

Analytisch-technische Untersuchungen

Dünnschicht-Chromatographie von Nucleotiden

von DR. K. RANDERATH [*]

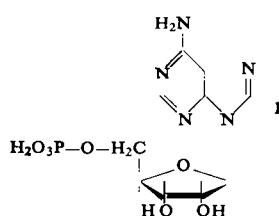
INSTITUT FÜR ORGANISCHE CHEMIE DER TECHNISCHEN HOCHSCHULE DARMSTADT

Die Dünnschicht-Chromatographie von Nucleotiden an DEAE- und ECTEOLA-Cellulose ist den bisher gebräuchlichen Trennungsmethoden überlegen. Mit verdünnter Salzsäure erhält man ohne Gradiententechnik sowohl eine Gruppentrennung der Mono-, Di- und Triphosphate als auch eine Subfraktionierung innerhalb dieser Gruppen, die von der Basizität der Nucleobasen bestimmt wird. Das Verfahren ist wesentlich empfindlicher als die Papierchromatographie; noch $5 \cdot 10^{-4} \mu\text{Mol}$ Adenin-nucleotide können erkannt werden. Die ohne Schwanzbildung chromatographierbare Substanzmenge ist größer als bei der Papierchromatographie; ein Gemisch aus je 1 μMol ADP und ATP/Startfleck läßt sich glatt trennen. Das Verfahren ist somit auch für mikropräparative Trennungen brauchbar. Je $10^{-2} \mu\text{Mol}$ ADP und ATP werden in 4 bis 10 min vollständig getrennt. – Vorversuche zeigen, daß sich auch Oligonucleotide durch Dünnschicht-Chromatographie an modifizierter Cellulose trennen lassen.

Einleitung

Nucleotide sind Bausteine der hochmolekularen Nucleinsäuren. Sie bestehen aus einer Base, der Nucleobase, einer Pentose – Ribose im Falle der RNS [1], 2'-Desoxyribose im Falle der DNS – und aus einem mit dem Zucker veresterten Phosphorsäurerest. Nucleobasen der RNS sind hauptsächlich die Purine Adenin und Guanin sowie die Pyrimidine Cytosin und Uracil. DNS enthält Thymin (5-Methyluracil) an Stelle von Uracil.

In der Nucleinsäure sind die Nucleotide, z. B. 5'-AMP (I), durch 3',5'-Phosphorsäurediester-Brücken miteinander verknüpft.



Chromatographie der Nucleotide

Die papierchromatographische Trennung von Nucleotiden dauert 15 bis 24 Stunden (eindimensionale Verfahren) oder 2 bis 3 Tage (zweidimensionale Verfahren). Zur Hochspannungspaperelektrophorese benötigt man eine verhältnismäßig komplizierte und kostspielige Apparatur.

[*] Ein Buch von K. Randerath über Dünnschicht-Chromatographie (etwa 220 S., zahlr. Abb.) erscheint demnächst im Verlag Chemie, GmbH, Weinheim/Bergstr.

[1] Abkürzungen: RNS = Ribonucleinsäure; DNS = Desoxyribonucleinsäure; AMP, ADP, ATP = Adenosin-mono-, -di- und -triphosphat; GMP, GDP, GTP; CMP, CDP, CTP; UMP, UDP, UTP = die entsprechenden Guanosin-, Cytidin- bzw. Uridinverbindungen; 5'-AMP = Adenosin-5'-monophosphat. – DEAE-Cellulose = Diäthylaminoäthyl-cellulose; ECTEOLA-Cellulose = Cellulose, die über Epichlorhydrin (EC) mit Triäthanolamin (TEOLA) verknüpft wurde.

Bei der Dünnschicht-Chromatographie extrem hydrophiler Verbindungen, wie der Nucleosid-polyphosphate [2–5] treten Schwierigkeiten auf, wenn man die üblichen anorganischen Trennschichten verwendet. Diese Schwierigkeiten lassen sich auch durch stark polare Laufmittel nicht beseitigen: Insbesondere Di- und Triphosphate neigen zur Schwanzbildung und sind schlecht trennbar. Der Gipsgehalt anorganischer Adsorbentien stört bei der Chromatographie mit alkalischen (ammoniakalischen) Laufmitteln [2,3]. Die anorganischen Schichten absorbieren stark bei 250 bis 260 μm , was den Nachweis der Nucleotide im UV-Licht [6] stört. Durch Herstellung der Schichten unter Zusatz von Leuchtstoffen [7,8] oder durch nachträgliches Besprühen der Platten mit Fluorescein-Lösung [9,10] läßt sich die untere Nachweissgrenze für Nucleotide herabsetzen, aber sie liegt auch dann noch über der Nachweissgrenze auf organischen Schichten.

