

- [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. Polischuk, *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-Hydroxychinaldin 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 Ethyldiamintetraessigsäure (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 ($IF = \text{Fluoreszenzintensität}$).

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

kompenziert werden, wenn zur Blindwertbestimmung 400 mg Homogenisat mit 65 mL einer wäßrigen NH₃-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 NH₃OH (Blindwert); Standardabweichung $\sigma = \pm 1.9 \mu\text{g TG/g Probe}$.

a) Krabben	Bestrahlungsdosis [kGy]	
	0	10
$IF(A)$	37	51
$IF(N)$	37	35
$IF(A) - IF(N)$	0	16
Thyminglycolgehalt [$\mu\text{g TG/g Probe}$]	0	16
Thyminglycol bezogen auf ursprüngliches Thymin	0%	17%

b) Seelachs	Bestrahlungsdosis [kGy]		
	0	5	10
$IF(A)$	11	19	28
$IF(N)$	8	8	10
$IF(A) - IF(N)$	3	11	18
Thyminglycolgehalt [$\mu\text{g TG/g Probe}$]	3.7	11.2	19.5
Thyminglycol bezogen auf ursprüngliches Thymin	4%	12%	22%

c) Hähnchenbrust	Bestrahlungsdosis [kGy]		
	0	5	10
$IF(A)$	27.5	43	43
$IF(N)$	26.0	31	29
$IF(A) - IF(N)$	1.5	12	14
Thyminglycolgehalt [$\mu\text{g TG/g Probe}$]	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 erfolgversprechend 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
$IF(A)$	2	3.5	120	143
$IF(N)$	0.5	0.5	17	27
$IF(A) - IF(N)$	1.5	3.0	103	116
Thyminglycolgehalt [$\mu\text{g TG/mg DNA}$]	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

gen weisen zugleich auch auf die Erfassungsgrenzen des Verfahrens hin.

In diesem Zusammenhang ist es interessant, daß die Arbeitsgruppe um Ames^[8] Thyminglycol und Thymidglycol im Urin von Mensch und Ratte analytisch bestimmt, um eine oxidative Schädigung der DNA durch Mutagene und Cancerogene nachzuweisen.

Eingegangen am 4. August 1986,
veränderte Fassung am 19. Januar 1987 [Z 1887]

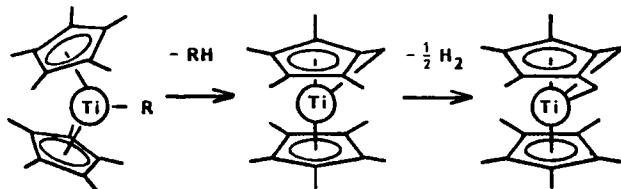
CAS-Registry-Nummer von Thyminglycol: 2943-56-8.

- [1] P. S. Zurer, *Chem. Eng. News* 64 (1986) Nr. 18, S. 46.
- [2] T. Grünewald, *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.* 180 (1985) 357.
- [3] L. Heide, W. Bögl, *Z. Lebensm.-Unters. Forsch.* 181 (1985) 283.
- [4] A. P. Casarett: *Radiation Biology*, Prentice-Hall, Englewood Cliffs 1968, S. 57.
- [5] P. V. Hariharan, J. F. Remsen, P. A. Cerutti in P. C. Hanawalt, R. B. Setlow (Hrsg.): *Molecular Mechanisms for the Repair of DNA*, Plenum Press, New York 1975, S. 51.
- [6] D. Roberts, M. Friedkin, *J. Biol. Chem.* 233 (1958) 483.
- [7] P. V. Hariharan, *Radiat. Res.* 81 (1980) 496.
- [8] R. Cathcart, E. Schwiers, R. L. Saul, B. N. Ames, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 5633.

Titanhydridbildung durch Wasserstofftransfer von 2-Methylpyridin auf eine Titan-Fulven-Verbindung; das erste strukturell charakterisierte terminale Titanhydrid

Von Johannes W. Pattiasina, Fré van Bolhuis und Jan H. Teuben*

Bei der Untersuchung der Thermolyse von Verbindungen des Typs $[\text{Cp}_2^*\text{TiR}]$ ($\text{Cp}^* = \eta^5\text{-C}_5\text{Me}_5$; $\text{R} = \text{H}$ oder Alkyl) haben wir eine schrittweise Wasserstoffabstraktion von einem der Cp^* -Liganden beobachtet^[1]. Wir interessie-



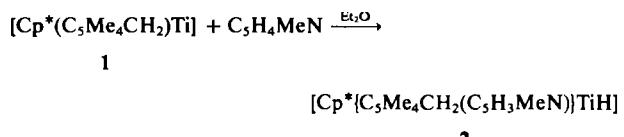
ren uns derzeit für die Reaktivität dieser modifizierten Cp^* -Liganden. In Verbindung 1 kann der Tetramethylfulven-Ligand entweder als Cyclopentadienylmethyl-Gruppe („tucked-in“-Form) A^[2] oder als neutrales konjugiertes Trien B^[3] koordiniert sein.



