

a) Dihydropteridin VII. Die Aufnahme von Wasserstoff betrug 0,95 Mol/Mol in 0,1N NaOH oder in  $\text{CH}_3\text{COOH}$  mit Pd als Katalysator. Die gelbe Farbe und die gelblichgrüne Fluoreszenz der Lösung verschwanden während der Hydrierung. Bei Stehenlassen an der Luft traten Farbe und Fluoreszenz wieder auf und das Ausgangsmaterial VII liess sich nachweisen. Mit Platin als Katalysator verläuft die Hydrierung sehr langsam und dauert länger als 48 Std.

b) Pteridin IX. In 0,1N NaOH mit Pd betrug die Aufnahme von Wasserstoff 1,8 Mol/Mol. Zu Beginn der Hydrierung wird die Lösung gelb, und diese Farbe bleibt, bis die Reduktion beendet ist. Gegen Schluss der Hydrierung verschwinden die gelbe Farbe und die gelblichgrüne Fluoreszenz. Bei Stehenlassen an der Luft treten beide wieder auf. In der wieder oxydierten Lösung lässt sich das Dihydropteridin VII leicht nachweisen. Die Hydrierung mit Pt als Katalysator gelang nicht.

#### SUMMARY

The reaction of cyanide ion with reduced 2-amino-6-hydroxy-pteridine yields 2-amino-6-hydroxy-dihydro-pteridine-8-carboxamide. Evidence is presented that the hydrogens are in the 7 and 10 positions. They can be readily removed by a number of mild oxidizing agents.

Austin, Zoological Department, University of Texas, USA  
Zürich, Organisch-chemisches Institut der Universität

## 129. Nachweis kleiner Mengen Trehalose und verwandter Zucker in einem Gemisch

von M. Wyss-Huber, Herb. Jäger und Ek. Weiss

(14. IV. 60)

Im Zusammenhang mit Untersuchungen über den Trehalosegehalt von Organen der Tsetsefliege<sup>1)</sup> erwies es sich als notwendig, eine Methode zur Bestimmung möglichst aller in diesen Organen vorhandenen Zucker auszuarbeiten. Nach dem von WYATT & KALF<sup>2)</sup> benützten Verfahren werden enzymatisch mit Trehalase, Gluco-seoxydase, Peroxydase und o-Dianisidin<sup>3)</sup> nur Trehalose und Glucose nachgewiesen. EVANS & DETHIER<sup>4)</sup> trennten und identifizierten Zucker aus Insektenhämolymph papierchromatographisch unter Nachweis der Zucker nach einer Modifikation der Silbermethode von TREVELYAN *et al.*<sup>5)</sup>. Quantitative Bestimmungen der Zucker führten sie mit Hilfe der Anthronreaktion<sup>6)</sup> durch. Für ihre Methode wird jedoch mehr Material benötigt, als es in unserem Falle zu erwarten war. Da uns nur sehr wenig Material mit einem sehr geringen, in seiner Zusammensetzung noch unbekanntem Zuckergehalt zur Verfügung steht (2–20  $\gamma$  Trehalose pro 100 mg Gewebe<sup>1)</sup>), ist

<sup>1)</sup> R. GEIGY, M. HUBER, D. WEINMANN & G. R. WYATT, *Acta tropica* 16, 255 (1959). – Diese Arbeiten werden vom SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS subventioniert.

<sup>2)</sup> G. R. WYATT & G. F. KALF, *J. gen. Physiol.* 40, 833 (1957).

<sup>3)</sup> A. ST. HUGGETT & D. A. NIXON, *Biochem. J.* 66, 12 (1957).

<sup>4)</sup> D. R. EVANS & V. G. DETHIER, *J. Insect Physiol.* 1, 3 (1957).

<sup>5)</sup> W. E. TREVELYAN, D. P. PROCTER & J. S. HARRISON, *Nature* 166, 444 (1950).

<sup>6)</sup> R. J. DIMLER, W. C. SCHAEFER, C. S. WISE & C. E. RIST, *Analyt. Chemistry* 24, 1411 (1952).

es notwendig, ohne Vorversuche in einem einzigen Papierchromatogramm möglichst alle vorhandenen Zucker erfassen zu können.

