

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Die thermische Behandlung von Ribonucleinsäure und deren ernährungsphysiologische Bedeutung*)

Von K. LANG und E. SCHÄFFNER**)

Mit 1 Abbildung und 8 Tabellen

(Eingegangen am 10. Juli 1963)

In unserem Arbeitskreis wird seit längerer Zeit über die Veränderung der Nahrungsstoffe bei der Einwirkung von Hitze gearbeitet. Als die wichtigsten Bestandteile der Nahrung sind bisher die Proteine (10, 11, 17), Zucker (10, 11) und Fette (9, 4, 5) untersucht worden. Nun soll in dieser Arbeit die Veränderung der Ribonucleinsäure (RNS) bei der Einwirkung von Hitze und die ernährungsphysiologische Bedeutung der RNS untersucht werden. Wenn die Nucleinsäuren auch keine essentiellen Nahrungsfaktoren sind, so sind sie doch normale Bestandteile aller Zellen und Gewebe und kommen daher in der Nahrung in geringen Mengen vor.

Die Ribonucleinsäure ist aus äquimolekularen Mengen Phosphorsäure, D-Ribose und einem Gemisch von 4 Pyrimidin- bzw. Purinbasen aufgebaut. Die Phosphorsäure und die Ribose bilden als polyfunktionelle Komponenten über Esterbindungen die makromolekulare Verbindung. Die Basen sind N-glykosidisch in 1'- β -Verknüpfung an die Pentosreste gebunden. Sowohl die Esterbindungen als auch die N-glykosidischen Bindungen sind labil und werden bei der thermischen Behandlung angegriffen.

Die Veränderungen der RNS werden je nach der thermischen Behandlungsweise von unterschiedlicher Art sein. Temperatur und Zeit spielen als die wichtigsten äußeren Einflüsse eine große Rolle. Aber auch die Gegenwart oder der Ausschluß von Luft, sowie das trockene Erhitzen oder das Erhitzen wäßriger Lösungen führen zu differenten Ergebnissen. Als Reaktionsprodukt ist durch Desaminierung an den Basen (Adenin, Guanin und Cytosin) Ammoniak zu erwarten. Außerdem wird eine mehr oder weniger weit gehende Abspaltung der Basen stattfinden. MICHEEL u. Mitarb. (14) haben gezeigt, daß die Stabilität der N-Glykoside außer von der Zuckerkomponente, wie SCHRAMM (20) gezeigt hat, von der Einbeziehung des glykosidischen N-Atoms in ein Resonanzsystem abhängt. Die Pyrimidinbasen sind daher etwas stabiler als die Purinbasen gegenüber H^+ -Ionen katalysierter Hydrolyse. Als weitere labile Bindung ist die Phosphorsäurediesterbindung im RNS-Molekül einem Angriff durch H^+ -Ionen ausgesetzt. Neben anorg. Phosphat können dabei Nucleoside und Nucleotide sowie Polymere mit prim. bzw. sek. Phosphatesterendgruppen entstehen.

Bei der Zerstörung der heterozyklischen Ringe ist mit der Bildung von Harnstoff zu rechnen. Doch dürfte unter den Versuchsbedingungen diese Aufspaltung nicht in großem Umfang auftreten.

Da die Lebensmittelverarbeitung im allgemeinen in Gegenwart von Luft stattfindet, werden alle Versuche unter Durchleiten von Luft durchgeführt. Dadurch werden die Reaktionen oft undurchsichtig und eine Erklärung für die Reaktionsvorgänge wird in vielen Fällen sehr erschwert.

*) Herrn Prof. Dr. Dr. h. c. H. KRAUT zum 70. Geburtstag gewidmet.

**) Diss. (Mainz 1963).

1. Thermische Behandlung von Heferibonucleinsäure in trockenem Zustand

Die Nucleinsäureproben werden 2 bzw. 5 Std. unter Luftdurchleiten auf 105 °C erhitzt. Das von uns verwendete RNS-Präparat (Hefenucleinsäure) hat 20 mg freien Ammoniak pro 100 g RNS, d. h. 0,115% des gesamten Stickstoffs liegen in Form von Ammoniumionen an die Nucleinsäure gebunden vor. Das Reaktionsprodukt enthält anstatt der anfänglich vorhandenen Menge von 20 mg Ammoniak 100 mg (2 Std.) bzw. 150 mg (5 Std.) Ammoniak pro 100 g RNS.

Bei der thermischen Behandlung nimmt das anorganische Phosphat zu. Im Gegensatz zu Ammoniak, welcher durch Abspaltung der Aminogruppe am Adenin, Guanin oder Cytosin, eventuell auch bei der Aufspaltung des heterozyklischen Ringes der Basen entsteht, wird bei der Bildung von anorg. Phosphat der makromolekulare Verband zerstört. Die anfängliche Menge von 15 mg anorg. P nimmt bei der 2 Std. erhitzten Nucleinsäure auf 87 mg anorg. P bzw. bei der 5 Std. erhitzten Nucleinsäure auf 177 mg anorg. P pro 100 g RNS zu. Wir erhalten nach dem Erhitzen also das 6- bzw. 12fache des ursprünglichen Wertes an anorganischem Phosphat.

Nehmen wir an, daß das Mol.-Gew. 35000 beträgt und das mittlere Mol.-Gew. der Nucleotide 350 ist, so sind in dem Makromolekül 100 Nucleotideinheiten und damit 100 Phosphatbrücken.

