

Dünnschichtchromatographie an Ionenaustauscher-Schichten

Trennung von Nucleinsäure-Derivaten

Von Dr. K. RANDEATH

Institut für Organische Chemie der T.H. Darmstadt

Cellulose-Ionenaustauscher lassen sich in der Dünnschichtchromatographie verwenden. Es wird über die Trennung von Nucleinsäure-Derivaten an Schichten aus dem Anionenaustauscher Ecteola-Cellulose berichtet. Vorteile dieses Verfahrens sind die Schnelligkeit und die Trennbarkeit geringer Mengen ähnlicher Verbindungen unter sehr schonenden Bedingungen.

Einleitung

Die Chromatographie von Nucleotiden an Ionenaustauscher-Säulen¹⁾ hat im Laufe des letzten Jahrzehnts in der Biochemie größte Bedeutung gewonnen. Die Methode dürfte allen anderen Verfahren zur präparativen Trennung dieser chemisch oft nicht unterscheidbaren Verbindungen überlegen sein. Die Einführung der Cellulose-Ionenaustauscher²⁾ stellte einen bedeutenden Fortschritt auf diesem Gebiet dar, da an diesen auch hochmolekulare Verbindungen (Proteine, Nucleinsäuren) chromatographiert werden können. Zur Chromatographie von Nucleinsäuren wurde vor allem Ecteola-Cellulose³⁾ vielfach angewandt⁴⁻⁶⁾.

Wir konnten feststellen, daß säulenchromatographisch verwendete Cellulose-Ionenaustauscher sich unter bestimmten Bedingungen auch zur Dünnschichtchromatographie eignen⁷⁾. Im folgenden sei über Ergebnisse der Chromatographie von Nucleinsäure-Derivaten an Ecteola-Schichten berichtet.

Die Trennung von Nucleotiden an den in der Dünnschichtchromatographie bisher gebräuchlichen anorganischen Schichten⁸⁾ (aus Kieselgel G oder Aluminiumoxyd G⁹⁾) ist grundsätzlich möglich⁷⁾. Da diese eine starke Eigenabsorption für UV-Licht im Wellenlängenbereich von 250–260 m μ besitzen, wird jedoch der in der Papierchromatographie allgemein übliche Nachweis der Purin- und Pyrimidin-Verbindungen durch Betrachten mit einer UV-Lampe gestört. Einen weiteren Nachteil erblicken wir in dem Gipsgehalt der Schichten. Nach bisherigen Erfahrungen sind vorwiegend alkalische (ammoniakalische) Laufmittel zur Trennung von Nucleotiden an den anorganischen Trennschichten geeignet. Durch die unter diesen Bedingungen gebildeten Calcium-Komplexe der Nucleosid-*poly*-phosphate wird die Chromatographie erheblich beeinträchtigt. Ein Zusatz großer Mengen von Komplexbildnern zum Laufmittel (15 g Äthylendiamin-tetraessigsäure auf 200 ml) verbessert die Trennungen.

Da die Ergebnisse unserer Versuche, Nucleotide an anorganischen Schichten zu chromatographieren, uns im ganzen wenig befriedigten, haben wir nach anderen Methoden gesucht. Wir prüften neben Cellulose-Ionenaustauschern auch nicht modifizierte Cellulose auf ihre Verwendbarkeit in der Dünnschichtchromatographie. An dieser lassen sich,

wie unabhängig von uns auch H. Struck¹⁰⁾ fand, Nucleobasen und Nucleoside, ähnlich wie in der Papierchromatographie¹¹⁾, mit Wasser als Laufmittel und Nucleotide mit schwach sauren Gemischen trennen¹²⁾. Nach unseren bisherigen Erfahrungen ist jedoch die Kombination von Verteilungschromatographischen und Ionenaustauscher-Eigenschaften im Falle der Ecteola-Schichten ein entscheidender Vorteil im Vergleich zu den Schichten aus unveränderter Cellulose.

