

Zur Biosynthese des Sinalbins, 1. Mitt.

Von

H. Kindl

Aus dem Organisch-chemischen Institut der Universität Wien

(Eingegangen am 4. Februar 1964)

Nach Applikation verschiedener möglicher Vorstufen wurde aus Pflänzchen von *Sinapis alba* das Tetramethylammoniumgluco-sinalbat isoliert. Ein selektiver Abbau dieser Verbindung ermöglichte die Differenzierung der Aktivität in den einzelnen C- und S-Atomen. Als besonders günstige Vorstufe erwies sich neben Phenylalanin die p-Cumarsäure.

Das Sinalbin (I), ein Senfölglycosid¹, kommt als sekundärer Inhaltsstoff in Pflanzen und Samen von *Sinapis alba* vor²; da es besonders in Samen in verhältnismäßig großer Menge (über 2%) enthalten ist, war das Sinalbin schon frühzeitig Gegenstand chemischer Untersuchungen. *Gadamer*³ stellte 1897 unter Berücksichtigung der vorhandenen experimentellen Daten für das Sinalbin eine Formel (II) auf, die aber 1956 von *Ettlinger* und *Lundeen*⁴ revidiert wurde. Der Umstand, daß ein in den Idioplasten der gleichen Pflanze vorkommendes Enzym, die Myrosinase, das Anion des Sinalbins in ein Isothiocyanat, Glucose und Sulfat spaltet, war der Grund für die Aufstellung der älteren Formel II. Heute deutet man diese Reaktion der Myrosinase als eine *Lossen-Umlagerung*, wobei aber weder die gleichzeitige Entstehung von Thiocyanat^{5, 6} und

¹ *A. Kjaer*, Fortschr. Chem. org. Naturstoffe **18**, 122 (1960).

² *W. Schneider*, Senfölglycoside: in *G. Klein*, Hdb. Pflanzenanalyse, Bd. III/2, S. 1063. Wien: J. Springer, 1932

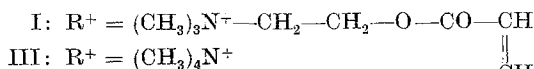
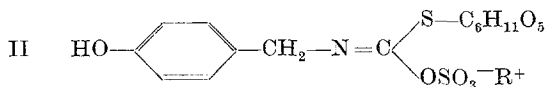
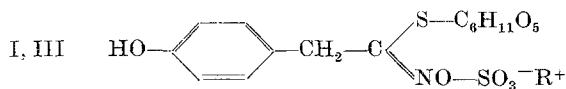
³ *J. Gadamer*, Ber. dtsh. chem. Ges. **30**, 2327 (1897).

⁴ *M. G. Ettlinger* und *A. J. Lundeen*, J. Amer. chem. Soc. **78**, 4172 (1956).

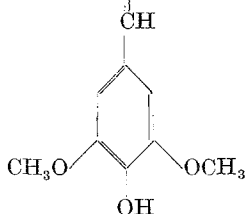
⁵ *A. I. Virtanen* und *M. Saarivirta*, Suomen Kemistilehti **B 35**, 102 (1962).

⁶ *A. I. Virtanen*, Arch. Biochem. Biophys., Suppl. I, 200 (1962).

Nitril, noch die primäre Wirkung der Myrosinase^{7, 8} selbst völlig geklärt sind.



II: R⁺ wie I



Die Biosynthese der Senfölgucoside war bis 1962 ein noch un bearbeitetes Gebiet. Das C₆-C₂-Skelett des Sinalbins läßt einen C₆-C₃-Körper in Form einer α-Aminosäure als direkte Vorstufe vermuten⁹. Weiters erscheint es in Analogie zur Biosynthese anderer C₆-C₂-Körper^{10, 11} wahrscheinlich, daß nur Verbindungen, die bereits die Hydroxylgruppe am Aromaten in der richtigen Stellung besitzen, gut eingebaut werden.

Während der Durchführung dieser Arbeiten erschienen Mitteilungen über die Biosynthese des Glucotropaeolins in *Tropaeolum majus*^{12, 13}, des Gluco-nasturtiins in *Nasturtium officinale*¹² und über die Biosynthese des Sinigrins in *Armoracia lapathifolia*¹² und in *Brassica juncea*¹⁴. Die Publikationen über den Aufbau des Sinigrins^{12, 14} widersprechen sich aber zum Teil.