Gesamt-P der RNS	etwa 9%
Anorg. P	0,015% = 0,17% d. Gesamt-P
Anorg. P nach 5stünd. Erhitzen	0,177% = 1,97% d. Gesamt-P

1,8% des gesamten P werden während der thermischen Behandlung in anorg. P übergeführt, d. h. aus einem Makromolekül mit 100 Phosphoratomen werden 1,8 anorg. P und 1,8 + 1 Polynucleotide als Bruchstücke der Nucleinsäure gebildet. Endständige Phosphatreste werden bei dieser Rechnung nicht berücksichtigt.

Harnstoff wurde nicht gefunden.

Die reine Ribonucleinsäure, die 2 Std. und 5 Std. erhitzten Ribonucleinsäuren werden mit verdünnter Natronlauge hydrolysiert und die Lösung der Hydrolysenprodukte nach Einstellung von p_H 5,3 auf einer Anionenaustauschersäule getrennt. Mit einem Ameisensäuregradienten bis p_H 1,6 können folgende Fraktionen isoliert werden:

Tabelle 1. Fraktionierung des alkalischen RNS-Hydrolysats an Dowex-1-formiat. Eluiert wurde mit Ameisensäure steigender Konzentration. Für die einzelnen Nucleotide ist der Extinktionsquotient angegeben. Cp = Cytidylsäure, Ap = Adenylsäure, Up = Uridylsäure, Gp = Guanylsäure und Ip = Inosinsäure

	Eluiert bei p_H	$Q \frac{E_{280}}{E_{260}}$
Nucleoside und freie Basen werden nicht absorbiert	—	—
2'-Cp	3,25–3,20	1,82
3'-Cp	3,20	2,00
2'-Ap	2,85–2,80	0,22
3'-Ap	2,80	0,22
2'- und 3'-Up	2,80–2,70	0,33
2'- und 3'-Gp	2,70–2,40	0,65–0,70
2'- und 3'-Ip	2,10–2,00	0,3

Inosinsäure wird bei den thermisch behandelten Nucleinsäuren in etwas größerer Menge als in der reinen RNS gefunden. Die Nucleotidmenge nach der Hydrolyse mit verd. Natronlauge hat bei den erhitzten Substanzen abgenommen. Diese Abnahme verteilt sich auf die einzelnen Nucleotide nicht in gleicher Weise (siehe Tab. 2). Die Abnahme ist bei der Cytidylsäure am stärksten und bei der Adenylsäure und Guanylsäure etwas geringer. Bei der Uridylsäure haben wir keine Abnahme festgestellt. Dieser konstante Wert der Uridylsäure kann darauf zurückgeführt werden, daß sie in dem Maße, in dem sie zerstört wird, wieder aus Cytidylsäure durch Hydrolyse der Aminogruppe entsteht.

Der Durchlauf, der Nucleoside und freie Basen enthält, wurde näher untersucht. Von den Nucleosiden werden nur Spuren, von den Pyrimidinbasen überhaupt nichts gefunden. Die Hauptmenge des Durchlaufs bilden die Purinbasen Adenin und Guanin, die bei den erhitzten Substanzen zunehmen. Freies Adenin steigt von 2 auf 9% des gesamten Adenins und freies Guanin von 1 auf 5% des gesamten Guanins.

Tabelle 2. RNS wird trocken 2 und 5 Std. erhitzt. 250 mg RNS, alkalisch hydrolysiert, werden an Dowex-1-Formiat $\times 8$, 30 cm \times 1 cm fraktioniert. Aus der Extinktion pro Volumeneinheit werden die mÄquivalente und die Anteile der zerstörten Nucleotide (in %) berechnet. Cp = Cytidylsäure, Ap = Adenylsäure, Up = Uridylsäure, Gp = Guanylsäure und Ip = Inosinsäure

Stunden erhitzt	Ext 260 m μ /1000 ml			m Äquivalente			% der Nucleotide zerstört	
	0	2	5	0	2	5	2	5
Cp	0,845	0,807	0,715	0,12	0,12	0,10	4,0	15,5
Ap	2,26	2,04	2,02	0,16	0,14	0,14	9,5	11,2
Up	1,50	1,47	1,50	0,15	0,15	0,15	0	0
Gp	2,05	1,98	1,87	0,18	0,17	0,16	4,0	9,6
Ip	0,017	0,109	0,108					

Die Zerstörung der Nucleotide beruht auf einer Spaltung der N-glykosidischen Bindung, die wie erwartet bei den Pyrimidinbasen geringer ist als bei den Purinbasen. Außerdem findet noch Desaminierung statt.

2. Thermische Behandlung von Ribonucleinsäure und Glukose in wäßriger Lösung

In wäßrigen Lösungen verlaufen die Reaktionen wesentlich anders. Es findet eine stärkere Veränderung beim Erhitzen statt als bei trockenem Erhitzen. Die RNS-Lösung hat nach 5stündigem Erhitzen auf 110 °C einen p_H-Wert 2,5. Die Azidität der in der Hitze gelösten Nucleinsäure ist verhältnismäßig groß (p_H 3,0) und nimmt während der Reaktion zu. Innerhalb von 5 Std. findet bereits eine weitgehende Abspaltung der Purinbasen statt. Gleichzeitig findet auch eine Spaltung der Phosphoresterbindungen statt. Wie SCHRAMM u. Mitarb. (16, 20) gezeigt haben, ist die Bildung einer hochpolymeren Apurinsäure nur bei der Desoxyribonucleinsäure möglich. Das Makromolekül der RNS wird abgebaut. Ein Auftrennen der Reaktionsprodukte an einer ECTEOLA-Austauschersäule ist nicht mehr möglich.

