

Fortschritte bei der Herstellung radioaktiver Zucker.

Von

L. Sverak, O. Suschny und E. Broda.

Aus dem I. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

Mit 4 Abbildungen.

(Eingelangt am 23. Juni 1953. Vorgelegt in der Sitzung am 25. Juni 1953.)

Nach einer verbesserten Methodik wurden gegenüber früheren Ergebnissen¹ in größerer Ausbeute Zucker erhalten, die erheblich reiner sind und deren spezifische Aktivität 5 bis 10mal größer ist.

Einleitung.

Für gewisse Stoffwechseluntersuchungen werden am Kohlenstoff markierte Zucker von extrem hoher spezifischer Aktivität benötigt. Dazu gehören insbesondere Untersuchungen über den Stoffwechsel einzelner Kulturen tierischer Gewebe, die wir in Gemeinschaft mit Herrn Dr. *Stockinger* und seinen Kollegen ausführen².

Ein Verfahren zur Herstellung derartiger Zucker ist bereits beschrieben worden². Dieses Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß die Isolierung der Zucker und ihre Trennung von einander ohne Trägerzusatz und daher auch ohne Fällungsreaktionen erfolgt. Ein grünes Blatt wird der Photosynthese mit Radiokohlendioxyd unterworfen. Dann wird das Blatt mit Alkohol und Wasser extrahiert und die von ätherlöslichen Stoffen befreiten Extrakte werden — gegebenenfalls nach Hydrolyse — durch Chromatographie an Ionenaustauschern von ionisierten Stoffen befreit. Schließlich werden die individuellen Zucker aus den sich ergebenden Lösungen durch Papierchromatographie gewonnen. Nachstehend soll nun über die Weiterentwicklung der Methode berichtet werden, durch die so-

¹ L. Sverak, H. Bilek und E. Broda, Mh. Chem 83, 1116 (1952).

² O. Suschny, E. Broda, L. Sverak, H. Bilek, O. Feldstein, L. Stockinger und H. Madl, Mh. Chem. 83, 1091 (1952).

wohl die Reinheit als auch die spezifische Aktivität der Zucker verbessert wurde.

Das beschriebene Verfahren wurde in folgenden Punkten verändert: 1. *Erhöhung der spezifischen Aktivität* und des *Drucks* des Kohlendioxyds bei der Photosynthese, 2. Verwendung *vorgewaschener* Kunstharz-Austauscher und vorgewaschenen Chromatographie-Papiers, 3. Kontrolle der radiochemischen Reinheit durch *zweidimensionale* Papierchromatographie und 4. *Beschleunigung* der *Elution* der Zucker aus dem Papier. Diese Punkte sollen nun der Reihe nach besprochen werden.

Erhöhung der spezifischen Aktivität und des Drucks des Kohlendioxyds bei der Photosynthese.

Für die Photosynthese stand ein vom Britischen Atomenergie-Institut in Harwell geliefertes Bariumkarbonat zur Verfügung, dessen Gehalt an Radiokohlenstoff (bezogen auf Gesamtkohlenstoff) statt — wie früher — 2,2% *nunmehr* 12% betrug.

Außerdem erwies es sich als möglich, die von uns verwendeten Blätter (*Solanum Hendersonii*) in einer Atmosphäre von 12½% (statt 10%) Kohlensäure assimilieren zu lassen, ohne daß nach der eintägigen Belichtung eine nennenswerte Menge Kohlensäure unaufgenommen blieb.

Verwendung vorgewaschener Austausch- und vorgewaschenen Papiers.

Es zeigte sich daß die von uns verwendeten Ionenaustauscher (Lewatit und Dowex) schon bei Behandlung mit kaltem destilliertem Wasser lösliche Stoffe abgeben. Die absolute Menge dieser Stoffe ist zwar klein, fällt aber neben der ebenfalls geringen Menge der Zucker merklich störend ins Gewicht. Auch ist besonders bei den Lewatit- (Phenol-Formaldehyd-) Harzen Giftwirkung der gelösten Stoffe zu befürchten. Aus diesem Grunde wurden die Säulen stets vorgewaschen.

