

Bei unseren Versuchen zur Darstellung und Trennung von Desoxyribonucleotiden der allgemeinen Form $(pT)_n (pdA)_m$ 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 $(pT)_n (pdA)_m$ 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 genügt. 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 Chlorid-Überschuss 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 behandelte 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 yield⁹ 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

p-nitrophenylcarbonate, hydrazinolysis of which leads to the desired carbazate. The overall yield here is less than 30%.

In a search for a more convenient method of preparing tert.-butyloxycarbonylhydrazine, we investigated the possibility of its synthesis directly by hydrazinolysis of tert.-butyloxycarbonyl chloride, which can be obtained in 33% yield from phosgene and potassium tert.-butylate³. It proved feasible not to isolate the chloride in the pure form, but after removal of excess phosgene to treat it directly with hydrazine, thus allowing the reaction to be carried out in a single stage. It was, moreover, found possible to use not only potassium tert.-butylate but also the crystal solvate of the composition $C_4H_9OK \cdot C_4H_9OH$, readily prepared by dissolving metallic potassium in tert.-butyl alcohol followed by distillation of the excess tert.-butanol and drying the residue to constant weight at 100° (10 mm). Although the overall yield is not high (about 30%), the simplicity and rapidity of the method (6–8 h), and the low cost and availability of the starting materials make it preferable to the earlier methods.

tert.-Butylcarbazate. To a solution of 495 g (5 moles) of phosgene in 1 l of dry ether is added portionwise, with vigorous stirring and cooling to –60°, crystal solvate $tert.-C_4H_9OK \cdot tert.-C_4H_9OH$ prepared as described above from 78 g (2 moles) of metallic potassium. The mixture is stirred for 3 h at –30° and the ether and excess phosgene are distilled off at temperatures not exceeding 0°. The residue is suspended in 500 ml of ether and is added to a mixture of 300 g (6 moles) of anhydrous hydrazine and 1.5 l of dry ether on stirring (30 min, –60°). The cooling bath is removed and the reaction mixture is warmed with continued stirring until room temperature is reached, following which it is washed with water

(1 × 600 ml, 2 × 100 ml). The ether solution is dried over $MgSO_4$ and evaporated. After distillation of the residue in vacuum 85 g (32%) of tert.-butylcarbazate is obtained, b.p. 120–122° (15 mm), m.p. 41–42°.

Zusammenfassung. Es wird eine neue einfache Methode für die Darstellung von tert.-Butylcarbazate beschrieben.

YU. A. OVCHINNIKOV, A. A. KIRYUSHKIN,
and A. I. MIROSHNIKOV

*Institute for Chemistry of Natural Products,
USSR Academy of Sciences, Moscow (USSR),
January 25, 1965.*

- ¹ R. A. BOISSONNAS, *Advances in Organic Chemistry: Methods and Results* (J. Wiley, 1963), vol. 3, p. 159.
- ² A. R. CHOPPIN and J. W. ROGERS, *J. Am. chem. Soc.* **70**, 2967 (1948).
- ³ C. J. MICHIEJDA and D. S. TARBELL, *J. org. Chem.* **29**, 1168 (1964).
- ⁴ G. W. ANDERSON and A. C. MCGREGOR, *J. Am. chem. Soc.* **79**, 6180 (1957).
- ⁵ F. C. MCKAY and N. F. ALBERTSON, *J. Am. chem. Soc.* **79**, 4686 (1957).
- ⁶ ST. GUTTMANN and R. A. BOISSONNAS, *Helv. chim. Acta* **41**, 1852 (1958).
- ⁷ R. SCHWYZER, P. SIEBER, and H. KAPPELER, *Helv. chim. Acta* **42**, 2692 (1959).
- ⁸ L. A. CARPINO, *J. Am. chem. Soc.* **82**, 2725 (1960).
- ⁹ L. A. CARPINO, *J. Am. chem. Soc.* **79**, 4427 (1957).
- ¹⁰ L. A. CARPINO, C. A. GIZA, and B. A. CARPINO, *J. Am. chem. Soc.* **81**, 955 (1959).
- ¹¹ G. W. ANDERSON, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **88**, 676 (1960).
- ¹² L. A. CARPINO, *J. org. Chem.* **28**, 1909 (1963).
- ¹³ L. A. CARPINO, *J. Am. chem. Soc.* **79**, 98 (1957).

Separation of Rabbit Marrow Myeloid Cells¹

The study of the biochemical features of the myeloid cells of normal marrow may contribute to the understanding of the biochemistry of the white cells. The methods of separation of these cells recently described by ARCHDEACON et al.² are unsatisfactory for biochemical investigations. We report a rapid (40 min) procedure for separating rabbit marrow myeloid cells. This procedure is similar to the methods used in this laboratory for isolating granulocytes³ and lymphocytes⁴.

Bone marrow obtained from the femurs of one rabbit was suspended in Tyrode's solution (saturated with a 95% O_2 and 5% CO_2 gas mixture) and 30 ml were poured through a gauze in a 120 ml siliconized tube. In order to eliminate the erythroid cells, the tube was filled through the gauze with 90 ml of a 0.83% NH_4Cl solution. After a few minutes the marrow cells were centrifuged at 120 g for 10 min in a refrigerated centrifuge at 4°C. The supernatant was filtered again through the same gauze into another tube and centrifuged at 120 g for 10 min. Both sediments were suspended and washed twice in 10 ml of Tyrode's solution.

The myeloid cells were not clumped and could therefore be counted easily; the recovery, however, is not determinable. The cells are viable and if elimination of mature granulocytes is required this could be done by the

method previously published⁴. These preparations are virtually free from erythroid cells and platelets.

Riassunto. Viene descritto un metodo per la separazione delle cellule mieloidi dal midollo osseo di coniglio. Questo metodo ha il vantaggio di essere molto rapido e consente di ottenere preparazioni di cellule mieloidi non ammassate, vitali e prive di elementi eritroidi e di piastrine.

A. AGOSTONI, G. IDÉO,
M. SCHWEIZER, and M. C. TONAZZI

*Istituto di Clinica Medica Generale e di Terapia Medica
della Università di Milano (Italy), February 17, 1965.*

- ¹ This study was aided by a grant from the Lady Tata Memorial Trust.
- ² J. W. ARCHDEACON, G. W. GLAZEBROOK, and W. C. WISE, *Nature* **204**, 996 (1964).
- ³ N. DIOGUARDI, A. AGOSTONI, G. FIORELLI, and B. LOMANTO, *J. lab. clin. Med.* **61**, 713 (1963).
- ⁴ A. AGOSTONI and G. IDÉO, *Exper.* **21**, 82 (1965).