Eine Mischung aus 1 Teil RNS, 1 Teil Glukose und 5 Teilen Wasser wird 5 Std. unter Luftdurchleiten auf 105 °C erhitzt. Die klare Reaktionslösung reagiert sauer. Nach dem Abkühlen wird ein p_H-Wert von 2,6 gemessen. Mit 2 n Natronlauge wird die Reaktionslösung neutralisiert.

Mit äquimolaren Teilen werden folgende Versuche durchgeführt:

- a) Alkalische Hydrolyse und anschließende chromatographische Trennung der Nucleotide an einer Anionenaustauschersäule.
- b) Azidimetrische Bestimmung des Ammoniak.
- c) Bestimmung des anorganischen Phosphors.

ad a) Die neutrale Reaktionslösung wird mit verd. Natronlauge versetzt. Man läßt über Nacht bei Zimmertemperatur stehen. Anschließend wird mit verd. Salzsäure neutralisiert und die Lösung der Nucleotide auf einer Anionenaustauschersäule getrennt. Abb. 1 zeigt das Fraktionierungsdiagramm.

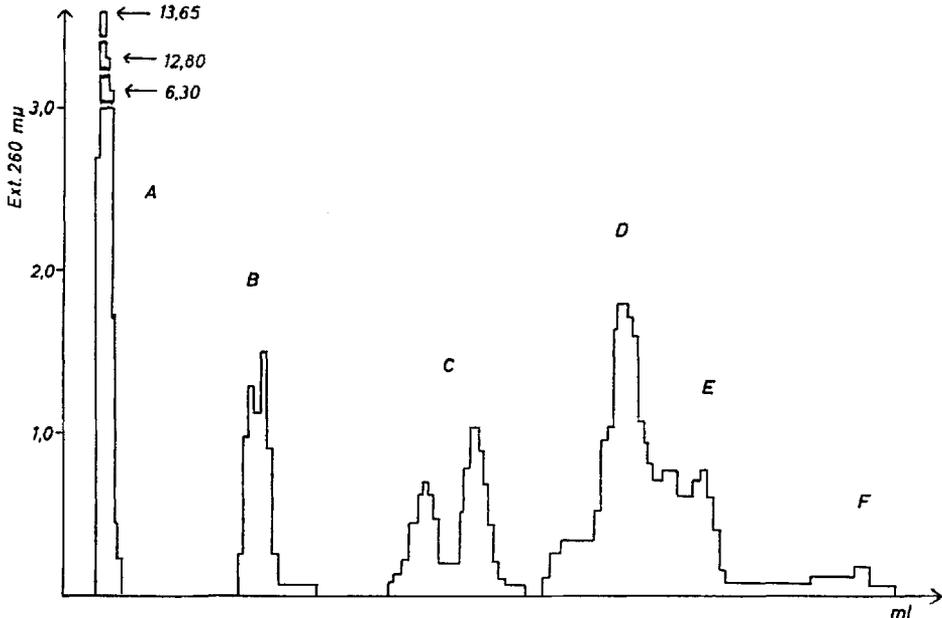


Abb. 1. Fraktionierung des alkalischen Hydrolysats von einem 5 Std. erhitzten Gemisch von RNS und Glukose in Wasser durch Ionenaustausch. Ionenaustauscher: Dowex-1-Formiat \times 8. Elution: Ameisensäuregradient

Der Durchlauf, Fraktion A, der die Nucleoside, die freien Basen und die Zucker enthält, ist im Gegensatz zur alkalischen Hydrolyse einer reinen RNS um ein vielfaches größer. Die Extinktion je 1000 ml bei 260 $m\mu$ beträgt 2,43 gegenüber 0,197/1000 ml für die entsprechende Fraktion der reinen RNS nach alkalischer Hydrolyse. Das entspricht einer Zunahme um rund das 12,5fache. In dieser Fraktion sind die beiden Purinbasen, sowie ein großer Teil der Glukose und Ribose enthalten. Diese Substanzen werden mit Hilfe der Papierelektrophorese getrennt und nachgewiesen. Neben Purinbasen und kleinen Mengen Nucleoside kommen hier mit großer Wahrscheinlichkeit noch Reaktionsprodukte der Zucker vor, die UV-Licht nicht absorbieren, aber auch mit den Reagenzien, die wir zum Nachweis der Purinbasen, Pyrimidinbasen und Zucker verwenden, nicht reagieren. Außerdem können durch Aufspaltung der Purin- bzw. Pyrimidinringe Substanzen in kleinen Mengen entstehen, die von uns noch nicht analytisch erfaßt sind und auch in der Fraktion A enthalten sind.

Die Fraktionen B-E (siehe Abb. 1) bestehen aus den Nucleotiden in der Reihenfolge Cytidylsäure, Adenylsäure, Uridylsäure und Guanylsäure. Eine geringe Menge Inosinsäure (F) wird auch gefunden.

