

## HELMUT SIMON und JOACHIM STEFFENS

**Abbauverfahren zur Ermittlung der  $^{14}\text{C}$ -Verteilung  
in Pentosen und Hexosen**

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Technischen Hochschule München  
(Eingegangen am 20. Juli 1961)

Es wird ein Verfahren beschrieben, mit dem von allen unverzweigten  $^{14}\text{C}$ -markierten Pentosen und Hexosen die Radioaktivitätsverteilung bestimmt werden kann. Die Osotriazole werden der Perjodatspaltung unterworfen und der entstehende *N*-Phenyl-triazolaldehyd nach Oxydation zur Säure weiter zu Cyanwasserstoff und Phenylhydrazinoessigsäure abgebaut, die dann decarboxyliert wird. Das Verfahren ist ebenfalls zur Bestimmung der Tritiumverteilung in Zuckern geeignet. Die einzelnen Abbaureaktionen wurden, soweit nötig, mit positionsmarkierten Verbindungen kontrolliert. Das Verfahren wurde mit Ergebnissen der *Leuconostoc mesenteroides*-Methode verglichen. Die Abbauergebnisse verschiedener  $^{14}\text{C}$ -markierter Ribulosen, Glucosen und Fructosen aus Photosyntheseexperimenten werden angegeben.

Bei vielen Stoffwechselfvorgängen kommt den Kohlenhydraten eine zentrale Bedeutung zu. Daher wurden in den letzten 10–15 Jahren zahlreiche Untersuchungen zur Bildung bzw. Umwandlung von Zuckern mit Hilfe von  $^{14}\text{C}$  durchgeführt. Dabei mußten Zucker so abgebaut werden, daß die Radioaktivität eines jeden C-Atoms bestimmt werden konnte. Die zahlreichen für Pentosen<sup>1–4)</sup> und Hexosen<sup>5–28)</sup> aus-

- 1) D. A. RAPPAPORT, H. A. BARKER und W. Z. HASSID, Arch. Biochem. Biophysics 31, 326 [1951].
- 2) I. A. BERNSTEIN und F. TIBERIO, J. biol. Chemistry 205, 309 [1953].
- 3) S. A. BROWN, Can. J. Biochem. and Physiol. 33, 368 [1955].
- 4) A. G. ZWEIFLER, Dissertat. Univ. of California, Berkeley 1953.
- 5) H. G. WOOD, N. LIFSON und V. LORBER, J. biol. Chemistry 159, 475 [1945].
- 6) H. G. WOOD, C. H. WERKMAN, A. HEMINGWAY und A. O. NIER, J. biol. Chemistry 139, 377 [1941].
- 7) S. ARONOFF, H. A. BARKER und M. CALVIN, J. biol. Chemistry 169, 459 [1947].
- 8) S. ARONOFF, A. BENSON, W. Z. HASSID und M. CALVIN, Science [New York] 105, 664 [1947].
- 9) H. N. BARNET und A. N. WICK, J. biol. Chemistry 185, 657 [1950].
- 10) M. GIBBS, R. DUMROSE, F. A. BENNET und M. R. BUBECK, J. biol. Chemistry 184, 545 [1950].
- 11) S. ARONOFF, V. A. HAAS und B. FRIES, Science 110, 476 [1949].
- 12) D. KOSHLAND und F. H. WESTHEIMER, J. Amer. chem. Soc. 71, 1139 [1949].
- 13) I. C. GUNSAUS und M. GIBBS, J. biol. Chemistry 194, 871 [1952].
- 14) I. A. BERNSTEIN, K. LENTZ, M. MALM, P. SCHAMBYE und H. G. WOOD, J. biol. Chemistry 215, 137 [1955].
- 15) Y. J. TOPPER und A. B. HASTINGS, J. biol. Chemistry 179, 1255 [1949].
- 16) S. ARONOFF und L. VERNON, Arch. Biochem. Biophysics 28, 424 [1950].
- 17) P. V. VITTORIO, G. KROTKOV und G. B. REED, Science [Washington] 115, 567 [1952].
- 18) S. ABRAHAM, I. L. CHAIKOFF und W. Z. HASSID, J. biol. Chemistry 195, 567 [1952].
- 19) C. T. BISHOP, Science [Washington] 117, 715 [1953].
- 20) J. C. BEVINGTON, E. J. BOURNE und C. N. TURTON, Chem. and Ind. 1953, 1390.
- 21) H. WEIGEL, Dissertat. Techn. Hochschule Aachen 1954.

gearbeiteten Verfahren befriedigen jedoch meist aus einem oder mehreren der folgenden Gründe nicht völlig:

- a) Der Abbau läßt sich nur für einen speziellen Zucker oder nur für Aldosen oder nur für Ketosen anwenden,
- b) Es können nicht alle C-Atome bestimmt werden,
- c) Es werden zuviele C-Atome indirekt, d. h. durch Differenzbildung bestimmt,
- d) Die Verfahren sind zu aufwendig und schließlich
- e) Zum Gesamtabbau müssen zu viele Wege beschritten werden, wodurch die  $^{14}\text{C}$ -Verteilung von Zuckern mit geringer Radioaktivität nicht mehr genau genug ermittelt werden kann.

Wir stellten uns daher die Aufgabe, ein allgemein anwendbares Verfahren auszuarbeiten, das auf alle unverzweigten Aldosen und Ketosen in der Pentose- und Hexose-Reihe anwendbar ist und möglichst wenige der unter b)–e) aufgeführten Nachteile besitzt. Schließlich war es noch wünschenswert, die Methode auch auf die Ermittlung der Tritiumverteilung in Zuckern anwenden zu können.

Bei vielen Abbauprozessen wurden bisher die Osazone und die daraus zu gewinnenden Osotriazole angewandt<sup>4,15–17,19,21,26</sup>), um die C-Atome 4, 5 und evtl. 6 von Pentosen bzw. Hexosen zu bestimmen. Es erhob sich daher die Frage, ob es möglich ist, das durch Perjodatspaltung aus den Zuckerosazonen erhältliche Osazon des Mesoxaldehyds oder den aus der Perjodatspaltung der *N*-Phenyl-osotriazole erhältlichen 2-Phenyl-triazol-aldehyd-(4) (II)<sup>29</sup>) weiter abzubauen.

1891 beschrieben A. JONAS und H. v. PECHMANN<sup>30</sup>) die Gewinnung von Phenylhydrazinoessigsäure durch Natriumamalgamspaltung von 2-Phenyl-1.2.3-triazol-carbonsäure-(4) (III). Dabei trat nach Angabe der Autoren ein Geruch nach Blausäure auf.