Da die Ionenaustausch-Chromatographie zur präparativen Trennung von Nucleotiden geeignet ist [11,12], vermuteten wir, daß sich an dünnen Ionenaustauscher-Schichten ähnlich gute Trenneffekte ergeben würden. In der Ionenaustausch-Chromatographie bestimmt in erster Linie die pH-abhängige Gesamtladung einer Substanz ihre Wanderungsgeschwindigkeit. Die Gesamtladung erhält man, indem man die Zahl der ionisierten Gruppen mit deren Dissoziationsgrad multipliziert und

- [2] K. Randerath, Angew. Chem. 73, 436 (1961).
- [3] K. Randerath, Angew. Chem. 73, 674 (1961).
- [4] K. Randerath u. H. Struck, J. Chromatogr. 6, 365 (1961).
- [5] K. Randerath, Biochem. biophys. Res. Commun. 6, 452 (1961/1962).
- [6] E. R. Holiday u. E. A. Johnson, Nature (London) 163, 216 (1949).
- [7] J. G. Kirchner, J. M. Miller u. G. E. Keller, Analytic. Chem. 23, 420 (1951).
- [8] H. Gänshirt u. A. Malzacher, Arch. Pharmaz. 293/65, 925 (1960).
- [9] T. Wieland u. L. Bauer, Angew. Chem. 63, 511 (1951).
- [10] T. Wieland u. B. Heinke, Liebigs Ann. Chem. 615, 193 (1958).
- [11] W. E. Cohn in E. Chargaff u. J. N. Davidson: The Nucleic Acids. Academic Press, New York 1955, Bd. 1, S. 211ff.
- [12] W. E. Cohn, J. Amer. chem. Soc. 72, 1471 (1950).

die Produkte summiert. Die Beziehung zwischen Gesamtladung und pH ist in Abb. 1 [11] für die vier wichtigsten Nucleosid-monophosphate dargestellt. Man erkennt, daß die negative Ladung bei gegebenem pH in

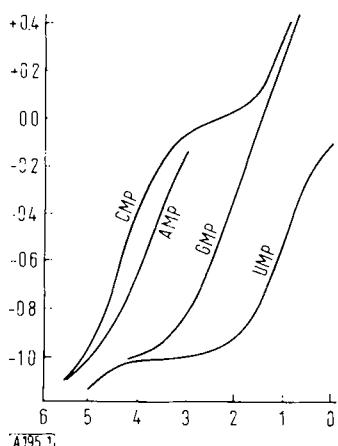


Abb. 1. Beziehung zwischen Gesamtladung und pH -Wert des Lösungsmittels für CMP, AMP, GMP und UMP (nach [11])
Ordinate: Gesamtladung
Abszisse: pH -Wert

der Reihenfolge $CMP < AMP < GMP < UMP$ ansteigt. Bei den Di- und Triphosphaten findet man die gleiche Reihe. Es ist demnach zu erwarten, daß CMP am leichtesten, UMP am schwersten mit verdünnten Säuren von einer Anionenaustauscher-Säule eluiert wird. Häufig ist die Reihenfolge von Guanin- und Uracil-Derivaten jedoch umgekehrt. Hierfür sind Adsorptionskräfte verantwortlich. Purine werden im allgemeinen stärker adsorbiert als Pyrimidine. Besonders bei der Ionenaustausch-Chromatographie mit neutralen Elektrolytlösungen wird dieser Effekt deutlich: Obwohl alle Nucleotide gleichen Typs dieselbe Gesamtladung tragen – die Basen sind unter diesen Bedingungen nicht geladen –, werden Cytosin- und Uracil-Derivate vor Adenin- und Guanin-Derivaten eluiert.

Vorversuche an Schichten aus den üblichen Harz-Austauschern zeigten, daß sich Nucleotide an Ionenaustauscher-Schichten trennen lassen, jedoch waren die Ergebnisse unbefriedigend. Vor allem störte die starke UV-Absorption der Schicht den Nachweis der Nucleotide. Hingegen lieferten Cellulose - Ionenaustauscher [13] Trennergebnisse, die sich mit keiner anderen bisher bekannten Methode erzielen lassen [2,3].