Ergebnisse und Diskussion

Die bisher üblichen Ionenaustauscher sind zur Verwendung in der Säulenchromatographie bestimmt. Sie sind in dieser Form nicht für die Dünnschichtchromatographie geeignet. Im Handel erhältliche [®]Ecteola-Cellulose läßt sich beispielsweise erst nach Zerstörung ihrer Faserstruktur¹³⁾ auf Glasplatten auftragen. Ecteola-Cellulosen verschiedener Herkunft zeigen außerdem weitgehend verschiedene dünnschichtchromatographische Eigenschaften. Wir möchten deshalb einige wesentlich erscheinende Kriterien für die Brauchbarkeit des Austauschers in der Dünnschichtchromatographie nennen.

1. Der Austauscher muß eine definierte durchschnittliche Korngröße besitzen. Nur in diesem Fall erhält man reproduzierbare Ergebnisse.
2. Er sollte während der Chromatographie nicht stark quellen, da dies zu teilweiser Ablösung der Schicht während der Chromatographie und zu Rißbildung nach dem Trocknen des Chromatogramms führen kann.
3. Mit verdünnten Salzlösungen sollten ohne Anwendung eines Gradienten Nucleosid-mono-, -di- und -triphosphate der gleichen Nucleobase, z. B. Adenosin-5'-mono-, -di- und -triphosphat, an der Schicht innerhalb von 15 Minuten vollständig trennbar sein.
4. Mit verdünnten Säuren sollten Adenin- von Guanin-Verbindungen und Uracil- von Cytosin-Verbindungen gleichen Typs getrennt werden.

Nach unseren bisherigen Erfahrungen erfüllen Ecteola-Cellulosen der Fa. Serva¹⁴⁾ die Kriterien 2), 3) und 4) am besten. Eine definierte Korngröße (Kriterium 1)) haben wir durch Zermahlen des Austauschers in einer Kugelmühle unter Standardbedingungen erzielt¹⁵⁾. Besonders eingehend haben wir zwei Ecteola-Cellulosen der Fa. Serva

¹⁾ W. E. Cohn, J. Amer. chem. Soc. 72, 1471 [1950].

²⁾ E. A. Peterson u. H. A. Sober, ebenda 78, 751 [1956].

³⁾ A. Bendich, J. R. Fresco, H. S. Rosenkranz u. S. M. Belser, ebenda 77, 3671 [1955].

⁴⁾ A. Bendich, H. B. Pahl, G. C. Korngold, H. S. Rosenkranz u. J. R. Fresco, ebenda 80, 3949 [1958].

⁵⁾ D. F. Bradley u. A. Rich, ebenda 78, 5898 [1956].

⁶⁾ G. M. Tener, H. G. Khorana, R. Markham u. E. H. Pol, ebenda 80, 6223 [1958].

⁷⁾ K. Randerath, Angew. Chem. 73, 436 [1961].

⁸⁾ E. Stahl, Chemiker-Ztg. 82, 323 [1958].

⁹⁾ Fa. Merck, Darmstadt.

¹⁰⁾ H. Struck, persönliche Mitteilung.

¹¹⁾ C. Tamm, H. S. Shapiro, R. Lipshitz u. E. Chargaff, J. biol. Chem. 203, 673 [1953].

¹²⁾ K. Randerath u. H. Struck, J. Chromatogr., im Druck.

¹³⁾ Vgl. Katalog „Cellulose-Ionenaustauscher“ der Fa. Serva, Entwicklungslabor, Heidelberg 1961.

¹⁴⁾ Serva, Entwicklungslabor, Heidelberg.

¹⁵⁾ Ecteola-Cellulosen, die diesen Forderungen entsprechen, sowie andere standardisierte Ionenaustauscher für Dünnschichtchromatographie werden demnächst bei der Fa. Serva erhältlich sein.

untersucht. Während die eine (Kapazität 0,41 mÄq N/g) die oben aufgestellten Kriterien vollkommen erfüllte, ließen sich an der anderen (Kapazität 0,26 mÄq N/g) Nucleosid-di- und -triphosphate der gleichen Nucleobase mit verdünnter Kochsalzlösung nicht vollständig trennen (vgl. Kriterium 3).