Wir prüften daher, ob auf Grund dieses Befundes eine saubere Erfassung der einzelnen C-Atome von III möglich ist. Aus Glucose-[1- $^{14}\text{C}$ ] bzw. Glucose-[2- $^{14}\text{C}$ ] stellten wir III-[5- $^{14}\text{C}$ ] bzw. III-[4- $^{14}\text{C}$ ] her und unterwarfen sie der Natriumamalgamspaltung.

Die in Form von Silbercyanid isolierte Blausäure aus III-[5- $^{14}\text{C}$ ] besitzt 98% der Radioaktivität des Triazols. Die Phenylhydrazinoessigsäure aus III-[4- $^{14}\text{C}$ ] weist 98,4% der Aktivität des Triazols auf.

Dies zeigt, daß die Amalgamspaltung für die Ermittlung der  $^{14}\text{C}$ -Verteilung sehr gut brauchbar ist. Unter entsprechenden Bedingungen kann die Phenylhydrazinoessigsäure (IV), ausgehend von 0,5 mMol III, mit ca. 55% und die Blausäure mit 70% Ausbeute isoliert werden.

22) B. BOOTHROYD, S. A. BROWN, J. A. THORN und A. C. NEISH, *Can. J. Biochem. and Physiol.* **33**, 62 [1955].

23) F. WEYGAND, K. FEHR und J. F. KLEBE, *Z. Naturforsch.* **14b**, 217 [1959].

24) P. KOHN, B. L. DMUCHOWSKI, *J. biol. Chemistry* **235**, 1867 [1960].

25) M. J. ABERCROMBIE und J. K. N. JONES, *Can. J. Chem.* **38**, 1999 [1960].

26) S. ARONOFF, *Techniques of Radiochemistry*, The Iowa State College Press, Ames Iowa **1956**, 112.

27) H. L. FRUSH und H. S. ISBELL, *J. Res. nat. Bur. Standards* **51**, 167 [1953].

28) F. EISENBERG, *J. Amer. chem. Soc.* **76**, 5152 [1954].

29) R. M. HANN und C. S. HUDSON, *J. Amer. chem. Soc.* **66**, 735 [1944].

30) Liebigs *Ann. Chem.* **262**, 277 [1891].



Das ausgearbeitete Verfahren wurde zum Abbau von vier aus Photosyntheseexperimenten stammenden Ribulosen angewandt. Die Ribulose wurde von Papierchromatogrammflecken eluiert und nach Zusatz von Träger in Form von Ribulose und Arabinose das Osazon gewonnen. Der Vergleich der Radioaktivität der Eluate, des Osazons und besonders von I ergab, daß sich die Ribulose- $^{14}\text{C}$  auf den Papierchromatogrammen zu einem wesentlichen Teil verändert hatte<sup>32)</sup>. Durch diesen Umstand standen für die Abbauprobe nur relativ geringe spezif. Aktivitäten zur Verfügung. Die nachfolgend aufgeführten Abbauprodukte von vier Ribulosen wurden, ausgehend von 2.85 mMol Pentoseosazon mit einer spezif. Radioaktivität von 2500–10000 ipm/mMol, erhalten.

Tab. 1. Prozentuale  $^{14}\text{C}$ -Verteilung in Ribulose von Photosyntheseexperimenten mit *Chlorella*

C-Atome	A	B	C	D
1	16.8	19.3	19.4	20.2
2	21.4	16.9	20.9	18.9
3	52.6	52.5	38.4	39.4
4	5.4	5.2	9.5	9.2
5	6.6	6.4	12.6	12.6
Summe	102.8	100.3	100.8	100.3

Wie der Vergleich der Summe der für die einzelnen C-Atome gefundenen Aktivitätswerte mit dem Wert der Ausgangsverbindung (*N*-Phenyl-osotriazol = 100%) zeigt, ist die Übereinstimmung sehr gut, ein Beweis für die Leistungsfähigkeit des Verfahrens.

Es wäre ein besonderer Vorteil des vorstehenden Pentoseabbaus, wenn er sich mit relativ geringen Modifikationen auf die Hexose-Reihe übertragen ließe. Besonders günstig ist dabei, daß sich die Osazon- und Osotriazolbildung bei den Hexosen im allgemeinen wesentlich vorteilhafter gestaltet. Während jedoch im Falle der Pentosen bei der Perjodatspaltung von I nur ein C-Atom in Form von Ameisensäure anfällt, ergeben in der Hexose-Reihe, beim analogen Vorgehen, C-4 und C-5 Ameisensäure.

Zur getrennten Erfassung von C-4 und C-5 muß man daher das Hexose-phenyl-osotriazol (V) vor der Spaltung mit Perjodat in ein Derivat überführen, das zwischen C-5 und C-6 nicht spaltbar ist.

Es wurde auf verschiedenen Wegen versucht, V durch spezif. Oxydation in die entsprechende 6-Carbonsäure zu überführen. Eine Perjodatspaltung dieser Säure würde dann II (C-1 + C-2 + C-3), Ameisensäure (C-4) und Glyoxylsäure (C-5 + C-6) liefern. Versuche, V analog H. KILIANI<sup>33)</sup> mit Salpetersäure zur *N*-Phenyl-osotriazolglucuronsäure zu oxydieren, schlugen fehl.

<sup>32)</sup> Die Ribulose-Chromatogrammeflecke wurden von Herrn Prof. Dr. O. KANDLER, Techn. Hochschule München, zur Verfügung gestellt. Herr Dr. KAUSS führte daraufhin Versuche durch, die zeigten, daß sich die Ribulose auf dem Papier bei langer Lagerung in mehrere Substanzen, u. a. Glycerinsäure, zersetzt.

<sup>33)</sup> Ber. dtsch. chem. Ges. 58, 2344 [1925].

Durch Verwendung von Stickstofftetroxyd, das von MAURER und DREFAHL<sup>34,35)</sup> zur Darstellung von Glucuronsäuren angegeben wurde, erzielten wir zunächst erfolgversprechende Ergebnisse. Die *N*-Phenyl-osotriazolglucuronsäure ließ sich als Lacton isolieren, was durch C,H-Analyse und IR-Spektrum bestätigt wurde. Durch Umsetzung der Substanz mit *o*-Phenylendiamin erhält man das Benzimidazolderivat. Die Ausbeute an reinem *N*-Phenyl-osotriazolglucuron war jedoch recht niedrig (15% d. Th.). Wir versuchten daher, die Ausbeute durch Variation der Mengenverhältnisse, der Temperatur und der Zeit sowie durch Verdünnung des Oxydationsmittels mit Chloroform und durch Zugabe von wasserentziehenden Mitteln zu steigern. Maximal bildeten sich jedoch, wie durch Verdünnungsanalyse festgestellt wurde, nur 35% Säure.

