

Die in Tabelle 1 angegebenen Werte sind Mittel aus 2 Abbauversuchen. Die spez. Aktivität der Glutaminsäure betrug 31400 Impulse/min/mg C und unter Berücksichtigung der etwa 35fachen Verdünnung durch Träger $1,09 \times 10^6$ Impulse/min/mg C.

C. *Bestimmung von Serindehydrataseaktivität in Meerschweinchenleber.* Meerschweinchenleber wurde in 0,1M Na-Phosphatpuffer pH 7,4 mit einem Glashomogenisator zerkleinert und 30 Min. bei 1500 g zentrifugiert. Die Hälfte des Überstehenden wurde 5 Min. im kochenden Wasserbad erhitzt und nachher von den ausgefallenen Proteinen abzentrifugiert. Sämtliche Ansätze enthielten 1 ml erhitztes oder nicht erhitztes Überstehendes, 1 ml 0,1M Na-Phosphatpuffer pH 7,4, Pyridoxalphosphat 10^{-4} M und Adenosintriphosphat 10^{-3} M. Die Ansätze mit Serin wiesen eine Aminosäurekonzentration von $1,6 \times 10^{-2}$ M auf. Das Volumen pro Ansatz betrug 4 ml. Die Inkubation erfolgte unter Vakuum in THUNBERG-Röhrchen bei 38° während 30 min. Pyruvat wurde nach FRIEDEMANN & HAUGEN bestimmt²⁸⁾.

Diese Arbeit wurde durch einen Fonds der ELI LILLY AND COMPANY ermöglicht, der wir für ihre Unterstützung bestens danken möchten.

SUMMARY

Slices of guinea-pig liver were incubated in the presence of glycine-[2-¹⁴C] and glutamine. The distribution of radioactivity among the different carbon atoms of the isolated glutamine is consistent with the view that glycine is metabolized *via* serine and pyruvic acid. Direct conversion of serine to pyruvic acid in guinea-pig liver is also shown to take place.

Biochemisches Institut der Universität, Zürich

²⁸⁾ TH. E. FRIEDMANN & G. E. HAUGEN, J. biol. Chemistry 147, 415 (1943).

10. Eine einfache Methode zur Bestimmung von ³⁵S in biologischem Material

von K. Schmid

(15. XI. 60)

1. Einleitung. – Bei weichen β -Strahlern, wie dem Radioschwefel (³⁵S), muss bei Radioaktivitätsmessungen der Selbstabsorption Rechnung getragen werden. Die Messproben müssen daher in gleichwertiger, wohldefinierter Form vorliegen. Für exakte Bestimmungen wird mit Vorteil Barium- oder Benzidinsulfat verwendet. Zur Oxydation des Schwefels stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung. Die Oxydation nach CARIUS¹⁾, wobei die Probe mit Salpetersäure-Perchlorsäure nass verascht wird, liefert zuverlässige Werte, ist aber speziell bei fettreichem biologischem Material sehr zeitraubend²⁾ und erfordert häufige Überwachung. Die elegante Kolbenverbrennung nach SCHÖNIGER³⁾ ist vorwiegend für kleine Substanzmengen geeignet und daher bei biologischen Proben nicht immer befriedigend.

1) S. S. WALKENSTEIN & C. M. KNEBEL, Analyt. Chemistry 29, 1516 (1957); G. A. NEČJEVA, Biochimija 21, 723 (1956); J. KATZ & S. B. GOLDEN, J. Lab. clin. Med. 53, 658 (1959).

2) K. H. MENKE, Z. Tierernährung Futtermittelkunde 12, 135 (1957).

3) W. SCHÖNIGER, Microchim. Acta 1956, 869; A. HABERSBERGEROVÁ-JENÍČKOVÁ & J. ČÍFKA, Coll. czechoslov. chem. Comm. 24, 3777 (1959).

