

²⁾ CHRISTEWA, L. A.: Internat. bodenkundl. Ges., Hamburg 2, 46—50 (1958). — ³⁾ FLAIG, W.: Internat. bodenkundl. Ges., Hamburg 1958, 11—45. — ⁴⁾ FLAIG, W., K. SCHARRE u. G. SCHOLL: Z. Pflanzenernähr., Düng., Bodenkunde 76, 201—209 (1957). — ⁵⁾ FITZEK, J., u. H. STREGMANN: Beitr. Silikose-Forsch. 47, 45 (1957).

Die Umwandlung von Thymin-2-C¹⁴ durch Röntgenstrahlen in vitro und in vivo

Radioaktives Thymin (Thymin-2-C¹⁴, spez. Aktivität 9,5 mC/mMol) wurde in verschiedenem Milieu (s. unten) bei sonst gleichen Bedingungen einer Röntgenbestrahlung ausgesetzt. Der Grad der Umwandlung wurde an Hand der Menge des bei der Zerstörung des Thymins entstehenden radioaktiven Harnstoffs bestimmt.

Durchführung der Bestrahlung. Bestrahlt wurde jeweils 2 Std bei einer Leistung von 10 kr/min (50 kV), Machlett-Röntgenröhre, Typ OEG 60, W-Anode; pH-Wert der Lösung 5,5; Schichtdicke 5,2 mm, Temperatur 22°C, Bestrahlung in Gegenwart von Luftsauerstoff, Konzentration des Thymins in der Lösung 15 µg/ml (bei Milieu 1—3, s. unten).

Bestrahlungsmilieu: 1. dest. Wasser, 2. Yeast-Extract-Bouillon (2% Glucose, 0,5% Pepton, 1% Difco-Yeast-Extract), 3. Zellhomogenisat aus Enterococcus Stei in dest. Wasser (~20 mg Zellmasse/ml Suspension), Thymin-2-C¹⁴ zum Homogenisat zugegeben. 4. Thymin-2-C¹⁴ eingebaut in Enterococcus Stei, radioaktive Zellen (~20 mg Zellmasse/ml, 10 bis 15 µg Thymin-2-C¹⁴/ml) in dest. Wasser homogenisiert. 5. Wie 4., radioaktive Zellen jedoch unzerstört in dest. Wasser suspendiert und bestrahlt.

Bestimmung des radioaktiven Harnstoffs. Das unveränderte Thymin, der durch Bestrahlung entstandene Harnstoff und eine weitere, nicht identifizierte radioaktive Verbindung (X) wurden durch Papierchromatographie getrennt. Die Radioaktivität im Chromatogramm wurde mit einem Glockenzählrohr (Friesecke und Hoepfner, FHZ 15b, 1,36 mg/cm² Glimmer) quantitativ bestimmt. Gesamtaktivität pro Chromatogramm etwa 8000 Impulse/min, Meßzeit 10 min/cm, Nullwert ~40 Imp./min. Nach Bestrahlung im Versuchsmilieu 4 und 5 (s. oben) wurde vor dem Chromatographieren mit 70%iger

Tabelle. Umwandlung von Thymin-2-C¹⁴ durch Röntgenstrahlen (1200 kr) in verschiedenem Bestrahlungsmilieu

Nr.	Thymin-2-C ¹⁴ bestrahlt in	Radioaktivität nach Bestrahlung (%)		
		Thymin	Harnstoff	Verbindung X
1	Destilliertem Wasser	31	58	11
2	Yeast-Extrakt-Bouillon	92 ^{b)}	6	2
3	Zellhomogenisat aus E. Stei in destilliertem Wasser	81 ^{b)}	12	7
4	vivo, in E. Stei, A ^{a)}	96	2	2
5	vivo, in E. Stei, B ^{a)}	98—99	0,5—1,0	0,2—1,0

a) vivo, nach Einbau in Enterococcus Stei, A Zellen vor Bestrahlung homogenisiert, B Zellen unzerstört bestrahlt.

b) Bei Vergleich der Versuche 2 und 3 ist zu beachten, daß in Versuch 2 die Trockenmasse pro ml Lösung größer ist (3,5%) als in Versuch 3 (~2%).