⁷ Z. Nagashima und M. Uchiyama, Bull. Agric. Chem. Soc. Japan **23**, 555 (1959); Chem. Abstr. **54**, 6836 (1960).

⁸ R. D. Gaines und K. J. Goehring, Biochem. biophys. Res. Commun. **2**, 207 (1960).

⁹ A. Kjaer, Acta Chem. Scand. **8**, 1110 (1954).

¹⁰ H. Kindl und G. Billek, Österr. Chemiker-Ztg. **63**, 290 (1962).

¹¹ J. Koukol, P. Miljanich und E. E. Conn, J. Biol. Chem. **237**, 3223 (1962).

¹² E. W. Underhill, M. D. Christholm und C. R. Wetter, Canad. J. Biochem. Physiol. **40**, 1505 (1962).

¹³ M. H. Benn, Chem. and Ind. **1962**, 1907.

¹⁴ M. Matsuo, Chem. Pharm. Bull. [Tokyo] **11**, 545 (1963); Chem. Abstr. **59**, 5506 (1963).

Methodik

Radioaktive Vorstufen

p-Hydroxyphenylelessigsäure-1-¹⁴C wurde durch Reaktion von p-Methoxybenzylchlorid mit Na¹⁴CN (hergestellt durch Austausch Ba¹⁴CO₃—NaCN) in siedendem Aceton im Millimol-Maßstab hergestellt; nach dem Absaugen des ausgeschiedenen NaCl und Einengen konnte das vorerst entstandene p-Methoxyphenylacetonitril-1-¹⁴C direkt durch 12stdg. Rückflußkochen mit einer Mischung von Essigsäure—(48proz.) Bromwasserstoffsäure—Jodwasserstoffsäure (*d* = 1,7) im Verhältnis 10:10:1 verseift und die p-Hydroxyphenylelessigsäure-1-¹⁴C durch Sublimation gereinigt werden. Eine Carboxylierung war nicht möglich, da p-Methoxybenzylmagnesiumchlorid dabei vorwiegend das entsprechende Dibenzyl ergibt. Inzwischen wurde eine Vorschrift bekannt, die amalgamiertes Magnesium verwendet und damit gute Ausbeuten an Homoanissäure erzielt¹⁵.

p-Hydroxybenzaldehyd-carbonyl-¹⁴C wurde aus p-Benzylxybrombenzol und Cu¹⁴CN hergestellt¹⁶.

Tyrosin-3-¹⁴C und p-Cumarsäure-3-¹⁴C wurden aus p-Hydroxybenzaldehyd-carbonyl-¹⁴C synthetisiert, Tyrosin-2-¹⁴C und H₂³⁵SO₄ vom Radiochemical Center, Amersham, England erhalten.

Applikation der radioaktiven Vorstufen und Isolierung des Tetramethylammonium-gluco-sinalbats

Die Applikation der radioaktiven Vorstufen erfolgte an 2—3 Wochen alten hydropon gezogenen Pflanzen von *Sinapis alba*. Wie durch Photosynthese mit ¹⁴CO₂ gezeigt werden konnte, sind selbst 3 Tage alte Pflänzchen in der Lage, sekundäre Inhaltsstoffe wie Sinalbin, Inosit, Phytinsäure¹⁷ und verschiedene Phenolcarbonsäuren in beträchtlicher Menge zu produzieren. Bei der Extraktion und der Abtrennung verschiedener unerwünschter chemischer Verbindungen wurden bereits beschriebene Methoden¹⁸ verwendet. Mit Hilfe eines Kationenaustauschers in Tetramethylammonium-Form wurde das Sinalbin direkt ohne Isolierung in das Tetramethylammonium-S-(β-D-glucopyranosyl)-p-hydroxyphenylacetothiohydroxamylsulfat (Tetramethylammonium-gluco-sinalbat⁴, III, abgekürzt als TAGS) übergeführt und als solches durch mehrmalige Papierchromatographie und anschließende Elektrophorese von den Verunreinigungen abgetrennt. Als Vergleichssubstanz diente ein aus reinem Sinalbin

¹⁵ C. C. Lee, D. Newman und D. P. Thornhill, *Canad. J. Chem.* **41**, 620 (1963).

¹⁶ G. Billek, A. Schimpl und H. Kindl (in Vorbereitung).

