅ 2 mm) beimpft. Als Kulturgefäße dienen Erlenmeyer-Kolben von 100ccm. Die Bakterien werden zum Teil über 10 Passagen an die zu prüfende Substanz gewöhnt und diese adaptierten Stämme auf Difco-Dextrose-Agar unter Zusatz der jeweiligen Substanzen gehalten. Die adaptierten Stämme nehmen die radioaktiven Substanzen leichter auf. Die Wachstumsdauer beträgt bei allen Bakterienansätzen 60–70 Stdn. bei 37°. Die Hefen erreichen ihr Wachstums-optimum (bei 25°) nach 4 Tagen, bei den Guaninansätzen wird bis zu 6 Tagen bebrütet.

*Aufarbeitung*: Die bebrütete Kultur wird abzentrifugiert und wie folgt gewaschen: je 2 mal mit 5ccm 2*n* NH<sub>3</sub>, Wasser, Äthanol, 5-proz. wäbr. Trichloressigsäure (0°), Äther-Äthanol 3:1 (3 Min. sieden lassen), Äther. Aus 50ccm Nährlösung erhält man etwa 30–40 mg Hefen oder Bakterien. Die lufttrockenen Zellen werden ausgewogen und auf Purine bzw. Pteridine aufgearbeitet.

Zur *Identifizierung der Purine* versetzt man mit 0.3ccm 60-proz. Perchlorsäure und läßt über Nacht stehen. Das hat gegenüber der Methode, mit Perchlorsäure zu erhitzen<sup>12)</sup>, den Vorteil, daß man genaue Flüssigkeitsmengen erhält und keine dunkel gefärbten Zersetzungsprodukte entstehen, welche die Chromatographie erschweren. Es wird dann mit Kalilauge schwach alkalisch gemacht, um sämtliche Purine und Pyrimidine in Lösung zu halten, und vom KClO<sub>4</sub> abzentrifugiert. Alle Operationen können in einem Zentrifugenglas ausgeführt werden.

Zur *Pteridin-Aufarbeitung* werden die trockenen Zellen mit Wasser angefeuchtet, mehrmals in flüssiger Luft eingefroren und schnell wieder aufgetaut. Der erhaltene Zellbrei wird zur quantitativen Bestimmung der Folsäure sowie zur Chromatographie der Folsäuregruppe verwendet.

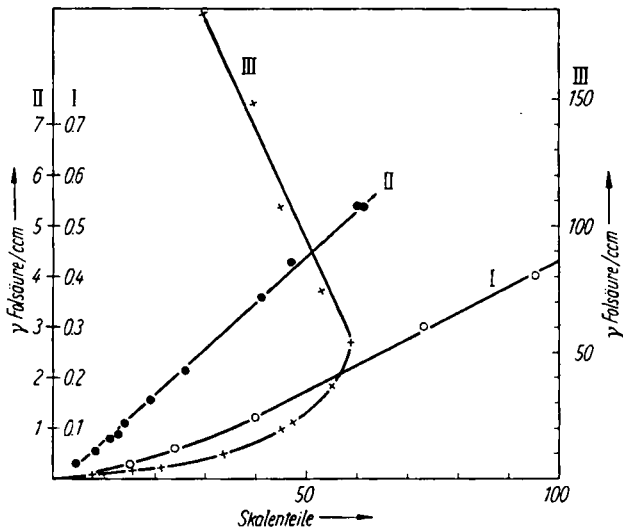
*Bestimmung der Folsäure in Hefen durch Fluoreszenzmessung*: Etwa 100 mg Zellbrei (dessen Wassergehalt bekannt ist, z. B. durch Karl-Fischer-Titration<sup>\*\*)</sup>) werden mit 3 ccm Acetat-

<sup>\*)</sup> Difco-Laboratories, Detroit, USA.

<sup>\*\*)</sup> E. EBERIUS, Wasserbestimmung mit Karl-Fischer-Lösung; Verlag Chemie, Weinheim 1954.

puffer ( $p_H$  4.2) versetzt, die Aufschwemmung 15 Min. bei 90–100° (Badtemperatur) gehalten, abzentrifugiert und der Rückstand mit 1ccm Pufferlösung nachgewaschen. Anschließend wird bis zum Sieden erhitzt, mit festem  $KMnO_4$  im Überschuß versetzt und nach 7 Min. das überschüss.  $KMnO_4$  sowie abgeschiedenes  $MnO_2$  mit  $H_2O_2$  reduziert. Nach dem Auffüllen auf 10ccm mit Pufferlösung ( $p_H$  4.2) erfolgt die Fluorescenzmessung. Die Konzentration läßt sich aus einer mit reiner Folsäure aufgenommenen Standardkurve ablesen. Die untere Nachweisgrenze beträgt 0.05 $\gamma$ /ccm.