Cellulose-Ionenaustauscher wurden bisher fast ausschließlich zur Trennung höher- und hochmolekularer Stoffe (Oligo- und Polynucleotide, Peptide, Proteine, Polysaccharide) verwendet. Über ihre Fähigkeit, auch niedermolekulare Verbindungen zu trennen, war fast nichts bekannt. Aus unseren Ergebnissen folgt, daß sie sich auch zur Chromatographie niedermolekularer Verbindungen eignen. Es werden auf der Cellulose-Ionenaustauscherschicht ohne Anwendung eines Gradienten (Veränderung von ionaler Konzentration und/oder pH des Elutionsmittels während der Chromatographie) Trennungen erzielt, die an der Harz-Austauschersäule nur durch Gradientenelution zu erreichen sind. Es ist anzunehmen, daß sich im Verlauf der Chromatographie infolge einer „Frontalanalyse“ des Laufmittels ein Gradient in der Schicht ausbildet, der für die guten Trenneffekte mitverantwortlich ist.

[13] E. A. Peterson u. H. A. Sober, J. Amer. chem. Soc. 78, 751 (1956).

Für die Säulen-Chromatographie bestimmte Cellulose-Austauscher sind für die Dünnschicht-Chromatographie nicht ohne weiteres geeignet; sie besitzen beispielsweise ein zu grobes Korn [3]. Mechanische Zerkleinerung allein genügt in vielen Fällen nicht. So hergestellte Produkte haben vielfach Eigenschaften (starke Quellfähigkeit, Ablösung vom Glas), die ihre Verwendung zur Dünnschicht-Chromatographie ausschließen. Im Handel befindliche modifizierte Cellulosen verhalten sich bei der dünnschicht-chromatographischen Prüfung so verschieden, daß zunächst eine Standardisierung der Herstellungsbedingungen erforderlich war [14].

Folgende Forderungen müssen erfüllt sein:

1. Die Schicht muß mechanisch stabil sein. Sie darf während der Chromatographie mit verdünnten Elektrolytlösungen nicht stark quellen. Beim Trocknen des Chromatogramms dürfen sich keine Risse bilden.
2. Mono-, Di- und Triphosphate der gleichen Nucleobase müssen sich ohne Gradientenelution mit 0,01 bis 0,03 N HCl an DEAE-Cellulose oder mit 0,02 bis 0,04 N HCl an ECTEOLA-Cellulose vollständig trennen lassen. An DEAE-Cellulose darf auch dann keine Schwanzbildung auftreten, wenn man die Schicht mit 1 μ Mol ADP oder ATP/Startfleck belädt. An ECTEOLA-Cellulose muß ein Gemisch aus je 10^{-2} μ Mol ADP und ATP mit 0,05 bis 0,07 N HCl nach 5 min vollständig getrennt sein.
3. CTP, ATP, GTP und UTP (je 10^{-2} μ Mol) müssen sich mit 0,03 bis 0,05 N HCl an DEAE-Cellulose oder mit 0,05 bis 0,07 N HCl an ECTEOLA-Cellulose trennen lassen. CTP und ATP brauchen nicht vollständig getrennt zu werden.
4. Cytosin- und Adenin-Derivate gleichen Typs müssen sich mit 0,05 bis 0,12 M NaCl-Lösung trennen lassen [*].
5. Der Austauscher darf kurzwelliges UV-Licht nicht nennenswert absorbieren. $5 \cdot 10^{-4}$ μ Mol ATP müssen an DEAE-Cellulose im Auflicht noch erkennbar sein.

Auch an Schichten aus nichtmodifizierter Cellulose, wie sie erstmals Teichert, Mutschler und Rochelmeyer [16] zur Dünnschicht-Chromatographie verwendeten, erzielt man gute Trennungen von Nucleobasen, Nucleosiden und Nucleotiden [4, 5]. Man kann hier die von der Papierchromatographie bekannten Laufmittel – unter Umständen geringfügig verändert – übernehmen. Die Vorteile der Dünnschicht-Chromatographie gegenüber der Papierchromatographie (z. B. kürzere Analysezeit, schärfere Substanzflecken) sind auch an nichtmodifizierter Cellulose zu beobachten.