¹⁷ H. Kindl und O. Hoffmann-Ostenhof, *Biochem. Z.* **339**, 374 (1964).

¹⁸ G. Billek und H. Kindl, *Mh. Chem.* **93**, 85 (1962).

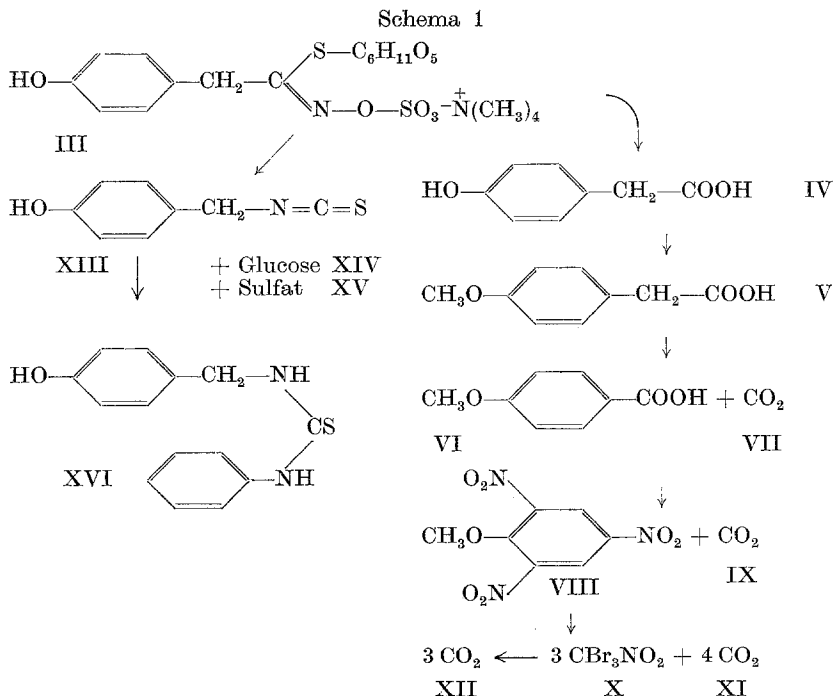
hergestelltes *TAGS*, das bei Elektrophorese das gleiche Anion ergab wie Sinalbin selbst.

Selektiver Abbau des Tetramethylammonium-gluco-sinalbats

Das *TAGS* (III) konnte durch saure Hydrolyse leicht in *p*-Hydroxyphenylessigsäure (IV) übergeführt werden (Schema 1), wobei das Kohlenstoffgerüst erhalten blieb. Nach Methylierung wurde die *p*-Methoxyphenylessigsäure (V) zur Anissäure (VI) und CO₂ (VII) oxydiert. Durch einen weiteren Abbau der Anissäure (VI) erhielt man neben CO₂ (IX) 2,4,6-Trinitroanisol (VIII); bei letzterem konnte durch einen Brompikrinabbau das Kohlenstoffskelett des Aromaten gesprengt werden, wobei man Brompikrin (X) und CO₂ (XI) erhielt. Das Brompikrin wurde durch Na₂Boxydatation in CO₂ (XII) übergeführt und als BaCO₃ gemessen.

Das *TAGS* konnte auch mittels der Myrosinase in *p*-Hydroxybenzylisothiocyanat (XIII), das dann als *N*-(*p*-Hydroxybenzyl)-*N'*-phenylthioharnstoff (XVI) isoliert wurde, Glucose (XIV) und Sulfat (XV) gespalten werden. Dieser Weg diente zur Differenzierung der Aktivität der S-Atome.

Zur Identifizierung weiterer sekundärer Inhaltsstoffe, die bei diesen Applikationsversuchen entstanden, wurden in früheren Arbeiten beschriebene Methoden^{17, 18} verwendet.



Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse der Applikation verschiedener markierter Vorstufen und die Verteilung der Aktivität nach selektivem Abbau des *TAGS* sind in den Tab. 1, 2 und 3 zusammengefaßt. Dort wird die Aktivität in den verschiedenen Abbauprodukten in Prozenten bezogen auf *TAGS* angegeben, wobei Ausbeuten und Verdünnung bereits einbezogen sind. Der selektive Abbau der Seitenkette des C₆—C₂-Körpers sollte vor allem darüber Aufschluß geben, ob die jeweilige Vorstufe einem starken Stoffwechsel unterworfen ist und ob bei der Biosynthese eine Phenylwanderung oder eine ähnliche Umgruppierung gegenüber dem C-Skelett der Vorstufen eintritt.