Perchlorsäure 1 Std auf 100°C erhitzt, um die radioaktiven Verbindungen aus der DNS zu befreien. Nach Neutralisation mit KOH und Abzentrifugieren des KClO₄ wurde chromatographiert. In einem Kontrollversuch wurde festgestellt, daß ohne Bestrahlung unter diesen Bedingungen keine anderen radioaktiven Verbindungen entstehen und das Thymin den Säureaufschluß unverändert übersteht.

Papierchromatographie. Lösungsmittelsysteme I. n-Butanol/Wasser 86:14, II. n-Butanol/Äthanol/Wasser 4:1:1, III. Wasser pH 10. Papier: Schleicher und Schüll, 2043b gewaschen. Es wurde aufsteigend chromatographiert. R_F-Werte in System I: Thymin 0,49; Harnstoff 0,24; Verbindung X 0,04.

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß der Grad der Zerstörung des Thymins immer geringer wird, je mehr sich die Milieubedingungen den Verhältnissen in vivo nähern. In vivo wird nach Bestrahlung ein Zerstörungseffekt festgestellt, der nur etwa 1% des Effektes bei Bestrahlung in vitro beträgt¹⁾. Diese Ergebnisse zeigen, daß in der Zelle die für die Vererbung der Eigenschaften wichtigen Nucleinsäurebasen sehr gut durch andere Zellsubstanzen vor der Wirkung der Strahlen geschützt

werden. Andererseits ist daraus ersichtlich, daß Erkenntnisse, die in vitro-Experimenten gewonnen werden, nicht ohne weiteres auf vivo-Verhältnisse übertragbar sind.

Für den hier beschriebenen Schutz des Thymins vor der Umwandlung durch Röntgenstrahlen können neben anderen Verbindungen hauptsächlich die Proteine verantwortlich sein, die eventuell selbst mit den primär durch die Röntgenstrahlen gebildeten Bestrahlungsprodukten des Wassers reagieren und so durch einen „Konkurrenzeffekt“ die DNS-Basen — hier an Hand von Thymin nachgewiesen — teilweise vor der Zerstörung schützen²⁾.

Die oben erwähnte Verbindung X wurde nicht identifiziert. Vermutlich handelt es sich hier um das von SCHOLLS und WEISS³⁾ beschriebene Hydroperoxyd des Thymins. Untersuchungen zur Aufklärung dieser Verbindung sind noch im Gange.

Herrn Professor Dr. W. STEIN und Herrn Professor Dr. A. WACKER danken wir für viele Anregungen und Hinweise. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Ministerium für Atomkernenergie sind wir für Unterstützung dieser Arbeit zu Dank verpflichtet.

I. Physikalisches Institut der Freien Universität Berlin, Abteilung für Biophysik, Berlin-Dahlem

E.-R. LOCHMANN und G. RIEBKE

Eingegangen am 20. Januar 1962

¹⁾ Vgl. auch LOCHMANN, E.-R.: Diss. T. U. Berlin 1961; WACKER, A.: Dtsch. Med. Wschr. 86, 735 (1961). — ²⁾ Über den Schutzeffekt von Aminosäuren vgl.: WACKER, A., u. Mitarb.: Z. Naturforsch. (1962, in Vorbereitung). — ³⁾ SCHOLLS, G., u. J. WEISS: a) Radiation Res., Suppl. 1, 177 (1959); — b) Nature [London] 185, 305 (1960).

Über das Vorkommen von Isoquercitrin und Astragalin in den Blättern einiger Obstarten

Glykoside des Quercetins und Kämpferols sind im Pflanzenreich weit verbreitet. So ist z.B. Isoquercitrin (Quercetin-3-glucosid) in den bisher geprüften Obstarten Apfel, Pflaume, Aprikose, schwarze Johannisbeere und Wein aufgefunden worden¹⁾, denen wir das Vorkommen in Birnen zugeben können. Es ist weiterhin in Kirsch- und Pfirsichblättern nachgewiesen worden; letztere enthalten ebenfalls Astragalin (Kämpferol-3-glucosid)²⁾. CRONENBERGER³⁾ fand Kämpferol als Glykosid in den Blättern der Süß- und Sauerkirsche,

Tabelle. Vorkommen von Isoquercitrin und Astragalin in den Blättern von Obstarten

	Isoquercitrin	Astragalin
Apfel (Malus silvestris Mill.)	+	—
Birne (Pyrus communis L.)	+	+
Garten-Stachelbeere (Ribes uva-crispa L.)	+	+
Garten-Johannisbeere (R. rubrum L. s. lat.)	+	+
Wald-Himbeere (Rubus idaeus L.)	+	+
Wald-Brombeere (Rubus fruticosus L.)	+	+

Pflaume, Pfirsich und Aprikose. Dies bewog uns, auch die Blätter der anderen Obstarten auf Flavonole, besonders Isoquercitrin und Astragalin, zu untersuchen.

