

Hochradioaktive Zucker.

Von

L. Sverak, H. Bilek und E. Broda.

Aus dem I. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

Mit 2 Abbildungen.

(Eingelangt am 11. Juni 1952. Vorgelegt in der Sitzung am 19. Juni 1952.)

Durchführung der Photosynthese.

Am Kohlenstoff markierte Zucker werden ähnlich wie andere markierte Pflanzenstoffe¹ zweckmäßig in der Weise hergestellt, daß ein grünes Blatt zur Assimilation von radioaktiver Kohlensäure veranlaßt wird und dann die Zucker aus dem Blatt isoliert werden. Solche Biosynthesen radioaktiver Zucker sind wiederholt ausgeführt worden² und die Produkte sind auch käuflich. Zur Erleichterung der Abtrennung werden den Lösungen wägbare Mengen der reinen inaktiven Zucker als Träger zugesetzt². Zur Untersuchung des Stoffwechsels *sehr kleiner* Gewebe, besonders auch von *Gewebskulturen*, sind jedoch Zucker notwendig, die nicht nur chemisch rein sind, sondern auch *besonders hohe spezifische Aktivität* (Aktivität pro Masseneinheit) besitzen. Wir haben nun ohne Verwendung von inaktiven Trägern Glukose und Fruktose erzeugt, deren spezifische Aktivität die der nach der älteren Methode hergestellten Zucker bei weitem übertrifft.

Zur Erzielung hoher spezifischer Aktivität soll eine möglichst große Menge einer möglichst hochaktiven Kohlensäure assimiliert werden. Das Blatt soll gerade groß genug sein, um die dargebotene Kohlensäure während der Versuchsdauer praktisch vollständig aufnehmen zu können. Die uns vorläufig zur Verfügung stehende Kohlensäure, die wir als Bariumsals aus Harwell bezogen haben, enthält nur 2,2% Radiokohlen-

¹ Siehe z. B. H. Schönfellingner und E. Broda, Mh. Chem. 83, 837 (1952).

² M. Calvin, C. Heidelberger, J. Reid, B. Tolbert und F. Yankwich, Isotopic Carbon. New York. 1948.

säure; wir hoffen, später konzentrierteres BaCO_2 erhalten zu können. Die Gewichte der Blätter (*Solanum Hendersonii*) haben wir allmählich bis auf 8 mg (wasserfrei gerechnet) gesenkt; dies entspricht einem Frischgewicht von 40 mg und einer Oberfläche von $2 \times 2,5$ qcm. Was nun die dargebotene Menge Kohlensäure betrifft, so war sie einerseits dadurch beschränkt, daß Kohlensäure in einer Konzentration von mehr als 10% von der Pflanze nicht mehr gut aufgenommen wird; andererseits dadurch, daß die Photosynthese zur möglichsten Vermeidung unerwünschter Stoffwechselforgänge (Umwandlung der Zucker in andere Stoffe) nicht über einen Tag hinaus ausgedehnt werden sollte. Das Volumen der Photosynthesekammer betrug 16 ccm. Daher war die höchste einsetzbare Kohlensäuremenge etwa 4 mg. Dies entspricht in unserem Falle etwa 125 Mikrocurie.

Die Kammer ist in Abb. 1 dargestellt. Sie unterscheidet sich von der Kammer nach Calvin² im wesentlichen durch ihr kleineres Volumen. Das Blatt, das zuvor an der Pflanze 24 Std. „hungern“ gelassen worden war, indem es durch schwarzes Papier verhüllt wurde, wurde in die wassergefüllte Vase *V* gesetzt. Sodann

wurde die Kammer durch Durchleiten eines CO_2 -freien Luftstromes gespült und ungefähr soweit evakuiert, daß bei der Entwicklung der Kohlensäure wieder Atmosphärendruck entstand. Die Kohlensäure wurde aus dem Bariumkarbonat in *B* durch Auffließenlassen von verdünnter Perchlorsäure aus *P* freigesetzt. Die Säure wurde durch vorsichtiges Neigen der ganzen Kammer zum Fließen gebracht.

