

b) 6 g II werden vorsichtig mit 30 ccm *Thionylchlorid* versetzt. Nach der anfänglich sehr heftigen Reaktion erhitzt man noch 3 Stdn. unter Rückfluß. Nach dem Abdestillieren des Thionylchlorids kristallisiert man den Rückstand aus wenig wäßr. Methanol um und sublimiert anschließend bei 100°/12 Torr. Ausb. 5.7 g (85 % d. Th.), Schmp. 165°.

FRIEDRICH WEYGAND*), HELMUT SIMON*)
und KARL-DIETHER KEIL*)

Isotopeneffekte beim Umkristallisieren tritiumhaltiger Verbindungen

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Technischen Universität Berlin

(Eingegangen am 15. April 1959)

Beim fraktionierten Umkristallisieren von Mannose-[1-T]-phenylhydrazon und Glucose-[1-T] werden Isotopeneffekte beobachtet, die durch die in den Lösungen ablaufenden Isomerisierungen erklärt werden.

Bei der Reinigung von kristallinen isotopenmarkierten Verbindungen, die nach irgendeinem Verfahren gewonnen wurden, kristallisiert man diese meist bis zur konstanten spezifischen Radioaktivität um. Im Verlaufe unserer Untersuchungen über die Osazonbildung von Hexosen mit an C-1 tritiummarkierten Zuckern stellten wir Isotopeneffekte beim Umkristallisieren fest. Es wurde zunächst beobachtet, daß die molare Radioaktivität von D-Mannose-[1-T]-phenylhydrazon beim Umkristallisieren aus Wasser/Alkohol (4:6 Vol.-Tle.) abnimmt.

Anfänglich vermuteten wir, daß radioaktive Verunreinigungen beim Umkristallisieren entfernt werden. Dies ließ sich jedoch mit Sicherheit ausschließen, da die Abnahme der Radioaktivität bei aufeinanderfolgenden Umkristallisationen nahezu gleich war und die Abnahme auch erfolgte, als die Mannose-[1-T] ein zweites Mal über das *p*-Nitranilin-mannosid gereinigt worden war.

Die Möglichkeit eines Austausches war unwahrscheinlich und wurde durch die nachstehend aufgeführten Versuche ausgeschlossen. Bereits Y.J. TOPPER und D. STETTEN¹⁾ hatten festgestellt, daß bei der Herstellung von Mannose-phenylhydrazon in deuteriumhaltigem Wasser kein Deuteriumeinbau erfolgt. Wir konnten diesen Befund mit tritiumhaltigem Wasser bestätigen. Auch beim Umkristallisieren von nichtmarkiertem Mannose-phenylhydrazon in tritiumhaltigem Wasser/Alkohol (4:6 Vol.-Tle.) trat keine Tritiumaktivität in dem Hydrazon auf, nachdem das Tritium aus labilen Wasserstoffbindungen entfernt worden war. Schließlich war der Tritiumverlust beim Umkristallisieren von Mannose-[1-T]-phenylhydrazon unabhängig davon, ob die Ver-

*) Neue Anschrift: Organisch-Chemisches Institut der Techn. Hochschule München, München 2.

¹⁾ J. biol. Chemistry 189, 191 [1951].

bindung drei Stunden oder nur wenige Minuten in der Hitze in dem Wasser/Alkohol-Gemisch gehalten wurde.

Aus diesen Versuchen ergab sich, daß der Tritiumverlust durch einen Isotopeneffekt bedingt wird. Daher mußte das in Lösung verbleibende Mannose-phenylhydrazon eine höhere molare Tritiumaktivität besitzen als das auskristallisierte, was sich bestätigte (vgl. Tab. 1). Die Schmelzpunkte und die IR-Spektren der verschiedenen Fraktionen waren hingegen gleich.

Tab. 1. Vergleich der prozentualen molaren Radioaktivität von Mannose-[1-T]-phenylhydrazon bei fraktionierter Umkristallisation

	% der mol. Radioaktivität	% Gewichtsanteil der Gesamtmenge
Ausgangssubstanz	100	
1. Fraktion	96.9	81
2. Fraktion	120.8	10
Ausgangssubstanz*)	100	
1. Fraktion	90.8	67
2. Fraktion	104.4	15

*) Als Ausgangsmaterial dienten die 0.81 Gew.-Tle. der 1. Umkristallisation.

Da auszuschließen ist, daß eine tritiummarkierte Verbindung vom Mol.-Gewicht 272 sich in ihrer Löslichkeit von den nichtmarkierten Molekülen vom Mol.-Gewicht 270 merklich unterscheidet, ist der Grund für die beobachteten Erscheinungen in Isomerisierungen, die mit einem Isotopeneffekt verbunden sind, zu suchen, wobei Bindungen an C-1 gelöst und wieder geknüpft werden. Sowohl die Anomerisierung wie die Änderung der Ringgröße kann hierbei eine Rolle spielen. Die Mutarotation von Mannose-phenylhydrazon wurde von C. L. BUTLER und L. CRETCHER²⁾ untersucht. Sie stellten fest, daß die Drehung einer Lösung (Pyridin/Äthanol, 1:1 Vol.-Tle.) durch ein Minium geht, und folgerten daraus, daß mehr als zwei Formen am Gleichgewicht beteiligt sind.

