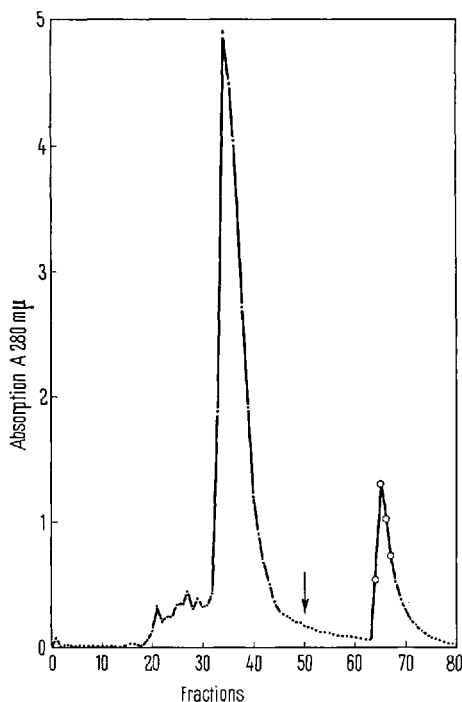


quatre animaux sur quatre, et si aucun taux individuel de créatinurie n'atteint 1 mg/100 g/24 h. On définit comme une unité cobaye (uc.) la quantité d'extrait qui dans cette épreuve suffit pour supprimer l'effet de 1 μ g de thyroxine. Pour la justification de ces conditions voir ³.



Chromatographie sur colonne d'hydroxyapatite (2×25 cm) d'un extrait de thymus^{1,2}. L'expérience a été faite à 22° et des fractions de 4,8 ml ont été collectées. Le produit a été chargé sur la colonne équilibrée avec du tampon phosphate pH 6,8, 0,001 M. Du tampon phosphate pH 6,8 0,5 M a été chargé sur la colonne en correspondance de la fraction zéro. La flèche indique la fraction en correspondance de laquelle le gradient linéaire de molarité de tampon phosphate pH 6,8 (0,5–1,5 M; 250 + 250 ml) a été mis en œuvre. Les fractions centrales du deuxième pic (points encadrés) ont été utilisées pour les mesures d'activité biologique.

Après de nombreux essais préliminaires, on a adopté pour la purification chromatographique de l'extrait de thymus le procédé suivant. (1) L'extrait de départ (1 g) dont l'activité est égale à 190 uc./mg est dissous à 10% dans l'eau distillée et passé sur une colonne de Séphadex G 25 équilibrée avec du tampon phosphate 0,001 M pH 6,8. On sépare une fraction principale qui a une activité supérieure d'environ 10% à celle du produit de départ, d'une petite fraction retardée par la colonne, biologiquement inactive, et dont l'absorption à 260 m μ est plus élevée que celle à 280 m μ . (2) La fraction principale est chargée sur une colonne d'hydroxyapatite équilibrée avec du tampon phosphate 0,001 M, pH 6,8. Une certaine quantité de produit n'est pas retenue sur la colonne dans ces conditions. Une grande quantité de matériel inactif est éluée ensuite par le tampon phosphate 0,5 M, pH 6,8. Enfin on élue une fraction active avec un gradient de molarité (0,5 à 1,5 M) de tampon phosphate, pH 6,8 (Figure). Les fractions centrales du pic sont passées séparément sur Séphadex G 25 équilibré avec tampon phosphate 0,001 M pH 6,8 et lyophilisées. Le rapport activité biologique/densité optique à 280 m μ est le même pour les quatre fractions. L'activité biologique est de 926 uc./mg. Des résultats préliminaires obtenus avec ce produit purifié indiquent qu'il s'agit d'un glycopeptide.

Il est important de signaler que le produit purifié montre toutes les propriétés substitutives du thymus qui sont possédées par l'extrait de départ⁵.

Summary. A chromatographic purification procedure is described for a biologically active thymus extract. The purified product shows all the thymus-substituting properties of the initial extract.

G. BERNARDI et J. COMSA

Centre de Recherches sur les Macromolécules, Strasbourg (France) et Faculté de Médecine, Université de la Sarre, Homburg (Allemagne), le 2 février 1965.

⁵ J. COMSA, en préparation.

Eine einfache Methode zur Abtrennung von Nucleotiden aus salzreichen Lösungen

Die chromatographische Trennung von Nucleotiden an Ionenaustauschern¹ ist oft nur dann erfolgreich, wenn der pH des Gradienten in den pK_B-Bereich der Aminogruppen der Nucleobasen fällt und das Salz des Gradienten möglichst dissoziiert ist. Gute Resultate wurden mit LiCl/HCl-Gradienten an Dowex-2 bei der Trennung von AMP², ADP und ATP³ und mit LiCl/Li-acetat-Gradienten bei der Trennung der Desoxyribooligoadenylsäuren an DEAE-Cellulose (in der Chloridform) erhalten⁴.