In Vorversuchen mit einer Vielzahl von Substraten mit aktiven Protonen wie Säuren und Alkoholen reagierte 1 als Cyclopentadienylmethyl-Gruppe unter Wasserstofftransfer vom Substrat zum Fulvenliganden und Wiederherstellung des ursprünglichen Cp^* -Liganden^[4].

Völlig anders und unerwartet verläuft dagegen die Umsetzung von 1 mit Pyridin-Derivaten. Bei -80°C reagiert die dunkelviolette Verbindung 1 schnell mit 2-Methylpyridin

in Et_2O zu einer dunkelgrünen Lösung, die sich bei Erwärmen auf Raumtemperatur dunkelblau färbt. Nach Einengen und Kühlen scheiden sich dunkelblaue Kristalle der Verbindung 2 ab^[5].



Wie die Molekülstruktur von 2 zeigt (Abb. 1)^[6], hat ein Wasserstofftransfer von Position 6 des 2-Methylpyridins zum Titan stattgefunden; gleichzeitig ist eine CC-Bindung zwischen dem Pyridinring und der Methylengruppe des Fulvenliganden entstanden. Auf diese Weise wurden ein Cp^* - und ein Pyridin-Ligand zu einem chelatisierenden Liganden verknüpft.

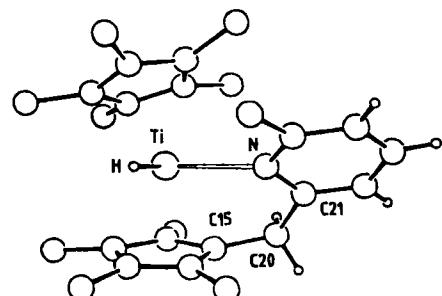


Abb. 1. Struktur von $[\text{Cp}^*(\text{C}_5\text{Me}_4\text{CH}_2(\text{C}_5\text{H}_3\text{MeN}))\text{TiH}]$ 2 im Kristall.

Verbindung 2 ist das erste strukturell charakterisierte Dicyclopentadienyl-titanhydrid mit einer terminalen Ti-H-Bindung. Der Ti-H-Abstand ist mit $1.70(4)$ Å deutlich länger als in terminalen Hydriden anderer 3d-Übergangsmetalle, aber vergleichbar mit dem in Hydriden der frühen 4d- und 5d-Übergangsmetalle^[7]. Bisher wurden nur Strukturbestimmungen von Titanhydriden mit brückenbildenden Wasserstoffatomen in Gruppierungen wie Ti-H-Ti oder z. B. Ti-H-Al oder Ti-H-B veröffentlicht. In diesen Komplexen variiert die Ti-H-Bindungslänge zwischen $1.69(10)$ und $1.94(7)$ Å^[7].

Die Stellung des Pyridylfragments zum Titanatom, besonders aber der Ti-N-Abstand von $2.340(3)$ Å zeigen, daß wir es mit einer Ti-N-Bindung zu tun haben^[8]. Der Winkel Ringzentrum-Ti-Ringzentrum beträgt 142.7° ; die Abstände zwischen Ti und den Ringzentren (2.086 und 2.064 Å) ähneln denen in unsubstituierten Cp_2^*Ti -Derivaten^[9] (Ringzentrum bedeutet Schwerpunkt von Cp^*).

Die Ebene mit den Ringzentren und Ti und die H-Ti-N-Ebene bilden einen Diederwinkel von 91.6° ; der Winkel H-Ti-N beträgt $91(2)^\circ$. Daraus geht hervor, daß 2 alle Charakteristika eines echten $\text{Cp}_2^*\text{M}(\text{L})\text{X}$ -Moleküls erfüllt. Die C15-C20-Bindung ist leicht von der Ringebene in Richtung Metall abgeknickt (7.4°). Die anderen C(Ring)-C(Methyl)-Bindungen weisen vom Metall weg; somit liegt die für Cp^* -Liganden normale „Tellerform“ vor^[10]. Der Winkel C15-C20-C21 von $111.5(3)^\circ$ zeigt, daß C20 nahezu exakt sp^3 -hybridisiert ist.

Im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von 2^[5] müssen die Protonen der Cyclopentadienyl-Liganden zugeordnet werden. Da 2 paramagnetisch ist, sind die Linien breit und stark verschoben. Die Hydrid-Resonanz kann, genau wie bei der verwandten Verbindung $[\text{Cp}_2^*\text{TiH}]$ ^[3], nicht lokalisiert wer-

[*] Dr. J. H. Teuben, Drs. J. W. Pattiasina, F. van Bolhuis
Department of Chemistry, University of Groningen
Nijenborgh 16, NL-9747 AG Groningen (Niederlande)