

was kindly taken by Professor R. O. C. NORMAN of the University of York, England and the NMR spectra by Mr. V. A. PICKLES of the University of New South Wales.

Received May 8, 1967

[1] HOMER, R. F., and TOMLINSON, T. E.: J. chem. Soc. 1960, 2498. — [2] HOMER, R. F., G. C. MEES, and T. E. TOMLINSON: J. Sci. Food Agr. 11, 309 (1960). — [3] BOON, W. R.: Chem. & Ind. (London) 1965, 782. — [4] SUMMERS, L. A.: Nature 214, 381 (1967). — [5] SUMMERS, L. A., and PICKLES, V. A.: Chem. & Ind. (London) 1967, 619.

## 2,4-Dinitrophenylhydrazone von Carbonylverbindungen aus dem Kaffee Aroma

W. WALTER und H.-L. WEIDEMANN

Universität Hamburg, Chemisches Staatsinstitut, Institut für organische Chemie

W. MOHR

Institut für Lebensmitteltechnologie und Verpackung, München

Mehrere Arbeitskreise [u. a. 1–5] bevorzugten zur Analyse des Kaffeearomas die Gaschromatographie. Für schwerer flüchtige Substanzen [1] ist auch die Analyse von Derivaten geeignet, obgleich bei ihrer Darstellung Artefakte auftreten können. — Kaffee-Öl wurde wie beschrieben [1a] gewonnen, später benutzten wir käufliches Öl [6]. Die schwerer flüchtige Aromafraktion wurde durch Dünnschichtverdampfung im Feinvakuum und Kondensation in einer Alkohol-Trockeneis-Falle erhalten [1]. Wir fällten die Carbonylverbindungen gemeinsam mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin. Die 2,4-Dinitrophenylhydrazone (2,4-DNPH) wurden auf einer kleinen Silicagel-Säule vorgetrennt (Bzl. u. Bzl.-Ä.) und dann so oft dünnschichtchromatographiert, bis gut getrennte Streifen isolierbar waren. Drei 2,4-DNPH wurden durch Massen-, Elektronen- (in  $\text{CHCl}_3$  und in 0,25 *n*-NaOH in Äthanol), und IR-Spektren (Mikro-KBr-Preßlinge) sowie Dünnschichtchromatographie identifiziert.

*Cyclopentan-1,2-dion-bis-2,4-DNPH*. M. S.: 458/183, 458, 153, 215, 459, 168, 276, 169, 164, 214 [7].  $\lambda_{\text{max}}$ : 354, 404 und 456  $\mu$ . [8]. Es ist zu vermuten, daß neben den substituierten Cyclopentan-1,2-dionen [2] auch das unsubstituierte Cyclopentan-1,2-dion im Kaffeearoma vorkommt. Das Osazon könnte sich aber auch aus dem  $\alpha$ -Amino- oder dem  $\alpha$ -Acetoxyketon gebildet haben [9, 10].

*Propan-1,2-dion-bis-2,4-DNPH*.  $\lambda_{\text{max}}$ : 394 und 440 (S) und (alkal.) 570  $\mu$ . Die Zuordnung dieses Derivates ist mehrdeutig; im Kaffeearoma wurden bisher Hydroxyaceton und dessen Acetylverbindung nachgewiesen [u. a. 2], es käme aber auch Methylglyoxal bzw. sein Polymeres in Frage.

*Acetylacrolein-bis-2,4-DNPH*. M. S.: 458/122, 44, 168, 128, 127, 57, 119, 130, 115, 116.  $\lambda_{\text{max}}$ : 410 und 450 (S) und (alkal.) 578  $\mu$ . Dieses Derivat ist kein Beweis für das Vorkommen von Acetylacrolein im Kaffeearoma, da schon bei der säurekatalysierten Spaltung von Furfurylalkohol u. a. Acetylacrolein entsteht [11]. Andererseits sind Furfurylalkohol und Säuren nachgewiesen, so daß auch das Auftreten von Acetylacrolein nicht unwahrscheinlich ist.