In Tab. 3 sind die Mengen der einzelnen Fraktionen angegeben und als Vergleichswerte die Mengen der einzelnen Nucleotide, die bei der Hydrolyse reiner RNS entstehen. Aus dieser Tabelle kann man entnehmen, daß ein großer Teil der Purinnucleotide abgebaut wird zu den freien Basen, wie wir aus dem Anstieg der Fraktion A gesehen haben.

Es zeigt sich, daß die eigene Azidität der Nucleinsäure bei 5stündigem Erhitzen auf 105 °C bereits ausreicht, um wenigstens einen Teil der Purinbasen abzuspalten. Die Glukose dürfte in den Spaltungsmechanismus nicht eingreifen.

ad b) Die Menge an freiem Ammoniak in der Lösung nimmt während der Reaktion zu. RNS hat 20 mg NH₃/100 g RNS, d. h. 0,115% des gesamten Stickstoffs liegen in Form von Ammoniak vor. Während der thermischen Behandlung des RNS-Glukosegemisches steigt die Menge des freien Ammoniaks auf 0,80% an. Die Entstehung von Ammoniak durch thermische Behandlung von RNS und Glukose in wäßriger Lösung ist in derselben Größenordnung wie beim trockenen Erhitzen der RNS.

Tabelle 3. RNS und Glukose werden 5 Std in wäßriger Lösung erhitzt. 250 mg RNS, alkalisch hydrolysiert, werden an Dowex-1-Formiat × 8, 30 cm × 1 cm fraktioniert. Aus der Extinktion pro Volumeneinheit werden die m Äquivalente und der Anteil der zerstörten Nucleotide berechnet. Cp = Cytidylsäure, Ap = Adenylsäure, Up = Uridylsäure, Gp = Guanylsäure und Ip = Inosinsäure

	Ext. 280 mμ/1000 ml		m Äquivalente		% der Nucleotide zerstört
	RNS	RNS + Glu erhitzt	RNS	RNS + Glu erhitzt	
Cp	0,845	0,561	0,124	0,0825	23
Ap	2,261	0,786	0,159	0,0552	65
Up	1,501	1,211	0,150	0,121	19,5
Gp	2,054	0,705	0,175	0,064	63,5
Ip	0,017	0,063	—	—	—

ad c) Bei der Bestimmung des anorg. Phosphat finden wir, daß die anfängliche Menge von 0,015 g P/100 g RNS bei der reinen Nucleinsäure auf 2,664 g P/100 g RNS, d. h. 27,5% des gesamten Phosphors, gestiegen war. Das Makromolekül wird vollständig zerstört. Jedes vierte P-Atom liegt als anorg. Phosphat vor. Es sind also im Durchschnitt nur mehr Tetranucleotide vorhanden.

3. Thermische Behandlung von Ribonucleinsäure und Glukose in neutraler wäßriger Lösung

Nachdem wir gesehen haben, daß bei der thermischen Behandlung der RNS-Glukose-Lösung die Veränderung vorwiegend auf der Azidität der Nucleinsäure beruht, haben wir eine Mischung aus 1 Teil RNS, 1 Teil Glukose und 5 Teilen Wasser mit verd. Natronlauge neutralisiert und 5 Std. auf 105 °C erhitzt. Wie wir schon vermutet haben, ist der Abbau geringer als bei der nicht neutralisierten RNS-Lösung. Die Nucleotidmenge nach der Hydrolyse mit verd.

Natronlauge hat etwa im gleichen Verhältnis wie beim trockenen Erhitzen von RNS abgenommen. Vorwiegend wird die N-glykosidische Bindung der Purinnucleotide gespalten. Sie sind zu 18 bzw. 16% zerstört worden. Die Cytidylsäure hat um 5% abgenommen. Die Uridylsäuremenge ist konstant geblieben. Im Reaktionsprodukt wird Adenin und Guanin gefunden.

Das anorg. Phosphat steigt von 0,17% des Gesamt-P auf 6%. Das Makromolekül wird also weitgehend zerstört.

Freier Ammoniak steigt von 0,11% des gesamten Stickstoffs auf 0,60%.

Tabelle 4. 250 mg RNS und 250 mg Glukose werden 5 Std. in neutraler wässriger Lösung erhitzt. Die Lösung der alkalischen Hydrolysenprodukte wird an Dowex-1-Formiat $\times 8$, 30 cm \times 1 cm fraktioniert. Aus der Extinktion werden die Äquivalente und der Anteil der zerstörten Nucleotide berechnet. Cp = Cytidylsäure, Ap = Adenylsäure, Up = Uridylsäure und Gp = Guanylensäure

	Ext. 260 m μ /1000 ml		m Äquivalente		% der Nucleotide zerstört
	RNS	RNS + Glu neutral erhitzt	RNS	RNS + Glu neutral erhitzt	
Cp	0,845	0,800	0,124	0,118	5,3
Ap	2,261	1,850	0,159	0,130	18,2
Up	1,501	1,55	0,150	0,155	0,0
Gp	2,054	1,715	0,175	0,146	16,5

4. Gehalt von Lebensmittel an Nucleinsäure

Wie wir in der Einleitung schon erwähnt haben, ist die Menge der Nucleinsäure in der Nahrung sehr gering. Bisher fehlt in der Literatur eine Aufstellung über den Nucleinsäuregehalt der Lebensmittel. Meistens wurde der Nucleinsäuregehalt an kleinen Versuchstieren bzw. an keimenden und wachsenden Pflanzen bestimmt. Wir haben aus den in der Literatur vorhandenen Daten und aus eigenen Nucleinsäurebestimmungen in Lebensmitteln die Nucleinsäureaufnahme in g/Kopf/Tag berechnet. Von den Hauptnahrungsmitteln (Tab. 6) enthalten Zucker, Trinkvollmilch, Margarine, Butter, Schlachtfett und Eier