Bei Stoffwechsel-Untersuchungen von ^{35}S -p-Butoxyphenyl-p-dimethylaminophenyl-thioharnstoff (DPT)⁴⁾ und ^{35}S -Sulfaphenazol⁵⁾ führten wir in unserem Laboratorium eine grosse Zahl von ^{35}S -Bestimmungen in den verschiedensten biologischen Materialien von stark unterschiedlichen Aktivitäten aus. Als einfachste und zuverlässigste Aufschlussmethode erwies sich dabei der Bombenaufschluss nach WURZSCHMITT⁶⁾. Die Substanzeinwaage, die bis zu 500 mg betragen kann, wird in einer Nickelbombe mit Natriumperoxyd gemischt und durch Anheizen von aussen gezündet. Die erkaltete Schmelze wird ausgelaugt und das gelöste Sulfat, eventuell nach Trägerzusatz, in die entsprechende Fällungsform übergeführt. Nach Abfiltrieren, Trocknen und Auswägen des Niederschlages werden Plättchen «unendlich» dicker Schicht hergestellt, deren Radioaktivität mit einem dünnwandigen Endfenster-Durchflusszählrohr bestimmt wird.

2. ^{35}S -Bestimmung. – 2.1. *Einwaage:* Bei festen Proben wie organischen Substanzen oder Trockenpulvern biologischer Proben (lyophilisiertes Blut, Gewebe- und Organhomogenate usw.) werden bis zu maximal 500 mg oder 1 mmol S direkt in die Aufschlussbombe⁷⁾ eingewogen. Bei Harn, anderen Körperflüssigkeiten oder Homogenaten wird eine entsprechende abgemessene Menge direkt in ein kleines, aus dünner Aluminiumfolie hergestelltes Nöpfchen gebracht und im Hochvakuum eingetrocknet. Die so erhaltenen Trockenrückstände werden mit dem Aluminiumnöpfchen zusammen verascht. Bei feuchten Proben ist es notwendig, die Einwaage vor Zugabe des Natriumperoxydes mit wenig pulverisiertem Natriumcarbonat zu überdecken, um eine vorzeitige Reaktion zu vermeiden.

2.2. *Aufschluss:* Zur Einwaage gibt man 160–180 mg Äthylenglykol (6 Tropfen) und überschichtet mit 5–10 g feinkörnigem Natriumperoxyd. Bei heftig reagierenden Substanzen ist es von Vorteil, das Peroxyd mit einer dünnen Lage Natriumcarbonat zu überschichten, um ein Festkleben des Deckels durch die Schmelze zu verhindern. Dieses Vorgehen ist besonders auch bei Anwendung der Aluminiumnöpfchen notwendig. Die verschlossene Bombe wird durch Anheizen mit einer kleinen Stichflamme gezündet. Durch die von WURZSCHMITT⁶⁾ vorgeschlagene Beimischung von Äthylenglykol erfolgt die Zündung bereits bei 56°. Sie zeigt sich an durch Orangefärbung der Flamme und durch Aufglühen des Bombenbodens. Die Bombe kann praktisch sofort darnach durch Eintauchen in Eiswasser abgekühlt werden. Man entfernt den Schraubverschluss und spült den Deckel und Dichtungsring der Bombe mit 30 ml Wasser ab, die Bombe selbst wird unter Umschwenken in dieses Spülwasser gebracht. Nach der kräftig einsetzenden Zersetzung wird das überschüssige Peroxyd durch kurzes Erhitzen zerstört. Anschliessend wird die Bombe aus der Lösung genommen und mit 25 ml Wasser abgespült.

Bei biologischen Proben, die in der Regel nur Spuren von Schwefel enthalten, werden 2 ml 1N Schwefelsäure als Träger zugefügt. Darauf wird die Lösung mit 20-proz. Salzsäure schwach angesäuert (Methylorange), heiss durch ein Hartfilter abfiltriert und das Filter dreimal mit je 5 ml heissem Wasser nachgewaschen. Gelegentliche Grünfärbung des Filtrates rührt von in Lösung gegangenen Nickelsalzen her. Kohleteilchen auf dem Filter sind für die Bestimmung ohne Einfluss, dagegen ist der Aufschluss unbrauchbar, falls die Lösung braun gefärbt ist.