Falls die Annahme eines Isotopeneffektes bei Isomerisierungen zutrifft, sollte er auch bei der fraktionierten Umkristallisation von Glucose-[1-T] zu beobachten sein. Das Ergebnis eines solchen Versuches, bei dem die Glucose zunächst in Wasser unter Zusatz eines Tropfens verdünnten Ammoniaks gelöst und nach dem Eindampfen aus Methanol wieder kristallisiert erhalten wurde, ersieht man aus Tab. 2.

Tab. 2. Vergleich der prozentualen molaren Radioaktivität von Glucose-[1-T] bei fraktionierter Kristallisation

	% der mol. Radioaktivität	% Gewichtsanteil der Gesamtmenge
Ausgangssubstanz	100	
1. Fraktion	104.6	11
2. Fraktion	nicht gemessen	35
3. Fraktion	103.2	15
4. Fraktion	101.0	6
5. Fraktion	98.2	6

2) J. Amer. chem. Soc. 53, 4358 [1931].

Entsprechende Versuche mit Glucose-[1-¹⁴C]³⁾ zeigten keinen mit Sicherheit außerhalb der Meßgenauigkeit liegenden Effekt. Allerdings scheint es nicht ausgeschlossen, daß bei weitergehender Fraktionierung ebenfalls die spezifische Radioaktivität nicht mehr ganz konstant ist.

Die in Tab. 1 und 2 angegebenen Effekte lassen sich durch einen kinetischen Isotopeneffekt oder teilweise auch durch einen Isotopeneffekt im Gleichgewicht erklären. Der kinetische Isotopeneffekt kommt dadurch zustande, daß die Bindungen an C-1 bei den markierten Molekülen mit einer anderen Geschwindigkeit gelöst bzw. geknüpft werden als bei den nichtmarkierten (sekundärer Isotopeneffekt).

Der Befund, wonach bei der Umkristallisation von Glucose-[1-T] zunächst Fraktionen höherer spezifischer Radioaktivität anfallen, während beim Mannose-[1-T]-phenylhydrazon die ersten Fraktionen eine geringere spezifische Radioaktivität aufweisen, muß der allgemeinen Erfahrung, nach der man erwarten würde, daß die an C-1 tritiummarkierten Molekülen langsamer reagieren, nicht widersprechen, da es sich um verschiedenartige Isomerisierungsvorgänge handeln kann.

Nach den vorliegenden Versuchen ist damit zu rechnen, daß beim Umkristallisieren von tritiummarkierten Verbindungen immer dann ein Isotopeneffekt auftreten kann, wenn an demjenigen C-Atom, das mit einem Tritiumatom verknüpft ist, in Lösung eine Isomerisierung stattfindet und die Wiederisolierung der Verbindung nicht zu 100% erfolgt.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

D-Mannose-[1-T]: D-Mannonsäure- γ -lacton wurde in tritiumhaltigem Wasser mit Natriumamalgam reduziert⁴⁾. Die Reinigung und die Kontrolle darüber, ob das gesamte Tritium an C-1 gebunden war, erfolgte wie im Falle der *D-Glucose-[1-T]*⁵⁾.

Faktionierte Kristallisation von D-Mannose-[1-T]-phenylhydrazon

a) 200 mg *D-Mannose-[1-T]-phenylhydrazon* wurden in 25 ccm siedendem 60-proz. Alkohol 6 Min. in Lösung gehalten. Bei sofortiger Kristallisation ergaben sich als erste Fraktion 162 mg (81%). Nach dem Einengen der Mutterlauge unter Stickstoff i. Vak. auf etwa 1 ccm wurden als zweite Fraktion 20 mg (10%) erhalten. Schmp. beider Fraktionen 193° (unkorr.).

b) 142 mg der unter a) erhaltenen ersten Fraktion wurden 12 Min. in 18 ccm siedendem 60-proz. Alkohol in Lösung gehalten. Die Kristallisation ergab 95 mg (67%). Nach dem Einengen unter Stickstoff i. Vak. auf etwa 2 ccm wurden als zweite Fraktion 21 mg (15%) erhalten. Schmp. 194° (unkorr.).

Faktionierte Kristallisation von D-Glucose-[1-T]: 500 mg *D-Glucose-[1-T]* wurden in 2 ccm Wasser gelöst und nach Zusatz von 1 Tropfen verd. Ammoniaks sofort i. Vak. zum Sirup eingeengt. Nach Aufnahme in 10 ccm absol. Methanol erfolgte die fraktionierte Kristallisation durch langsames Einengen der Lösung bei 35°. Die α -Glucosefraktionen (Tab. 2) zeigten den konstanten Schmp. 145° (unkorr.).

Messung der Tritiumaktivität: Die Bestimmungen erfolgten in Proportionalzählrohren⁶⁾.

3) Ausgeführt von Herrn DIETER PALM.

4) F. WEYGAND, H. SIMON und K.-D. KEIL, Chem. Ber., in Vorbereitung.

5) F. WEYGAND, H. SIMON und J. F. KLEBE, Chem. Ber. 91, 1567 [1958].

6) H. SIMON, H. DANIEL und J. F. KLEBE, Angew. Chem., 71, 303 [1959].