Wie papierchromatographische Auftrennungen zeigten, waren im Reaktionsgemisch außer der Säure bzw. dem Lacton und Ausgangsmaterial noch 4 andere Substanzen vorhanden.

Auch durch katalytische Oxydation konnte die Säure zwar erhalten werden, aber auch hier waren die Ausbeuten mit maximal 30% unbefriedigend. Es wurde deshalb versucht, die Hydroxylgruppe an C-6 zu veräthern bzw. zu verestern, wobei sich herausstellte, daß das 6-*O*-Benzoyl-D-glucose-phenylosotriazol (VI)<sup>20,21)</sup> das günstigste Derivat war.

Bei der Perjodatspaltung von VI<sup>36)</sup> ergeben sich 2 Probleme: 1. Trennung des entstehenden Phenyltriazolaldehyds II und des *O*-Benzoyl-glykolaldehyds (VII). 2. Vermeidung der Verseifung des Benzoylrestes während der Perjodatspaltung und bei der Trennung der beiden Aldehyde.

Folgende Arbeitsweise ergab schließlich eine einfache und zuverlässige Trennung von II und VII. Die beiden Aldehyde werden unter völlig wasserfreien Bedingungen in Aceton mit Kaliumpermanganat oxydiert. Anschließend können nach Abspaltung des Benzoylrestes die Glykolsäure, Benzoesäure und III gut getrennt werden.

Nach Versuchen von WEIGEL<sup>21)</sup> ist die Benzoylgruppe am 6-*O*-Benzoyl-osotriazol (VI) und am *O*-Benzoyl-glykolaldehyd (VII) sehr hydrolysenbeständig. Wir überprüften diese Angaben und stellten mit Hilfe von 6-*O*-Benzoyl-osotriazol-[6-<sup>14</sup>C] fest, daß Perjodatspaltungen unter sehr verschiedenen Bedingungen stets mit einer mehr oder weniger starken Hydrolyse verbunden sind. Dabei zeigte sich, daß der Benzylester des Glykolaldehyds relativ hydrolysenempfindlich ist. Unter speziellen Bedingungen tritt bei der Perjodatspaltung von 6-*O*-Benzoyl-osotriazol (VI) eine reproduzierbare Menge von 4–5% Formaldehyd auf. Mit der gleichen Menge Ameisensäure, die aus C-5 stammt, ist folglich C-4 verunreinigt. Obwohl sich eine entsprechende Korrektur anbringen ließe, ist es günstiger, einen Teil des Osotriazols nicht zu benzylieren und direkt der Perjodatspaltung zu unterwerfen. In diesem Falle wird C-6 als Formaldehyd gefaßt und C-4 + C-5 als Ameisensäure. Aus dem durch Spaltung der Glykolsäure erhaltenen Wert für C-5 kann C-4 berechnet werden.

<sup>34)</sup> K. MAURER und G. DREFAHL, Ber. dtsh. chem. Ges. 75, 1489 [1942].

<sup>35)</sup> K. MAURER und G. DREFAHL, Chem. Ber. 80, 94 [1947].

<sup>36)</sup> 6-*O*-Benzoyl-D-glucose-phenylosotriazol (VI) wurde schon vorher von J. C. BEVINGTON, E. J. BOURNE und C. N. TURTON, Chem. and Ind. 1953, 1390, zum Studium der Radioaktivitätsverteilung benutzt. In der Veröffentlichung wird auch eine Trennung von *N*-Phenyl-osotriazolaldehyd und Benzoylglykolaldehyd angegeben, ohne daß jedoch der dazu eingeschlagene Weg angedeutet wird.

Von SMITH<sup>37)</sup> wurde ein Verfahren zum Abbau von Glykolsäure mit Hilfe von Cer(IV)-Salzen entwickelt. Danach wird Glykolsäure in 6 *m* Perchlorsäurelösung bei Raumtemperatur zu Kohlendioxyd und Ameisensäure gespalten. Bei 100° wird die Ameisensäure oxydiert.

Ein unter den angegebenen Bedingungen durchgeführter Versuch bestätigte die Angaben (s. Tab. 2, Vers. 1). Versucht man jedoch die Bedingungen zu variieren, indem man z. B. eine wäßrige Glykolsäurelösung vorlegt, wie sie beim Hexose-Abbau anfällt, so ist die Reaktion nicht mehr so spezifisch. Besonders auffallend ist die niedrige Ausbeute beim zweiten Oxydationsschritt (s. Tab. 2, Vers. 2 und 3).

Tab. 2. Spaltung der Glykolsäure mit  $\text{H}_2\text{Ce}(\text{ClO}_4)_6$

Vers.- Nr.	Glykolsäure mMol	CO <sub>2</sub> -Ausbeute bei 25° (C-1)		CO <sub>2</sub> -Ausbeute bei 100° (C-2)	
		mMol	%	mMol	%
1	0.50	0.501	= 100	0.443	= 89.0
2	0.56	0.608	= 108	0.147	= 26.5
3	0.50	0.442	= 89	0.077	= 15.4

Eine ähnliche Methode zur Spaltung der Glykolsäure bedient sich des Cer(IV)-ammoniumsulfats<sup>37)</sup>. Dieses Verfahren hat den Vorteil, daß es weniger von der Konzentration abhängig ist. In schwefelsaurer Lösung wird Glykolsäure bei 100° von Cer(IV)-ammoniumsulfat quantitativ zu Kohlendioxyd und Ameisensäure oxydiert.

Die Spezifität der Reaktion wurde durch Versuche mit Glykolsäure-[1- $^{14}\text{C}$ ] bestätigt. Dabei wurde nach beendeter Cer(IV)-ammoniumsulfat-Oxydation der Überschuß an Cer(IV)-Ionen mit Zinn(II)-Lösungen zerstört und die mitentstandene Ameisensäure direkt mit Quecksilber(II)-acetat zu Kohlendioxyd oxydiert.