Die Aufarbeitung der Blätter erfolgte in der von uns früher angegebenen Weise⁴⁾, wobei wir einen Äther- und einen Essigesterextrakt erhielten. Sie wurden auf Papierbogen Schleicher & Schüll Nr. 2043b in 15%iger Essigsäure präparativ aufgetrennt, die Flavonolzonen dann mit Methanol extrahiert und die so erhaltenen Auszüge in den Fließmitteln 15%ige Essigsäure und Butanol-Essigsäure-Wasser 4:1:2,2 aufsteigend chromatographiert. Hierbei wurden nach Besprühen mit 0,2%iger methanolischer Flavognost-Lösung und 1%iger methanolischer AlCl₃-Lösung unter der UV-Lampe Isoquercitrin und Astragalin, wie in der Tabelle angegeben, aufgefunden und durch Mischchromatogramm mit authentischen Substanzen identifiziert. Isoquercitrin stellt in allen untersuchten Blättern das Hauptvorkommen, während Astragalin in etwas geringerer Menge auftritt. Die Flavonolglykoside wurden weiterhin 90 min in siedender 2%iger Schwefelsäure hydrolysiert, wonach das Aglykon und der Zuckerrest papierchromatographisch nachgewiesen werden konnten. Himbeer-, Brombeer- und Stachelbeerblätter enthalten noch weitere

Quercetin- und Kämpferolglykoside, Apfelblätter Quercitrin.

Köln, Trajanstraße 17

KARL HERRMANN

Eingegangen am 17. Januar 1962

¹) HERRMANN, K.: Mitt. Gebiete Lebensmittelunters. Hyg. [Bern] 50, 121 (1959). — ²) GEISSMAN, T.A.: Arch. Biochem. Biophysics 60, 21 (1956). — ³) CRONENBERGER, L.: C. R. hebdom. Séances Acad. Sci. 249, 2866 (1959). — ⁴) HERRMANN, K.: Z. Lebensmittelunters. u. Forsch. 106, 341 (1957); 108, 152 (1958).

Digitoxigenin-glucomethylosid und Gitaloxin aus den Blättern von Digitalis lanata Ehrh. *)

In den mit Xylol-Methyläthylketon 1:1 (XMAeK) entwickelten Formamid-Papierchromatogrammen¹⁾ der Extrakte aus fermentierten Blättern von Digitalis lanata findet man, je nach Herkunft der Blätter mehr oder weniger deutlich, einen nach Behandlung mit Trichloressigsäure-Chloramin gelb fluoreszierenden Fleck dicht unter dem Fleck des Digoxins. Im Formamid-Chromatogramm, das mit Cyclohexan-Tetrahydrofuran-Chloroform 1:1:2 (CTC 112) entwickelt worden ist, liegt dieses Glykosid genau zwischen Stropesid und Verodioxin mit einem R_f -Wert von etwa 0,25. Bei der Chromatographie der Extrakte an Aluminiumoxyd mit Chloroform und zunehmenden Zusätzen Methanol wird das Glykosid erst sehr spät, nach dem Gitoxin und Digoxin, mit Chloroform-Methanol 1:1 eluiert. Aus dieser letzten Anreicherungsfraktion haben wir es verteilungschromatographisch an Formamid-cellulose-Säulen mit dem System CTC 112 und an Säulen von Celite 545/Wasser 1:1 mit Cyclohexan-Essigester 3:2 isoliert. — Nach der Mannich-Spaltung des reinen Produktes ließ sich Digitoxigenin identifizieren (IR-Spektrum identisch mit authentischem Digitoxigenin) und ein Zucker nachweisen, der in Papierchromatogrammen ähnliche R_f -Werte wie Rhamnose hatte. Der gereinigte Zuckersirup hatte $[\alpha]_D^{20} = +59^\circ$ ($c = 0,5$ in Methanol, Anfangswert). Die analytischen Daten stimmen weitgehend mit denen des Digitoxigenin-glucomethylosids überein, das K. MEYER et al.²⁾ kürzlich aus den Blättern von Digitalis canariensis L., var. isabelliana isoliert haben.