Die der Entionisierung der Zuckerlösung dienende Säule enthielt je etwa 10 Gramm Lewatit KS und M. Als Maß für die Konzentration der Verunreinigungen im Waschwasser wurde der nach *Hagedorn-Jensen* bestimmte Reduktionswert genommen. Dieser sank unter den angewendeten Bedingungen bei Waschung mit drei bis vier Litern auf den vierten Teil des Anfangswertes ab, entsprach dann etwa 0,6 Mikro-Äquivalent/Liter, und blieb weiterhin annähernd konstant (Abb. 1).

Auch die Spezialpapiere von *Schleicher-Schüll* (2043) und von *Whatman* erwiesen sich als gegen Wasser nicht völlig beständig³. Vorwaschen des Papiers erfolgt zweckmäßig mit durchfließendem Wasser im Chromatographierkasten. Auch durch bloßes Einhängen in einen Wasserbehälter

³ *H. Bilek*, Dissertation, Wien, in Vorbereitung.

lassen sich brauchbare Ergebnisse erzielen. Verwendet wurden Papiere, die sechs Wochen in einem Behälter gehangen waren. Aus 60 cm² dieses Papiers wurden in der unten genannten Anordnung zur Elution von 26 cm³ Wasser nur mehr etwa 0,17 Mikroäquivalent reduzierende Substanz herausgewaschen; das ist nur mehr ein Bruchteil des Wertes, den man ohne Vorwaschung erhält.

Reinheitskontrolle durch zweidimensionale Papierchromatographie.

Bei der präparativen Trennung der Zucker durch eindimensionale Papierchromatographie wurde stets — wie zuvor — zur Kontrolle parallel mit dem aktiven Zuckergemisch inaktiver Zucker laufen gelassen, dessen Lage auf dem Kontrollstreifen dann durch Farbreaktion festgestellt wurde. Dennoch wurde die Identität und Reinheit einzelner Zucker durch zweidimensionale Chromatographie geprüft.

Die Aktivitätskurven der Abb. 2 bis 5 wurden mit einem spaltförmigen Zählrohrenfenster von 4 mm Breite erhalten. Die Lage des Zentrums der Farbreaktion ist durch einen Punkt unterhalb der Abszissenachse kenntlich gemacht.

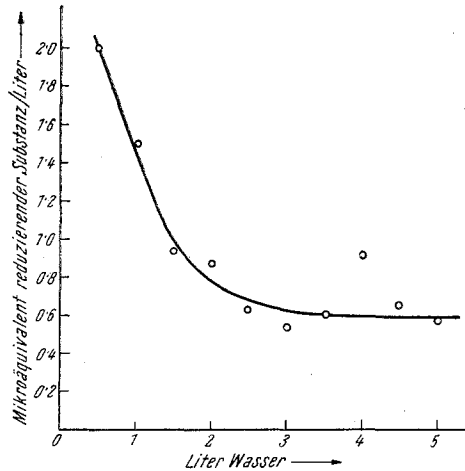


Abb. 1. Reinigungskurve des Ionenaustauschers.

So zeigt Abb. 2 das ursprüngliche Chromatogramm [Butanol-Eisessig-Wasser (4 : 1 : 5)] des alkoholischen Blattextraktes nach Reinigung durch den Ionenaustauscher; das Überwiegen des Rohrzuckers in diesem Extrakt fällt auf. Der dem Rohrzucker zugeschriebene Fleck wurde eluiert und ein Teil dieser Substanz unter Trägerzusatz der zweidimensionalen Chromatographie unterworfen. Abb. 3 gibt den Aktivitätsverlauf in der ersten Dimension (Butanol-Eisessig-Wasser), Abb. 4 in der zweiten Dimension (Wasser-Phenol-Blausäure).

Schließlich wurde ein weiterer Teil des Rohrzuckers mit 1 cm³ 2n H₂SO₄ unter Trägerzusatz bei 100° C 30 Min. lang hydrolysiert, die Säure durch BaCO₃ gebunden und das Produkt der Hydrolyse abermals mit Butanol-Eisessig-Wasser chromatographiert. Abgesehen von den erwarteten hohen Spitzen der Glukose und der Fruktose erscheint eine Nebenspitze ($R_F = 0,27$). Die dieser Spitze entsprechende Fläche beträgt

etwa ein Zehntel der Fläche, die den genannten Zuckern entspricht. Wir schreiben sie vorläufig einem Produkt der Einwirkung der Schwefelsäure auf die Zucker zu. Die Identifizierung dieses Produkts ist noch im Gange.