Die Kammer mit dem Blatt wurde einen Tag lang dem Sonnenlicht ausgesetzt. Besondere Versuche zeigten, daß innerhalb dieser Zeit der allergrößte Teil der Kohlensäure aufgenommen wird. Diese Versuche bestanden darin, daß nach Versuchsende ein CO_2 -freier Luftstrom durch die Kammer, das Absorptionsgefäß *A* und den Turm *T* gesaugt wurde. *A* und *T* waren mit $n/10$ Lauge gefüllt. Die Lauge wurde dann auf Radioaktivität geprüft. Bei den Photosynthesen mit aktivem CO_2 wurde allerdings manchmal auf die Analyse verzichtet, da das vollständige Austreiben des CO_2 viele Stunden beansprucht und während dieser Zeit Stoffwechselforgänge im Blatt stattfinden. (Während des Austreibens ist nicht nur Umwandlung der Zucker in andere Pflanzenstoffe, sondern auch Atmung zu fürchten.)

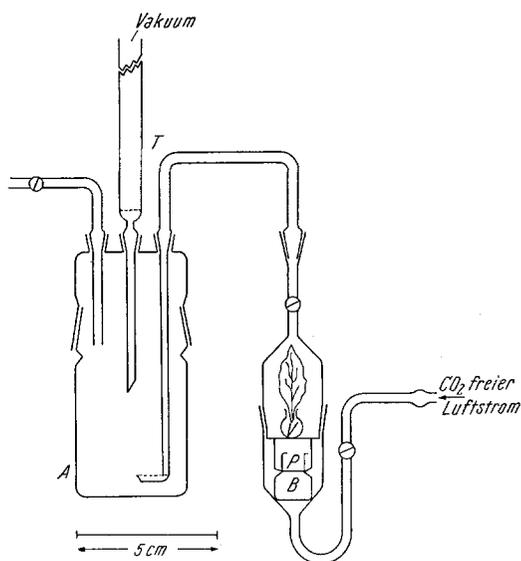


Abb. 1.

Analysenmethoden.

Die Zuckerbestimmungen wurden nach *Hagedorn-Jensen* vorgenommen. Erfahrung hat gelehrt, daß nach dieser Methode auch manche anderen organischen Stoffe mitbestimmt werden, soweit solche in den Lösungen vorhanden sind³. Man darf aber jedenfalls erwarten, daß die Analysenwerte den wahren Werten um so näher kommen, je weiter die Reinigung der Lösungen fortschreitet.

Die Aktivitäten wurden mit Glimmerfenster-Zählrohren bestimmt, indem den Lösungen je $\frac{1}{100}$ ccm entnommen, auf ein Glasschälchen gesetzt, dort getrocknet und schließlich unter das Zählrohrfenster geschoben wurde. Das Zählrohr mußte einmal während der hier beschriebenen Versuche gewechselt werden. Die Ausbeuten der beiden Zählrohre wurden in Eichversuchen in der gegebenen Anordnung zu 0,90 bzw. 1,46% bestimmt. Für die Tabellen 2 bis 4 werden die gemessenen Aktivitäten mit Hilfe der genannten Ausbeutefaktoren auf 100% Zählausbeute, also auf die tatsächlichen Zerfallszahlen (pro Minute) berechnet. (Mit Hilfe des Gaszählrohres⁴ könnte auch wirklich mit annähernd 100% Ausbeute gemessen werden.)

Extraktion der Zucker.

Nach einer Anzahl von Vorversuchen, die zunächst von den Empfehlungen der Literatur² ausgingen, wurde ein zur Erzeugung möglichst hochaktiver Zucker geeignetes Extraktionsverfahren entwickelt. Der Hauptunterschied gegenüber den älteren Verfahren liegt darin, daß die Fällung der Stärke als Jodverbindung aus einem wäßrigen CaCl_2 -haltigen Extrakt des Blattes als zu verlustreich unterbleibt; infolge der Kleinheit der Masse unserer Blätter ist — ohne Trägerzusatz — die gesamte vorhandene Stärkemenge zu klein, der in Lösung verbleibende Bruchteil daher zu groß. Es besteht dementsprechend keine vernünftige Möglichkeit, reine Glukose durch Hydrolyse reiner Stärke zu erhalten.

Statt dessen reinigen wir den wäßrigen Extrakt (ohne CaCl_2 -Zusatz) nach der Hydrolyse durch *Ionenaustausch* und trennen sodann die einzelnen Zucker voneinander und von nicht ionisierten Begleitstoffen durch *Papierchromatographie*. Das Verfahren läßt sich auch auf den alkoholischen Extrakt anwenden, der noch vor dem wäßrigen Extrakt aus dem Blatt erhalten wird. Der alkoholische Extrakt enthält bedeutend mehr und höheraktive Glukose und Fruktose als der wäßrige Extrakt. Nach den Angaben der Literatur² konnte auch der Alkoholextrakt bisher nur unter Zusatz von inaktiven Trägern auf reine Zucker (Glukose, Fruktose, Saccharose) aufgearbeitet werden; darunter muß aber natürlich wieder die spezifische Aktivität leiden.