Tabelle 5. Nucleinsäuregehalt einiger tierischer und pflanzlicher Gewebe

	% frisches Gewebe		Nucleinsäure % frisches Gewebe	Lit.
	RNS*)	DNS*)		
Leber	1,10	0,23	1,33	21
	1,09	0,30	1,39	18
	0,93	0,18	1,11	22
	0,36	0,08	0,44	13
Muskel	0,08	0,06	0,14	19
Weizenmehl	0,06	0,08	0,14	**)
Roggenmehl	0,21	0,19	0,40	**)
Kartoffel	0,06	0,01	0,07	**)
Gemüse	0,09	0,02	0,10	**)
Milch	0,0	0,0	0,0	**)

*) RNS = Ribonucleinsäure, DNS = Desoxyribonucleinsäure.

**) Eigene Bestimmungen.

Tabelle 6. Nährstoff- und Nucleinsäureaufnahme pro Kopf und Tag in der Bundesrepublik Deutschland

Nahrungsmittel	g/Kopf/Tag (24)	Nucleinsäure %	Nucleinsäure g/Kopf/Tag
Weizenmehl	155	0,14	0,22
Roggenmehl	62,5	0,40	0,25
Reis + Futtergetreide	16,2	—	—
Speisehülsenfrüchte	3,8	—	—
Kartoffeln, einschl. Stärke	365	0,07	0,27
Zucker	78,5	0,0	0,0
Honig, Kakaomasse	6,6	—	—
Gemüse, insgesamt	119	0,10	0,12
Frishobst	134	—	—
Trockenobst	5,5	—	—
Südfrüchte	58,7	—	—
Nüsse, Obstkonserven	11,2	—	—
Rindfleisch	44,6	0,1–0,2	0,066
Kalbfleisch	4,9	0,1–0,2	0,008
Schweinefleisch	79,4	0,1–0,2	0,12
Schafffleisch	0,8	—	—
Pferdefleisch	1,1	—	—
Innereien	7,2	0,5–1,0	0,055
Geflügelfleisch	10,7	0,2	0,022
Sonstiges Fleisch	1,9	—	—
Fische, Filetgewicht	1,9	—	—
Trinkvollmilch	308	0,0	0,0
Trinkmagermilch	29,4	0,0	0,0
Kondensmilch	19,7	0,0	0,0
Vollmilchpulver	2,2	0,0	0,0
Magermilchpulver	1,1	0,0	0,0
Ziegenmilch	8,8	0,0	0,0
Käse, Quark	18,6	0,0	0,0
Eier	35,8	—	—
Butter	21,4	0,0	0,0
Margarine (vitaminiert)	31,0	0,0	0,0
Schlachtfett	15,9	0,0	0,0
tier. u. pflanzl. Öle	10,7	0,0	0,0

praktisch keine Nucleinsäure. Fleisch (Muskel) enthält 0,1–0,2% Nucleinsäure. Innereien enthalten im Durchschnitt einen höheren Wert von 0,5–1,0%. Der Gehalt von Mehl, Kartoffeln, Gemüse und Obst liegt im Durchschnitt bei 0,1%.

Die Nahrungsaufnahme pro Kopf pro Tag in der Bundesrepublik Deutschland beträgt 1670 g (24). Täglich werden pro Kopf 1,05 g Nucleinsäure aufgenommen. Dieser Wert entspricht 0,06% der gesamten Nahrungsaufnahme des Menschen. Von einigen Nahrungsmitteln (Tab. 6) fehlt der Nucleinsäuregehalt. Wir berücksichtigen bei unserer Berechnung nur 82% der aufgenommenen Nahrung, so daß der tatsächliche Wert um 10–20% höher liegt.

In der Nahrung kommen neben der hochmolekularen Ribonucleinsäure, die freien 5'-Ribomononucleotide, insbesondere das Inosin-5'-monophosphat vor. In der lebenden Zelle ist die stationäre Konzentration von Inosin-5'-phosphat außerordentlich gering. Es entsteht jedoch rasch in großen Mengen postmortal

durch Desaminierung von Adenosin-5'-phosphat bzw. Desaminierung und partieller Dephosphorylierung von Adenosindiphosphat (ADP) und Adenosin-triphosphat (ATP). Muskulatur enthält etwa 600–800 μ Mole Adenosinmononucleotide je 100 g Frischgewicht, so daß man dann in Fleisch einen Gehalt von rund 200 mg% Inosin-5'-phosphat vorfindet. Leber enthält 500–600 μ Mol Adenosinnucleotide, die postmortal etwa 150 mg% Inosin-5'-phosphat liefern. Die anderen 5'-Nucleotide wie Guanosin-5'-phosphat – aus dem postmortal Xanthosin-5'-phosphat entsteht –, Uridin-5'-phosphat und Cytidin-5'-phosphat kommen in den Organen und im Fleisch in einer etwa 20–30mal kleineren Konzentration vor als die Adeninmononucleotide. Zu den oben angegebenen 1,1 g täglich aufgenommenen Nucleinsäuren kommen noch die in der Nahrung enthaltenen 0,3 g/Kopf/Tag freien 5'-Ribomononucleotide, insbesondere das Inosin-5'-monophosphat. Dieser Wert berechnet sich ausschließlich aus der aufgenommenen Fleischmenge. Daten für andere Lebensmittel fehlen. Die gesamte Tagesaufnahme an 5'-Ribomononucleotiden liegt nach dem Gesagten in der Größenordnung von rund 1,5 g im Tag für den erwachsenen Menschen.