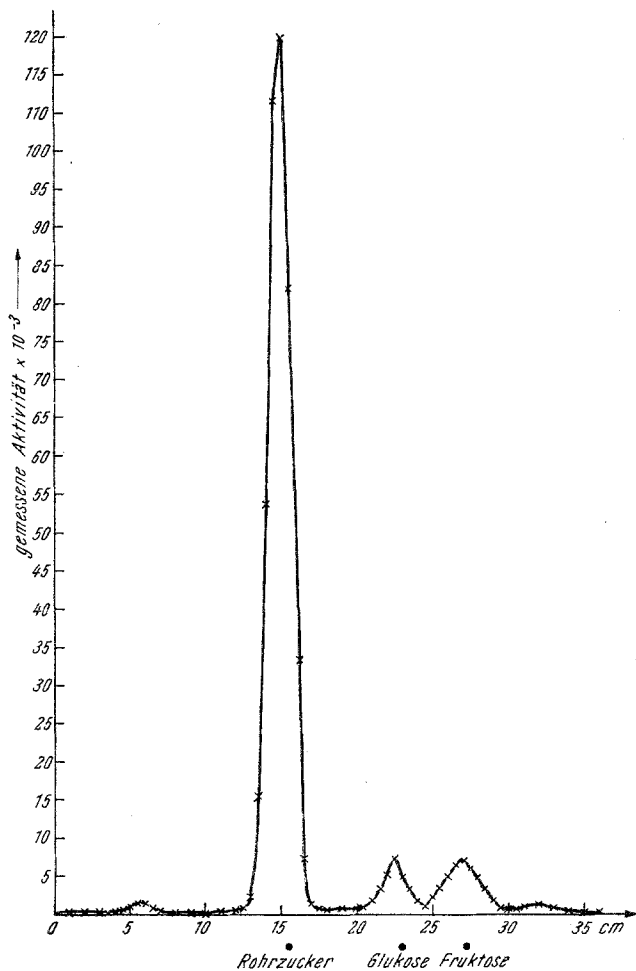


Abb. 2. Chromatogramm des gereinigten alkoholischen Extrakts.

Beschleunigung der Elution.

Wir haben die Erfahrung gemacht, daß insbesondere die verdünnten wässrigen Lösungen unserer Zucker gegen Zersetzung — möglicherweise durch Mikroorganismen — sehr empfindlich sind. Daher wurde der Zeitraum, innerhalb dessen die Gefahr einer solchen Zersetzung besteht, so weit als möglich verringert. Diesem Zweck dient auch eine Veränderung der Elutionsmethode. Statt — wie vorher — das Verfahren nach *Dent* zu

verwenden, wird nunmehr das Stück Papier zusammengerollt, in ein senkrechtes Glasröhrchen gestopft und Wasser durchtropfen gelassen. Es zeigt sich, daß in unserer Anordnung eine Wassermenge von 26 cm³ innerhalb von 2 Stdn. über 99% des Zuckers auswäscht.

Das Eluat wird sogleich unter vermindertem Druck im Kohlendioxyd-Strom zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird in 80%igem Alkohol aufgenommen. Die alkoholische Lösung erleidet bei Aufbewahrung keinen Aktivitätsverlust. Hingegen büßt trockener, in einem Glasschälchen an der

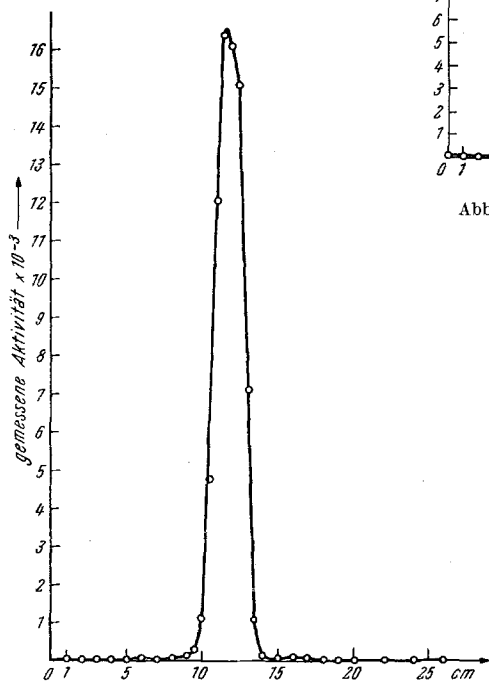


Abb. 4. Chromatogramm des Rohrzuckers. (Zweite Dimension.)