Es ergibt sich nun die folgende Arbeitsvorschrift: Das Blatt wird nach beendeter Photosynthese mit heißem 80%igem Alkohol getötet, in mehrere

³ Siehe *H. Wanner*, *Helv. chim. Acta* **35**, 460 (1952).

⁴ *O. Feldstein* und *E. Broda*, *Nature* (London) **168**, 599 (1951) und unveröffentlicht.

kleine Stücke zerschnitten und mit dem gleichen Alkohol einige Stunden im *Soxhlet*-Apparat extrahiert. Der Extrakt wird in einer Schale unter mehrmaligem Wasserzusatz zur Trockne eingedampft. Dieser Rückstand wird in einem Scheidetrichter mit Wasser und Äther behandelt. Das Wasser wird mehrmals mit Äther gewaschen, der Äther mit Wasser. Die wäßrigen Lösungen werden vereinigt (Fraktion „Z“) und am Dampfbad von gelöstem Äther befreit. Die Ätherlösungen und der Teil des Extrakts, der beim Eindampfen zur Trockne in einen unlöslichen Zustand übergegangen ist, werden im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter verwendet.

Das mit Alkohol extrahierte Blatt wird nun getrocknet und dann mit Wasser extrahiert. Zu diesem Zweck wird das Blatt zunächst mit zirka 1 bis 2 ccm Wasser im Mikrohomogenisator behandelt. Dann wird das Homogenisatorröhrchen einige Min. ins siedende Wasserbad gehängt und die Lösung durch Zentrifugieren vom Ungelösten getrennt. Dann wird wieder heißes Wasser zugefügt und diese Art der Extraktion 5- bis 6mal wiederholt. Die vereinigten Extrakte werden in einem Kölbchen zur Trockne eingedampft und zur Hydrolyse der Stärke mit zirka 4 ccm 10%iger H_2SO_4 im Ölbad etwa 5 Stdn. am Rückflußkühler gekocht. Dann wird die Lösung zur Entfernung der Schwefelsäure durch eine Anionenaustauscherkolonne (Lewatit M in der Hydroxylform) geschickt und die Kolonne gut gewaschen. Auf diese Weise wird die Fraktion „S“ gewonnen.

Die Fraktionen Z und S werden nun von ionisierbaren Stoffen, wie Karbonsäuren, Aminosäuren usw. gereinigt. Dies geschieht, indem die beiden Lösungen getrennt durch je eine Kolonne geschickt werden, die abwechselnd etwa je 5 Segmente aus Kationen- (Lewatit KS) und Anionen- (Lewatit M) Austauscher enthalten. Jedes Segment schließt zirka 5 g locker gepacktes grobkörniges Harz in der Wasserstoff- bzw. Hydroxylform ein. Das Harz muß vor der Verwendung zur möglichst weitgehenden Entfernung löslicher Anteile sehr gründlich mit Wasser gewaschen werden. Es zeigt sich, daß die Säule in verschiedenen Versuchen zwischen einem Drittel und zwei Dritteln der zugeführten Aktivität und auch ungefähr den gleichen Bruchteil der organischen Substanz zurückhält, auf die die Bestimmungsmethode von *Hagedorn-Jensen* anspricht. Zucker werden aber, wie besondere Versuche bestätigt haben, nicht zurückgehalten.

Die Tropfgeschwindigkeit beträgt etwa 4 bis 6 Tropfen/Min. Nachher wird mit 400 ccm Wasser gewaschen. Die durchgeflossene Lösung wird dann durch Blauband filtriert. Die Daten der Tabelle 1 zeigen auf Grund eines typischen Versuches, daß durch eine Verlängerung der Kolonne nicht viel zu gewinnen wäre. Die Werte wurden erhalten, indem das Harz nach dem Durchfluß einer Z-Fraktion getrocknet und dann als solches in dicker Schicht unter das Zählrohrfenster gebracht wurde. „A“ bezeichnet anionen-, „K“ kationenaustauschendes Harz. Aus den „S“-Fraktionen nehmen die Harze weniger Aktivität an.

