

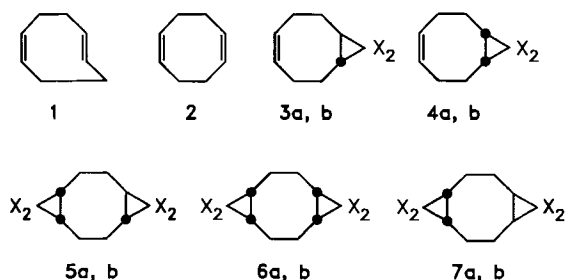
Autoren, die eine „Zuschrift“ veröffentlichen wollen, sollten vor der Abfassung ihres Manuskripts unbedingt die „Hinweise für Autoren“ lesen, die jeweils im Januarheft eines Jahrgangs nach dem Inhaltsverzeichnis gedruckt sind; auf Anforderung können sie auch von der Redaktion erhalten werden.

Scheinbar nicht-stereospezifische Dihalogencarbenadditionen – eine Erklärung**

Von Eckehard V. Dehmlow* und Thomas Stiehm

Die stereospezifische Addition von Dihalogencarbenen an Alkene ist in hunderten von Fällen beobachtet worden und dient entsprechend der Skell-Hypothese als Argument für den Singulett-Charakter dieser kurzlebigen Spezies^[1]. Einzig für *trans*-Cycloocten konnte eine nicht-stereospezifische Addition von Dibromcarben belegt werden^[2-4], die mit einer Isomerisierung des Edukts einherging. Dichlorcarben verhielt sich „normal“. Jetzt wurden CCl_2 - und CBr_2 -Additionen an das noch gespanntere *cis,trans*-1,5-Cyclooctadien **1** untersucht. Hier addiert sich auch Dichlorcarben anomal, sofern es phasentransferkatalytisch (PTC) erzeugt wurde.

1 und :CCl_2 (aus Ethyl-trichloracetat und Natriumethanolat) ergaben in Übereinstimmung mit der Literatur^[5] nur **3a** und daraus **5a**. Wurde :CCl_2 jedoch unter PTC erzeugt, erhielt man ein Gemisch von **5a** und **6a** im Verhältnis 2 : 1.



a, X = Cl; b, X = Br

Ähnliches gilt für die Umsetzung von **1** mit :CBr_2 . Mit Kalium-*tert*-butylalkoholat/ CHBr_3 entstand nur **5b**^[6], während mit CHBr_3 /50proz. Natronlauge/ $(\text{PhCH}_2)_3\text{NCl}$ (TEBA) wieder ein Gemisch erhalten wurde^[7]. Es bestand zu 2/3 aus **5b** und zu 1/3 aus den *syn*/*anti*-Isomeren **6b** und **7b**^[8].

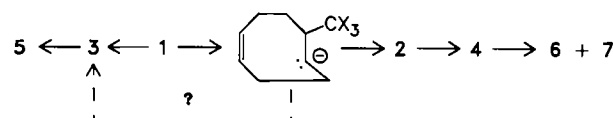
Folgende Beobachtungen sind für eine Klärung des Reaktionsmechanismus relevant:

- a) Wurde die Reaktion mit :CCl_2 vorzeitig abgebrochen, so war das zurückgewonnene Dien ein Gemisch von **1**

und *cis,cis*-1,5-Cyclooctadien **2**, und die Monoadduktfraktion (10% Ausbeute) enthielt ein 2 : 1-Gemisch von **3a** und **4a**^[10]. Die Bisadduktfraktion (5% Ausbeute) war dagegen reines **5a**. Es ist bekannt, daß die *trans*-Doppelbindung in **1** reaktiver ist. Offenbar reagiert **3a** auch schneller weiter als **4a**.

- b) **1** wurde weder bei 24stündigem Rühren in CHCl_3 /Petrolether mit TEBA noch bei 24stündigem Rühren in CH_2Cl_2 /Petrolether mit 50proz. Natronlauge und TEBA zu **2** isomerisiert.
c) Auch **3a** war gegenüber 50proz. Natronlauge/TEBA stabil.
d) Arbeiten an Luft beeinflusste die Stereoselektivität nicht, so daß radikalische Prozesse und Triplett-Prozesse ausgeschlossen werden können.
e) Rührte man **1** jedoch 17 h in CH_2Cl_2 /Petrolether/50proz. Natronlauge/TEBA mit wenig Ethanol (oder mit Acetylaceton), so wurde ein 8 : 1 (bzw. 5 : 1)-Gemisch von **1** und **2** zurückerhalten^[11]. Additionsprodukte der Nucleophile an **1** bzw. **2**^[12] wurden nicht gefunden.