Schließlich hat sich das IR-Spektrum mit dem des authentischen Digitoxigenin-glucomethylosids als identisch erwiesen³⁾.

Digitoxigenin-glucomethylosid: $C_{29}H_{44}O_8$ (520,64); ber.: C 66,89, H 8,52, gef.: C 66,93, H 8,51; Schmp. 215 bis 218°, $[\alpha]_D^{20} = -9,2^\circ \pm 2^\circ$ (Methanol). Triacetyldigitoxigeninglucomethylosid: Schmp. 234 bis 239°, $[\alpha]_D^{20} = -1,3^\circ$ (CHCl₃).

Digitoxigenin-glucomethylosid kommt in Digitalis lanata-Pflanzen verschiedener Herkunft genuin mit einer endständigen Glucose verknüpft als Digitoxigenin-gluco-sido-glucomethylosid in Mengen bis zu 0,03 %, meist um 0,01 %, bezogen auf Trockenblatt, vor.

Die Anwesenheit mehrerer Gitaloxigeninglykoside und vor allem des Acetylgitaloxins in den Blättern von Digitalis lanata⁴⁾,⁵⁾ gab Veranlassung zu der Annahme, daß auch Gitaloxin, das dritte Hauptglykosid der Digitalis purpurea⁶⁾, in D. lanata vorhanden ist. Im XMAeK-Chromatogramm der fermentierten Lanata-Extrakte ist Gitaloxin nicht mit Sicherheit auszumachen, weil sich Acetylgitoxin- α und - β sowie Lanadoxin im gleichen R_f -Bereich des Papierchromatogrammes befinden. Mutterlaugen aus der Digoxin-Produktion, welche die Glykoside enthalten, die im XMAeK-Chromatogramm höhere R_f -Werte haben als Gitoxin, wurden an Silicagel-Säulen (Substanz: Silicagel = 1:10) mit Benzol-Essigester 2:1, 1:1 und 1:2 fraktioniert. In den ersten Fraktionen befanden sich Digitoxigenin, Gitaloxigenin, Acetyldigitoxin, Lanadoxin, Acetylgitaloxin und Acetylgitoxin. Digitoxin + Gitaloxin traten erst mit Benzol-Essigester 1:2 aus der Säule. Die Abtrennung des Gitaloxins erfolgte dann in der früher beschriebenen Weise⁶⁾ an Formamidcellulose-Säulen mit Cyclohexan-Tetrahydrofuran 1:1. Das aus Aceton-Äther-Petroläther umkristallisierte Produkt war in allen Daten und im IR-Spektrum mit authentischem Gitaloxin aus D. purpurea identisch. Gitaloxin ist in D. lanata mit einem auf Trockenblatt bezogenen Gehalt von weniger als 0,005 % ein Nebenglykosid.

Forschungslaboratorien der Firma C.F. Boehringer u. Soehne, G.m.b.H., Mannheim

F. KAISER, E. HAACK und H. SPINGLER

Eingegangen am 18. Januar 1962

*) 18. Mitteilung über Herzglykoside.

¹) KAISER, F.: Chem. Ber. 88, 556 (1955). — ²) REES, R., C.R. GAVILANES, W. MEIER, A. FÜRST u. K. MEYER: Helv. chim. Acta 44, 1607 (1961). — ³) Wir danken Herrn Professor K. MEYER auch an dieser Stelle für die freundliche Überlassung von Digitoxigenin-glucomethylosid und Glucomethylose. — ⁴) KUTTER, D.: Diss. Lausanne 1957. — ⁵) HAACK, E., F. KAISER, M. GUBE u. H. SPINGLER: Naturwissenschaften 45, 241, 315, 388 (1958). — ⁶) HAACK, E., F. KAISER u. H. SPINGLER: Chem. Ber. 89, 1353 (1956).

Bildung von ¹⁴C-Glucose und ¹⁴C-Fructose aus ¹⁴C-Weinsäure in reifenden Beeren der Rebe

Die Abnahme des Säure- und die Zunahme des Zuckergehaltes in Früchten mit fortschreitender Reifung ist allgemein bekannt. Durch Einführen von DL-1,4-¹⁴C-Weinsäure¹⁾ in reifende Beeren der Rebe konnten wir unter anderem eindeutig einen Übergang in ¹⁴C-Glucose und ¹⁴C-Fructose nachweisen und somit einen Beitrag zu der viel diskutierten Frage leisten, auf welche Art und Weise Zucker in reifenden Beeren entstehen.