Die Wirksamkeit dieser Methode war bislang dadurch eingeschränkt, dass das Nucleotidmaterial von den gleichzeitig anfallenden erheblichen Mengen an anorganischem Salz nur zeitraubend und oft unter grossen Verlusten mit Hilfe der Absorption an Aktivkohle⁵ oder Umfällen der

Nucleotid-Lithiumsalze aus Methanol mit Aceton³ getrennt werden konnte.

¹ W. E. COHN, *The Nucleic Acids*, vol. I, Kapitel 6.

² Abkürzungen: AMP = Adenosin-5'-phosphat; ADP = Adenosin-5'-diphosphat; ATP = Adenosin-5'-triphosphat; TpT = Thymidyl-(3'-5')-thymidin; (pT)₅ = 5'-O-Phosphoryl-thymidyl-(3'-5')-thymidyl-(3'-5')-thymidyl-(3'-5')-thymidin etc. – Näheres über das System der abgekürzten Formelwiedergabe siehe H. G. KHORANA, *Some Recent Developments in the Chemistry of Phosphate of Biological Interest* (John Wiley & Sons, Inc., New York 1961), Kapitel 5.

³ M. SMITH und H. G. KHORANA, *J. Am. chem. Soc.* 80, 1141 (1958).

⁴ R. K. RALPH und H. G. KHORANA, *J. Am. chem. Soc.* 83, 2926 (1961).

⁵ D. LIPKIN, P. T. TALBERT und M. COHN, *J. Am. chem. Soc.* 76, 2871 (1954).

Bei unseren Versuchen zur Darstellung und Trennung von Desoxyribooligonucleotiden der allgemeinen Form $(pT)_n$ $(pdA)_m$ ⁶ fanden wir nun eine sehr einfache Methode, das Nucleotidmaterial auch in Gegenwart grosser Chloridmengen (Verhältnis 1:5000) schnell und schonend abzutrennen. Das Verfahren besteht darin, dass Mono- und Oligonucleotide zusammen mit Metallionen auch aus verdünnten Lösungen nahezu quantitativ ausgefällt werden. Als Voraussetzung für eine allgemeine Anwendung der Methode sahen wir folgende Bedingungen als gegeben an: (1) Das Nucleotidmaterial sollte durch Metallionen möglichst quantitativ gefällt werden, nicht aber das anorganische Salz. (2) Der Niederschlag sollte sich in möglichst schwach alkalischen Milieu wieder auflösen (Säurebehandlung würde Abspaltung des Adenins aus $(pT)_n$ $(pA)_m$ bewirken). (3) Das Metallion selbst darf keine UV-Absorption haben. (4) Die Methode sollte wenig Aufwand und Zeit erfordern und unter so milden Bedingungen durchführbar sein, dass sie auch in der Ribonucleotidreihe ohne Gefahr der Isomerisierung angewendet werden kann.

Fe^{+3} , Al^{+3} und Ce^{+4} -Ionen sind wegen ihrer UV-Absorption und wegen der Schwerlöslichkeit der entstehenden Niederschläge ungeeignet. In dem Zn^{+2} -Ion fanden wir dann das Metallion, dass den gestellten Bedingungen am besten genügte. Durch Zusatz von Zinksulfatlösung zu einer salzhaltigen wässrigen Nucleotidlösung und vorsichtiges Einstellen des pH-Wertes auf 7–8 mit verdünntem Ammoniak fällt Zinkhydroxyd mit dem an Zink gebundenen Nucleotiden aus. Im folgenden sei das Trennprinzip am Beispiel der Abtrennung von Thymidin-5'-phosphat von einem grösseren Chloridüberschuss beschrieben: 5 ml einer wässrigen Lösung von Thymidin-5'-phosphat (Konzentration 0,5 [OD]-Einheiten/ml = 0,02 mg/ml) wurden mit 100 mg LiCl versetzt. Nach Zugabe von 0,05 ml 1.84 M $ZnSO_4$ wurde durch Hinzufügen von 0,1 ml 5%igem Ammoniak der pH auf 7–8 gebracht. Der ausgefallene Niederschlag enthielt das Nucleotidmaterial. Er wurde auf einer Glassinterfritte (G 4) gesammelt, mit wenig Wasser gewaschen, in wenig wässrigem Ammoniak gelöst (Bildung löslicher Zink-Ammin-Komplexe) und zur Entfernung der Zn^{+2} -Ionen mit soviel Ionenaustauscher in Pyridinform (z. B. Merck I) versetzt, bis der pH-Wert der Lösung auf 7 absank. Nach