Tabelle 1.

	Nummer des Segments								
	1 K	2 A	3 K	4 A	5 K	6 A	7 K	8 A	9 K
Relative Aktivität in willkürlichen Einheiten	425	710	17	53	9	29	5	21	3

In einem Versuch wurde besonders darauf geprüft, ob radioaktive Aminosäuren, die sich während der Photosynthese gebildet haben können, durch die Säule laufen. Der durchgetretenen Lösung einer Z-Fraktion wurde inaktives Aminosäuregemisch als Träger zugesetzt, das durch Hydrolyse von Kasein erhalten worden war. Dann wurden die Aminosäuren nach *Neuberg* und *Kerb*⁵ mit Hg-Ion gefällt, der Niederschlag unter Zusatz eines großen Überschusses an inaktiver Glukose umgefällt, das Hg mit H₂S abgetrennt, die verbleibende Lösung eingedampft und der Rückstand auf Aktivität geprüft. Er erwies sich als inaktiv⁶.

Man darf demnach damit rechnen, daß die Fraktionen Z und S nur mehr unionisierte Stoffe, wie Zucker und Alkohole, enthalten. Diese müssen nun chemisch voneinander getrennt werden. Da es sich um Bruchteile von Milligrammen handelt, kann die Trennung nur mit den Methoden der Papierchromatographie erfolgen.

Papierchromatographie.

Es wurde auf *Schleicher-Schüll*-Papier 2043 B nach der Methode der absteigenden Papierchromatographie gearbeitet. Als Flüssigkeit diente das System Butanol-Eisessig-Wasser im Verhältnis 4:1:5⁷. Parallel zum Hauptpapierstreifen wurde die gleiche aktive Zuckermischung auf einem Kontrollstreifen laufen gelassen; nur war der Mischung im Kontrollstreifen zur Verdeutlichung der Farbreaktion (siehe unten) außerdem noch inaktive Glukose zugefügt worden. Nach etwa 100 Stdn. wurde durch Besprühen mit p-Anisidinphosphat entwickelt. Dieses Reagens gibt mit Fruktose einen zitronengelben, mit Glukose einen braunen Fleck⁸. Die Bereiche des Hauptpapierstreifens, in denen nach der Farbreaktion am Kontrollstreifen Glukose oder Fruktose zu erwarten war, wurden ausgeschnitten und mit Wasser ungefähr 2 Tage eluiert⁹.

Die relative Lage der Flecke entsprach den bekannten R_f -Werten¹⁰. Neben den durch Glukose und Fruktose verursachten Flecken fanden sich in einigen — aber nicht in allen — Versuchen noch weitere Flecken, deren Identifizierung noch im Gange ist. Offenbar hängt die Zusammensetzung der Z- und S-Fraktion von den Bedingungen der Photosynthese und der Aufarbeitung ab. Der Startpunkt der Chromatogramme bleibt

⁵ *C. Neuberg* und *J. Kerb*, *Biochem. Z.* **40**, 498 (1912); **67**, 119 (1914).

⁶ Wir danken unserem Kollegen Herrn *O. Suschny* für die Durchführung der Prüfung auf Aminosäuren.

⁷ *S. M. Partridge*, *Biochemic. J.* **42**, 238 (1948).

⁸ *S. Mukherjee* und *H. C. Srivastava*, *Nature* (London) **169**, 330 (1952).

⁹ *C. E. Dent*, *W. Stepka* und *F. C. Stewart*, *Nature* (London) **160**, 682 (1947).

¹⁰ Siehe z. B. *F. Cramer*, *Papierchromatographie*. Weinheim. 1952.

bräunlich; die Färbung dürfte durch Verunreinigungen bedingt sein, die aus dem Harz stammen.

In einigen Fällen wurden die Chromatogramme mit dem Zählrohr abgetastet. Ein typisches Ergebnis, erhalten an einem entwickelten Kontrollstreifen, ist in Abb. 2 wiedergegeben. Die Ordinaten geben nur relative Werte der Aktivitäten, da die Selbstabsorption der Strahlung im Papier sehr erheblich ist. Die R_f -Werte an der Abszisse wurden erhalten, indem für Glukose im Einklang mit der Literatur¹⁰ der Normalwert $R_f = 0,18$ eingesetzt wurde.