Wir danken sehr herzlich Prof. Dr. R. HEISS für die Anregung und Förderung dieser Arbeit und Dr. H. F. GRÜTZMACHER für die Massenspektren.

Eingegangen am 11. Mai 1967

[1] RADTKE, R., R. SPRINGER u. W. MOHR (a) mit R. HEISS: Z. Lebensm.-Untersuch. u. Forsch. 119, 293 (1963); (b) 128, 321 (1966); (c) 129, 349 (1966). — [2] GIANTURCO, M. A., et al.: Tetrahedron 19, 2051 (1963); Nature 210, 1358 (1966). — [3] VIANI, R., et al.: Helv. chim. Acta 48, 1809 (1965). — [4] HEINS, J. TH., et al.: J. Gaschromatog. 1966, 395. — [5] STOLL, M., et al.: Helv. chim. Acta 50, 628, 694 (1967). — [6] Zur Zeit bearbeiten wir Kaffee-Öl, das wir durch Auspressen von Röstkaffee erhalten haben. Wir danken der Firma Deutsche Extrakt-Kaffee G. m. b. H. für die Möglichkeit, das Öl zu gewinnen. — [7] Massenspektrum: Molekülion/Reihenfolge der 10 intensivsten Ionen. Es wurde ab M. Z. 150 gemessen. — [8] RAMIREZ, F., et al.: J. Am. chem. Soc. 76, 491 (1954). — [9] CRAM, D. J., et al.: ibid. 85, 1273 (1963). — [10] CAGLIOTI, L., et al.: ibid. 88, 3865 (1966). — [11] BIRKOFER L., et al.: Liebigs Ann. Chem. 657, 94 (1962).

## Zersetzung von Chorisminsäure durch Mineralsäure

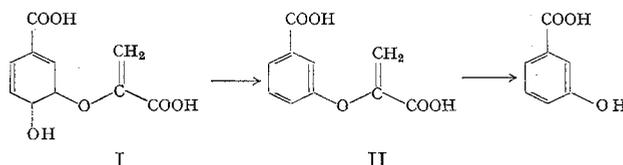
F. LINGENS und GERHARD MÜLLER

Biochemische Abteilung des Chemischen Instituts der Universität Tübingen

Im Verlauf der Biosynthese aromatischer Aminosäuren tritt Chorisminsäure (3-Enolbrenztraubensäureäther der trans-3,4-Dihydroxy-cyclohexa-1,5-dien-carbonsäure, I) als Endprodukt des Grundzweiges auf. Diese Verbindung ist als Akkumulator bei verschiedenartig blockierten Mangelmutanten von *Aerobacter aerogenes*, *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae* nachgewiesen [1–3]. Chorisminsäure wird bei pH 8 in Prephensäure umgelagert, in schwach saurem Milieu zerfällt die Verbindung in 4-Hydroxybenzoesäure, Brenztraubensäure und Phenylbrenztraubensäure [1].

Wir konnten nachweisen, daß bei der Zersetzung von Chorisminsäure durch konz. Salzsäure ein Gemisch entsteht, das überwiegend 3-Hydroxybenzoesäure neben wenig 4-Hydroxybenzoesäure und Phenylbrenztraubensäure und außerdem Brenztraubensäure enthält (Papierchromatographie, Isopropanol-Ammoniak-Wasser (8:1:1)). Die Ausbeute an 3-Hydroxybenzoesäure in 2 *n* Salzsäure steigt von 0 auf ca. 75%, wenn man die Temperatur von 20 °C auf 100 °C erhöht (in konz. Salzsäure stets 75%).