Zu Zahlen derselben Größenordnung für die Tagesaufnahme kommt man auch, wenn als Berechnungsgrundlage die tägliche Harnsäureausscheidung gewählt wird. Alle den Purinring enthaltenden Nucleotide werden vom Menschen im intermediären Stoffwechsel zu Harnsäure abgebaut. Die alimentäre bedingte Harnsäure-Ausscheidung des Menschen pflegt in der Größenordnung von 0,5–1,5 g im Tag zu liegen. 1 mg Harnsäure entspricht 4,4 mg Inosin-5'-phosphat (berechnet auf freie Inosinsäure). Bei der Auswertung der Harnsäureausscheidung ist jedoch zu berücksichtigen, daß auch beim Abbau der Desoxyribonucleinsäure Harnsäure entsteht, die Harnsäure-Ausscheidung also nicht nur auf die Ribonucleotide zu beziehen ist.

5. Tierversuche

Die menschliche Nahrung enthält 0,06% Nucleinsäure. Eine Diskussion über die Nährwertminderung nach thermischer Behandlung wie bei Proteinen, Aminosäuren, Zuckern und Fetten kann bei dieser geringen Menge entfallen. Es muß aber das Auftreten pharmakologisch wirksamer Substanzen diskutiert werden. Tab. 7 zeigt die Änderung der LD₅₀ bei thermisch behandelten Nucleinsäuren nach i.p.-Injektion an der Maus.

Man gibt die LD₅₀ normalerweise in g Substanz pro kg Maus an. Wir haben nach dem Erhitzen ein Gemisch von Substanzen, die sich gegenseitig bei der

Tabelle 7. LD₅₀. I RNS in Wasser neutralisiert p_H 6; II RNS in Wasser 5 Std. auf 105 °C erhitzt. Nach dem Erhitzen neutralisiert p_H 6; III RNS + Glukose in Wasser 5 Std. auf 105 °C erhitzt. Nach dem Erhitzen neutralisiert p_H 6; IV RNS + Glukose in Wasser 5 Std. auf 105 °C erhitzt. Nach dem Erhitzen neutralisiert p_H 6. Die Glukose wurde vergoren

	LD ₅₀	
	g Trockensubstanz/kg Maus	g N/kg Maus
I	6,02 (6,89–5,26)	0,94
II	5,41 (6,45–4,43)	0,67
III	7,90 (9,72–6,27)	0,49
IV	2,30 (2,85–1,79)	0,37

LD₅₀-Bestimmung beeinflussen können. Besonders störend wirkt die große Menge Glukose, die an sich keine toxische Wirkung zeigt. Wir haben nun auf rechnerischem Wege diese Schwierigkeit umgangen und die LD₅₀ nicht in g Trockensubstanz angegeben, sondern die Glukose ausgeschaltet, indem wir die LD₅₀ in g N/kg Maus angeben. Außerdem haben wir auch experimentell die Wirkung der Glukose ausgeschaltet, indem wir vor der LD₅₀-Bestimmung die Glukose durch Vergärung aus dem Reaktionsgemisch entfernt haben. Die Hefesuspension wird durch Absaugen entfernt. Die Reaktionslösung muß zur LD₅₀-Bestimmung etwas konzentriert werden. Der entstehende Alkohol wird also mit dem Wasser im Vakuum abdestilliert. Die Berechnung der Statistik wurde nach LITCHFIELD (12) durchgeführt.

LANG und Mitarb. (11) haben in Fütterungsversuchen an Ratten gezeigt, daß eine Wachstumsverzögerung eintritt und die Futterefficiency verschlechtert wird.

Tabelle 8. Futterefficiency (Gewichtszunahme pro g Futter)

Wochen	5% RNS unerhitzt	5% RNS 2 Std. 105 °C	5% RNS 5 Std. 105 °C	10% RNS 5 Std. 105 °C
2	0,30	0,28	0,28	0,28
4	0,27	0,19	0,24	0,20
6	0,24	0,21	0,23	0,18
8	0,19	0,17	0,20	0,16

Die verabreichten Dosen von 5 bzw. 10% der gesamten Nahrungsaufnahme liegen weit über dem Gehalt von Lebensmitteln an Nucleinsäure. Die LD₅₀-Werte sind im Verhältnis zur tatsächlichen NS-Aufnahme des erwachsenen Menschen ebenfalls sehr hoch. Der erzielte Effekt ist in beiden Fällen gering. Außerdem muß betont werden, daß auch die Erhitzungsdauer von 2 bzw. 5 Std. ungewöhnlich hoch ist und sich mit den Verhältnissen bei der hauswirtschaftlichen oder industriellen Verarbeitung der Lebensmittel nicht vergleichen läßt.