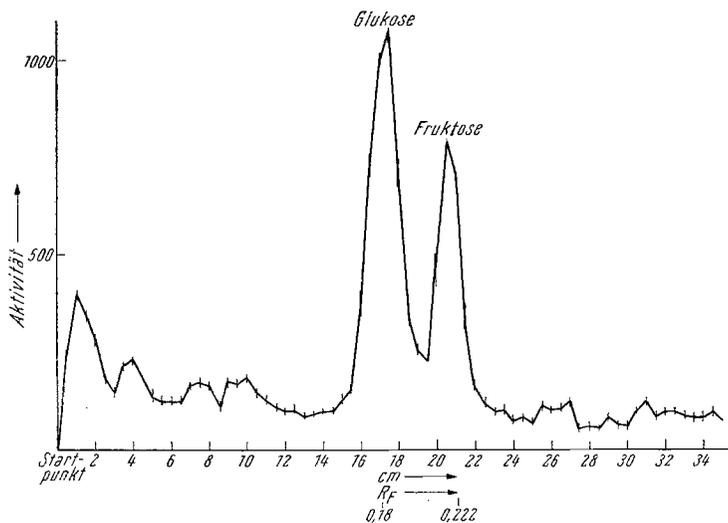


Abb. 2.

Ergebnisse.

Die Ergebnisse zweier Versuche sind in den Tabellen 2 bis 4 zusammengestellt. Die Zahlenwerte sind für die Verluste korrigiert, die durch die Abzweigung von Lösung für die Kontrollstreifen und durch die Entnahme von Analysenproben während des Arbeitsganges bedingt sind. In der Durchführung unterscheiden sich die beiden Versuche durch die Blattfrischgewichte (88 bzw. 37 mg) sowie dadurch, daß nach Ende der Photosynthese im Versuch „1“ 12 Stdn., im Versuch „2“ aber nur 2 Stdn. gelüftet wurde. [Es ist daher zu erwarten, daß die Aufnahme von CO_2 in Versuch 2 (Tabellen 2 und 4) überschätzt wird.] Die Aktivitäten des ungereinigten Wasserextraktes und des Rückstandes nach der Wasserextraktion wurden in diesen Versuchen nicht bestimmt, sie ergaben sich aber in anderen Versuchen, die dem Versuch 1 entsprechen, zu etwa 10 bzw. 0,5% der aufgenommenen Aktivität.

Tabelle 2.

	CO ₂ angeboten (mg)	CO ₂ aufgenommen (mg)	Aktivität in	
			Ätherlösung	ungereinigter Alkohollösung
			(% der aufgenommenen Aktivität)	
Versuch 1 .	1,25	1,06	1,1	84,6
Versuch 2 .	3,2	3,13?	3,3	67,5

Tabelle 3.

	Eluierte Glukose		Eluierte Fruktose	
	Menge (mg)	Spezifische Aktivität Zerfälle/Min. mg	Menge (mg)	Spezifische Aktivität Zerfälle/Min. mg
Z-Fraktion.				
Versuch 1 .	0,376	39 · 10 ⁶	0,268	30 · 10 ⁶
Versuch 2 .	0,145	63 · 10 ⁶	0,136	12 · 10 ⁶
S-Fraktion.				
Versuch 1 .	0,111	6 · 10 ⁶	0,043	7 · 10 ⁶
Versuch 2 .	0,102	12 · 10 ⁶	0,156	6 · 10 ⁶

Eine Bilanz über den eingesetzten Radiokohlenstoff wird in Tabelle 4 gezo-gen. Alle Aktivitäten sind als Bruchteile der eingesetzten Aktivität ausgedrückt.

Tabelle 4.

	Bei Photo- synthese aufgenommen	Der Papier- chromatographie zugeführt	Eluiert als	
			Glukose	Fruktose
Versuch 1 .	0,85	0,54	0,17 ₆	0,09 ₃
Versuch 2 .	0,98?	0,32	0,04 ₅	0,01 ₅

Diskussion.

Bei der Betrachtung der Tabelle 4 fällt zunächst die geringere Ausbeute an Aktivität in Glukose + Fruktose, bezogen auf die eingesetzte Aktivi-tät, bei Versuch 2 auf. Diese kann nicht etwa auf die Kleinheit des Blattgewichtes und der Stoffmengen zurückgeführt werden, mit denen in diesem Versuch gearbeitet werden mußte; die gewichtsmäßige Ausbeute an Glukose + Fruktose (Tabelle 3) ist nämlich in bezug auf das Blattgewicht in Versuch 2 eher besser als in Versuch 1. Wir nehmen vielmehr an, daß in Versuch 2 ein größerer Teil des ¹⁴C in anderer chemischer Form vorliegt. In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, daß sich

der Startpunkt des Chromatogramms der *S*-Fraktion von Versuch 2 als besonders aktiv erwiesen hat.