Wie Abb. 1 zeigt, ist die Kombination von Ionenaustauscher-Eigenschaften und verteilungschromatographischen Eigenschaften ein Hauptmerkmal der Ecteola-Schicht. Während die R_F -Werte von Nucleotiden (im Beispiel Adenosin-5'-monophosphat und Adenosin-diphosphat) eine

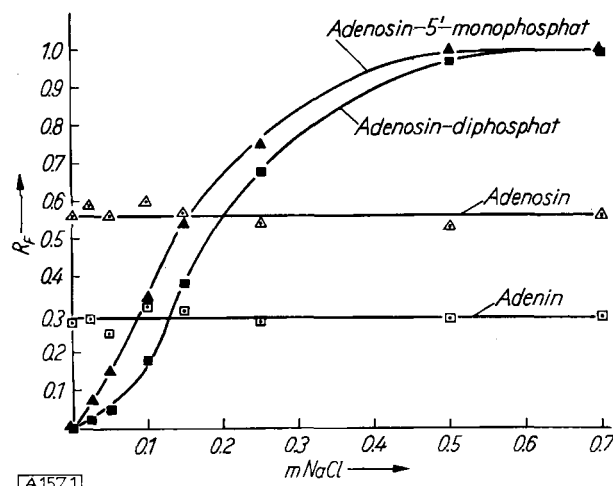


Abb. 1. R_F -Werte von Adenin, Adenosin, Adenosin-5'-monophosphat und Adenosin-diphosphat als Funktion der Kochsalzkonzentration des Elutionsmittels. Ecteola-Cellulose, Kapazität 0,26 mÄq N/g. Laufstrecke etwa 10 cm, Laufzeit 15 min

stetige Funktion der Chloridionen-Konzentration des Laufmittels zwischen $R_F = 0$ und $R_F = 1$ darstellen, sind die R_F -Werte von Nucleobasen und Nucleosiden (im Beispiel Adenin und Adenosin) von der Kochsalzkonzentration unabhängig. Hieraus ergibt sich beispielsweise, daß man an der Ecteola-Schicht Nucleobasen und Nucleoside von Nucleotiden quantitativ durch eine Vorchromatographie mit destilliertem Wasser trennen kann, bevor man eine Trennung der Nucleotide mit verdünnten Salz- oder Säurelösungen durchführt. Wie im Falle der Ionenaustauscherpapiere¹⁰⁾ kann man auch zweidimensional chromatographieren: in der einen Richtung Verteilungschromatographie, in der anderen Ionenaustauscher-Chromatographie.

Vergleicht man die verteilungschromatographischen Eigenschaften von Ecteola-Schicht, Cellulose-Schicht¹²⁾ und Chromatographiepapier miteinander (Tabelle 1), so stellt man eine bemerkenswerte weitgehende Übereinstimmung der R_F -Werte fest, während die Kieselgel-G-Schicht ein abweichendes Verhalten zeigt.

Substanz	Ecteola-Schicht*)	Cellulose-Schicht ¹²⁾	Papier**)	Kieselgel-G-Schicht
Adenin	0,29	0,30	0,38	0,57
Adenosin	0,56	0,53	0,56	0,75
Guanin	0,33	0,37	0,38	0,66
Guanosin	0,50	0,58	0,57	0,80
Hypoxanthin	0,46	0,55	0,57	0,74
Inosin	0,61	0,70	0,73	0,82
Uracil	0,73	0,72	0,75	0,78
Uridin	0,84	0,81	0,84	0,85
Cytidin	0,82	0,80	0,77	0,76

Tabelle 1. Dünnschichtchromatographische und papierchromatographische R_F -Werte von Nucleobasen und Nucleosiden. Laufmittel: dest. Wasser

*) Ecteola, Kapazität 0,26 mÄq N/g.

**) Ederol 202 (Fa. Binzer, Hatzfeld/Eder).

¹⁰⁾ C. S. Knight, Nature [London] 183, 165 [1959].