Experimenteller Teil

a) *Erhitzen der Substanzen.* In einem Dreihalskolben mit Rückflußkühler und Gas-einleitungsrohr, das bis zum Boden reicht werden sowohl die trockene RNS, als auch die wäßrigen Lösungen erhitzt. Die durch den Rückflußkühler angesaugte Luft wird in einer Waschflasche mit Schwefelsäure gewaschen. Erhitzt wird in einem Ölbad auf 110 °C Badtemperatur.

b) *Hydrolyse.* Die RNS und die thermisch behandelte RNS werden mit 2 n Natronlauge etwa 16 Std. bei Zimmertemperatur hydrolysiert.

c) *Säulenchromatographie.* Verwendet wird für alle Nucleotidtrennungen Dowex-I-Formiat $\times 8$ 50–100 mesh. Die Säule ist 30 cm lang und hat einen Durchmesser von 1 cm. An der Säule können Proben bis 250 mg RNS-Hydrolysat getrennt werden. Die Proben werden in neutralem Milieu auf die Säule aufgegeben. Eluiert wird mit gleichmäßig steigender Konzentration an Ameisensäure (3). Die Extinktion der einzelnen Fraktionen bei 260 und 280 m μ ($38,5 \cdot 10^3$ und $35,7 \cdot 10^3$ cm⁻¹) werden mit einem Zeiß-Spektralphotometer bestimmt.

d) *Papierchromatographie und Papierelektrophorese.* Für die Papierchromatographie verwenden wir S + S 2043 b, für die Hochspannungselektrophorese (Pherograph-Frank-

furt nach Wieland und Pfeiderer) M + N 214. Die Hochspannungselektrophorese wird in Boratpuffer pH 9,2 nach JAENICKE (8) ausgeführt.

Alle Nucleotide, die wir säulenchromatographisch getrennt haben, wurden elektrophoretisch nochmals identifiziert. Der Durchlauf der Säulen, der Nucleoside und Nucleinbasen und Zucker enthält, wurde zweidimensional auf Papier durch Elektrophorese und Chromatographie getrennt. Die im UV-sichtbaren Flecken wurden mit 4 ml 0,1 n HCl eluiert. Das UV-Spektrum wurde aufgenommen.

e) *Sprühreagenzien*. Zum Nachweis der Substanzen auf den Papierchromatogrammen und den Papierelektrophoresen werden neben der Sichtbarmachung im UV-Licht folgende Sprühreagenzien verwendet:

Phosphat (7). Zum Nachweis von phosphathaltigen Substanzen auf Papierchromatogrammen und Papierelektrophoresen wird mit einer Lösung von 5 ml 60%iger Perchlorsäure, 10 ml 1 n Salzsäure und 25 ml 4%iger Ammoniummolybdatlösung in 100 ml Wasser besprüht. Das Chromatogramm wird 7 min auf 85 °C erhitzt. Anschließend wird entweder in H_2S -Atmosphäre oder 1–2 Std. in der Sonne entwickelt.

Glykolgruppierung. Um benachbarte freie Hydroxylgruppen auf Papierchromatogrammen oder Papierelektrophoresen nachzuweisen, besprüht man mit 0,3%iger Bleitetraazetatlösung in Eisessig. Nach 2–3 min wird mit einer 3%igen Benzidinlösung in Eisessig nochmals besprüht. FAWAZ und Mitarb. (6) beschreiben auch eine quantitative Bestimmung.

Freie Aldehydgruppe. Es wird mit einer Lösung von Anilin und Phthalsäure in Butanol besprüht und anschließend 5 min auf 100 °C erhitzt.

f) *Quantitative Analysen*.

Phosphat wird als anorg. Phosphat mittels Ausschütteln nach WEIL-MALHERBE und Mitarb. (23) bestimmt. 5 ml einer Probe, die 1–30 μ Phosphat-P enthalten, werden mit 6 ml einer Isobutanol-Benzolmischung (1:1) und 1 ml 5%iger Ammoniummolybdatlösung (in 4 n Schwefelsäure) versetzt und 15 sec in einem Schliffreagenzglas geschüttelt. Die org. Phase wird vorsichtig abgehoben und zur Klärung mit wenig wasserfreiem Natriumsulfat versetzt. Zu 3 ml der wasserfreien Lösung werden 4 ml angesäuertes Alkohol (2 ml konz. Schwefelsäure auf 98 ml Äthanol) und 0,2 ml einer Zinn-II-chloridlösung (10 g $SnCl_2$ in 25 ml konz. Salzsäure; diese Stammlösung wird vor Gebrauch 1:40 mit n H_2SO_4 verdünnt) gegeben. Nach 10–15 min wird in der 1-cm-Küvette (3,1 ml) bei 740 $m\mu$ in einem Zeiß-Spektralphotometer die Extinktion gemessen. Diese Methode ist eindeutig für anorg. Phosphat. Nucleotide geben keine Reaktion.

Man kann auch den Gesamtphosphor nach Veraschen auf diese Weise bestimmen. 1 ml Lösung wird in einem Kjeldahlkolben mit 0,4 ml konz. Schwefelsäure versetzt und 3–4 min erhitzt, bis SO_2 -Dämpfe erscheinen. Wenn die Lösung noch braun ist, werden 3 Tropfen 30%ige Wasserstoffperoxydlösung zugegeben. Es wird nochmals kurze Zeit erhitzt. Nach dem Abkühlen wird in ein Schliffreagenzglas gespült und auf 5 ml aufgefüllt. Die Analyse wird nach der obigen Vorschrift weitergearbeitet. Da sich der Phosphorsäuremolybdatkomplex nur bei ganz bestimmter Schwefelsäurekonzentration quantitativ ausschütteln läßt, muß man zu der sauren Aschelösung eine wäßrige Ammoniummolybdatlösung geben.