[14] Zur Dünnschicht-Chromatographie geeignete DEAE- und ECTEOLA-Cellulose wird hergestellt und ist zu beziehen von der Firma Serva-Entwicklungsabor, Heidelberg. Weitere Ionenaustauscher für die Dünnschicht-Chromatographie sind in Vorbereitung. Neuerdings bringen Macherey und Nagel, Düren, ebenfalls Cellulose-Ionenaustauscher für die Dünnschicht-Chromatographie in den Handel. Wir haben mit diesen Präparaten keine Erfahrungen.

[*] Ein früher [3] genanntes Kriterium (Trennung von Mono-, Di- und Triphosphaten mit verdünnter Salzlösung an ECTEOLA-Cellulose) wird nicht aufrecht erhalten. Trennungen mit verdünnten Säuren sind hier überlegen.

Ergebnisse

1. Herstellung der Schicht und Chromatographie

10 g Cellulose-Austauscher [14] oder nichtmodifizierte Cellulose [15] wurden mit 60 bis 70 ml dest. Wasser 30 bis 45 sec in einem verschlossenen Erlenmeyerkolben sehr kräftig geschüttelt und die Suspension in üblicher Weise [17] auf Glasplatten ausgebreitet (Schichtdicke etwa 250 μ). Wenn man die Suspension in einem elektrischen Mixgerät herstellt, erhält man manchmal homogener erscheinende Schichten. Nach eigenen Erfahrungen ist jedoch das Schütteln ausreichend. 10 g Pulver ergeben 7–10 Platten (10–20 cm²). Die Schichten sind mechanisch am stabilsten, wenn man sie über Nacht bei Raumtemperatur trocknen lässt. Für ihre Aufbewahrung gelten die gleichen Regeln wie für die Aufbewahrung von Chromatographiepapier.

An Ionenaustauscher-Schichten chromatographiert man aufsteigend in offenen Gefäßen, die etwa 1,2 cm hoch mit dem Laufmittel gefüllt sind. Die Substanzen werden 3,0 cm vom unteren Plattenrand mit einer Mikropipette aufgetragen. Man kann die Chromatographie im kurzweligen UV-Licht (Auflicht) verfolgen. Eine Verdunkelung des Raumes ist im allgemeinen nicht erforderlich. Man trocknet die Platten im warmen Luftstrom. Die Chromatogramme lassen sich im UV-Licht (Auflicht) auf Cellophan durchzeichnen.

Zur Chromatographie an nichtmodifizierter Cellulose siehe [5].

2. Chromatographie an DEAE-Cellulose

Wie aus den Abb. 2 bis 4 hervorgeht, lassen sich Nucleotide auf DEAE-Celluloseschichten mit verdünnter Salzsäure gut trennen.

Die Wanderungsgeschwindigkeit der Verbindungen wird vor allem bestimmt

- a) durch die unterschiedliche negative Ladung von Mono-, Di- und Triphosphaten (Monophosphate wandern schneller als Diphosphate, diese schneller als Triphosphate);
- b) durch die unterschiedliche Ionisation der Basen (Abnahme der Wanderungsgeschwindigkeit in der Reihenfolge Cytosin- > Adenin- > Guanin- > Uracil-Derivate).

Die in Abb. 1 dargestellte Beziehung findet sich also im Dünnsschicht-Chromatogramm wieder.

Besonders bemerkenswert ist die Trennung der Diphosphate mit 0,02 bis 0,03 N HCl (Abb. 2 und 3) und der Triphosphate mit 0,04 N HCl (Abb. 4). Mit keiner anderen bisher bekannten Methode kann man unter ähnlich primitiven experimentellen Bedingungen in so kurzer Zeit gleichwertige Trennungen erzielen.

Die mit verdünnter Salzsäure nicht vollständig trennbaren [*] Adenin- und Cytosin-Derivate gleichen Typs können mit Kochsalzlösung (0,05 bis 0,12 M) getrennt werden. Die Flecke sind dann weniger scharf begrenzt

[15] Cellulosepulver MN 300 und MN 300 G, Fa. Machery und Nagel, Düren.

[16] K. Teichert, E. Mutschler u. H. Rochelmeyer, Dtsch. Apotheker-Ztg., 100, 283 (1960).

[17] E. Stahl, Chemiker-Ztg., 82, 323 (1958).