Bis zu einer Konzentration von 5 $\gamma$ /ccm ist die Fluorescenz der Konzentration direkt proportional. Mit steigender Konzentration nimmt der Intensitätszuwachs ab und wird bei Konzentrationen über 50 $\gamma$ /ccm negativ. Die Messung erfolgt im Eppendorf-Photometer (Normalausführung) (Abbild. 1).



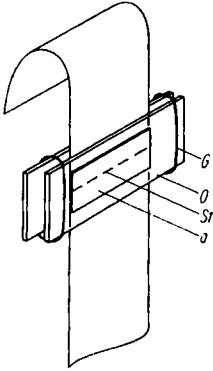
Abbild. 1. Fluorescenzmessung der Folsäure,  $C_{19}H_{19}O_6N_7 \cdot H_2O$ , mit dem Eppendorf-Photometer (Netheler & Hinz, Hamburg); Fluorescenzfilter 300–400  $m\mu$ . Die Einstellung auf 100 Skalenteile erfolgt mit dem Fluorescenznormal Nr. 4081. Bei dieser Verstärkung wird an Kurve III abgelesen. Bei geringeren Konzentrationen kann nach Erhöhung der Verstärkung auf das 3.16fache Kurve II, auf das 17.8fache Kurve I benutzt werden

*Chromatographische Identifizierung von Folsäure als 2-Amino-4-hydroxy-pteridin-carbonsäure-(6):* Der Zellbrei wird mit der gleichen Gewichtsmenge festem  $KMnO_4$  gut vermischt, 30 Min. bei 90–100° (Badtemperatur) gehalten, überschüss.  $KMnO_4$  mit Äthanol reduziert und vom  $MnO_2$  sowie von den ungelösten Zellbestandteilen abzentrifugiert. Die klare alkalische Lösung dient zur Chromatographie.

Bei Formyl-5.6.7.8-tetrahydro-folsäure wird unter diesen Bedingungen das Pteridingerüst zerstört. Das Verfahren erfäßt nur die Folsäure und ihre Konjugate.

*Papierchromatographie:* Die Identifizierung der Reaktionsprodukte erfolgt papierchromatographisch durch Bestimmung der  $R_F$ -Werte in verschiedenen Lösungsmitteln. Die Lösungen werden bei geringen Aktivitäten über die ganze Startlinie verteilt. Mit sek. Butanol-Eisessig-Wasser (20:5:5) bleiben die gefärbten Begleitstoffe fast vollständig in der Startlinie haften, während die Purine und Pyrimidine gut wandern. Verwendet man Isopropylalkohol-Wasser-

konz. Salzsäure (170:39:41)<sup>14</sup>), so wandern die Begleitstoffe zum größten Teil mit der Lösungsmittelfront, während die untersuchten Substanzen kleine  $R_F$ -Werte haben. Auf diese Weise gelingt eine Abtrennung der Hauptverunreinigungen. Für die Peridine verwendet man zweckmäßig  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (3-proz. wäbr. Lösung,  $p_H$  4.9) oder Kollidin-Wasser-gesättigt.



Abbild. 2. Anordnung für die zweite Chromatographie der radioaktiven Zonen. G Gummiband, O Objektträger, St Startlinie, a ausgeschnittene Streifen

Die radioaktiven Zonen werden in 0.5–1 cm breite Streifen zerschnitten, auf ein zweites Chromatogramm gebracht, zwischen zwei Objektträger geklemmt und erneut im gleichen oder einem anderen Lösungsmittel chromatographiert. Um die Konzentrationen zu erhöhen und die Substanzen weiter zu reinigen, kann man bis zu 5 Streifen aufeinanderlegen, ohne auseinandergezogene Flecken zu erhalten. Bei genügender Aktivität läßt sich dieses Verfahren mehrmals wiederholen (Abbild. 2).