Tab. 3. Spaltung von 1 mMol Glykolsäure-[1- $^{14}\text{C}$ ] mit Cer(IV)-ammoniumsulfat und anschließende Oxydation der Ameisensäure mit  $\text{Hg}^{\text{II}}$ -Salz

Vers.- Nr.	Glykol- säure ipm/ mMol	C-1 als CO <sub>2</sub>			C-2 als CO <sub>2</sub>		
		CO <sub>2</sub> - Ausb.	ipm/ mMol	% Aus- gangsakt.	CO <sub>2</sub> - Ausb.	ipm/ mMol	% Aus- gangsakt.
1	67672	100%	64247	95	91.7%	89	0.13
2	67672	99.3%	66620	99.1	92.7%	60	0.10

Da die Glykolsäure beim Abbau von Hexosen durch Verseifung aus *O*-Benzoylglykolsäure in Gegenwart der Phenyltriazolcarbonsäure III erhalten wird, mußte noch das Verhalten von III unter den Reaktionsbedingungen geprüft werden, da diese noch in geringen Mengen in der wäßrigen Glykolsäurelösung enthalten sein kann. Wie Versuche zeigten, wird III durch Cer(IV)-ammoniumsulfat decarboxyliert. Sie kann aber durch mehrmaliges Ausäthern von Glykolsäure leicht abgetrennt werden. So zeigte das aus einer Mischung von 0.5 mMol Glykolsäure und 0.05 mMol radioaktivem III nach 3maligem Ausäthern gewonnene Kohlendioxyd keine Radioaktivität.

<sup>37)</sup> G. F. SMITH, Cerate oxidimetrie, S. 88, G. F. Smith Chemical Company, Columbus, Ohio, 1942.

Daher ist es am zweckmäßigsten, die Glykolsäure nach sorgfältiger Abtrennung der Phenyltriazolcarbonsäure mit Cer(IV)-ammoniumsulfat zu Kohlendioxyd und Ameisensäure zu spalten.

Die Perjodatspaltung des Osotriazols und die Bestimmung von C-5 aus der Glykolsäure liefert, wie aus nachfolgender Tabelle hervorgeht, gut reproduzierbare Werte. Ohne Angaben von Beleganalysen ist nach ARONOFF<sup>38)</sup> die Bestimmung von C-4 + C-5 als Ameisensäure nicht zuverlässig, was unter den von uns angewandten Bedingungen nicht zutrifft.

Tab. 4. Reproduzierbarkeit einzelner C-Positionen bei verschiedenen Degradationen desselben Ausgangsmaterials

Vers. 1 und 3: Perjodatspaltung von D-Glucose-phenyl-osotriazol in der Kälte. Dauer 40 Std.  
Vers. 2: Perjodatspaltung von D-Glucose-phenyl-osotriazol in der Siedehitze. Dauer 20 Min.

Substanz	1. Vers.	2. Vers.	3. Vers.
Phenyltriazolcarbonsäure III	50.9	—	50.6
Ameisensäure (C-4 + C-5)	41.1	41.0	40.9
C-5 von Glykolsäure	4.6	—	4.9
2.4-Dinitrophenylhydrazon von H <sub>2</sub> CO (C-6)	7.8	7.9	7.5

Auf Grund der Untersuchungen führten wir eine Reihe von Hexoseabbauversuchen nach dem auf der nächsten Seite gezeigten Schema durch.

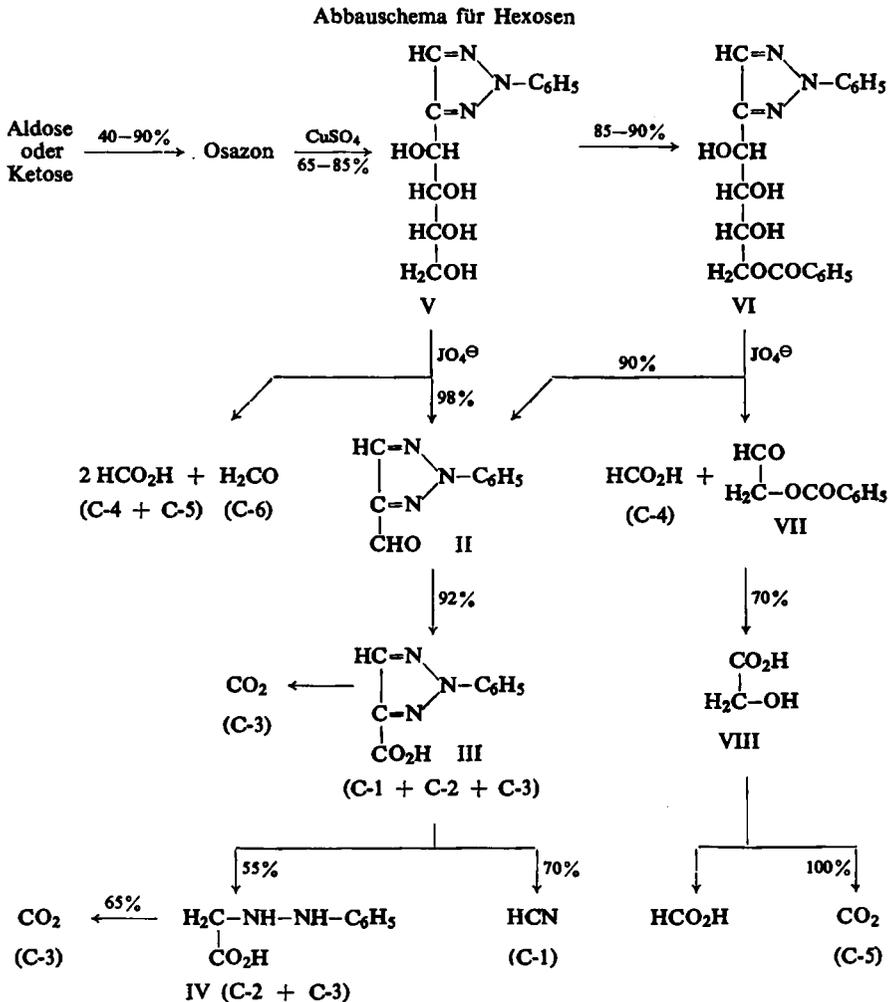
Die Hexose wird in das Osotriazol V übergeführt und ein Teil davon benzoyliert. Die Perjodatspaltung des 6-O-Benzoyl-osotriazols VI liefert C-4 als Ameisensäure. II (C-1 + C-2 + C-3) und VII (C-5 + C-6) werden oxydiert und die O-Benzoylglykolsäure anschließend verseift. VIII, Benzoesäure und III werden getrennt. Glykolsäure wird mit Cer(IV)-ammoniumsulfat zu CO<sub>2</sub> und Ameisensäure oxydiert. Das nicht benzoylierte Osotriazol (V) wird ebenfalls der Perjodatspaltung unterworfen und C-6 als Formaldehyd sowie (C-4 + C-5) als Ameisensäure bestimmt. Die auf beiden Wegen anfallenden Triazolcarbonsäuren werden vereinigt und wie bei den Pentosen angegeben, weiter abgebaut. Nach dem angegebenen Verfahren wurden 4 Glucosen und 2 Fructosen abgebaut.