Zur Ausarbeitung einer diesen Anforderungen entsprechenden Methode wurde ein Gemisch von Glucose, Fructose, Galaktose, Maltose, Trehalose, Lactose und Saccharose verwendet. An Lösungsmittelsystemen wurden geprüft:

1. *sek.-Butanol gesättigt mit Wasser*<sup>2)</sup>. Laufzeit 48 Std. Nur Lactose liess sich abtrennen. Die übrigen Zucker wurden in zwei Gruppen aufgetrennt: a) Fructose – Glucose – Galaktose – Saccharose; b) Maltose – Trehalose. Zusatz von 1% NH<sub>3</sub> ergibt etwas schärfere Flecke, jedoch keine bessere Trennung.

2. *n-Butanol-Äthanol-Wasser-NH<sub>3</sub>-(45:5:49:1)*<sup>7)</sup>. Laufzeit 100 Std. Ausser Maltose-Trehalose werden alle erwähnten Zucker getrennt. Bei der langen Laufzeit resultieren jedoch ziemlich ausgedehnte Flecke, wodurch der Nachweis weniger empfindlich wird.

3. *Dimethylformamid-n-Butanol-Wasser-(1:4:1)*. (Modifikation des von CRAMER & STEINLE<sup>8)</sup> angegebenen Systems Dmf-Bu-W-(1:2:1)<sup>9)</sup>). Laufzeit 24 Std. Dieses System gibt sehr gute Resultate; einzig Trehalose und Maltose werden nicht getrennt. Die Tabelle gibt die R<sub>G</sub>-Werte der verwendeten Zucker in diesem System.

$$R_G = \frac{\text{Entfernung des Zuckers X vom Startpunkt}}{\text{Entfernung von Glucose vom Startpunkt}}$$

Zucker	R <sub>G</sub> -Werte				R <sub>G</sub> -Mittelwert
Lactose	0,45	0,44	0,46	0,49	0,46
Maltose	0,58	0,59	0,57	0,59	0,58
Trehalose	0,63	0,63	0,59	0,61	0,61
Saccharose	0,75	0,76	0,77	0,81	0,77
Glucose	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Galaktose	0,90	0,92	0,91	0,91	0,91
Fructose	1,09	1,11	1,16	1,11	1,12
R <sub>G</sub> -Werte im System Dmf-Bu-W-(1:4:1)					

Zum Nachweis der Zucker auf dem Papierchromatogramm waren Perjodat-Benzidin<sup>10)</sup>, Perjodat-fuchsinschweflige Säure, Bleitetraacetat<sup>11)</sup> und Silbernitrat<sup>5)</sup> zu unempfindlich und zu wenig zuverlässig. Gleichmässige Resultate lieferte der Nachweis mit Perjodat-KMnO<sub>4</sub> nach LEMIEUX & BAUER<sup>12)</sup>. Glucose, Galaktose, Fructose, Lactose und Maltose liessen sich damit in Mengen von 5 γ nachweisen, während von Trehalose und Saccharose mindestens 20 γ notwendig waren. Noch geeigneter für den Nachweis der reduzierenden Zucker und von Saccharose war das Reagens von PARTRIDGE<sup>13)</sup> (Anilinphtalat in wässrigem Butanol) bei Zusatz von 6%

<sup>7)</sup> S. M. PARTRIDGE, *Biochem. J.* **42**, 238 (1948).

<sup>8)</sup> F. CRAMER & D. STEINLE, *Liebigs Ann. Chem.* **595**, 81 (1955).

<sup>9)</sup> Erklärung der Abkürzungen im experimentellen Teil.

<sup>10)</sup> J. A. CIFONELLI & F. SMITH, *Analyt. Chemistry* **26**, 1132 (1954); H. T. GORDON, W. THORNBERG & L. N. WERUM, *ibid.* **28**, 849 (1956); D. F. MOWERY, *ibid.* **29**, 1560 (1957).

<sup>11)</sup> J. G. BUCHANAN, C. A. DEKKER & A. G. LONG, *J. chem. Soc.* **1950**, 3162.

<sup>12)</sup> R. U. LEMIEUX & H. F. BAUER, *Analyt. Chemistry* **26**, 920 (1954).