[*] Zwei überlappende Flecke erkennt man am besten im Durchlicht: UV-Lampe → Schicht → Glas → Schutzbrille → Auge.

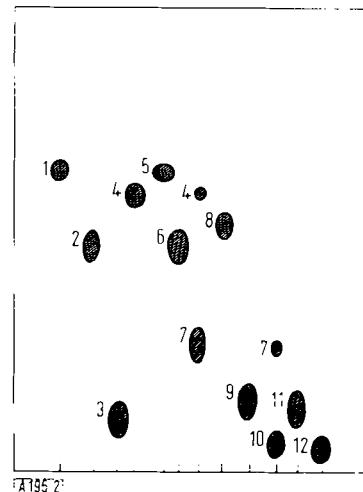


Abb. 2. Dünnsschicht-Chromatogramm von Nucleotiden (je 10⁻² μ Mol) auf DEAE-Cellulose. Laufmittel: 0,02 N HCl. Laufstrecke: 9,2 cm in 40 min.

1 = 5'-AMP. — 2 = ADP. — 3 = ATP. — 4 = 5'-GMP. — 5 = 5'-CMP. — 6 = 5'-UMP. — 7 = GDP. — 8 = CDP. — 9 = UDP. — 10 = GTP. — 11 = CTP. — 12 = UTP.

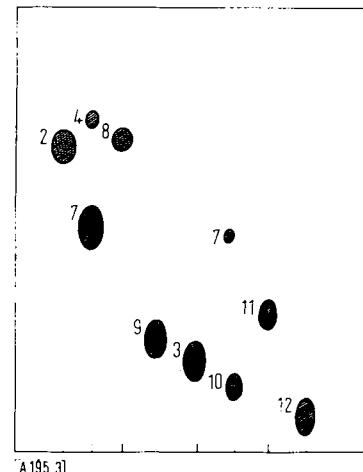


Abb. 3. Dünnsschicht-Chromatogramm von Nucleotiden (je 10⁻² μ Mol) auf DEAE-Cellulose. Laufmittel: 0,03 N HCl. Laufstrecke: 8,8 cm in 40 min. Numerierung siehe Legende zu Abb. 2

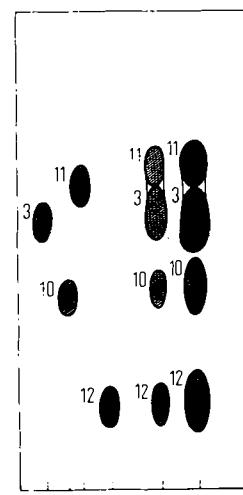


Abb. 4. Dünnsschicht-Chromatogramm von Nucleosid-triphosphaten (je 10⁻² μ Mol; Bahn rechts außen: je 5 · 10⁻² μ Mol) auf DEAE-Cellulose. Laufmittel: 0,04 N HCl. Laufstrecke: 12,8 cm in 100 min. Numerierung siehe Legende zu Abb. 2

als bei der Chromatographie mit verdünnter Säure. Alkalische Pufferlösungen ergeben keine gute Trennung der Mononukleotide.

Bei der Chromatographie von ATP mit 0,03 N HCl an DEAE-Cellulose liegt die untere Nachweisgrenze bei etwa $5 \cdot 10^{-4}$ μMol . Man beleuchtet die Schicht mit kurzwelligem (etwa 260 m μ) UV-Licht [*] in einem vollständig verdunkelten Raum. Beim Nachweis größerer Mengen ist eine Verdunkelung nicht erforderlich. Man hält die UV-Lampe so dicht über das Chromatogramm, daß ein Teil des Tageslichtes abgehalten wird. Adenin-, Cytosin- und Uracil-Verbindungen erscheinen als dunkelblaue, Guanin-Verbindungen als hellblau-fluoreszierende Flecke. Besonders leicht erkennt man Spuren GMP in GDP-Lösungen und Spuren GDP in GTP-Lösungen (vgl. Abb. 2 und 3).

DEAE-Cellulose eignet sich auch für Trennungen im mikropräparativen Maßstab. Das in Abb. 5 wiedergegebene Chromatogramm enthielt an den drei Startpunkten (von links nach rechts) etwa 0,8; 1,4 und 2 μMol eines Gemisches aus ADP und ATP (Molverhältnis 1:1). Die vollständige Trennung der beiden Komponenten gelingt mit 0,03 N HCl in 80 bis 100 min.