Tab. 5. Prozentuale <sup>14</sup>C-Verteilung in Glucose und Fructose von Photosyntheseexperimenten

- A: Glucose, 60 Sek. Photosynthese  
B: Glucose, 60 Sek. Photosynthese unter KCN-Zusatz  
C: Fructose, 60 Sek. Photosynthese  
D: Fructose, 60 Sek. Photosynthese unter KCN-Zusatz  
E: Glucose, 6 Min. Photosynthese  
F: Glucose, 60 Sek. Photosynthese

C-Atome	A	B	C	D	E	F
1	10.3	10.8	9.5	10.8	15.2	9.8
2	7.9	8.2	7.9	8.5	14.9	6.2
3	32.0	30.5	31.0	30.3	18.6	35.0
4	34.4	32.6	37.0	32.7	27.3	36.3
5	5.8	5.4	6.0	6.2	7.1	4.7
6	7.9	8.4	9.0	8.6	14.3	7.7
Summe	98.3	95.9	100.4	97.1	97.4	99.7

<sup>38)</sup> S. ARONOFF, Techniques of Radiobiochemistry, S. 110, The Iowa State College Press, Ames Iowa 1956.



Die Zucker der Abbauprobe A–D stammen aus denselben Photosyntheseexperimenten wie die Ribulosen, deren Abbauprodukte in Tab. 1 angegeben sind.

Auch hier ist die molare Aktivität der Osotriazole V = 100% gesetzt.

Nach der Ausarbeitung und Überprüfung der Methode interessierten wir uns für einen Vergleich mit dem zum Abbau von Glucose häufig angewandten biochemischen Verfahren mit *Leuconostoc mesenteroides*<sup>13,14</sup>. Da hierbei häufig die Summe der molaren Radioaktivitäten der einzelnen C-Atome nicht gleich der Aktivität des Ausgangszuckers ist<sup>39,40</sup>, stellten wir uns insbesondere die Frage, ob alle C-Atome eine gleichmäßige Verdünnung erfahren oder ob einzelne C-Atome nach der *Leuconostoc*-Methode zu geringe Aktivität zeigen.

<sup>39</sup>) O. KANDLER, Privatmittel., und H. KAUSS, Dissertat. Univ. München 1961.

<sup>40</sup>) F. FIEDLER, Diplomarb. Techn. Hochschule München 1961 und Privatmittel.

Tab. 6. Vergleich der prozentualen  $^{14}\text{C}$ -Verteilung einer biosynthetisch gewonnenen Glucose nach der in dieser Arbeit angegebenen Methode mit dem *Leuconostoc mesenteroides*-Verfahren

C-Atom	Unsere Methode		<i>Leuconostoc</i> -Methode	
	Diese Arbeit *)	l. c. 40*)	l. c. 40**)	l. c. 39**)
1	13.5	13.8	16.0	14.8
2	11.1	8.8	10.2	11.4
3	25.8	22.6	26.2	25.6
4	29.0	24.5	28.4	27.8
5	7.2	6.7	7.7	8.4
6	11.5	9.9	11.5	12.0
Summe	98.1	86.3	100.0	100.0

\*) Die Radioaktivität der Glucose = 100% gesetzt.

\*\*\*) Die Summe der gefundenen Radioaktivitäten der einzelnen C-Atome = 100% gesetzt.

Tab. 6 zeigt eine befriedigende Übereinstimmung der beiden Verfahren. Offensichtlich sind bei der *Leuconostoc*-Methode alle C-Werte mit Ausnahme von C-1 um den gleichen Prozentsatz zu tief, falls die Summe der Einzelaktivitäten nicht gleich der Ausgangsaktivität ist.

Um einen möglichst raschen Überblick über die  $^{14}\text{C}$ -Verteilung in einer Hexose erhalten zu können, kann man das 6-O-Benzoyl-osotriazol VI in Aceton mit Permanganat zu Phenyltriazolcarbonsäure III und O-Benzoyl-glykolsäure oxydieren. Diese beiden Säuren können dann, wie beschrieben, weiter abgebaut werden. C-4 muß dann allerdings durch Differenz bestimmt werden.

Wie wir durch eine Reihe von Versuchen zeigen konnten, kann der vorstehend beschriebene Abbau für Pentosen und Hexosen auch zur Ermittlung der Tritiumverteilung in Zuckern verwendet werden, worüber in anderem Zusammenhang berichtet wird. Weiterhin sollte das Verfahren sehr gut zum Abbau von Rhamnose geeignet sein und allgemein für den partiellen Abbau von Verbindungen des Typs  $\text{R}-\text{CHX}-\text{CHOH}-\text{CHO}$  bzw.  $\text{R}-\text{CHX}-\text{CO}-\text{CH}_2\text{OH}$ , bei denen  $\text{X}=\text{H}, \text{OH}, \text{NH}_2$  oder  $\text{SH}$  ist, falls sie ein Osazon und Osotriazol darzustellen erlauben.

Die Radioaktivitätsbestimmungen wurden in Gaszählrohren durchgeführt, gleichzeitig erfolgte stets eine C-Analyse<sup>41)</sup>. Falls nötig, erfolgte die Radioaktivitätsbestimmung mit einer Antikoinzidenzanordnung (Nulleffekt eines 100-ccm-Gaszählrohres ca. 3 ipm).

Herrn Prof. Dr. F. WEYGAND danken wir für seine Unterstützung und sein Interesse, der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT für ein Stipendium und eine Sachbeihilfe, ebenso dem FONDS DER CHEMISCHEN INDUSTRIE; Frl. PFLAUMER und Herrn SALECKER für geschickte Mitarbeit und sorgfältige Durchführung der Analysen.

41) H. SIMON, H. DANIEL und J. F. KLEBE, *Angew. Chem.* 71, 303 [1959].

## BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

I. *Abbau von Ribulose- $^{14}\text{C}$* 

1. *Osazon*darstellung: Die Eluate der Papierchromatogrammflecke wurden mit 30 mg Trägerpentose versetzt und gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde mit weiteren 270 mg Träger (Ribulose, Arabinose oder Ribose) versetzt. Nach Zugabe von 1.2 ccm Glykolmonomethyläther, 3.5 ccm Eisessig und 0.78 ccm *Phenylhydrazin* (farblos) wurde 20 Min. auf 50–55° erhitzt und anschließend 30 ccm siedendes 20-proz. Äthanol zugefügt. Nach Erkalten und Nachwaschen mit verd. Essigsäure ließen sich 328 mg (50% d. Th.) Osazon vom Schmp. 164° isolieren.