2.3. *Fällung und Filtration:* Das klare, schwach salzsaure Filtrat des Aufschlusses wird zum Sieden erhitzt und unter Umschwenken tropfenweise mit 5 ml Bariumchloridlösung (100 mg $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}/\text{ml}$) versetzt. Nach 12stündigem Stehenlassen wird der Niederschlag auf eine gewogene Glasfilternutsche (G4) abfiltriert, mit 20 ml heissem Wasser und zum Schluss mit Alkohol und Äther nachgewaschen. Die Nutsche wird 30 Min. im Trockenschrank bei 120° getrocknet, 20 Min. im Exsiccator erkalten gelassen und gewogen.

4) K. SCHMID & J. TRIPOD, *Leprosy Review* 30, 85 (1959).

5) K. SCHMID, J. TRIPOD & F. GROSS, *Klin. Wschr.* 38, 862 (1960); W. PADOWETZ, K. SCHMID & J. DRUEY, *Helv.* 44, 89 (1961).

6) B. WURZSCHMITT, *Mikrochemie* 36/37, 769 (1951).

7) Bomben, Verschluss und Sicherheitsofen zu beziehen von JANKE & KUNKEL, Staufen i. Br., Deutschland.

2.4. *Herstellung der Messproben:* Für die Radioaktivitätsbestimmung werden vom Bariumsulfat-Niederschlag 150 mg in ein Schälchen aus rostfreiem Stahl eingewogen und mit einem dazu passenden Stempel unter Rotieren fest gepresst. Die auf diese Weise erhaltenen Bariumsulfatplatten sind von sog. «unendlich» dicker Schicht (40 mg/cm^2), so dass die Selbstabsorptionskorrektur wegfallen kann. Die gemessene Radioaktivität wird nach entsprechenden Korrekturen für den Blindwert sowie den Aktivitätsabfall auf Grund der Halbwertszeit unter Berücksichtigung der gefundenen Menge Niederschlag auf die Einwaage umgerechnet.

3. *Diskussion der analytischen Methoden.* – Die Reproduzierbarkeit und Genauigkeit der analytischen Methoden sowie der radiochemischen Messungen wurde mit Hilfe der nachfolgend beschriebenen ^{35}S -markierten Substanzen überprüft. Die Ergebnisse sind in der Tabelle wiedergegeben. Zur Analyse der ^{35}S -Schwefelsäure wurden reine wässrige Lösungen von titrimetrisch bestimmtem Gehalt ohne Aufschluss direkt gefällt und ausgezählt.

Prüfung der gravimetrischen und der radiochemischen S-Bestimmungsmethode

	Präparat ^{a)}	Anzahl Bestimmungen	BaSO ₄ gef. in % der Th.	ipm/mg
1	$^{35}\text{S}\text{-H}_2\text{SO}_4$	12	$99,8 \pm 0,5$	1546 ± 17
2	$^{35}\text{S}\text{-DPT}^{\text{b)}$	18	$99,2 \pm 0,7$	3942 ± 51
3	$^{35}\text{S}\text{-Sulfaphenazol}$	22	$99,4 \pm 0,6$	2463 ± 29
4	$^{35}\text{S}\text{-Sulfaphenazol} + \text{biol. Material}^{\text{c)}$	24	$99,6 \pm 0,9$	2471 ± 37

a) Einwaage: 0,5 bis 1,0 mMol.
 b) DPT = p-Butoxyphenyl-p-dimethylaminophenyl-thioharnstoff.
 c) Je 4 Analysen mit Zusatz von Blut, Kot, Harn, Leber, Lunge oder Niere (100–300 mg).

Zur Prüfung der Anwendbarkeit der Methode auf biologische Proben wurden Einwaagen einer reinen ^{35}S -Verbindung mit verschiedenen biologischen Materialien zusammen aufgeschlossen und verarbeitet. Die Werte der letzten Zeile der Tabelle zeigen, dass die Bestimmung auch in Gegenwart von biologischem Material zu denselben Resultaten führt, wie sie mit der reinen Testsubstanz erhalten wurden.