Wir postulieren als Zwischenstufe der Bildung von 3-Hydroxybenzoesäure den Enolbrenztraubensäureäther (II). Es ließ sich zeigen, daß beim Erhitzen von Chorisminsäure in 2 *n* Mineralsäure auf 80 °C (10 min) im Reaktionsgemisch II auftritt (Isolierung dünnschichtchromatographisch; Benzol-Methanol-Eisessig (45:8:4)). II zeigt charakteristische Reaktionen mit Osmiumtetroxyd, Kaliumpermanganat und kuppelt mit Echtschwarz K in Gegenwart von Natronlauge; UV-Maxima: 287 nm (in Methanol), 282 nm (in 0,1 *n* methanol. KOH), 287 nm (in 0,1 *n* methanol. HCl). Die isolierte Verbindung war identisch mit einer synthetischen Probe [4].



Dem Fonds der Chemischen Industrie und der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für materielle Unterstützung.

Eingegangen am 23. Juni 1967

[1] GIBSON, F.: Biochem. J. 90, 256 (1964). — [2] LINGENS, F., u. W. LÜCK: Angew. Chem. 76, 51 (1964). — [3] LINGENS, F., u. G. MÜLLER: Z. Naturforsch. (im Druck). — [4] LINGENS, F., u. B. SPRÖSSLER: Liebigs Ann. Chem. (im Druck).

## Wirkungen von 1-Nitroso-3-nitro-1-methylguanidin auf die zellfreie Proteinsynthese in E. coli-Zellen und die Matrizenaktivität der Kalbthymus-DNS

F. LINGENS und R. SÜSSMUTH

Biochemische Abteilung des Chemischen Instituts der Universität Tübingen

A. WACKER und P. CHANDRA

Institut für Therapeutische Biochemie der Universität Frankfurt/M.

In Fortsetzung unserer Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus von 1-Nitroso-3-nitro-1-methylguanidin (NNMG) bei der Mutationsauslösung [1] haben wir den Einfluß dieser Verbindung auf die zellfreie Proteinsynthese und die Matrizenaktivität der DNS im RNS-Polymerase-System untersucht. Bei der Züchtung von *Escherichia coli* B unter Zusatz von NNMG in höherer Konzentration wird eine starke Hemmung des Bakterienwachstums beobachtet. Versuche mit Methyl-<sup>3</sup>H-markiertem NNMG zeigten, daß der Wachstumshemmung eine Methylierung der Nucleinsäuren entspricht. Gleichzeitig ist eine Hemmung der Nucleinsäuresynthesen zu beobachten.

Wir haben daher die zellfreie Proteinsynthese mit Zellfraktionen NNMG-behandelter Bakterien untersucht. Tabelle 1 zeigt einen verringerten Einbau von Lysin mit Polyadenylsäure in Gegenwart von Zellfraktionen aus NNMG inkubierten Bakterien. Diese Einbauhemmung läßt sich auf eine Inaktivierung der Ribosomen oder der Enzyme zurückführen. Versuche, in denen nur die Ribosomen NNMG-behandelter Bakterien verwendet wurden, zeigten eine merkliche Hemmung

Tabelle 1. Wirkungen von NNMG *in vitro* auf die zellfreie Proteinsynthese [2]. Die Bakterien wuchsen in einem Hefe-Glucose-Medium mit 30  $\mu$ g/ml NNMG

Fraktionen unbehandelter Bakterien		Fraktionen NNMG-behandelter Bakterien		% Lysin-Einbau	
Ribosomenfraktion	Enzymfraktion	Ribosomenfraktion	Enzymfraktion	Ver-such 1	Ver-such 2
+	+			100	100
	+	+	+	44	41
		+		48	40
+			+	120	98

der Polymerisation des Lysins. Wurden dagegen die Enzymfraktionen ausgetauscht, ergab sich kein merklicher Effekt. Die offensichtliche Inaktivierung der Ribosomen kann mit einer Methylierung der Ribosomen-RNS erklärt werden [3]. Sie bedingt vermutlich auch weitgehend die letale Wirkung von NNMG auf die Bakterien.