Purine und Pyrimidine zeigen in  $\text{NH}_4\text{Cl}$  gut lokalisierte Zonen. Von den Pyrimidinen ( $R_F > 0.7$ ) sind die Purine ( $R_F < 0.7$ ) leicht auch präparativ abtrennbar. Die Pyrimidine untereinander sowie Guanin und Adenin trennt man dann durch Chromatographie mit sek. Butanol (III). Bei Benutzung von II als mobile Phase ist auf den  $p_H$ -Wert der Lösung zu achten, aus der aufgetragen wird; z. B. ergibt Guanin aus 2n HCl den  $R_F$ -Wert 0.52, aus 3n  $\text{NH}_3$  dagegen 0.36.

Tab. 1.  $R_F$ -Werte

I = Isopropylalkohol-Wasser-konz. Salzsäure (170:39:41)<sup>14</sup>), II =  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 3-proz. wäbr. Lösung,  $p_H$  4.9<sup>15</sup>), III = sek. Butanol-Eisessig-Wasser (20:5:5), IV = Kollidin-Wasser-gesättigt<sup>16</sup>), Papier: Schleicher & Schüll 2043a

	I	II	III	IV
Adenin	0.30	0.38	0.57	0.67
Guanin	0.22	0.36*)	0.29	0.57
Hypoxanthin	0.28	0.59	0.36	0.68
Xanthin	0.21	0.45	0.28	0.70
Thymin	0.73	0.76	0.61	0.85
Cytosin	0.44	0.79	0.39	0.47
4-Amino-uracil		0.57	0.32	
Harnsäure	0.29	0.41	0.14	
Xanthopterin	0.21	0.38	0.18	0.39
Isoxanthopterin-carbonsäure	0.08	0.30	0.18	0.18
2-Amino-4-hydroxy-pteridin-carbonsäure-(6)	0.22	0.49	0.08	0.25
2-Amino-4-hydroxy-pteridin-aldehyd-(6)		0.58	0.08	
Uracil	0.66	0.80	0.50	0.80

\*) alkalisch aufgetragen.

Guanin und Hypoxanthin lassen sich papierchromatographisch nur sehr schwer unterscheiden, da ihre  $R_F$ -Werte in allen Lösungsmitteln ähnlich sind. So vermuteten wir zunächst, daß von den Mikroorganismen aus Xanthin auch Hypoxanthin gebildet würde<sup>17</sup>). Durch das UV-Spektrum konnten wir jedoch eindeutig nachweisen, daß es sich bei dieser Substanz um Guanin handelt.

<sup>14</sup>) G. R. WYATT, Biochem. J. **48**, 584 [1951].

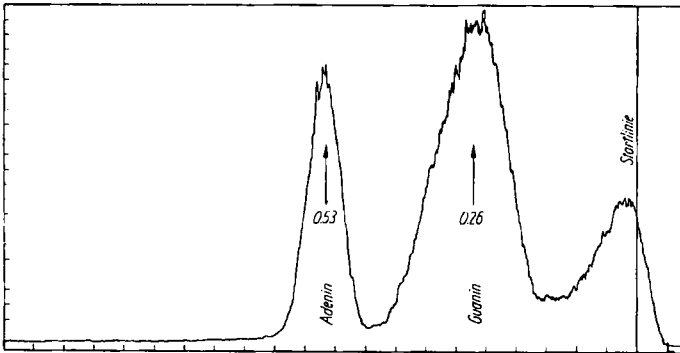
<sup>15</sup>) R. TSCHESCHE und F. KORTE, Chem. Ber. **84**, 641 [1951].

<sup>16</sup>) E. VISCHER und E. CHARGAFF, J. biol. Chemistry **168**, 781 [1947]; **176**, 703 [1948].

<sup>17</sup>) F. KORTE, H. G. SCHICKE und H. WEITKAMP, Angew. Chem. **69**, 96 [1957].

*Nachweis:* Der Nachweis der Purine und Pyrimidine auf dem Chromatogramm erfolgt auf Grund ihrer Fluoreszenzlöschung bei 250–260 m $\mu$  (Hanauer Analysenquarzlampe, Pl 327). Bei Dunkelheit sind die Flecken auch ohne Besprühen mit Fluorescein<sup>18)</sup> gut sichtbar.

Die radioaktiven Chromatogramme werden mit Hilfe des FH 49 in Verbindung mit einem Papierchromatographen FH 452 (Frießecke & Höpfner) ohne Benutzung der Schutzfolie ausgewertet. Bei genügend hohen Aktivitäten verwendet man mit Vorteil die Registrierung durch einen an das Gerät angeschlossenen Papierschreiber (Metrawatt, PC 120). Aus der Flächen-größe kann das Verhältnis der radioaktiven Substanzen abgelesen werden (Abbild. 3).