Das Rohprodukt wurde mit 825 mg (2.5 mMol) reinem, nichtradioaktivem Osazon aus absol. Äthanol umkristallisiert. 970 mg. Schmp. 167°.

2. *Oso*triazolbildung: 940 mg fein pulverisiertes *Osazon* wurden in 100 ccm Wasser suspendiert (250-ccm-Dreihalskolben, Rückflußkühler, Rührer) und in einem Ölbad zum Sieden erhitzt. In die kochende Suspension wurde eine siedende Lösung von 0.785 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  in 10 ccm Wasser gegeben. Nach 15 Min. war das Osazon in Lösung gegangen. Nach insgesamt 30 Min. wurde rasch auf Raumtemperatur abgekühlt und filtriert. Mit Dowex 50  $\times$  8, 200 bis 400 mesh, in der  $\text{H}^{\oplus}$ -Form und mit Dowex 2  $\times$  8, 20–50 mesh, in der  $\text{OH}^{\ominus}$ -Form wurde vom Kupfer und von der Schwefelsäure befreit<sup>42)</sup>. Die Reaktionslösung vom pH 6–7 wurde anschließend gefriergetrocknet und der farblose, bzw. mitunter schwach bräunlich gefärbte feste Rückstand in 50 ccm reinem Chloroform aufgenommen, filtriert, i. Vak. unter Stickstoff auf 2 ccm eingengt und durch Zugabe einer Mischung von 1.5 ccm absol. Äther und 1.5 ccm n-Hexan ausgefällt. Das abgeschiedene ölige Triazol kristallisierte beim Kratzen. Ausb. 343 mg (51% d. Th.), Schmp. 65°.

Das nochmals in 2 ccm Chloroform gelöste und mit 1.5 ccm Äther + 1.5 ccm Hexan ausgefallte *Oso*triazol I (330 mg) zeigte Schmp. 67–68°.



10400 ipm/mMol

3. *Perjodatspaltung des Oso*triazols: Zu einer Lösung von 298 mg (1.27 mMol) I in 5 ccm Wasser wurden 10 ccm einer 0.35 molaren Natriummetaperjodatlösung gegeben. In kurzer Zeit bildete sich ein kristalliner Niederschlag, der nach 2 Stdn. (mehrmals umschütteln!) abgesaugt und mit wenig kaltem Wasser gewaschen wurde. Das Filtrat wurde mit 0.8 ccm Eisessig angesäuert und überschüss. Perjodat und Jodat titrimetrisch durch Zugabe von 1 m  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  zerstört. Der Endpunkt wurde am Verschwinden der Jodfärbung erkannt. (Überschuß an  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  ist zu vermeiden.) Nach erfolgter Reduktion wurde die Reaktionslösung neutralisiert. Zur Entfernung letzter Spuren von II wurde die Lösung 2mal mit 10 ccm Äther extrahiert.

Der Ätherextrakt wurde mit der Hauptmenge an II vereinigt und mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet. Anschließend wurde der Äther i. Vak. abgezogen und der erhaltene Rückstand im Vakuumexsikkator über  $\text{P}_2\text{O}_5$  getrocknet. Ausb. 204 mg (93% d. Th.) II. Schmp. 68°.

Falls nur die  $^{14}\text{C}$ -Verteilung bestimmt werden soll, kann der Aldehyd ohne Isolierung oxydiert werden.

4. *Oxydation des 2-Phenyl-triazol-aldehyds-(4) (II)*: Der Aldehyd wurde mit 185 mg NaOH, 185 mg  $\text{KMnO}_4$  und 2 ccm Wasser versetzt und 30 Min. unter mehrmaligem Umschütteln auf dem siedenden Wasserbad erhitzt. Dann wurde mit Schwefelsäure angesäuert und überschüss. Permanganat und entstandenes Mangandioxyd durch Zugabe von festem Natriumsulfit reduziert. Nach Abkühlung auf 0° wurde die ausgeschiedene, weiße Carbonsäure (III)

42) Überschuß an Kationaustauscher muß vermieden werden!

abgesaugt, mit wenig kaltem Wasser gewaschen und bei 100° getrocknet. Ausb. 204 mg (91.5% d. Th.). Schmp. 189°. Die gesamte Menge wurde aus ca. 60 ccm Wasser umkristallisiert und ergab 173 mg reine III. Schmp. 191°.

$C_9H_7N_3O_2$  (189.2) Ber. C 57.14 Gef. C 57.24

8239 ipm/mMol

5. *Bestimmung von C-5 als Formaldehyd-2.4-dinitrophenylhydrazon*: Aus der mit Äther extrahierten wäbr. Lösung von 3. wurde der Formaldehyd direkt bei 80 Torr abdestilliert. Der Salzzrückstand wurde noch 3 mal mit 10 ccm Wasser versetzt, wonach jeweils wieder abdestilliert wurde. Das in einer eisgekühlten Vorlage aufgefangene Destillat wurde mit 150 ccm einer 2.4-Dinitrophenylhydrazinlösung (3.3 g 2.4-Dinitrophenylhydrazin, 165 ccm konz. Salzsäure, 100 ccm Methanol, 735 ccm Wasser) versetzt und kurz zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlung wurde abgesaugt, gut mit Wasser gewaschen und bei 100° getrocknet. Ausb. 251 mg (94.5% d. Th.). Schmp. 161°. Nach Umkristallisieren aus 20 ccm absol. Äthanol 209 mg vom Schmp. 162°.

$C_7H_6N_4O_4$  (210.2) Ber. C 40.00 Gef. C 40.07

1319 ipm/mMol

6. *Bestimmung von C-4 durch Oxydation von Ameisensäure*: Die Oxydation der Ameisensäure erfolgte in einem 100-ccm-Zweihalskolben, der zum Auffangen des Kohlendioxyds über einen Liebig-Kühler und eine mit Trockeneis gekühlte Wasserfalle mit der spiralförmigen  $CO_2$ -Ausfrierfalle (mit flüssiger Luft gekühlt) verbunden war. Die  $CO_2$ -Ausbeutebestimmung erfolgte volumetrisch in der  $^{14}C$ -Analysen-Apparatur<sup>41</sup>).