Tabelle 2. Wirkungen von NNMG auf die Starterfunktion der DNS in der RNS-Polymerase-Reaktion [4]

Inkubationszeit mit NNMG h	Einbau von NNMG <sup>1</sup> in Ip 20 M/mg DNS	Einbau der Ribonucleotide CTP-H <sup>3</sup> %	ATP-C <sup>14</sup> %
0	0	100	100
3	811	56	59
6	1357	38	44
12	1922	26	33
18	2669	8	3

<sup>1</sup> Versuche mit Methyl-H<sup>3</sup>-markiertem NNMG in der für unmarkiertes NNMG ange deuteten Weise.

Da Nucleinsäuren neben der Translation auch der Transcription dienen, haben wir die Matrizenaktivität der DNS nach einer Behandlung mit NNMG *in vitro* geprüft. Aus Tabelle 2 folgt, daß die Methylierung durch NNMG eine Funktion der Inkubationszeit ist. Mit wachsender Methylierungsrate der DNS sinkt graduell die funktionelle Aktivität der Polymerase-Reaktion. Aber eine solche selektive Hemmung wie im Falle der Polyribonucleotide [7] ließ sich bei dieser Reaktion nicht nachweisen. Wahrscheinlich ist dies auf den Kopierungsmechanismus zurückzuführen. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie danken wir für materielle Hilfe.

Eingegangen am 11. Juli 1967

[1] CHANDRA, P., A. WACKER, R. SÜSSMUTH u. F. LINGENS: Z. Naturforsch. 22b, 512 (1967). — [2] NIRENBERG, M. W., u. H. MATTHAEI: Proc. nat. Acad. Sci. 47, 1588 (1961). — [3] In Vorbereitung. — [4] ZILLIG, W., E. FUCHS u. R. MILLETE: Proc. nucl. acid Res. Edts: CANTONI, DAVIES, HARPER u. ROW, London 1966, S. 323.

### Einfluß von Hydroxylamin auf die *in-vitro*-Aktivität von Benzoylcholinhydro-lase frisch entnommenen Spenderblutes

HILDEGARD WEISS und MANFRED MEYER

Institut für Krebsforschung der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Bereich: Robert-Rössle-Klinik, Berlin-Buch

Die Zunahme der Acetylcholin-Spaltung nach 72stündiger Aufbewahrung des Patientenserums bei +4° C [1] konnte auch für Benzoylcholin und Succinylcholin nachgewiesen

werden [2]. Daraus leiteten wir die Existenz eines labilen Inhibitors für verschiedene Esterase-Fractionen ab [2, 9].

Die *in-vitro*-Steigerung der Benzoylcholinhydro-lase-Aktivität durch Leber- und Serumcholinesterase nach Zugabe von NH<sub>4</sub>Cl [3] ließ uns vermuten, daß auch die zeitabhängige Zunahme der Hydrolysenrate [1, 2] mit einem Anstieg von NH<sub>4</sub>-Ionen im aufbewahrten Plasma in Zusammenhang stehen könnte. Tatsächlich sinkt die Hydrolysenrate *in vitro* in Anwesenheit von 0,01 m  $\alpha$ -Ketoglutar säure auf etwa 60% ab [4]. Neben anderen Metaboliten werden Carbaminsäure-Derivate [5] als mögliche Ammoniak-Muttersubstanzen diskutiert. Carbamate sind Inhibitoren der Cholinesterase [6, 7]. Das carbamylierte Enzym regeneriert jedoch in Gegenwart von Hydroxylamin schneller [7]. Dies veranlaßte uns, die Benzoylcholin-Spaltung durch natives Blutplasma in Anwesenheit von 0,25 m Hydroxylamin zu messen. Hydroxylamin ergab eine mittlere Erhöhung der Hydrolysenrate auf 170% gegenüber Kontrollmessungen ohne Hydroxylamin. Die Hydrolysenraten, angegeben in  $V = \text{Ext.}/\text{min} \cdot 10^{-4}$ , lagen für die Kontrollmessungen bei  $M = 298,4 \pm 13,36$ ,  $s = 42,22$  ( $N = 10$ ) und für die Messungen in Gegenwart von Hydroxylamin bei  $M = 504,0 \pm 22,96$ ,  $s = 72,55$  ( $N = 10$ ). Die Differenz ist mit  $P < 0,001$  gesichert.