Tabelle 1. Einbau und Verteilung der Aktivität nach Applikation verschiedener Vorstufen

Vorstufen	spezif. Aktiv. $\mu\text{C}/\text{mMol}$	Aktiv. μC	<i>TAGS</i>		% Aktivität bez. auf <i>TAGS</i>		
			spezif. Aktiv. $\mu\text{C}/\text{mMol}$	Einbau %	p-OH-Phenyl-essigsäure	Anis-säure	BaCO ₃ VII
p-Hydroxyphenylacetamid-1- ¹⁴ C	30	2	0,01	0,09	n. b.	n. b.	n. b.
p-Hydroxyphenylelessigsäure-1- ¹⁴ C	90	30	0,06	0,10	n. b.	n. b.	n. b.
p-Cumarsäure-3- ¹⁴ C	200	15	18,0	0,89	94	95	2
D,L-Tyrosin-2- ¹⁴ C	4230	50	0,5	0,08	9	2	8
D,L-Tyrosin-3- ¹⁴ C	8	2	0,01	0,15	n. b.	n. b.	n. b.
D,L-Phenylalanin-2- ¹⁴ C	460	7	8,5	0,31	99	2	97
D-Glucose-1- ¹⁴ C	2570	250	27,5	0,52	1	1	0,1
p-Hydroxybenzaldehyd-carbonyl- ¹⁴ C	1000	150	0,5	0,08	90	88	3

n. b. = nicht bestimmt

Tabelle 2. Verteilung der Aktivität nach Applikation von Glucose-1-¹⁴C

	Homoanis-säure (V)	Anis-säure (VI)	BaCO ₃ (VII)	Trinitro-anisol (VIII)	BaCO ₃ (XI)	BaCO ₃ (XII)
% Aktivität, bez. auf p-Hydroxyphenylelessigsäure	100	92	9	55	43	8

Tabelle 3. Einbau und Verteilung der Aktivität nach Applikation von ³⁵SO₄"

³⁵ SO ₄ " als Vorstufe		<i>TAGS</i>		% Aktivität, bez. auf <i>TAGS</i>	
spezif. Aktiv. mC/mMol	Aktiv. mC	Spezif. Aktiv. $\mu\text{C}/\text{mMol}$	Einbau, %	BaSO ₄ XV	Thioharnstoffderiv. XVI
6,26	2,0	11	0,20	65	30

Obwohl es sich beim Sinalbin um einen C_6-C_2 -Körper mit einer Hydroxylgruppe in p-Stellung handelt, wurde ein nur sehr geringer Einbau von p-Hydroxyphenylelessigsäure-1- ^{14}C gefunden.

Die relativ höchste Einbaurate zeigte erwartungsgemäß die p-Cumar-säure. Hingegen überraschte der schlechte Einbau von Tyrosin, das man neben der p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure als direkte Vorstufe annehmen könnte. Hier dürfte das Tyrosin ähnliche Schwierigkeiten zeigen, wie sie sich bei Einbauversuchen in andere Phenylpropankörper ergaben. *Brown* und *Neish*¹⁹ fanden bei Applikationsversuchen mit markiertem Tyrosin, daß lediglich einige Gräser zur Verwandlung des Tyrosins in Lignin und substituierte Zimtsäuren befähigt sind. Unter Berücksichtigung dieser Befunde erscheint es nicht mehr verwunderlich, daß sich Tyrosin bei der Biosynthese des Dhurrins (p-Hydroxymandelsäurenitrilglucosid) in *Sorghum vulgare*¹¹, einem Vertreter der echten Gräser, als sehr gute Vorstufe erwies, während es bei der Biosynthese des Sinalbins in *Sinapis alba*, einem Kreuzblütler, viel schlechter eingebaut wurde als Phenylalanin, was vermutlich auf das Fehlen der Tyrase zurückzuführen ist.