Abb. 2 und Abb. 3 veranschaulichen zwei Ecteola-Dünnschichtchromatogramme; aus Tabelle 2 sind R_F -Werte von Nucleotiden (Mittelwerte aus mehreren Bestimmungen) ersichtlich. Während bei Verwendung von verdünnter Koch-

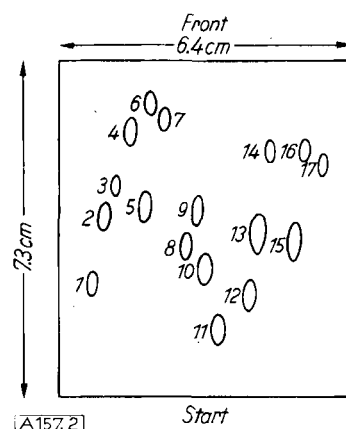


Abb. 2. Chromatogramm von Nucleobasen, Nucleosiden und Nucleotiden. Ecteola-Schicht. Kapazität des Austauschers 0,41 mÄq N/g. Elutionsmittel 0,15 m NaCl. Laufzeit 15 min. 1 = Adenin; 2 = Adenosin; 3 = Hypoxanthin; 4 = Inosin; 5 = Guanosin; 6 = Uridin; 7 = Cytidin; 8 = Adenosin-3'-monophosphat; 9 = Adenosin-5'-monophosphat; 10 = Adenosin-diphosphat; 11 = Adenosin-triphosphat; 12 = P^1 -[Adenosyl-(5')]- P^2 -phenyl-pyrophosphat; 13 = P^1 -[Adenosyl-(5')]- P^2 -methyl-pyrophosphat; 14 = Inosin-5'-monophosphat; 15 = Guanosin-3'-monophosphat; 16 = Uridin-3'-monophosphat; 17 = Cytidin-3'-monophosphat

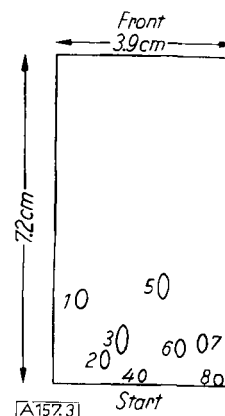


Abb. 3. Chromatogramm von Nucleotiden. Ecteola-Schicht. Kapazität des Austauschers 0,41 mÄq N/g. Elutionsmittel 0,01 n HCl. Laufzeit 15 min. 1 = Adenosin-5'-monophosphat; 2 = Adenosindiphosphat; 3 = Guanosin-5'-monophosphat; 4 = Guanosindiphosphat; 5 = Cytidin-5'-monophosphat; 6 = Cytidindiphosphat; 7 = Uridin-5'-monophosphat; 8 = Uridindiphosphat

Substanz	R_F -Wert Laufm. 1	R_F -Wert Laufm. 2
Adenosin-5'-monophosphat	0,57	0,26
Adenosin-diphosphat	0,36	0,08
P^1 -[Adenosyl-(5')]- P^2 -methyl-pyrophosphat	0,46	
P^1 -[Adenosyl-(5')]- P^2 -phenyl-pyrophosphat	0,32	
Adenosin-triphosphat	0,21	
Guanosin-5'-monophosphat	0,55	0,14
Guanosin-diphosphat	0,37	0,03
Guanosin-triphosphat	0,17	
Uridin-5'-monophosphat	0,80	0,13
Uridin-diphosphat	0,63	0,00
Uridin-triphosphat	0,44	
Cytidin-5'-monophosphat	0,74	0,31
Cytidin-diphosphat	0,51	0,11
Cytidin-triphosphat	0,34	
Inosin-5'-monophosphat	0,74	
Adenosin-3'-monophosphat	0,48	
Guanosin-3'-monophosphat	0,44	
Uridin-3'-monophosphat	0,75	
Cytidin-3'-monophosphat	0,71	
Hochmolekulare Ribonucleinsäure*)	0,00	

Tabelle 2. R_F -Werte von Nucleotiden an der Ecteola-Schicht. Kapazität des Austauschers 0,41 mÄq N/g. Laufmittel 1: 0,15 m NaCl; Laufmittel 2: 0,01 n HCl. Laufzeit: 15 min