<sup>13)</sup> S. M. PARTRIDGE, *Nature* **164**, 443 (1949).

sirupöser Phosphorsäure. Im Papierchromatogramm liessen sich damit je 0,5  $\gamma$  von Glucose, Galaktose, Lactose, Maltose und Saccharose und 1  $\gamma$  von Fructose deutlich als fluoreszierende Flecke auffinden. Spezifisch auf Fructose erwies sich Vanillin-Perchlorsäure<sup>14)</sup>, wobei noch 1–2  $\gamma$  als graublauer Fleck nachweisbar waren. Die andern erwähnten Zucker gaben in Mengen von 20  $\gamma$  den Test nicht<sup>15)</sup>.

Da es in keinem der geprüften Lösungsmittelsysteme möglich war, Maltose und Trehalose voneinander zu trennen, und da zudem der Nachweis der Trehalose in Mengen von 2  $\gamma$  mit den erwähnten Reaktionen nicht gelang, wurde aus einem Papierchromatogramm der oben erwähnten sieben Zucker im System 3 die den vier Disacchariden entsprechende Zone ausgeschnitten, mit Methanol-Wasser-(1:1) eluiert und der im Vakuum getrocknete Eindampfrückstand der Eluate mit Trehalase behandelt. Das Ferment war nach der Vorschrift von KALF & RIEDER<sup>16)</sup> aus verpuppungsbereiten *Galleria*-Raupen isoliert worden. Es zeigte sich in Vorversuchen gegen die drei oben erwähnten Disaccharide ausser Trehalose vollkommen inaktiv, während Trehalose vollständig in Glucose gespalten wurde. Durch Zusatz von Dimethylformamid zur Fermentierungslösung wurde das Enzym nicht gehemmt. Nach der Fermentierung wurde das Zuckergemisch erneut papierchromatographisch geprüft und die gebildete Glucose nachgewiesen. Bis zu 2  $\gamma$  Trehalose waren auf diese Weise noch eindeutig als Glucose feststellbar. Die restlichen Disaccharide können mit PARTRIDGE-Reagens unter Zusatz von 6%  $H_3PO_4$  in Mengen von 1  $\gamma$  nachgewiesen werden.

Zusätzlich wurde versucht, die sieben Zucker mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie<sup>17)</sup> zu trennen. Von allen geprüften Systemen (n-Butanol-Wasser, sek.-Butanol-Wasser, Äthanol-Wasser, Isopropanol-Wasser, Aceton-Wasser, n-Butanol-Eisessig-Wasser) ergab nur sek.-Butanol-Wasser für Glucose und Trehalose annehmbare Resultate; Rf-Werte: Glucose 0,5, Trehalose 0,3. Ein Gemisch aller sieben Zucker liess sich jedoch nicht trennen. Der Nachweis von Trehalose mit Perjodat- $KMnO_4$  ohne Trehalase-Behandlung ist auf der Silicagelplatte bedeutend empfindlicher, indem schon 5  $\gamma$  deutlich sichtbar werden.

Wir danken Herrn Prof. Dr. R. GEIGY für die Anregung zu dieser Arbeit und die Überlassung des Themas. Herrn Prof. Dr. T. REICHSTEIN sind wir für sein stetes Interesse an diesen Untersuchungen und für zahlreiche wertvolle Ratschläge zu Dank verpflichtet.

**Experimentelles.** – Es werden folgende Abkürzungen benützt: Alk = Äthanol, An = Aceton, Bu = n-Butanol, Chf = Chloroform, Dmf = N,N-Dimethylformamid, Me = Methanol, W = Wasser, Pchr = Papierchromatogramm.

Als Papier wurde WHATMAN N<sup>o</sup> 1 verwendet. Um Störungen der Nachweisreaktionen durch Papierverunreinigungen zu vermeiden, wurde das Papier zuerst je ca. 6 Std. mit W, Me und Chf gewaschen und anschliessend staubfrei aufbewahrt.

Für System 1 wurde das Papier vor dem Auftragen der Substanzen mit An-W-(1:1) imprägniert und vor dem Einhängen in den Trog bis zu einer Gewichtszunahme von 50% getrocknet. Bei den anderen beiden Systemen waren die Resultate mit unimprägniertem Papier besser. Auf

<sup>14)</sup> A. P. MAC LENNAN, H. M. RANDALL & D. W. SMITH, *Analyt. Chemistry* 31, 2020 (1959).