Gesamtaktivität und spezifische Aktivität der Zucker aus den *S*-Fraktionen sind stets kleiner als die der Zucker aus den *Z*-Fraktionen. Besonders klein ist der Anteil der *S*-Fraktion an der Gesamtaktivität im Versuch 1 (12stündige Lüftung). Daß Fruktose überhaupt in der *S*-Fraktion vorhanden ist, kann entweder darauf zurückgeführt werden, daß durch das Homogenisieren einfache Zucker der Extraktion zugänglich werden, die vorher vom wäßrigen Alkohol nicht „erreicht“ wurden, oder aber darauf, daß die Fruktose zum Teil in Form von alkoholunlöslichen Verbindungen vorliegt. Warum die spezifische Aktivität der Zucker der *S*-Fraktion der der Zucker der *Z*-Fraktion so stark unterlegen ist, ist nicht klar.

Ebenfalls unklar ist der Grund für den niedrigen Wert der spezifischen Aktivität der Fruktose der *Z*-Fraktion in Versuch 2.

Man kann berechnen, daß der am stärksten aktive Zucker ($63 \cdot 10^6$ Zerfälle/Min. mg) immerhin bereits ein Atom ^{14}C auf weniger als 100 Atome ^{12}C enthält. (Anders ausgedrückt: Da wir von 2,2%igem $^{14}\text{CO}_2$ ausgegangen sind, haben wir während der Biosynthese nur etwa die Hälfte der spezifischen Aktivität eingebüßt, das heißt, die aus aktivem CO_2 neugebildete Glukose ist nur zur Hälfte durch Glukose aus anderen Quellen, insbesondere durch bereits im Blatt vorgebildete Glukose, verdünnt worden.) Beim Einsatz von reinem statt des 2,2%igem $^{14}\text{CO}_2$ würde man also Radiozucker erwarten, deren Aktivität schon der theoretischen Grenze nahe liegt.

Außerdem darf man bei der zukünftigen präparativen Herstellung der Zucker auf bessere Ausbeuten hoffen, weil mehr Material gleichzeitig aufgearbeitet werden soll; auch wird dann der Bruchteil absinken, der für Analysen und Kontrollstreifen abgezweigt werden muß.

Da mit dem Gaszählrohr⁴ ~ 5 Zerfälle/Min. noch gemessen werden können, müßte schon beim jetzigen Aktivitätsgrad der Nachweis von $\sim 10^{-10}$ g unserer Glukose oder der organischen Substanz gelingen, die durch Umwandlung dieser Glukosemenge im Stoffwechsel — etwa in Gewebeskulturen — entsteht.

Zusammenfassung.

Ein Verfahren zur Gewinnung von reinen Radiozuckern sehr hoher Aktivität ohne Verwendung inaktiver Träger wird beschrieben. Grüne Blätter werden zur Assimilation von Radiokohlensäure veranlaßt. Sodann werden die Blätter mit Alkohol und Wasser extrahiert. Der alkoholische Extrakt wird mit Äther und Wasser geschieden, der wäßrige Extrakt hydrolysiert. Darauf werden beide Extrakte mit Ionenaustauschern gereinigt und papierchromatographisch auf reine Glukose und Fruktose

aufgearbeitet. Die spezifische Aktivität der derart gereinigten Glukose beträgt bis zu $63 \cdot 10^6$, der Fruktose bis zu $30 \cdot 10^6$ Zerfälle/Min. mg. Dies dürften bei weitem die höchstaktiven Zucker sein, deren Darstellung in der Literatur beschrieben worden ist.

Wir danken Herrn Prof. *L. Ebert* für sein lebhaftes Interesse, ohne das die Durchführung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre, sodann für allgemeine finanzielle Unterstützung den Österr. Stickstoffwerken A. G., Linz, sowie der Österr. Gesellschaft zur Erforschung und Bekämpfung der Krebskrankheit (aus den Mitteln der *Sonnleithner*-Stiftung der Österr. Akademie der Wissenschaften) und für die Gewährung von Mitteln aus der *Treitl*-Stiftung zum Bau des Zählgerätes abermals der Österr. Akademie der Wissenschaften.