*) Isoliert aus Spinatblättern von Frau Dr. Maria Fekete, Darmstadt.

salzlösung als Elutionsmittel zwar Purin-Derivate von Pyrimidin-Derivaten gleichen Typs (z.B. Adenosin-diphosphat von Uridin-diphosphat) getrennt werden können, sind Trennungen innerhalb der Purin-Gruppe (z. B. Adenosin-diphosphat von Guanosin-diphosphat) oder innerhalb der Pyrimidin-Gruppe (z. B. Cytidin-diphosphat von Uridin-diphosphat) auf diese Weise nicht möglich. Eine gute Trennung dieser Verbindungen gelingt jedoch bei Verwendung von verdünnter Salzsäure als Elutionsmittel (Abb. 3, Tabelle 2).

Zusammenfassung und Ausblick

1. Die Methode der Chromatographie von Nucleinsäure-Derivaten an Ecteola-Schichten ermöglicht die schonende Trennung geringer Mengen ähnlicher Verbindungen in kürzester Zeit und ohne apparativen Aufwand.

2. Die chromatographische Trennung von Oligo- und Polynucleotiden scheint an Ecteola-Schichten ebenso möglich zu sein wie an Ecteola-Säulen.

3. Es ist zu erwarten, daß man durch Anwendung der Gradiententechnik (Veränderung von ionaler Konzentration und p_H des Elutionsmittels während der Chromatographie) eine verbesserte Trennung der Verbindungen erzielen kann.

Hierüber sowie über das Verhalten weiterer Ionenaustauscher in der Dünnschichtchromatographie, besonders mit Bezug auf die Chromatographie von Protein-Derivaten, wird später berichtet werden.

Experimenteller Teil

a) Herstellung der Ecteola-Schicht

80 g käufliche Ecteola-Cellulose wird zweimal mit je 800 ml dest. Wasser, dann dreimal mit je 250 ml Aceton gewaschen. Der Austauscher wird drei Stunden bei 105 °C getrocknet und in einer Kugelmühle zu Teilchen einer durchschnittlichen Korngröße von

12–25 μ zerkleinert. 15 g dieses Pulvers werden in einem Mörser mit 30 ml einer 0,25-proz. Collodiumlösung^{17,18)} verrührt, schnell durch ein Sieb DIN 1171, Nr. 30 gegeben¹⁹⁾, in das Streichgerät gefüllt, noch einmal kurz aufgerührt und in üblicher Weise aufgetragen²⁰⁾. 15 g Ecteola-Pulver reichen für 12 bis 15 Platten (5×20 cm) oder für 6 bis 7 Platten (10×20 cm). Die Platten bleiben am besten zum Trocknen über Nacht bei Raumtemperatur liegen, können aber auch 1 bis 2 h bei 60 °C getrocknet werden. Die so hergestellten Schichten besitzen eine große mechanische Stabilität. Die Platten können in Stapeln von etwa 10 Stück gelagert werden; eine Aufbewahrung im Exsikkator ist nicht erforderlich.

b) Chromatographie an der Schicht

Diese wird in offenen Bechergläsern mit verdünnten Elektrolytlösungen als Laufmittel ausgeführt. Die Substanzen (im allgemeinen $2 \cdot 10^{-2}$ bis $2 \cdot 10^{-3}$ μ Mol) werden 2,5 bis 3 cm vom unteren Plattenrand mit einer Mikropipette aufgetragen. Die Platte wird vorsichtig in das Becherglas, das bis zu einer Höhe von 1 bis 1,5 cm mit dem Elutionsmittel gefüllt ist, gestellt. Für 8 bis 10 cm Laufstrecke benötigt das Laufmittel etwa 15 min. Das Chromatogramm wird in einem warmen Luftstrom getrocknet. Der Nachweis der Verbindungen erfolgt im Auflicht einer UV-Lampe (Emissionsmaximum bei etwa 260 m μ). Noch 10^{-3} μ Mol Adenin-Verbindungen lassen sich erkennen, da die Ecteola-Schicht, im Gegensatz zu den anorganischen Schichten, UV-Licht praktisch nicht absorbiert. Bei Pyrimidin-Derivaten liegt die Erfassungsgrenze etwas höher.