Abbild. 3. Auswertung der Chromatogramme. Kultur: *Pichia membranaefaciens*. Angebotene Substanz: Guanin-[5-<sup>14</sup>C]. Aufgetragene Impulse/Min.: 10800. Entwickler: III (s. Tab. 1). Laufstrecke: 20.2 cm, Vorschub: 120 mm/Seite.; Spaltbreite: 10 mm

Bei geringer Intensität erweist sich ein Zeitdrucker FH 449 dem Schreiber überlegen. Durch schrittweises Abtasten der Chromatogramme lassen sich die Zählfehler durch geeignete Impulsvorwahl in beliebigen Grenzen halten; statistischer Fehler:  $\pm \sqrt{\text{Zahl der Impulse}}$  (Tab. 2).

Tab. 2. Registrierung eines Chromatogramms mit dem Zeitdrucker.

Kultur: *Candida albicans*. Angebotene Substanz: Isoxanthopterin-carbonsäure-[8a-<sup>14</sup>C]. Aufgetragene Impulse/Min.: 300. Mobile Phase: 3-proz. wäBr. NH<sub>4</sub>Cl. Laufstrecke: 22 cm, Vorschub: 10 mm, Spaltbreite: 10 mm; Impulse/Schritt: 400; statistischer Fehler  $\pm 5\%$ .

Sek./Schritt	0760	0754	0648	0584	0546	0490	0452	0307	0442	0436	0405	0479	0498	0424	0484	0511	0507	0544	0562	0567	0602	0649	0582	0575	0700	
Schrittzahl	24	23	22	21	20	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	09	08	07	06	05	04	03	02	01	00	00
							R <sub>F</sub> :	0.82		0.64		0.50													Start- linie	

Das verwendete Zählrohr FHZ 15 hat eine Massenbelegung von 0.95 mg/cm<sup>2</sup>, 25 mm  $\varnothing$ .

Bei unserer Meßmethode werden 270 Imp./Min. erfaßt, wenn man das Zählrohr auf den Standard CFP 2 (1.0 $\mu$ C/g)\* aufsetzt und durch ein 1 mm dickes Messingblech eine Kreisfläche von 5 mm  $\varnothing$  ausblendet. Durch Anwendung des Methandurchflußzählers FH 407 erhöht sich die Zählausbeute um etwa den Faktor 2.

\*) Radiochemical Centre, Amersham, England. Emissionsrate  $35 \frac{\text{Imp.}}{\text{cm}^2 \cdot \text{sec}} \pm 10\%$ .

18) TH. WIELAND und L. BAUER, Angew. Chem. 63, 511 [1951].

Zur Messung der von den Mikroorganismen aufgenommenen Substanzmengen entnimmt man den Versuchsgefäßen nach der Sterilisation unter sterilen Bedingungen etwa 1/2 ccm Flüssigkeit, trägt eine bestimmte Menge auf ein Chromatographierpapier und mißt nach dem Trocknen die Zahl der Impulse pro Minute. In gleicher Weise verfährt man mit der bebrüteten Nährlösung nach dem Zentrifugieren der Organismen. Aus der Differenz ergibt sich die Menge

Tab. 3. Aufnahme und Umwandlung bei *Streptococcus faecalis* R

	Konz. im Nährmedium γ/ccm	Nährmedium ccm	<i>Streptococcus faecalis</i> R			
			Auswaage mg	Aufnahme %	gefundene Substanz	Verhältnis %
Xanthin-[5- <sup>14</sup> C]	24	25	18	40	Guanin Adenin	55 45
Guanin-[5- <sup>14</sup> C]	34	30	21	70	Guanin Adenin	60 40
Xanthopterin-[8a- <sup>14</sup> C]	50	40	26	< 1	Pter.-6-COOH Subst. A Subst. B	40 20 40
Isoxanthopterin-carbonsäure-[8a- <sup>14</sup> C]	32	25	30	< 5	Pter.-6-COOH Subst. A Subst. B	40 20 40