<sup>15)</sup> Dieses Reagens wurde für den Nachweis von 2-Desoxyzuckern verwendet, ist aber auch sehr empfindlich auf 2-Ketozucker. So konnten damit ebenfalls 1–2  $\gamma$  Sorbose und Tagatose im Papierchromatogramm nachgewiesen werden.

<sup>16)</sup> G. F. KALF & S. V. RIEDER, *J. biol. Chemistry* 230, 691 (1958).

<sup>17)</sup> M. BARBIER, HORST JÄGER, H. TOBIAS & E. WYSS, *Helv.* 42, 2440 (1959); weitere Literatur daselbst.

ein 12 cm breites Papier wurde auf der Mitte der Startlinie das zu prüfende Zuckergemisch (höchstens 20  $\gamma$  pro Zucker) aufgetragen und rechts und links davon im Abstand von 3,0 cm ein Gemisch von je 20  $\gamma$  der sieben Zucker. Nach 24 Std. Entwicklung im System 3 wurde das Pchr ca. 1 Std. bei 70° getrocknet, dann der Mittelstreifen mit dem Testgemisch herausgeschnitten und die beiden Randstreifen mit Perjodat-KMnO<sub>4</sub>-Reagens besprüht. Die mit Hilfe der Randstreifen bestimmte Zone der Hexosen im Mittelstreifen wurde durch PARTRIDGE-Reagens<sup>18)</sup> + 6% sirupöse Phosphorsäure durchgezogen<sup>18)</sup>, ca. 3–5 min bei 110° unter Kontrolle getrocknet, bis Glucose, Galaktose und Fructose im UV.-Licht als fluoreszierende Flecke feststellbar waren. Die Zone der Disaccharide wurde ausgeschnitten und viermal mit je 1,5 ml Me-W-(1:1) eluiert. Die vereinigten Eluate wurden im Vakuum zur Trockne eingedampft und zur vollständigen Entfernung des Dmf noch einmal 30 min bei 60° im Hochvakuum getrocknet. Der getrocknete Zuckerrückstand (mit maximal 20  $\gamma$  Trehalose) wurde in 0,08 ml 0,1 M Acetatpuffer (pH 5,5) gelöst, mit 0,02 ml Trehalaselösung versetzt und 8–12 Std. bei 37° fermentiert. Danach wurde das fünffache Volumen Alk zugegeben, leicht erwärmt, das ausgefällte Ferment abfiltriert und mit wenig Alk nachgewaschen. Die Alkohollösung wurde eingeeengt, quantitativ auf ein zweites Pchr übertragen und analog wie oben beschrieben chromatographiert. Das Vorhandensein von Glucose (aus Trehalose), Maltose, Lactose und Saccharose wurde dann wie oben beschrieben festgestellt.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Es wird eine Methode zum Nachweis von je 0,5  $\gamma$  Glucose und Galaktose, je 1  $\gamma$  Fructose, Maltose, Lactose und Saccharose und 2  $\gamma$  Trehalose in einem Gemisch dieser sieben Zucker beschrieben.

Schweizerisches Tropeninstitut, Basel, und  
Organisch-chemische Anstalt der Universität Basel

<sup>18)</sup> Das Gemisch wurde vor Gebrauch jeweils frisch hergestellt.

### 130. Radiometrische Mikromethode zur quantitativen Bestimmung von Metall-Ionen

von Ernst Schumacher und Walter Friedli

(14. IV. 1960)

#### Grundlagen

1. Wir berichten über eine analytische Methode für  $< \mu\text{g}$ -Mengen von Metallen, die von der folgenden Überlegung ausgeht: Das zu analysierende Metall-Ion M, Konzentration  $[M]_t$ , wird mit einer «gewichtlosen» Menge M\* eines radioaktiven Isotops versetzt. Dann gibt man einen Liganden L zu, wobei  $[L]_t < [M]_t$ . Damit wird M teilweise in den Komplex ML überführt, der vom überschüssigen M unter bestimmten Bedingungen abgetrennt werden kann. Bei bekannter Konzentration  $[L]_t$  und Stöchiometrie der Komplexbildung wird  $[M]_t$  aus den folgenden Beziehungen erhalten:

Das unter identischen geometrischen Bedingungen gemessene Radioaktivitätsverhältnis

$$Q \equiv [M]/[ML] \quad (1)$$