Die Veraschung von biologischen Proben ohne Zusatz einer Schwefelverbindung ergab Bariumsulfatmengen, die je 100 mg Trockengewicht der Probe maximal $1/100 \text{ mM}$ Schwefel entsprachen. Zur radiochemischen Messung sind für die angewandte Zähltechnik jedoch 150 mg Bariumsulfat erforderlich. Es ist daher bei biologischen Materialien ein Zusatz von inaktiver Trägersubstanz in allen Fällen notwendig. Daraus ergab sich für die Praxis eine wesentliche Vereinfachung des Analysenganges. Nach Aufschluss der Probe wird vor der Fällung eine genau bekannte Menge inaktive Schwefelsäure zugesetzt, gegenüber der der Schwefelgehalt der biologischen Probe vernachlässigt werden kann. Da die Berechnung der Radioaktivität auf diesen genau dosierten Zusatz bezogen wird, kann die radiochemische Messung an einem beliebigen Anteil des Bariumsulfates ausgeführt werden. Die Verarbeitung des Aufschlusses (Filtration, gravimetrische Bestimmung) muss daher nach Zusatz des Trägers nicht mehr quantitativ erfolgen, ebenfalls kann nach der Fällungsoperation ohne Wartefrist abfiltriert werden.

Eine Verseuchung der Aufschlussbomben durch Veraschung hochaktiver Verbindungen konnte nicht beobachtet werden. In speziellen Versuchen wurden ab-

wechselnd in derselben Bombe hochaktive und inaktive Verbindungen verascht, die einwandfreie Resultate bzw. Blindwerte lieferten.

Abschliessend werden für die angewandten ^{35}S -markierten Verbindungen die Synthesen beschrieben, die allgemein zur Darstellung von ^{35}S -markierten Sulfonamid- und Thioharnstoff-Derivaten anwendbar sind.

4. ^{35}S -markierte Verbindungen. – 4.1. ^{35}S -Schwefelsäure: ^{35}S -Schwefelsäure wurde durch Neutronenbestrahlung von Kaliumchlorid hergestellt; dabei bildet sich in Gegenwart von Luft gemäss der Reaktion $^{35}\text{Cl} (n, p) \rightarrow ^{35}\text{S}$ radioaktiver Schwefel direkt in Form von Sulfat. Die Abtrennung der radioaktiven Schwefelsäure erfolgte an Amberlite IRA 400 auf die von DESHPANDE⁸⁾ ausführlich beschriebene Weise.

30,0 g fein pulverisiertes und getrocknetes Kaliumchlorid (*p. a.*) wurde in einem kleinen Aluminiumbehälter 20 Std. der Neutronenstrahlung (Fluss: $1,15 \cdot 10^{13}$ n/cm²/sec) des Saphir⁹⁾-Reaktors ausgesetzt. Nach 5-tägiger Wartezeit, während der der Grossteil der Strahlung, die von unerwünschten Nebenprodukten (vor allem ^{42}K) herrührt, abklingt, wurde die gesamte Menge in 200 ml Wasser gelöst und in Portionen weiter verarbeitet. 50 ml davon wurde mit der 20fachen Menge Wasser verdünnt und auf eine Säule von 200 ml Amberlite IRA 400 (Chloridform) gegeben. Eluiert wurde mit 500 ml dest. Wasser und anschliessend mit 6 l 0,1N Salzsäure, wobei Fraktionen von je 100 ml aufgefangen wurden. Von jeder Fraktion wurde 0,01 ml auf einem Kupferplättchen eingedampft und die Radioaktivität direkt und nach Abdecken mit einer Aluminiumfolie¹⁰⁾ (30 mg/cm²) bestimmt. Auf diese Weise liess sich feststellen, dass in den Fraktionen 16–22 vorwiegend ^{32}P -Phosphorsäure, in den Fraktionen 30–50 nur ^{35}S -Schwefelsäure vorlag. Diese letzteren Fraktionen wurden daher vereinigt und nach Zugabe von 5,0 g inaktiver Schwefelsäure im Rotationseindampfer im Vakuum eingedampft. Der Rückstand ergab nach Filtration und Destillation (Metallbad) 4,70 g farblose Schwefelsäure; radiochemische Ausbeute 80 mC.