Tab. 4. Aufnahme und Umwandlung bei Hefen

gefundene Substanz	Konz. im Nährmedium		<i>Pichia membranaefaciens</i>			Konz. im Nährmedium		<i>Candida albicans</i>		
	γ/ccm	ccm	Auswaage mg	Aufnahme %	Verhältnis %	γ/ccm	ccm	Auswaage mg	Aufnahme %	Verhältnis %
Xanthin-[5- <sup>14</sup> C]					75	15	25	29	80	70
Adenin			26	80	25					30
Guanin-[5- <sup>14</sup> C]					70	40	50	31	60	100
Adenin			36	70	30					
			6 Tage bebrütet					3 Tage bebrütet		
Xanthopterin-[8a- <sup>14</sup> C]					25	40	50	28	< 1	25
Pter.-6-COOH			24	< 1	25					25
Subst. A					50					50
Subst. B					25					25
Isoxanthopterin-carbonsäure-[8a- <sup>14</sup> C]					25	20	50	19	1	25
Pter.-6-COOH			27	1	50					50
Subst. A					70					70
Subst. B			12	1	30					30
Isoxanthopterin-carbonsäure-[8a- <sup>14</sup> C]					70					70
Subst. A					40					40
Subst. B			32	2	40					40
+ Folsäure			10							
Isoxanthopterin-carbonsäure-[8a- <sup>14</sup> C]					20					20
Pter.-6-COOH					40					40
Subst. A					40					40
Subst. B			50		40					40
i- Uracil			50							

Die Purine und Pteridine werden in 2 ccm 0.1 N NaOH gelöst und zu dieser Lösung das Nährmedium zugegeben.

der aufgenommenen radioaktiven Substanzen. Dieses Verfahren eignet sich gut, wenn die Aufnahme mehr als 10% beträgt. Im anderen Falle empfiehlt sich die Impulsmessung an den Organismen<sup>12)</sup>.

Da während der Bebrütungsdauer erhebliche Mengen Wasser aus den Versuchsgefäßen verdampfen, stellt man diese in ein abgedecktes Becherglas, dessen Boden mit Wasser bedeckt ist. Man erhält so eine mit Wasserdampf gesättigte Atmosphäre, wodurch das Volumen in den Versuchsgefäßen konstant bleibt.

*Spektren:* Zur Bestätigung der chromatographischen Ergebnisse werden die Spektren der erhaltenen Umwandlungsprodukte aufgenommen. Nach 3 maliger Chromatographie (sek. Butanol-Eisessig-Wasser → n-Butanol-Wasser-gesättigt → Isopropylalkohol-Wasser-konz. Salzsäure) schneidet man die Flecken aus, eluiert über Nacht mit 5 ccm HCl ( $p_H$  1.6–1.9) und filtriert die Lösung in eine Küvette. Zur Kompensation eluiert man einen entsprechenden Papierstreifen, den man bei der Chromatographie unter gleichen Bedingungen erhält, ohne daß Substanz aufgetragen wird.

In gleicher Weise werden auch die Spektren in Alkali gemessen (NaOH,  $p_H$  10.1).

Tab. 5. UV-Absorption

	$p_H$ 1.6–1.9		$p_H$ 10.1	
	$\lambda_{max}$	$\lambda_{min}$	$\lambda_{max}$	$\lambda_{min}$
Adenin	262	228	260	230
Guanin	247	225	245, 276	225
Hypoxanthin	250	<220	258	230
Uracil	259	228	284	243

KARL ZIEGLER und HELMUT DISLICH

Metallorganische Verbindungen, XXIII<sup>1)</sup>

ÜBER  $\alpha$ -PHENYL-ISOPROPYL-KALIUM<sup>2)</sup>

Aus dem Max-Planck-Institut für Kohlenforschung, Mülheim (Ruhr)

(Eingegangen am 21. Februar 1957)

*Herrn Professor Dr. B. Helferich zum 70. Geburtstag gewidmet*

Methyl- $[\alpha$ -phenyl-isopropyl]-äther ist heute viel leichter zugänglich als früher. Damit verdient das daraus leicht zu gewinnende  $\alpha$ -Phenylisopropyl-kalium als mannigfach verwendbares metallorganisches Reagens wieder erhöhte Beachtung. Es werden besprochen: seine Verwendung zur Reinheitsprüfung von Gasen, seine Addition an Äthylen, Tolan und Methylphenylacetylen sowie die Metallierung von methylierten Aromaten und Äthylenen durch die Kaliumverbindung.

$\alpha$ -Phenylisopropyl-kalium —  $C_6H_5(CH_3)_2CK$  — hat vor längerer Zeit eine gewisse Rolle als Prototyp einer relativ leicht herstellbaren, nicht zu kompliziert gebauten

1) XXII. Mitteil.: Liebigs Ann. Chem. **605** [1957], im Druck.

2) Auszug aus der Dissertat. H. DISLICH, Techn. Hochschule Aachen 1957.