Man weiß aus Konkurrenzversuchen, daß auch :CCl_2 aus PTC ein freies Singulett-Carben ist^[13]. Im Unterschied zu anderen Generierungsverfahren entsteht :CX_2 hier jedoch *reversibel* im Gleichgewicht mit seiner Vorstufe :CX_3^+ ^[14]. Die $\text{p}K_a$ -Werte von Acetylaceton (**9**) und Ethanol (**19**) schließen die von CHBr_3 (**9**^[15]) und CHCl_3 (**15**^[15]) ein, so daß man statt des von uns ursprünglich postulierten Zwischenprodukts, eines Carben-Alken-Komplexes^[3], nunmehr eine reversible nucleophile Addition an **1** mit Isomerisierung zu **2** annehmen muß.



Arbeitsvorschrift

1 g (9.3 mmol) **1** in 40 mL Petrolether (30–40°C)/30 mL CHCl_3 wurde mit 100 mg (0.44 mmol) TEBA oder äquivalenten Mengen Aliquat 336, Bu_4NHSO_4 oder Ph_4AsCl versetzt und mit 1 g 50proz. Natronlauge 6 h unter Eiskühlung, dann 10 h bei Raumtemperatur gerührt. Ausbeute: 15–24%; Fp des präparativ nicht trennbaren Gemisches von **5a** und **6a** = 115°C. Analyse durch HPLC an einer RP-18-Säule mit Methanol/ H_2O = 2/1.

Eingegangen am 11. Juli 1986,
veränderte Fassung am 21. Januar 1987 [Z 1857]

- [1] J. T. Sharp in D. Baston, W. D. Ollis (Hrsg.): *Comprehensive Organic Chemistry*, Vol. 1, Pergamon, Oxford 1979, S. 469.
[2] A. C. Cope, W. R. Moore, R. D. Bach, H. J. S. Winkler, *J. Am. Chem. Soc.* 92 (1970) 1243.
[3] E. V. Dehmlow, R. Kramer, *Angew. Chem.* 96 (1984) 700; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 23 (1984) 706.
[4] Die Ergebnisse von [3] wurden kürzlich exakt reproduziert: J. F. Hartwig, M. Jones, Jr., R. A. Moss, W. Ławrynowicz, *Tetrahedron Lett.* 27 (1986) 5907.
[5] J. A. Deyrup, M. Betkouski, W. Szabo, M. Mathew, G. J. Palenik, *J. Am. Chem. Soc.* 94 (1972) 2147; J. A. Deyrup, M. F. Betkouski, *J. Org. Chem.* 40 (1975) 284.
[6] Fp = 117°C; $^1\text{H-NMR}$ (300 MHz): δ = 0.75–0.9 (m, 1H), 1.0–1.2 (m, 2H), 1.2–1.45 (m, 3H), 1.5–1.65 (m, 2H), 2.2–2.5 (m, 4H).
[7] 30% Ausbeute, HPLC-Analyse mit Methanol/Wasser = 3/1.
[8] Eine Trennung der bekannten [9] Verbindungen **6b** und **7b** durch HPLC war nicht möglich; sie wurden nach fraktionierender Kristallisation identifiziert. **6a** dagegen war nicht von **7a** begleitet.
[9] E. V. Dehmlow, G. C. Ezimora, *Tetrahedron Lett.* 1970, 4047.

[*] Prof. Dr. E. V. Dehmlow, Dipl.-Chem. T. Stiehm
Fakultät für Chemie der Universität
D-4800 Bielefeld 1

[**] Diese Arbeit wurde vom Ministerium für Wissenschaft und Forschung Nordrhein-Westfalens (Projekt-Nr. IV B 4 – 10 302 486) gefördert.