4.2. ^{35}S -3-(*p*-Aminobenzolsulfonamido)-2-phenylpyrazol (Sulfaphenazol¹¹⁾): ^{35}S -Acetylsulfanilsäure: 4,380 g ^{35}S -Schwefelsäure (62 mC) wurden unter Rühren und Eiskühlung mit 5,0 ml Acetanhydrid versetzt, danach wurde in kleinen Portionen 2,50 g Acetanilid zugegeben und für 30 Min. auf 98° (Ölbad) erwärmt. Unter Eiskühlung wurden 10 ml Aceton zugefügt. Der Niederschlag wurde auf eine Glasfilternutsche abfiltriert und mit wenig kaltem Aceton und Äther ausgewaschen. Nach Trocknen im Hochvakuum erhielt man 3,765 g (39,1% bezogen auf die ^{35}S -Schwefelsäure) schwach gelbgefärbte Acetylsulfanilsäure.

^{35}S -Acetylsulfanilsäurechlorid: Zu 3,75 g der obigen Acetylsulfanilsäure wurden bei 15° 7,5 g Phosphorpentachlorid gegeben. Nach kurzem Umschwenken bildet sich eine klare Lösung, die 1 Std. auf 48° (Ölbad) erwärmt wurde. Unter intensiver Eiskühlung wurde erst vorsichtig Eis in kleinen Portionen zugefügt, dann 20 ml Wasser und 20 ml Chloroform. Nach 20 Min. Rühren wurde das Reaktionsgemisch im Scheidetrichter erschöpfend mit Chloroform extrahiert. Nach Waschen mit wenig kaltem Wasser wurden die Extrakte über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Der dunkelgelbe Rückstand ergab nach einmaligem Umlösen aus Chloroform 3,881 g (80,3%) hellgelbes ^{35}S -Acetylsulfanilylchlorid.

Eine weitere Charge wurde durch direkte Umsetzung von ^{35}S -Chlorsulfonsäure mit Acetanilid hergestellt: 940,6 mg (42,5 mC) ^{35}S -Chlorsulfonsäure¹²⁾ wurden bei 10° unter Umrühren mit 214 mg Acetanilid versetzt. Anschliessend wurde 2½ Std. lang auf 55–57° (Ölbad) erwärmt. Nach analoger Aufarbeitung wie oben wurden 286,6 mg ^{35}S -Acetylsulfanilylchlorid erhalten. Radiochemische Ausbeute 15,1%; im Vergleich dazu beträgt die Ausbeute, wenn von ^{35}S -Schwefelsäure ausgegangen wird, 31,4%.

^{35}S -Acetylsulfaphenazol: 3,223 g ^{35}S -Acetylsulfanilylchlorid wurden mit 20,0 ml Äthylenchlorid und 4,420 g 2-Phenyl-3-aminopyrazol (frisch destilliert) versetzt und 2 Std. unter Rühren auf 120° (Ölbad) erwärmt. Nach Abkühlen wurde mit 1N Natronlauge erschöpfend extrahiert.

⁸⁾ R. G. DESHPANDE, J. Chromatography 2, 117 (1959).

⁹⁾ «Swimming-pool»-Reaktor, Eidgen. Institut für Reaktorforschung, Würenlingen (Schweiz).

¹⁰⁾ 30 mg/cm² Aluminium absorbieren praktisch vollständig die ^{35}S -Strahlung, hingegen nur zu ca. 15% diejenige von ^{32}P .

¹¹⁾ Orisul® (CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel). P. SCHMIDT & J. DRUEY, Helv. 41, 306 (1958).

¹²⁾ Bezogen von The Radiochemical Centre, Amersham, England.