Abtrennung des Austauschers durch Filtration liegt das Pyridiniumsalz des Thymidin-5'-phosphates in reiner Form vor. Die spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung ergab, dass 94% des eingesetzten Thymidin-5'-phosphates wieder gewonnen wurden. Papierchromatographie und Elektrophorese zeigten keinerlei Salzeffekte mehr. Die Titration nach Mohr zeigte, dass fast keine Chloridionen mitgefällt worden sind. Versuche der Entsalzung bei ähnlichen Konzentrationsverhältnissen mit DEAE-Cellulose (in Carbonatform), mit Sephadex G-25 oder durch Absorption an mit Säure behandelter Aktivkohle waren alle unbefriedigend verlaufen. Auch Ersatz des LiCl-Gradienten durch einen Triäthylammoniumacetat-Gradienten bei der Auftrennung der $(pT)_n$ $(pdA)_m$ Glieder an DEAE-Cellulose war wegen der bevorzugten Hydrolyse dieses Salzes fehlgeschlagen.

Wurde die obige Methode auf AMP, dA5'-p, TpT⁷, TpTpT, $(pT)_5$ ⁶ und $(pT)_n$ $(pdA)_m$ angewendet, so konnten ähnliche Resultate erzielt werden wie mit Thymidin-5'-phosphat. In einigen Fällen wurde die Zinkhydroxydfällung wiederholt. Nicht gefällt wurden Nucleoside, ein erster Hinweis darauf, dass es sich nicht um ein unspezifisches Mitfällen von Nucleotidmaterial mit Zinkhydroxyd handeln dürfte, sondern eher um eine Bindung des Zinkkations an das primäre und sekundäre Phosphatanion.

Summary. Coprecipitation of mono-, oligo- and polynucleotides with zinc hydroxide, under weakly alkaline conditions, proved to be a simple and efficient method for separating nucleotide material from large quantities of inorganic salt, e.g. NaCl.

K. DANECK, G. WEIMANN,
und F. CRAMER

*Chemische Abteilung der Medizinischen
Forschungsanstalt der Max-Planck-Gesellschaft,
Göttingen (Deutschland), 22. Februar 1965.*

⁶ K. DANECK, G. WEIMANN und F. CRAMER, unveröffentlicht.

⁷ F. CRAMER, R. WITTMANN, K. DANECK und G. WEIMANN, *Angew. Chem.* 75, 92 (1963).

A New Convenient Method for the Synthesis of tert.-Butyloxycarbonylhydrazine

In recent years the tert.-butyloxycarbonyl (BOC) group has found wide use for blocking the amino group in the synthesis of peptides. Its merits are high selectivity and ease of removal by acidolysis (CF_3COOH or $HCl(HBr)$ in an inert solvent), and at the same time resistance to hydrogenolysis, alkaline splitting, hydrazinolysis, etc., as well as absence of appreciable racemization¹.

Unfortunately, up to now BOC-amino acids are very difficult to obtain and are costly compounds. This is due to the fact that tert.-butyloxycarbonyl chloride^{2,3} is too unstable for use in the synthesis of BOC-amino acids^{4,5} and the latter are usually prepared in other ways^{4–7}. The most universal and widely employed reagent for the preparation of BOC-amino acids is tert.-butyloxycarbonyl azide^{8–10}, which readily reacts with both the free amino

acids and their esters^{7,11}. This reagent can be prepared very easily and in good yield⁸ from the stable tert.-butyloxycarbonylhydrazine (tert.-butylcarbazate $(CH_3)_3COCONHNH_2$), which could have served as a key intermediate in the synthesis of BOC-amino acids were it not very difficult to obtain. Heretofore, two methods have been described for the synthesis of tert.-butylcarbazate. According to one of them⁸ sodium tert.-butylate is treated with COS, the resulting sodium salt is converted to methyl ester and finally to hydrazide.

A recently proposed modification¹² of this method, however, still requires costly reagents which are difficult to obtain, so that in practice preference is given to another, three-stage method for the synthesis of tert.-butylcarbazate^{8–10,13}. First, from sodium phenolate (or still better *p*-nitrophenolate) and phosgene is obtained the *p*-nitrophenylchlorocarbonate, which by treatment with tert.-butanol in pyridine is transformed into tert.-butyl