Die Aktivität der Glucose-1- ^{14}C wurde zu einem Großteil im Thio-glucosylrest gefunden, während die restliche Aktivität vorwiegend den C-Atomen 2 und 6 (und 4) des Benzolringes und dem kernnahen C-Atom der Seitenkette der p-Hydroxyphenylelessigsäure zugeordnet werden konnte. Die hier gemessene Aktivitätsverteilung entspricht somit weitgehend der Verteilung der Aktivität bei der Biosynthese der Shikimisäure²⁰ und bei der Biosynthese der Cumarine²¹ und des Lignins^{22, 23} nach Gabe von Glucose-1- ^{14}C . Bei allen diesen Untersuchungen war nach Applikation von Glucose-1- ^{14}C die überwiegende Menge der Aktivität in den C-Atomen 2 und 6 des Benzolkerns und im kernnahen C-Atom der Seitenkette. Daraus darf man schließen, daß das C-Skelett des Sinalbins über den Shikimisäureweg aufgebaut wird. Der Umstand, daß sich im C-Atom der Carboxylgruppe der p-Hydroxyphenylelessigsäure fast keine Aktivität befindet, spricht dafür, daß es dabei zu keiner Kondensation eines C_6-C_1 -Körpers mit einem C_1 -Körper kommt, sondern daß C_6-C_3 -Körper die Vorstufen sind. Damit stimmt der minimale Einbau des p-Hydroxybenzaldehydes, einer Verbindung, die im Falle des Dhurrins¹¹ durchaus zum Aufbau eines C_6-C_2 -Körpers beitragen kann, überein.

¹⁹ *S. A. Brown* und *A. C. Neish*, *Canad. J. Biochem. Physiol.* **34**, 769 (1956).

²⁰ *P. R. Srinivasan*, *H. T. Shigeura*, *M. Sprecher*, *D. B. Sprinson* und *B. D. Davis*, *J. Biol. Chem.* **220**, 477 (1956).

²¹ *F. Weygand* und *H. Wendt*, *Z. Naturforsch.* **14 b**, 421 (1959).

²² *K. Kratzl* und *H. Faigle*, *Z. Naturforsch.* **15 b**, 4 (1960).

²³ *S. N. Acerbo*, *W. J. Schubert* und *F. F. Nord*, *J. Amer. Chem. Soc.* **82**, 735 (1960).

Die durch die Applikation von $^{35}\text{SO}_4$ erhaltenen Resultate zeigen interessante Einzelheiten. Der geringe Einbau überrascht; man kann somit nicht von einem leichten Austausch der Sulfatgruppe des Sinalbins sprechen. Weiters konnte man nicht voraussehen, daß $^{35}\text{SO}_4$ in die Hydroxamylsulfatgruppe nicht um ein Vielfaches besser eingebaut wurde als in das S-Atom der Thiolgruppe.

Bei den Einbauversuchen zeigten neben dem Gluco-sinalbat noch andere Inhaltsstoffe größere Aktivität. p-Hydroxyphenylelessigsäure wurde vorwiegend in das Glucosid und in p-Hydroxyphenylacetylglucose übergeführt. p-Cumarsäure ergab neben dem eigenen Glucosid noch die Glucoside der p-Hydroxybenzoesäure, der Ferulasäure und der Kaffeesäure, während p-Hydroxybenzaldehyd zum Großteil in das p-Hydroxybenzoesäureglucosid umgewandelt wurde; daneben war geringe Aktivität in Protocatechusäure zu finden. Nach Applikation von Tyrosin-2- ^{14}C war der überwiegende Teil der Aktivität in den Kohlehydraten und mehreren Glucosiden von Phenolcarbonsäuren (p-Hydroxybenzoesäure, p-Hydroxyphenylelessigsäure); nach Glucosidspaltung konnte aber keine Aktivität in den Phenolcarbonsäuren gefunden werden. Ein derart starker Abbau des Tyrosins mit anschließender Gluco-neogenese wurde auch von anderen Autoren²⁴ bei verschiedenen Angiospermen gefunden. Beim Einbau der Glucose-1- ^{14}C zeigten neben Sinalbin noch einige Phenolcarbonsäureglucoside, Inosit und Phytinsäure Aktivität. Da sich beim Einbau von $^{35}\text{SO}_4$ einige dem TAGS im R_F -Wert sehr nahe gelegene Aktivitätsspitzen fanden, darf man annehmen, daß es sich dabei um ähnliche Senfölglycoside oder Vorstufen handelt.