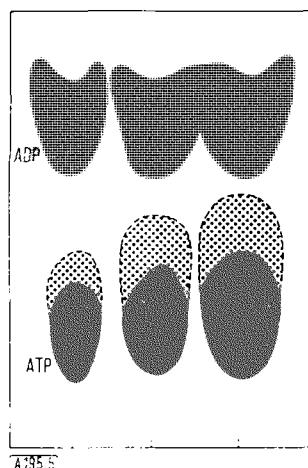


Abb. 5. Mikropräparatives Dünnsschicht-Chromatogramm von ADP und ATP auf DEAE-Cellulose. Laufmittel: 0,03 N HCl. Laufstrecke: 11,7 cm in 90 min. Aufgetragen wurden: links je 0,4 μMol , Mitte je 0,7 μMol , rechts je 1 μMol ADP und ATP. Ungefährre Fläche der Startflecke (UV-absorbierende Zonen) von links nach rechts: 1 · 1 cm 2 ; 1,5 · 1,5 cm 2 ; 2,5 · 1,5 cm 2 (Breite · Höhe). Die Front des ADP-Flecks liegt im Bereich einer im UV-Licht sichtbaren Zone, die man bei der Chromatographie mit verdünnter Säure häufig auf DEAE- und ECTEOLA-Celluloseschichten beobachtet. Ihre Wanderungsgeschwindigkeit steigt mit zunehmender Säurekonzentration. Die Trennungen werden hierdurch nicht beeinträchtigt.

Ein übliches Papierchromatogramm läßt sich nicht mit 1 μMol Nucleotid/Startfleck beladen. Eine Überschlagsrechnung zeigt, daß man im Dünnsschicht-Chromatogramm an 20 · 20 cm 2 DEAE-Cellulose etwa 2 mg ADP von 2 mg ATP trennen kann. Die Flecke können mit einem Skalpell abgekratzt und die Nucleotide beispielsweise mit 0,2 N HCl eluiert werden.

Analytische Mengen (10^{-2} μMol und weniger) ADP und ATP lassen sich in 7 bis 10 min vollständig trennen.

[*] Z. B. Mineralight-Lampe der Ultraviolet Products, Inc., San Gabriel, Calif., USA.

R_F -Werte zeigt Tabelle 1. Beachtenswert sind besonders die großen Unterschiede in den R_F -Werten der Di- und Triphosphate mit 0,02 N und 0,03 N HCl als Laufmittel.

Verbindung	Laufmittel			
	0,01 N HCl	0,02 N HCl	0,03 N HCl	0,04 N HCl
S'-AMP	0,45	0,65		
ADP	0,24	0,48	0,68	
ATP	0,06	0,11	0,20	0,56
S'-GMP	0,36	0,60	0,75	
GDP	0,09	0,27	0,51	
GTP	0,05	0,07	0,14	0,41
S'-CMP	0,46	0,65		
CDP	0,31	0,53		
CTP	0,09	0,13	0,31	0,64
S'-UMP	0,31	0,49		
UDP	0,07	0,15	0,25	
UTP	0,04	0,04	0,08	0,18

Tabelle 1. R_F -Werte von Nucleotiden an DEAE-Cellulose (Dünnsschicht-Chromatogramm; 10^{-2} $\mu\text{Mol}/\text{Startfleck}$)

3. Chromatographie an ECTEOLA-Cellulose

Auch an ECTEOLA-Celluloseschichten sind verdünnte Säuren für die Chromatographie von Mononukleotiden besser geeignet als neutrale Salzlösungen [3] oder alkalische Pufferlösungen. Die Unterschiede gegenüber der Chromatographie an DEAE-Cellulose sind verhältnismäßig gering. Eine Trennung der Triphosphate kann mit 0,06 N HCl in etwa 60 min erreicht werden. Das Chromatogramm entspricht dem Chromatogramm an DEAE-Cellulose (Abb. 4). Während CTP, GTP und UTP oder ATP, GTP und UTP vollständig getrennt werden, lassen sich CTP und ATP – wie an DEAE-Cellulose – nur teilweise trennen. Die vollständige Trennung gelingt mit verdünnter Kochsalzlösung [3], und dies gilt auch für die entsprechenden Di- und Monophosphate.