Der bei der Destillation erhaltene trockene Salzzrückstand wurde in 30 ccm Wasser aufgenommen und mit 1.5 ccm Eisessig angesäuert. Zur Vertreibung von evtl. vorhandenem Kohlendioxyd wurde die Reaktionslösung 10 Min. am Rückfußkühler unter Durchleiten von Stickstoff gelinde zum Sieden erhitzt. Die abgekühlte Lösung wurde dann mit einer Lösung von 3 g Quecksilber(II)-acetat + 3 ccm Eisessig in 25 ccm Wasser versetzt und unter ständigem Durchleiten von Stickstoff zum Sieden erhitzt; nach weiteren 20 Min. wurde die  $^{14}CO_2$ -Falle an die  $^{14}C$ -Analysenapparatur angeschlossen. Ausb. 1.09 mMol (86% d. Th.). Radioaktivität: 955 ipm/mMol.

7. *Natriumamalgampaltung der Phenyltriazolcarbonsäure III*: 153 mg (0.81 mMol) III wurden, in 1 ccm 1 *n* NaOH und 2 ccm Wasser gelöst, mit 4.3 g 4-proz. Natriumamalgam versetzt. Die Reaktionslösung wurde 10 Min. geschüttelt, wobei eine leichte Erwärmung und Gelbfärbung zu beobachten waren. Anschließend wurden 4 mal 1 ccm Wasser abdestilliert, nachdem man der Reaktionslösung vor der Destillation jeweils 1 ccm Wasser zugesetzt hatte. Nach beendeter Reaktion wurde die inzwischen farblos gewordene Lösung so weit gekühlt, daß sie vom erstarrten Amalgam dekantiert werden konnte. Es wurde 2 mal mit wenig Wasser nachgespült. Die klare Reaktionslösung wurde auf 0° gekühlt und mit ca. 0.37 ccm konz. Phosphorsäure auf pH 4–5 angesäuert, wobei sich die *Phenylhydrazinoessigsäure* (IV) rasch abschied; sie wurde abgesaugt, mit eiskaltem Wasser gewaschen und über  $P_2O_5$  im Vakuumexsikkator getrocknet. Ausb. 69.5 mg (52% d. Th.). Schmp. 150°. Eine Umkristallisation ist meist nicht notwendig.

$C_8H_{10}N_2O_2$  (166.2) Ber. C 57.81 Gef. C 57.63

6064 ipm/mMol

8. *Isolierung von Cyanwasserstoff*: Das Filtrat von IV wurde mit 10 ccm 5-proz. Schwefelsäure versetzt und mit Wasserdampf destilliert, wobei man das Destillat in 5 ccm 1 *n* NaOH auffing. Nachdem ungefähr 60 ccm Wasser überdestilliert waren, wurde zum Destillat eine

salpetersaure  $\text{AgNO}_3$ -Lösung gegeben und kurz aufgeköcht. Das Produkt wurde gut mit Wasser gewaschen und getrocknet. Ausb. 73 mg (67.5% d. Th.).

$\text{AgCN}$  (133.9) Ber. C 8.97 Gef. C 9.07

2135 ipm/mMol

9. *Decarboxylierung der Phenylhydrazinoessigsäure IV*: 24.5 mg IV wurden in ein Bombenrohr, das auf der einen Seite eine leicht brechbare Spitze (break tip) trug, eingewogen, mit 2 ccm konz. Phosphorsäure versetzt und mit flüssiger Luft tiefgekühlt. Nach dem Evakuieren wurde die Bombe zugeschmolzen und 2 Stdn. auf  $230^\circ$  erhitzt. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde die Bombe in der  $^{14}\text{C}$ -Bestimmungsapparatur<sup>41)</sup> geöffnet. Das Kohlendioxid wurde nach Reinigung im Kupferofen volumetrisch bestimmt und anschließend ins Gaszählrohr übergeführt. Ausb. 0.092 mMol  $\text{CO}_2$  (62% d. Th.). Radioaktivität: 4102 ipm/mMol.

## II. Abbau von Fructose- bzw. Glucose- $^{14}\text{C}$

10. *Osazondarstellung*: Die Eluate der Papierchromatogrammflecke wurden mit 30 mg Trägerhexose versetzt und gefriergetrocknet.

Der Rückstand wurde mit 540 mg (3 mMol) Fructose (Glucose) versetzt. Nach Zugabe von 1.8 ccm Methylcellosolve und 0.6 ccm Eisessig wurde das Reaktionsgemisch auf  $80^\circ$  erwärmt. Dann wurden 1.2 ccm frisch dest. Phenylhydrazin (farblos) zugegeben und die Lösung weitere 45 Min. auf dem siedenden Wasserbad erhitzt. Die Reaktionsmasse wurde vor dem Absaugen mit 25 ccm Wasser gut durchgearbeitet. Das Osazon wurde 2mal mit je 3 ccm 10-proz. Essigsäure und 2mal mit 5 ccm Wasser gewaschen, sodann in der gerade nötigen Menge Methanol zu einem Brei aufgeschlämmt, abgesaugt und 2mal mit 3 ccm Äther gewaschen. Das erhaltene hellgelbe Osazon wurde bei  $100^\circ$  getrocknet. Ausb. 970 mg (90% d. Th.). Schmp.  $208^\circ$ .

Analog wird mit Glucose verfahren. Ausb. ca. 70%.

$\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_4$  (358.4) Ber. C 60.32 Gef. C 60.31

11. *Phenyl-osotriazol (V)*: 1.32 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  wurden in 94 ccm Wasser gelöst und mit 0.94 g (2.62 mMol) Phenyllosazon versetzt (Dreihalskolben, Rührer, Rückflußkühler, Ölbad  $120$ – $130^\circ$ ). Unter ständigem Rühren wurde die wäßr. Suspension zum Sieden erhitzt, wobei man bei zu starkem Schäumen etwas Entschäumer zusetzte. Nach zwei Stdn. wurde mit etwas Aktivkohle versetzt und siedend heiß abfiltriert. Aus dem hellgrünen Filtrat kristallisierte V aus. Nach Kühlung wurde abgesaugt, gut mit Eiswasser gewaschen und bei  $100^\circ$  getrocknet. Ausb. 449 mg = 1.7 mMol (65% d. Th.). Es wurde aus Wasser unter Zusatz von Aktivkohle umkristallisiert, wobei 370 mg V in langen, feinen, farblosen Kristallen ausfielen. Schmp.  $194^\circ$ .