Junge Pflänzchen von *Sinapis alba* enthalten neben Sinalbin noch weitere phenolische Inhaltsstoffe: 2-Hydroxybenzoesäure, 4-Hydroxybenzoesäure, 3,4-Dihydroxybenzoesäure, 2,5-Dihydroxybenzoesäure, Vanillinsäure, 3,4,5-Trihydroxybenzoesäure, Syringasäure, p-Hydroxyphenylelessigsäure, p-Cumarsäure, Kaffeesäure, Ferulasäure, Sinapinsäure.

Aus den hier erhaltenen Resultaten und ähnlichen Ergebnissen bei der Biosynthese anderer Senfölglycoside kann man vermuten, daß α -Ketosäuren (p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure beim Sinalbin, Benzylbrenztraubensäure aus Phenylbrenztraubensäure und Essigsäure beim Glucanasturtiin, die α -Ketoadipinsäure aus α -Ketoglutarsäure und Essigsäure beim Sinigrin) die Ausgangsstoffe der Biosynthese darstellen. Im speziellen Fall des Sinalbins könnte die p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure durch oxydative Decarboxylierung in einen „aktiven p-Hydroxyphenylacetaldehyd“ (Thiaminpyrophosphat-Verbindung?) übergeführt werden, der durch Oxydation mit Cystin direkt unter Abspaltung von Cystein

²⁴ R. K. Ibrahim, S. G. Lawson und G. H. N. Towers, *Canad. J. Biochem. Physiol.* **39**, 873 (1961).

zum entsprechenden Thioester umgewandelt würde. Dieser könnte durch eine Transoximase, wie sie *Yamafuji*²⁵ in anderen Organismen nachgewiesen hat, mit der α -Oximinoglutarinsäure als Donor oder über das Thioamid in den Thiohydroxamsäureester übergeführt werden. Unter Reaktion mit einem Glucose-Donor (Uridindiphosphatglucose?) sollte dann unter Abspaltung von Serin die S-(β -D-Glucopyranosyl)-thiohydroxamsäure entstehen, die ähnlich den Oximen im tierischen Organismus²⁶ in das Sulfat umgewandelt werden könnte. Als Alternative zu dem besprochenen Schema kann der Weg angesehen werden, bei dem primär der N der α -Aminosäure oxydiert wird und auch in der Folge keine Spaltung dieser C—N-Bindung erfolgt.

Herrn Prof. Dr. *O. Hoffmann-Ostenhof* danke ich für seine Unterstützung und wertvolle Diskussion, Herrn Doz. Dr. *G. Billek* (z. Zt. Rio de Janeiro) für sein reges Interesse zu Beginn der Untersuchungen. Die Arbeit wurde mit Unterstützung der Ludwig-Boltzmann-Gesellschaft, Wien, durchgeführt, wofür ihr mein besonderer Dank gilt.

Experimenteller Teil

TAGS. Reines Sinalbin²⁷ wurde in wenig Wasser gelöst und durch eine Säule mit Kationenaustauscher (100—200 mesh) in Tetramethylammonium-Form laufen gelassen. Die wäßrige Lösung engte man ein und trennte auf einer Cellulosesäule mit dem Elutionsmittel Aceton—Wasser, 9:1 (R_F des *TAGS* ca. 0,55), von geringfügigen Verunreinigungen ab. Die erhaltene Lösung wurde sehr schonend eingengt und getrocknet. So erhielt man ein weißes mikrokristallines Pulver, das bei der Elektrophorese (pH 2,6, Na-Citrat—HCl-Puffer, 15 V/cm) ein sich dem Sinalbin in Wanderungsweg und Reaktion völlig gleich verhaltendes Anion ergab.

$C_{18}H_{32}N_2O_{11}S_2$. Ber. C 41,9, H 6,23, N 5,43, S 12,4.
Gef. C 42,0, H 6,29, N 5,51, S 11,9.

Applikation

Ca. 100 Stück 2—3 Wochen alte Pflänzchen von *Sinapis alba* wurden vorsichtig gewaschen und in mehrere Kelchgläser gesetzt. Die *Knopsche* Nährlösung enthielt neben der zu applizierenden Verbindung pro ml noch je 20 μ g Glucose, Cystein, K_2SO_4 , Cholinchlorid und Sinapinsäure. Im Falle der Applikation von $^{35}SO_4$ wurde das K_2SO_4 der Nährlösung durch L-Tyrosin ersetzt. Je nach Flüssigkeitsaufnahme der Pflänzchen wurde *Knopsche* Nährlösung nachgegossen. Dauer der Applikation: 5 Tage. Die nicht aufgenommene Aktivität wurde jeweils zurückgemessen und betrug zwischen 1 und 7%.