Ammoniak wird nach Übertreiben mit Wasserdampf entweder mit Neßlers Reagenz oder azidimetrisch bestimmt.

Die Nucleinsäuren werden nach OGUIR und ROSEN (15) extrahiert und bestimmt. Die Berechnung wird nach CHARGAFF (1, 2) durchgeführt.

Dem Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit.

Zusammenfassung

Ribonucleinsäure wurde trocken, in wäßriger Lösung und zusammen mit Glukose erhitzt. Die chemischen Veränderungen bestehen erstens in der Spaltung der N-glykosidi-

schen Bindung, vorwiegend der Purinbasen, und zweitens im Abbau des Makromoleküls durch Spaltung der Phosphoresterbindung.

Die akute Toxizität der Ribonucleinsäure ist sehr gering. Sie nimmt bei den erhitzten RNS-Präparaten zu. Die täglich durch die Nahrung aufgenommene Ribonucleinsäuremenge liegt jedoch weit unter der kritischen Grenze. Vom ernährungsphysiologischen Standpunkt aus können sowohl die Ribonucleinsäure als auch die erhitzten Ribonucleinsäuren als unbedenklich angesehen werden.

Schrifttum

1. CHARGAFF, E. und S. ZAMENHOF, J. Biol. Chem. **173**, 327 (1948). — 2. CHARGAFF, E., B. MAGASANIK, E. VISCHER, C. GREEN, R. DONIGER und D. ELSON, J. biol. Chem. **186**, 51 (1950). — 3. COHN, W. E., J. Amer. Chem. Soc. **72**, 1471 (1950). — 4. DEGKWITZ, E. und K. LANG, Klin. Wschr. **40**, 515 (1962). — 5. DEGKWITZ, E. und K. LANG, Klin. Wschr. **40**, 542 (1962). — 6. FAWAZ und SERAIDARIAN, J. Amer. Chem. Soc. **69**, 966 (1947). — 7. HANES, C. S. und F. A. ISHERWOOD, Nature (Lond.) **164**, 1107 (1949). — 8. JAENICKE, L. und J. VOLBRECHTSHAUSEN, Naturwiss. **39**, 86 (1952). — 9. JAHR, K., Doktorarbeit (Mainz 1961). — 10. KRUG, E., W. PRELLWITZ, E. SCHÄFFNER, W. KIECKEBUSCH und K. LANG, Naturwiss. **46**, 534 (1959). — 11. LANG, K., E. KRUG, W. PRELLWITZ, E. SCHÄFFNER und W. KIECKEBUSCH, Intern. Z. Vitaminforsch. **30**, 180 (1959). — 12. LITCHFIELD jr. J. T., und F. WILCOXON, J. Pharmacol. **96**, 99 (1946). — 13. LOWE, C. U., W. L. WILLIAMS und L. THOMAS, Proc. Soc. Exper. Biol. Med. **78**, 818 (1951). — 14. MICHEEL, F. und A. HEESING, Chem. Ber. **94**, 1814 (1961). — 15. OĞUR, M. und G. ROSEN, Arch. Biochem. **25**, 262 (1950). — 16. POLLMANN, W. und G. SCHRAMM, Z. Naturforsch. **166**, 673 (1961). — 17. PRELLWITZ, W., E. KRUG und K. LANG, Biochem. Z. **333**, 236 (1960). — 18. SCHNEIDER W. C. und Mitarb., J. Natl. Cancer Inst. **10**, 977 (1950). — 19. SCHNEIDER, W. C. und H. L. KLUG, Cancer Research **6**, 691 (1946). — 20. SCHRAMM, G., H. GRÖTSCH und W. POLLMANN, Angew. Chem. **74**, 53 (1962). — 21. THOMSON, R. Y., F. C. HEAGY, W. C. HUTCHISON und J. N. DAVIDSON, Biochem. J. **53**, 460 (1953). — 22. YOUNG, J. M. und J. S. DINNING, J. Biol. Chem. **193**, 743 (1951). — 23. WEIL-MALHERBE, H. und R. H. GREEN, Biochem. J. **49**, 286 (1952). — 24. WIRTHS, W., Z. Ernährungswiss. **3**, 78 (1962).

Anschrift der Verfasser:

Prof. Dr. Dr. K. LANG, 6500 Mainz, Physiologisch-Chemisches Institut der Universität

Aus der Abteilung für Vitamin- und Ernährungsforschung der F. Hoffmann-La Roche & Co. A.G., Basel

Bedarf an Vitamin E in Abhängigkeit von der Zufuhr an Linolsäure*)

Von F. WEBER, H. WEISER und O. WISS

Mit 2 Abbildungen und 5 Tabellen

(Eingegangen am 24. Juli 1963)

Als vor ca. 40 Jahren das Vitamin E von EVANS und BISHOP (1) entdeckt wurde, brachte man die physiologische Wirkung dieses Vitamins ausschließlich mit der Fertilität in Zusammenhang. Die damaligen Untersuchungen hatten gezeigt, daß ein Mangel an Vitamin E bei der weiblichen Ratte zu Resorp-

*) Erweiterte Fassung eines Vortrages, der anlässlich des Wissenschaftlichen Kongresses der Deutschen Gesellschaft für Ernährung am 18. April 1963 in Mainz gehalten wurde.