$\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_4$  (265.3) Ber. C 54.33 Gef. C 54.46

37958 ipm/mMol

12. *Perjodatspaltung des Osotriazols*: 64 mg (0.25 mMol) V, 201 mg (0.94 mMol)  $\text{NaJO}_4$  und 6 ccm Wasser wurden 20 Min. am Rückflußkühler unter Magnetrührung auf dem siedenden Wasserbad der Perjodatspaltung unterworfen. Die auf  $0^\circ$  abgekühlte Reaktionslösung wurde weiter aufgearbeitet, wie beim Pentoseabbau beschrieben (vgl. Nr. 3–6).

13. *6-O-Benzoyl-osotriazol (VI)*: 265 mg (1 mMol) V wurden in 3 ccm absol. Pyridin unter Erwärmen gelöst und auf  $0^\circ$  abgekühlt. Zu dieser Lösung wurde tropfenweise unter starker Magnetrührung 1 ccm einer Lösung von frisch dest. Benzoylchlorid (1.1 mMol) in absol. Pyridin (1.546 g/10 ccm absol. Pyridin) gegeben. Das Reaktionsgemisch wurde noch 2 Stdn. bei  $0^\circ$  (Eis/Wasser-Kühlung) gerührt, über Nacht bei  $0^\circ$  aufbewahrt und dann in 12 ccm Eiswasser gegossen. Das zunächst ölig ausgeschiedene Produkt kristallisierte bald. Es wurde

abgesaugt, gut mit Wasser gewaschen, und aus 50 ccm 60-proz. Äthanol umkristallisiert. Ausb. 321 mg (87% d. Th.). Schmp. 154–156°.

$C_9H_{19}N_3O_5$  (369.4) Ber. C 61.78 Gef. C 61.81

14. *Perjodatspaltung des 6-O-Benzoyl-osotriazols (VI)*: 300 mg (0.81 mMol) VI wurden unter starkem Rühren mit einer heißen Perjodatlösung (30 ccm Wasser + 428 mg  $NaJO_4$ ) versetzt und 10 Min. auf dem siedenden Wasserbad erhitzt. Anschließend wurde die Reaktionslösung schnell auf 0° abgekühlt und von den farblos kristallin ausgeschiedenen Aldehyden abgesaugt. Die mit 1 n NaOH gegen Bromthymolblau neutralisierte Reaktionslösung wurde 2 mal mit 20 ccm Äther extrahiert und der gelöste Äther durch kurzes Erwärmen auf dem siedenden Wasserbad entfernt. Die wäbr. Perjodatlösung kann dann direkt zur Bestimmung der Ameisensäure aus C-4 mit  $Hg^{II}$ -Salz zu  $CO_2$  oxydiert werden, wie unter 6. beschrieben. Ätherextrakt und Aldehydgemisch wurden vereinigt und gut mit Natriumsulfat getrocknet.

15. *Oxydation von 2-Phenyl-triazol-aldehyd-(4) (II) und O-Benzoyl-glykolaldehyd (VII)*: Die mit Natriumsulfat getrocknete äther. Aldehydlösung (ca. 0.8 mMol II und VII) wurde i. Vak. eingeeengt. Der trockene Rückstand wurde in 15 ccm Aceton p. a. gelöst und bei Raumtemperatur im geschlossenen Kolben mit 210 mg Kaliumpermanganat unter ständigem Rühren oxydiert. Nach 90 Min. wurde das Aceton i. Vak. abgezogen. Der braune Rückstand wurde mit 20 ccm Äther und 15 ccm eiskalter 10-proz. Schwefelsäure versetzt und solange Natriumsulfat zugegeben, bis das Mangandioxyd reduziert war. Anschließend wurde die wäbr. Lösung noch 2 mal mit 15 ccm Äther extrahiert. Nach Vereinigung der äther. Lösungen und Trocknen mit  $Na_2SO_4$  wurde der Äther i. Vak. abgezogen.

16. *Verseifung der O-Benzoyl-glykolsäure und Trennung von Glykolsäure (VIII), Phenyltriazolcarbonsäure (III) und Benzoessäure*: Der Ätherrückstand, bestehend aus III und O-Benzoyl-glykolsäure, wurde in 6 ccm 1 n NaOH aufgenommen und zur Verseifung 1 Stde. am Rückflußkühler auf dem siedenden Wasserbad erhitzt. Die mit halbkonz. Schwefelsäure angesäuerte Reaktionslösung wurde in Eis/Wasser gekühlt und dann von der ausgeschiedenen III und Benzoessäure abgesaugt. Das Filtrat wurde 3 mal mit Äther extrahiert. Die wäßrige Lösung wurde zur Vertreibung gelösten Äthers zum Sieden erhitzt und zur weiteren Oxydation der Glykolsäure aufbewahrt.

Die Phenyltriazolcarbonsäure III und Benzoessäure wurden mit den Ätherextrakten vereinigt und der Äther i. Vak. abdestilliert. Der Rückstand wurde aus 45 ccm Wasser umkristallisiert, wobei die Benzoessäure vollständig in Lösung blieb. Nach Kühlung auf 0° wurde die in langen, farblosen Kristallen ausgeschiedene III abgesaugt, mit wenig eiskaltem Wasser gewaschen und bei 100° getrocknet. Ausb. 119 mg (79% d. Th.). Schmp. 191°.

$C_9H_7N_3O_2$  (189.2) Ber. C 57.13 Gef. C 57.13

17. *Bestimmung von C-5 durch Oxydation der Glykolsäure*: Die bei der Verseifung erhaltene wäbr. Glykolsäurelösung wurde in der Versuchsanordnung, wie sie bei der Ameisensäure-Oxydation mit Quecksilberacetat beschrieben wurde (vgl. unter 6.), mit 5 ccm 5-proz. Schwefelsäure und 20 ccm einer Cer(IV)-ammoniumsulfatlösung (12.7 g/15 ccm konz. Schwefelsäure + 85 ccm Wasser) versetzt und 1 Stde. im Stickstoffstrom zum Sieden erhitzt. Ausb. 0.51 mMol (64% d. Th., bez. auf 0.8 mMol eingesetztes VI).

18. *Permanganatoxydation des 6-O-Benzoyl-osotriazols (VI)*: 369 mg (1 mMol) VI wurden in 25 ccm Aceton p. a. gelöst und mit 395 mg  $KMnO_4$  versetzt. Die Reaktionslösung wurde 1½ Stdn. bei Raumtemperatur gerührt und anschließend das Aceton i. Vak. abdestilliert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte, wie unter 15. beschrieben. Die Ausb. an III betrug 142 mg (75% d. Th.).

Die wäbr. Glykolsäurelösung wurde, wie unter 17. angegeben mit Cer(IV) oxydiert und ergab eine  $CO_2$ -Ausbeute von 0.567 mMol (57% d. Th., bez. auf VI).