Herrn Professor Dr. Friedrich Cramer sei für die großzügige Förderung dieser Arbeit, Fräulein Dipl.-Chem. Erika Ehrhardt für wertvolle Hinweise herzlich gedankt.

Eingegangen am 31. Juli 1961

[A 157]

¹⁷⁾ Die Verwendung von Collodium als Bindemittel wurde von Dipl.-Chem. Erika Ehrhardt, Darmstadt, vorgeschlagen.

¹⁸⁾ 4 % Collodiumlösung (Merck) mit dest. Aceton entsprechend verdünnt.

¹⁹⁾ Das Sieben ist nicht unbedingt erforderlich; es bewirkt nur eine größere Homogenität der Schicht.

²⁰⁾ Grundausrüstung Nr. 600 zur Dünnschichtchromatographie. Fa. Desaga, Heidelberg.

Ionensiebe III

Kapillareigenschaften eines Kationenaustauschers auf Silicon-Basis

Von Priv.-Doz. Dr. E. BLASIUS und Dipl.-Ing. W. HEIN

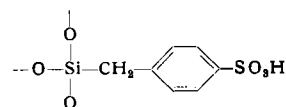
Anorganisch-chemisches Institut der Technischen Universität Berlin

Die für die Verwendung der Austauscher als Ionensiebe wichtigen Porendimensionen werden auf zwei voneinander unabhängigen Wegen bestimmt. Für einen Kationenaustauscher auf Silicon-Basis werden die erhaltenen Werte miteinander und mit denen der Austauscher auf Kunstharzbasis verglichen.

In früheren Arbeiten¹⁾ wurden die Kapillareigenschaften von Austauschern auf Kunstharzbasis mit einem von Bemmelen²⁾ beschriebenen und von Bachmann und Maier³⁾ apparativ vervollkommenen Verfahren untersucht. Die Auswertung der nach dieser B.B.M.-Methode erhaltenen Ad- und Desorptionsisothermen mit der Kelvin-Gleichung lieferte qualitative Ergebnisse über die Verteilung und Größe der Porenradien. Hierbei waren jedoch Zusatzannahmen notwendig, die sich aus den speziellen Eigenschaften der Kunstharz-Austauscher ergaben. Durch die Entwicklung eines Kationenaustauschers auf Silicon-Basis⁴⁾, der auch bei höheren Temperaturen beständig ist, wurde es möglich, die Methode von Brunauer, Emmet und Teller⁵⁾

dem oben aufgeführten Verfahren gegenüberzustellen. Aus den gefundenen Oberflächengrößen und den experimentell leicht bestimmbareren Porenvolumina können die Porenradien mit Hilfe einfacher Modellvorstellungen über die geometrische Form der Poren errechnet werden.

Der Silicon-Austauscher enthält in ein Kieselsäuregerüst eingebaut, als kationenaktive Komponente die Benzylsiloxyp-sulfonsäure-Gruppe:



Selbst bei 310 °C ließ sich noch keine SO₂-Abspaltung feststellen⁶⁾. Untersucht wurde die H⁺-, Na⁺- und K⁺-Form in der Siebfraktion 20–50 mesh und die H⁺-Form in der Siebfraktion 200–400 mesh.

¹⁾ E. Blasius, H. Pittack u. M. Negwer, Angew. Chem. 68, 671 [1956]; 71, 445 [1959].

²⁾ J. H. van Bemmelen, Z. anorg. allg. Chem. 13, 233 [1897]; 18, 98 [1898]; 59, 225 [1908]; 62, 1 [1909].

³⁾ W. Bachmann u. L. Maier, ebenda 168, 61 [1928].

⁴⁾ F. Runge u. H. Zimmermann, DDR.-Pat. 8560 [29. 12. 1953].

⁵⁾ S. Brunauer: The Adsorption of Gases and Vapors, Bd. I, Princeton University Press, Princeton 1943.