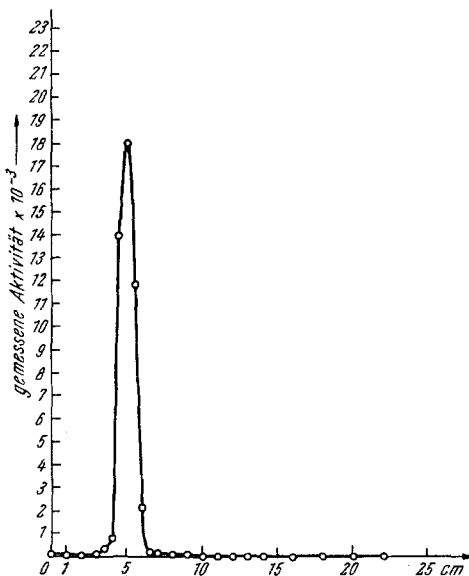


Abb. 3. Chromatogramm des Rohrzuckers. (Erste Dimension.)

Luft aufbewahrter Zucker bemerkenswerterweise allmählich Aktivität ein, unterliegt also einer Zersetzung unter Entstehung leicht flüchtiger Stoffe. Die Möglichkeit einer solchen Zersetzung dürfte damit zusammenhängen, daß der Rückstand eine große Oberfläche besitzt.

Besonders mikrobiologische Zersetzung ist zu fürchten. Sie führt nämlich nicht nur zu Verlusten an Zucker, sondern vor allem auch zur Bildung radioaktiver Eiweißkörper und

Aminosäuren in der Lösung. Daher wurde die durch eindimensionale Papierchromatographie gewonnene Glukoselösung zur „Analyse“ nachträglich noch durch einen Kationenaustauscher geschickt. Die Säule

wurde gründlich mit Wasser gewaschen und schließlich mit Salzsäure eluiert. Es wurde festgestellt, daß jedenfalls weniger als 0,05% des Radiokohlenstoffs durch Austauscher festgehalten wird.

Ergebnis.

Mit Hilfe der vorstehend beschriebenen Verbesserungen des Verfahrens zur Gewinnung radioaktiver Zucker konnten die in Tabelle 1 angeführten spezifischen Aktivitäten erreicht werden:

Tabelle 1. Spezifische Aktivitäten der Zucker.

Zucker	Zerfälle/Gramm und Minute	Microcurie/Milligramm
Glukose	$3,0 \cdot 10^{11}$	135
Fruktose	$2,4 \cdot 10^{11}$	110
Rohrzucker*	$2,7 \cdot 10^{11}$	120

Die Ausbeute an Aktivität im Gesamtzucker, bezogen auf die Aktivität des eingesetzten Kohlendioxyds, beträgt etwa 50%.

Zusammenfassend ist demgemäß festzustellen, daß nach der vorliegenden, weiterentwickelten Methode die Zucker nicht nur reiner und in größerer Ausbeute als nach dem ursprünglichen Verfahren erhalten werden, sondern daß sie auch um einen Faktor 5 bis 10 aktiver sind. Ihre Aktivität entspricht derjenigen, die inzwischen auch von *Putman* und *Hassid*⁴ bei der Weiterentwicklung ihres Verfahrens erreicht wurde.

Wir danken den Österreichischen Stickstoffwerken, Linz, der *Sonnleithner*-Stiftung (Österreichische Akademie der Wissenschaften und Österreichische Gesellschaft zur Erforschung und Bekämpfung der Krebskrankheit) und schließlich der Van t'Hoff-Stiftung für die finanzielle Unterstützung unserer Arbeit. Unserem Kollegen Herrn *H. Bilek* danken wir für die freundliche Mitarbeit bei den chemischen Analysen.

* Berechnet aus den spezifischen Aktivitäten von Glukose und Fruktose nach Hydrolyse.

⁴ *E. W. Putman* und *W. Z. Hassid*, *J. Biol. Chem.* **196**, 749 (1952).