- [10] Analytische Trennung durch HPLC mit Acetonitril/Wasser = 1/1.
 [11] Wir danken Prof. J. Sauer, Regensburg, für die Anregung zu diesen Experimenten.
 [12] Vgl. R. D. Bach, C. L. Willis, *J. Organomet. Chem.* 77 (1974) 31.
 [13] Übersicht: R. A. Moss in M. Jones, Jr., R. A. Moss (Hrsg.): *Carbenes*, Vol. 1, Wiley, New York 1973, S. 153–304.
 [14] Übersicht: E. V. Dehmlow, S. Dehmlow: *Phase Transfer Catalysis*, 2. Auflage, Verlag Chemie, Weinheim 1983, S. 220–278.
 [15] K. P. Butin, A. N. Kashin, I. P. Beletskaya, L. S. German, V. R. Polishchuk, *J. Organomet. Chem.* 25 (1970) 11.

Die fluorimetrische Bestimmung von Thyminglycol in Lebensmitteln (biologischem Material) – der Thyminglycolgehalt als Kriterium für eine Behandlung mit ionisierenden Strahlen

Von Konrad Pfeilsticker* und Jürgen Lucas

Die propagierte Behandlung von Lebensmitteln mit ionisierenden Strahlen^[1,2] zur Entkeimung, Keimungshemmung oder Reifungsbeeinflussung ist in der Bundesrepublik Deutschland zur Zeit noch verboten. Sie kann nur bei Trockenprodukten, insbesondere bei Gewürzen, durch Chemi- und Thermolumineszenz mit Einschränkungen nachgewiesen werden^[3]. Eine allgemein anwendbare Nachweismethode, insbesondere für wasserhaltiges biologisches Material, fehlt bisher. Im folgenden stellen wir das Prinzip einer neuen Methode vor, die die Strahlenempfindlichkeit der DNA ausnutzt.

In einer wäßrigen DNA-Lösung reagieren etwa 70% der radiolytisch aus dem Wasser gebildeten Hydroxylradikale mit den Basen der DNA. Dabei sind die Pyrimidinbasen und besonders Thymin am empfindlichsten^[4]. Ein Haupttyp der Radiolyseprodukte ist 5,6-Dihydroxy-5,6-dihydrothymin (Thyminglycol)^[5], das nun als Bestrahlungskriterium in Anlehnung an die DNA-Bestimmungsmethode von Roberts und Friedkin^[6] fluorimetrisch quantitativ erfaßt wird: Von dem in der DNA gebundenen Radiolyseprodukt Thyminglycol wird unter alkalischen Bedingungen Hydroxyaceton (Acetol) abgespalten und mit *o*-Aminobenzaldehyd (*o*-ABA) zum fluoreszierenden 3-Hydroxy-chinaldin umgesetzt. Hierbei wird die von Roberts und Friedkin^[6] vorgesehene Oxidation des Thymins mit Brom durch die Bestrahlung ersetzt.

5 g einer Lebensmittelprobe werden zur Ausfällung der Nucleinsäuren und Proteine in 25 mL 6proz. Trichloressigsäure homogenisiert und zentrifugiert. Mit dem Präzipitat wird zweimal genauso verfahren. Dann wird mit 10 mL Wasser aufgefüllt, mit 1 M KOH neutralisiert, mit Wasser auf 25 g aufgefüllt und erneut homogenisiert. Zu 400 mg des Homogenisates werden 35 µL einer Lösung von 0.1 M Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) in 2.1 M NaOH gegeben und 90 min bei 20°C inkubiert^[7]. Dann wird mit 65 µL einer nach Roberts und Friedkin^[6] hergestellten *o*-ABA-Lösung versetzt und 20 min bei 65°C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 4.5 mL 0.1 M Kaliumphosphatpuffer (pH 6.9) gestoppt^[6]. Vor der Messung muß zur Entfernung von Schwebstoffen zentrifugiert werden. Bei einer Anregung bei $\lambda = 375$ nm wird die Fluoreszenz bei 444 nm gemessen. Das Gerät wird vorher mit einer wäßrigen Lösung von Chininsulfat (0.1 mg/mL) (*IF* = 100) und mit destilliertem Wasser (*IF* = 0) bei den gleichen Wellenlängen justiert (*IF* = Fluoreszenzintensität).