Daraus folgt, daß endogen vorhandene Carbaminsäure-Derivate die Cholinesterase-Aktivität des nativen Blutplasmas beträchtlich hemmen. Eine eventuelle Identität zwischen den Carbaminsäure-Derivaten und dem von uns postulierten Inhibitor bleibt zu beweisen.

**Methodik:** Die Benzoylcholin-Spaltung wurde spektrophotometrisch [8] gemessen. Der Plasmapufferverdünnung wurde Hydroxylamin 0,5 m zugesetzt. Die Hydroxylamin-Konzentration im Ansatz betrug 0,25 m. Die erste Messung nach der Zugabe von Hydroxylamin erfolgte nach etwa 4,5 min. Die Hydroxylamin-Lösung wurde aus Hydroxylaminsulfat durch Neutralisation mit Ba(OH)<sub>2</sub> hergestellt. Die Messungen erfolgten an einem registrierenden Unicamspektralphotometer SP 800.

Das Untersuchungsgut bestand aus Blutspendern. Das Plasma wurde jeweils nach der Abnahme von 400 ml Blut gewonnen.

Eingegangen am 20. März 1967

[1] PILZ, W., u. H. HÖRLEIN: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 339, 157 (1964). — [2] MEYER, M., u. H. WEISS: Naturwissenschaften 53, 279 (1966). — [3] SVENSMARK, O.: Acta physiol. scand. 59, 378 (1963). — [4] WEISS, H., u. M. MEYER: Unveröffentlichte Befunde. — [5] FREUND, E., u. B. LUSTIG: Biochem. Z. 232, 442 (1931). — [6] MYERS, D. K.: Biochem. J. 62, 556 (1956). — [7] WILSON, J. B., et al.: J. biol. Chem. 236, 1498 (1961). — [8] KALOW, W., u. H. A. LINDSAY: Canad. J. Biochem. 33, 568 (1955). — [9] WEISS, H., u. M. MEYER: Kongreßbericht „anaesthesia 66“, Bd. 2 (1967, im Druck).

### Schutzwirkung von Cysteamin gegen Corticosteroid-Anstieg nach Röntgenbestrahlung

K. FLEMMING und B. GEIERHAAS

Radiologisches Institut der Universität Freiburg i. Br. und Arbeitsgruppe Strahlenbiologie und Pharmakologie im Heiligenberg-Institut, Heiligenberg/Baden

Bei Ratten ist der Corticosteroid-Gehalt in den Nebennieren (und im Blut) 2,5 h und 72 h nach Röntgenbestrahlung erhöht [1, 2]. Diese Befunde stimmen mit Ergebnissen überein, die mit indirekten Methoden erhalten wurden: der Gehalt der Nebennieren (NN) an Cholesterin und Ascorbinsäure, die bei der Corticosteroid-Synthese verbraucht werden, war zu den gleichen Zeiten herabgesetzt [3, 4]. Die Frage, ob der biphasische Aktivitätsanstieg der Nebennierenrinde (NNR) durch Strahlenschutzstoffe gehemmt werden kann, ist nicht geklärt. Es wurde festgestellt, daß Cysteamin die Cholesterin-Abnahme 2,5 h nach Bestrahlung (p. r.) nicht beeinflusste, 72 h p. r. jedoch verhinderte [3]. Diese verschiedenartige Beeinflussung der beiden Aktivitätsphasen ist schwer verständlich, wenn die Veränderungen im Cholesterin-Gehalt den Aktivitätszustand der NN richtig widerspiegeln. Cysteamin greift hemmend in die physikalischen und chemischen Primärvorgänge ein, welche der biologischen Strahlenwirkung ursächlich zugrunde liegen. Wenn beide Phasen gesteigerter NNR-Aktivität durch denselben Grundvorgang verursacht werden, müßten beide durch Cysteamin in gleicher Weise beeinflusst werden.