Die Laufstrecken der Nucleotide hängen bei der Chromatographie mit Salzsäure gemäß Abb. 1 von der Art der Nucleobase ab. Die für gleiche Laufstrecken benötigten Laufzeiten sind an ECTEOLA-Cellulose kürzer als an DEAE-Cellulose. Beispielsweise wird ein Gemisch aus je 10^{-2} μMol ADP und ATP an ECTEOLA-Cellulose mit 0,05 bis 0,07 N HCl in nur 4 bis 5 min vollständig getrennt. Mit keiner anderen Methode kann man in so kurzer Zeit diese chemisch äußerst ähnlichen Substanzen trennen. Die Papierchromatographie benötigt 15 bis 20 Stunden; auch eine elektrophoretische Trennung dauert mehrere Stunden.

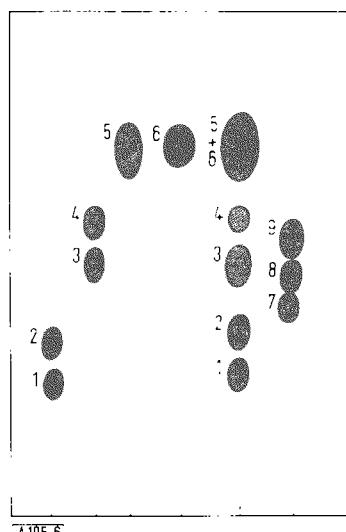
4. Chromatographie an nichtmodifizierter Cellulose

Da man bei der Dünnsschicht-Chromatographie an nichtmodifizierter Cellulose [15] im allgemeinen die gleichen Laufmittel verwenden kann wie in der Papierchromatographie, ist ein Vergleich der beiden Methoden [5] möglich. Unter gleichen Bedingungen sind die Flecke im Dünnsschicht-Chromatogramm wesentlich kleiner und schärfer begrenzt als auf dem Papier [5] (vgl. Abb. 6 und 7).

Ionenaustauscher-Schichten sind jedoch bei der Chromatographie der Nucleotide einfachen Celluloseschichten eindeutig überlegen.

Nucleobasen und Nucleoside lassen sich an Schichten aus nichtmodifizierter Cellulose wie in der Papier-

chromatographie [19] mit destilliertem Wasser oder verdünnten Salzlösungen trennen [4, 5]. Auch an DEAE- und ECTEOLA-Cellulose-Schichten gelingt die Trennung mit wässrigen Laufmitteln. Man beobachtet eine bemerkenswerte Übereinstimmung der R_F -Werte [3] von Verfahren zu Verfahren.

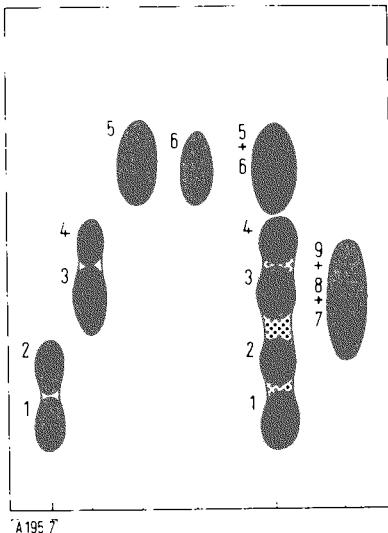


A 195. S.

Abb. 6. Dünnenschicht-Chromatogramm von Nucleotiden [5] auf Cellulose MN 300 G [15]. Laufmittel: gesättigte Ammoniumsulfatlösung / 1 M Natriumacetatlösung / Isopropanol 80:18:2 (v/v) [18]. Laufstrecke: 10 cm in etwa 90 min.

1 = 3'-AMP. — 2 = 2'-AMP. — 3 = 3'-GMP. — 4 = 2'-GMP. — 5 = 2'- und 3'-CMP. — 6 = 2'- und 3'-UMP. — 7 = 5'-AMP. — 8 = ADP. — 9 = ATP.

[18] R. Markham u. J. D. Smith, Biochem. J. 49, 401 (1951).



A 195. T

Abb. 7. Papierchromatogramm von Nucleotiden unter gleichen Bedingungen wie das Dünnenschicht-Chromatogramm der Abb. 6 [5]. Papier: 2043 b (Schleicher und Schüll). Laufstrecke: 10 cm in etwa 130 min. Numerierung siehe Legende zu Abb. 6

Prof. Dr. F. Cramer bin ich für sein Interesse und die großzügige Förderung dieser Arbeit zu großem Dank verpflichtet.