Bei Aufnahmeversuchen von ¹⁴C-Weinsäure durch die Schnittfläche von Triebspitzen der Rebe (etwa 10 cm lang) war aufgefallen, daß im Dunkelversuch ein bestimmter Anteil der markierten Weinsäure zu Kohlendioxyd veratmet wird. Damit tauchte die Vermutung auf, daß Weinsäure in den Citronensäure-Zyklus eingegliedert werden kann. Diese Vermutung wurde dadurch gestützt, daß ¹⁴C-Weinsäure beim Erwärmen in alkoholischer Lösung leicht in ¹⁴C-Äpfelsäure übergeht, wobei sich ein Gleichgewichtszustand zwischen Weinsäure und Äpfelsäure einstellt. Inwieweit diese Modellreaktion für den biologischen Versuch Beachtung finden kann, ist noch zu klären.

Mitte September 1961 wurden Trauben der resistenten Rebneuzucht Sbl. 5-24-20 vom Stock abgeschnitten und einzelne, gesunde Beeren so abgetrennt, daß ein Teil des Stieles an der Beere verblieb. Die Beeren wurden mit durch Chloroform befeuchteter Watte abgerieben und 3 Tage in einem Exsikkator über Phosphorpentoxyd im Vakuum aufbewahrt; dadurch wurde ein Teil des Fruchtwassers durch die unbeschädigte Beerenhaut entzogen. 11,28 g der so vorbehandelten Beeren wurden in eine Lösung von 2,7 mg (0,1 mC) DL-1,4-¹⁴C-Weinsäure in 11 ml Wasser gebracht. Nach 136 Std waren 0,79 g der Lösung aufgenommen worden.

Weitere Aufarbeitung: Waschen der Beeren. Homogenisieren mit wäßriger Trichloressigsäure-Lösung (2 %). Zentrifugieren, mehrmaliges Auswaschen des Sedimentes. Gefrier-trocknung des Zentrifugates und des Bodensatzes. Lösen des Gefrier-trocknungsrückstandes des Zentrifugates (2,22 g) in Wasser. Befreien von Anionen an Amberlite IR 45. Gefrier-trocknen des Neutralstoffes enthaltenden Säulenauslaufes. Nach Lösen in Wasser Chromatographie auf Papier (Schleicher u. Schüll 2043 bm). Fließmittel n-Butanol/Ameisensäure/Wasser (1024:200:90). Rechromatographieren von Glucose und Fructose nach Elution.

Die so erhaltenen und gereinigten Zucker Glucose und Fructose wurden zur Bestimmung ihres Impulsgehaltes nach dem Verfahren von H. SIMON²⁾ in Bombenröhrchen verbrannt. Die Röhrchen werden in einer Glasapparatur aufgestoßen, wobei Kohlendioxyd und Wasser in ein Vakuum strömen und getrennt in Kühlfallen ausfrieren. Nach Überführen des Kohlendioxyds in ein Füll-Zählrohr waren z. B. folgende Impulswerte zu messen³⁾:

4,65 mg Glucose \rightarrow CO₂: 1400 I/min
7,35 mg Fructose \rightarrow CO₂: 1350 I/min

Der gesamte Bodensatz enthielt 1027170 I/min; das gesamte Zentrifugat 3370000 I/min.

Daraus ist folgende prozentuale Impulsverteilung zu errechnen (in Prozent der Gesamtaktivität):

Bodensatz 23,4 %	Neutraler Säulenauslauf 30,0 %
Überstand 76,6 %	Glucose 4,1 %
	Fructose 4,1 %

Parallel zu den Untersuchungen an isolierten Beeren wurden Aufnahmeversuche mit traubentragenden Trieben durchgeführt. Dabei ließ man wäßrige Lösungen von DL-1,4-¹⁴C-Weinsäure und L-¹⁴C-Glutaminsäure⁴⁾ durch die Stengel-Schnittfläche im Dunkeln aufnehmen. Nach genau gleicher Aufarbeitung der Beeren, die nach Beendigung des Versuches separat homogenisiert wurden, hatte im Weinsäure-Versuch Glucose 2,2 % und Fructose 1,8 % der Gesamtaktivität, im Glutaminsäure-Versuch Glucose 7,4 %, Fructose 8,6 % der Gesamtaktivität.