Die vereinigten Extrakte wurden im Wasserstrahlvakuum bei 35° auf ein kleines Volumen eingeeengt und nach Behandlung mit Norit unter Erwärmen und Umschwenken tropfenweise mit 50-proz. Essigsäure neutralisiert, wobei die Acetylverbindung als weisser Niederschlag ausfällt. Nach Abfiltrieren und Trocknen im Hochvakuum ergaben sich 4,640 g (94,4%) ³⁵S-Acetyl-sulfaphenazol als schwach gelbgefärbte Kristalle.

³⁵S-Sulfaphenazol: 4,620 g der Acetylverbindung wurden mit 52,0 ml 1N Natronlauge 2 Std. auf 120° (Ölbad) erwärmt. Nach Zugabe von wenig Norit wurde heiss filtriert, nach Abkühlen mit 50-proz. Essigsäure neutralisiert, der gebildete Niederschlag abfiltriert und getrocknet: 3,483 g (85,5%) Rohprodukt. Nach dreimaligem Umkristallisieren aus Methanol verblieben 2,976 g ³⁵S-Sulfaphenazol als weisse Kristalle vom Smp. 177–179°.

$C_{15}H_{14}O_2N_4S$ Ber. C 57,31 H 4,49 N 17,82% Gef. C 57,33 H 4,53 N 17,89%

4.3. ³⁵S-*p*-Butoxyphenyl-*p*-dimethylaminophenyl-thioharnstoff (DPT)¹³: 1,34 g frisch destilliertes *p*-Dimethylaminoanilin wurden nach Zugabe von 5,9 ml Wasser mit 1,2 ml 23-proz. wässrigem Ammoniak versetzt. Mittels einer Tropfpipette wurde unter Rühren mit 541 mg ³⁵S-Schwefelkohlenstoff¹² (13 mC) versetzt, wobei sich sofort ein gelber Niederschlag bildete. Nach einstündigem Rühren bei 20° wurde das Reaktionsgemisch mit 20 ml Wasser in einen Scheidetrichter übergeführt und dreimal mit je 5 ml Äther gewaschen. Die hellgelbe wässrige Phase wurde tropfenweise unter intensivem Rühren mit einer Lösung von 2,6 g Bleinitrat in 7 ml Wasser versetzt, dann im Verlauf von 20 Min. langsam auf 65° erwärmt und 30 Min. lang bei dieser Temperatur gehalten. Nach Abkühlen wurde mit 50 ml Äther versetzt, kräftig geschüttelt und durch Filtration mit Hilfe von Hyflo vom ausgefallenen Bleisulfid abgetrennt. Nach Abtrennen der Wasserphase im Scheidetrichter wurde diese dreimal mit Äther geschüttelt. Diese Extrakte wurden mit der Ätherphase vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Der Rückstand ergab bei der Kugelrohr-Destillation (88–105°/0,05 Torr) 1096,8 mg (86,5%) hellgelbes ³⁵S-*p*-Dimethylaminophenylisothiocyanat.

1050 mg der Isothiocyanatverbindung wurden in 3 ml Essigester gelöst und bei 20° mit 1180 mg frisch destilliertem *p*-Butoxyanilin, gelöst in 1,5 ml Essigester, versetzt. Nach 20std. Stehen bei –10° wurden die Kristalle abfiltriert und mit Äther nachgewaschen. Nach zweimaligem Umkristallisieren aus Essigester-Äther verblieben 1,812 g (89,5%) weisse Kristalle der im Titel genannten Verbindung. Smp. 126–127°.

$C_{19}H_{25}ON_3S$ Ber. C 66,44 H 7,34 N 12,23 S 9,34%
Gef. „ 66,75 „ 7,24 „ 12,23 „ 9,34%

SUMMARY

A simple and rapid method for the radioassay of ³⁵S in organic compounds and biological materials is described. The procedure given for the preparation of the ³⁵S labelled test substances used is generally applicable to the syntheses of labelled sulfonamides and thioureas.

Forschungslaboratorien der CIBA AKTIENGESELLSCHAFT, Basel,
Pharmazeutische Abteilung

¹³) R. L. MAYER, P. C. EISMAN, T. A. GISI & E. A. KONOPKA, Amer. Review Tbc. 77, 694 (1958).