Eingegangen am 2. März 1962 [A 195]

[19] C. Tamm, H. S. Shapiro, R. Lipshitz u. E. Chargaff, J. biol. Chemistry 203, 673 (1953).

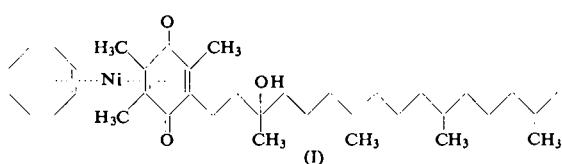
ZUSCHRIFTEN

Vitamin-E-Chinon-nickel(0)-cyclooctadien(1,5)

Von Dr. G. N. Schrauzer und Dipl.-Chem. H. Thyret [1]

Institut für Anorganische Chemie der Universität München

Im Rahmen unserer Arbeiten [2] fanden wir, daß Vitamin-E-chinon mit Nickelcarbonyl bei 70–80 °C in Gegenwart von überschüssigem Cyclooctadien(1,5) den Nickel(0)-„Sandwich“-Komplex I ergibt. Vitamin-E-chinon-Ni(0)-cyclooctadien (1,5) wurde als tiefrotes, bis 150 °C beständiges, hochviscoses Öl isoliert. Seine Struktur (I) folgt eindeutig aus der Analyse und den IR-, UV- und ^1H -NMR-Spektren. So verschiebt sich die C=O-Bande des Tocochinons bei



der Komplexbildung um 114 cm^{-1} von 1647 cm^{-1} nach 1533 cm^{-1} und es treten für das symmetrisch π -komplexgebundene Cyclooctadien(1,5) charakteristische Banden bei 779, 824 und 860 cm^{-1} auf. Das UV-Spektrum ist dem des Cyclooctadien(1,5)-Ni(0)-durochinons sehr ähnlich. Im Protonenresonanz-Spektrum liegt das Signal der vier olefinischen Protonen des π -gebundenen Cyclooctadiens bei $\tau = 2,28$, während das der aliphatischen Protonen des Diens bei $\tau = 1,90$ (40 mHz) auftritt. Der übrige Teil des NMR-Spektrums ist dem des d,L- α -Tocochinons sehr ähnlich. Die längere Zeit luftstabile Verbindung ist in Benzol, halogenierten Kohlenwas-

serstoffen, Alkoholen, Äthern und in Aceton löslich und in Wasser unlöslich. Es handelt sich um den ersten definierten π -Komplex eines Übergangsmetalls mit einem Naturstoff, der z. B. im Hinblick auf die mögliche Cancerogenität des Nickels interessante physiologische Untersuchungen verspricht.

Eingegangen am 21. Mai 1962 [Z 289]

[1] 4. Mitteilung über Komplexe vom Typ des Bis-durochinon-nickel(0); 3. Mitt.: G. N. Schrauzer u. H. Thyret, Z. Naturforsch. 17b, 73 (1962).

[2] G. N. Schrauzer u. H. Thyret, J. Amer. chem. Soc. 82, 6420 (1960); Z. Naturforsch. 16b, 353 (1961). — Bei der Reaktion von d,L- α -Tocochinon mit Nickelcarbonyl entstehen paramagnetische, salzartige, unlösliche Verbindungen, in denen das Nickel ähnlich wie im Reaktionsprodukt von p-Benzochinon mit Nickelcarbonyl zweiwertig ist.

Explosion durch Tropylium-perchlorat

Von Dr. P. G. Ferrini und PD. Dr. A. Marxer

Forschungslaboratorien der CIBA Aktiengesellschaft, Basel
Pharmazeutische Abteilung

Bei einer schweren Explosion von Tropylium-perchlorat wurden ein Chemiker schwer und ein Laborant lebensgefährlich verletzt. Tropylium-perchlorat ist in der Literatur wiederholt beschrieben worden und wird oft als Ausgangsmaterial zu Synthesen herangezogen. Nach dem normalen Verlauf von Reaktionen im 0,1 Mol-Ansatz wurden größere Mengen (80 g) durch einen Pulvertrichter in einen Rundkolben abgefüllt. Die im Pulvertrichter aufgehäufte Substanz sollte mit