Einige Inhaltsstoffe bewirken dabei eine erhöhte Fremdfluoreszenz. Wie wir gefunden haben, kann sie weitgehend

kompensiert werden, wenn zur Blindwertbestimmung 400 mg Homogenisat mit 65 mL einer wäßrigen NH_3 -Lösung (0.08 M) anstelle von *o*-ABA versetzt werden (siehe Tabelle 1 und 2, *IF*(N)). Dieser wichtige Befund ermöglicht die Bewertung einer Probe ohne authentische unbestrahlte Vergleichsprobe. Die Differenz zwischen der Fluoreszenzintensität der Probe und dem Blindwert entspricht dem in der Probe vorhandenen Thyminglycol. Die Umrechnung der relativen Fluoreszenzwerte in absolute Werte für den Thyminglycolgehalt gelingt über eine Eichkurve, die nach ^[6] mit Thymin erstellt wird.

Tabelle 1. Fluoreszenzintensität (*IF*) und Thyminglycolgehalte in bestrahlten und unbestrahlten Lebensmitteln. TG = Thyminglycol; *IF*(A) = Fluoreszenzintensität mit *o*-Aminobenzaldehyd; *IF*(N) = Fluoreszenzintensität mit NH_4OH (Blindwert); Standardabweichung $\sigma = \pm 1.9$ µg TG/g Probe.

a) Krabben	Bestrahlungsdosis [kGy]	
	0	10
<i>IF</i> (A)	37	51
<i>IF</i> (N)	37	35
<i>IF</i> (A) – <i>IF</i> (N)	0	16
Thyminglycolgehalt [µg TG/g Probe]	0	16
Thyminglycol bezogen auf ursprüngliches Thymin	0%	17%

b) Seelachs	Bestrahlungsdosis [kGy]		
	0	5	10
<i>IF</i> (A)	11	19	28
<i>IF</i> (N)	8	8	10
<i>IF</i> (A) – <i>IF</i> (N)	3	11	18
Thyminglycolgehalt [µg TG/g Probe]	3.7	11.2	19.5
Thyminglycol bezogen auf ursprüngliches Thymin	4%	12%	22%

c) Hähnchenbrust	Bestrahlungsdosis [kGy]		
	0	5	10
<i>IF</i> (A)	27.5	43	43
<i>IF</i> (N)	26.0	31	29
<i>IF</i> (A) – <i>IF</i> (N)	1.5	12	14
Thyminglycolgehalt [µg TG/g Probe]	0.9	11.7	14.2
Thyminglycol bezogen auf ursprüngliches Thymin	1%	13%	16%

Die Methode wurde zunächst an einigen bestrahlten (5 und 10 kGy, ⁶⁰Co) und unbestrahlten Lebensmitteln geprüft (Krabben, Seelachs und Hähnchenbrust, siehe Tabelle 1). In jedem Fall konnte bei den bestrahlten Proben eine signifikant erhöhte Fluoreszenzintensität beobachtet werden, so daß das Arbeitsprinzip erfolversprechend ist. Bei einer Bestrahlung mit 10 kGy sind bei den Lebensmittelproben 16–22% des Thymins in Thyminglycol umgewandelt (vgl. Tabelle 1), wenn man annimmt, daß das Probenmaterial 1 g/kg DNA enthält. Aus Tabelle 1 geht hervor, daß man auf diesem Wege neben einer qualitativen Aussage auch die angewendete Strahlendosis wird ableiten können. Das ergibt sich auch aus Messungen an Lösungen reiner Kalbsthymus-DNA (siehe Tabelle 2); diese Messun-

Tabelle 2. Fluoreszenzintensität (*IF*) und Thyminglycolgehalte in bestrahlter und unbestrahlter Kalbsthymus-DNA in wäßriger Lösung (0.5 mg/mL in 0.15 M NaCl). Abkürzungen siehe Tabelle 1.

	Bestrahlungsdosis [kGy]			
	0	0.05	5	10
<i>IF</i> (A)	2	3.5	120	143
<i>IF</i> (N)	0.5	0.5	17	27
<i>IF</i> (A) – <i>IF</i> (N)	1.5	3.0	103	116
Thyminglycolgehalt [µg TG/mg DNA]	0.35	1.1	32	36
Thyminglycol bezogen auf ursprüngliches Thymin	0.4%	1.2%	36%	40%

[*] Prof. Dr. K. Pfeilsticker, Dipl.-Oecotroph. J. Lucas
 Lehrstuhl für Lebensmittelwissenschaft
 und Lebensmittelchemie der Universität
 Endenicher Allee 11–13, D-5300 Bonn 1