²⁵ *K. Yamafuji, S. Hatano und H. Omura, Enzymologia* [den Haag] **24**, 141 (1962).

²⁶ *E. Boyland und R. Nery, J. Chem. Soc. [London] 1962*, 5217.

²⁷ *H. Will, Ann. Chem.* **199**, 150 (1879).

Isolierung des *TAGS* aus *Sinapis alba*

Die Pflänzchen wurden mit Wasser abgespült, zerschnitten und sofort mit 80proz. Alkohol aufgeköcht. Nach dem Abdekantieren wurde noch zweimal mit 20proz. Alkohol extrahiert, die vereinigten Lösungen bis zum wasserfeuchten Rückstand eingengt und der Rückstand zwischen Wasser und Äther verteilt. Man befreite die dunkelrot gefärbte wäßrige Lösung im Vak. vom Äther und filtrierte über eine Mischung von Celite und Aktivkohle. Das Filtrat ließ man durch eine mit Kationenaustauscher (Dowex 50 \times 4, 200 mesh) in Tetramethylammonium-Form beschickte Säule (1,5 \times 30 cm) laufen, wusch mit Wasser nach und engte die vereinigten Lösungen ein. Diese konzentrierte Lösung wurde als 140 cm langer Strich auf Chromatographiepapier (4 Bögen, SS 2043 b, à 35 cm Breite) aufgetragen und mit dem Lösungsmittel A* entwickelt. Die Aktivitätsverteilung am Chromatogramm wurde am Scanner bestimmt und die dem *TAGS* entsprechende Zone herausgeschnitten, mit Wasser eluiert und im Lösungsmittelgemisch B* rechromatographiert. Schließlich wurde durch Elektrophorese (pH 2,6, Na-Citrat—HCl-Puffer, 15 V/cm) das Produkt auf Einheitlichkeit geprüft. Die Menge des *TAGS* wurde nach entsprechender Eichung am Papierchromatogramm bestimmt, die Aktivität im Eluat gemessen.

Es konnte auch so vorgegangen werden, daß die oben beschriebene, durch Celite filtrierte wäßrige Lösung durch eine Kaskade von Kationenaustauscher (Dowex 50 \times 4, 200 mesh, H⁺-Form) und Anionenaustauscher (Dowex 2 \times 4, 200 mesh, Cl⁻-Form) durchlaufen gelassen wurde, der Anionenaustauscher mit 0,2 m K₂SO₄-Lösung eluiert wurde, diese Lösung zur Trockene eingengt und dann mit heißem Methanol extrahiert wurde. Der Rückstand, der sich nach Einengen der methanol. Lösung ergab, konnte direkt der Elektrophorese unterworfen werden.

Abbau des *TAGS*

a) Das aktive *TAGS* wurde mit 50 mg inaktiven Materials verdünnt und durch 1stdg. Kochen mit 10proz. HCl hydrolysiert. Die entstandene p-Hydroxyphenylelessigsäure konnte durch Extraktion mit Äther und Sublimation im liegenden Rohr bei 0,01 Torr und 180° isoliert werden. Nach Bestimmung der spezif. Aktivität wurde mit 150 mg inaktiver p-Hydroxyphenylelessigsäure verdünnt und diese durch Methylierung mit Diazomethan und anschließende Verseifung mit NaOH in die p-Methoxyphenylelessigsäure übergeführt. Die Homoanissäure wurde analog der Phenylpropionsäure²⁸ alkalisch mit KMnO₄ zur Anissäure und CO₂ oxydiert. Die Anissäure wurde nach Ansäuern und Zugabe von NaHSO₃ mit Äther extrahiert und nach Sublimation bei 145° und 0,01 Torr mit 80% Ausbeute gewonnen. Diese Oxydation wurde in einer geschlossenen Apparatur durchgeführt; dadurch war es möglich, nach dem Ansäuern vor der Zugabe von NaHSO₃ unter N₂-Spülung das entstandene CO₂ in einen mit NaOH beschickten Absorptionsturm zu treiben und dann als Bariumcarbonat zu fällen. Anissäure ergab durch Nitrierung bei 70° 2,4,6-Trinitroanisol²⁹. Der Brompikrinabbau des letzteren wurde analog zum Abbau der Pikrinsäure durchgeführt³⁰. Nach dem Abdestillieren des Brom-

* Genaue Beschreibung siehe unter Papierchromatographie.

²⁸ E. A. Fehnel und P. A. Lackey, J. Amer. Chem. Soc. **73**, 2473 (1951).

²⁹ C. L. Jackson und R. B. Eagle, Amer. Chem. J. **29**, 104 (1903).

³⁰ J. Baddiley, G. Ehrensward, E. Klein, L. Reio, E. Saluste und R. Stjernholm, J. Biol. Chem. **183**, 777 (1950).

pikrins wurde in einer geschlossenen Apparatur angesäuert und das CO_2 mit N_2 in einen mit NaOH beschickten Absorptionsturm übergetrieben. Nach Fällung mit BaCl_2 erfolgte die Messung der Aktivität der C-Atome 1, 3 und 5 des Trinitroanisols am BaCO_3 . Das vorerst entstandene Brompikrin wurde durch Na -Oxydation nach *van Slyke* und *Folch* in BaCO_3 übergeführt.

b) Das aktive *TAGS* wurde mit 50 mg inaktivem Material verdünnt und bei pH 6,0 und 30° mit einer Myrosinase-Lösung³¹ inkubiert. Diesem Ansatz wurden nach 2 Std. 500 μl Anilin zugefügt, worauf mit Äther erschöpfend extrahiert wurde. Der wäßrigen Lösung setzte man 100 mg K_2SO_4 als Träger zu, säuerte mit HCl an und fällte mit BaCl_2 . Das ausgefallene BaSO_4 wurde abgesaugt, gegläht und gewogen. Es wurde die Aktivität unter Korrektur der Selbstabsorption bei unendlich dicker Schichtdicke gemessen und die spezif. Aktivität unter der Voraussetzung berechnet, daß das Sulfat quantitativ abgespalten wurde. Die vorher erhaltene äther. Lösung wurde zuerst kurz mit verd. HCl , dann mit verd. NaHCO_3 und H_2O geschüttelt und dann eingengt. Der Rückstand konnte mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie (Kieselgel *G*, Schichtdicke 0,5 mm, Lösungsmittelgemisch *E*) aufgetrennt werden. Menge und Aktivität des N-(p-Hydroxybenzyl)-N'-phenylthioharnstoffes ließen sich nach Elution der entsprechenden Zone mit Methanol bestimmen.

Zur Aktivitätsmessung wurden die zu untersuchenden Verbindungen in unendlich dünner Schichte auf Alu-Plättchen aufgetragen, während BaCO_3 , BaSO_4 in Stahlschälchen bei unendlich dicker Schichte unter geeigneten geometrischen Bedingungen gemessen wurden.

Papierchromatographie

Lösungsmittelgemisch A: Aceton— H_2O , 9 : 1

Glucose (0,24), *TAGS* (0,65), p-Hydroxyphenylessigsäure (0,95).

Lösungsmittelgemisch B: n-Butanol—Pyridin— H_2O , 10 : 3 : 3.

Glucose (0,20), *TAGS* (0,30), p-Hydroxyphenylessigsäure (0,85), Inosit (0,05).

Zur Sichtbarmachung reduzierender Verbindungen wurde zuerst mit aceton. AgNO_3 -Lösung und dann mit alkohol. NaOH -Lösung gesprüht. *TAGS* und Phenolcarbonsäuren wurden mit diazot. Sulfanilsäure nachgewiesen.

Dünnschichtchromatographie

(bei Kammersättigung, bzw. in BN-Kammer)

Lösungsmittelgemisch C: H_2O —Methanol—Essigester, 15 : 1 : 1; Sinalbin (0,18).

Lösungsmittelgemisch D: Acetonitril—Methanol, 5 : 1; *TAGS* (0,50), Glucose (0,30), Inosit (0,00).

Lösungsmittelgemisch E: Benzol—Methanol, 7 : 1; N-(p-Hydroxybenzyl)-N'-phenylthioharnstoff 0,30.

³¹ C. Neuberg und J. Wagner, *Biochem. Z.* **174**, 457 (1926).