

[Chem. Pharm. Bull.]
13(10)1160~1163(1965)

UDC 547.567 : 543.544.42 : 543.422.6.062

148. Hiroshi Morimoto und Isuke Imada : Ubichinone und Verwandte Substanzen. VII.*¹ Quantitative Analyse der Ubichromenole.(Forschungslaboratorien für Chemie, Takeda Chemische Industrien A. G.*²)

Um das biologische Verhalten von Ubichromenol (35) (IIb) zu untersuchen, haben die Autoren, wie aus der folgenden Mitteilung¹⁾ hervorgeht, in Ratten IIb subkutan injiziert und diese in der Leber, im Plasma, in den Blutkörperchen sowie im Gehirn quantitativ analysiert. Vor dieser Untersuchung, war es für sie jedoch erforderlich, eine Isolierungs- und quantitative Bestimmungsmethode zu entwickeln, um IIb im tierischen Gewebe feststellen zu können. Die Autoren konnten die Aufgabe folgendermaßen lösen.

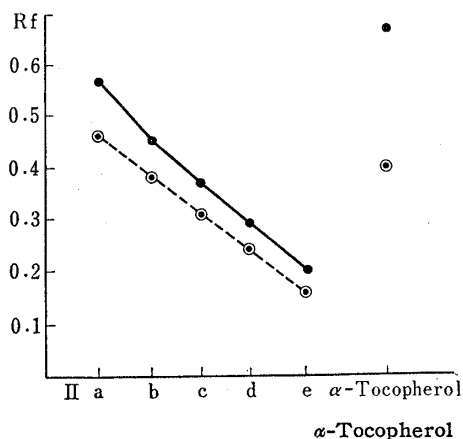


Abb. 1. Rf-Werte der Ubichromenole (IIa~e)

- Papierchromatographie
Papier: mit Silicon imprägniertes Whatman-Nr. 1
Fließmittel: PrOH-H₂O (4:1)
Anfärbereagenz: FeCl₃-K₃Fe(CN)₆-Reagenz
Nachweisgrenze: 0.1 γ
Absteigend Methode, 21°
- Dünnschichtchromatographie
Dünnschicht: mit Paraffin imprägnierte Kieselgel G-Schicht
Fließmittel: Aceton-das mit Paraffin gesättigte H₂O (9:1)
Anfärbereagenz: FeCl₃-K₃Fe(CN)₆-Reagenz dann konz. H₂SO₄
Nachweisgrenze: 0.1 γ
Laufstrecke: 15 cm
Absteigend Methode, 21°

Qualitative Analyse der Ubichromenol-Gruppe

Ob sich Ubichromenol in der Natur wesentlich befindet, ist sehr fraglich. Es scheint zur Zeit richtiger, es als ein von Ubichinon gebildetes Artefakt während seiner Isolierung anzusehen. Die Autoren mußten deshalb darauf Rücksicht nehmen, daß sich während des Extrahierens von IIb das in Ratten wesentlich vorliegende Ubichinon (45) in Ubichromenol (45) umwandelt, und untersuchten zuerst eine qualitative Analyse der Ubichromenol-Gruppe. Ubichinon (30) (Ia) (aus *Saccharomyces cerevisiae*), (35) (Ib) (aus *Candida utilis*), (40) (Ic) (aus *Escherichia coli*), (45) (Id) (aus *Penicillium chrysogenum*) und (50) (Ie) (aus Ochsenherz-Muskel) wurden dargestellt und durch die von den Autoren gefundenen ausgezeichneten Bedingungen,²⁾ nämlich durch Umsetzung mit Triäthylamin in entsprechende Ubichromenole (IIa~e) cyclisiert. Die hierbei erhaltenen Produkte IIa~e wurden nach Imprägnierungsmethoden der Chromatographie untersucht, die bei der Auftrennung der Ubichinon-Gruppe, die sich durch die Zahl der Isopreneinheiten unterscheiden, schöne Erfolge brachten: Dabei war ermittelt worden, daß die Substanzen (IIa~e) auf imprägniertem Papier nach Lester³⁾ und auf paraffinierter Kieselgel G-Schicht nach Wagner⁴⁾ die regelmäßig abnehmenden Rf-Werte durch

*¹ I. Mitt.: Dieses Bulletin, 12, 1043 (1964), II. Mitt.: *Ibid.*, 12, 1047 (1964), III. Mitt.: *Ibid.*, 12, 1051 (1964), IV. Mitt.: *Ibid.*, 12, 1057 (1964), V. Mitt.: *Ibid.*, 13, 130 (1965), VI. Mitt.: *Ibid.*, 13, 136 (1965). Zugleich K. Mitt. in der Reihe "Über die Bestandteile der Hefe." VIII. Mitt.: H. Morimoto, H. Kawashima, M. Yamano: *Biochem. Z.*, 341, 120 (1964).

*² Juso-Nishino-cho, Higashiyodogawa-ku, Osaka (森本 浩, 今田伊助).

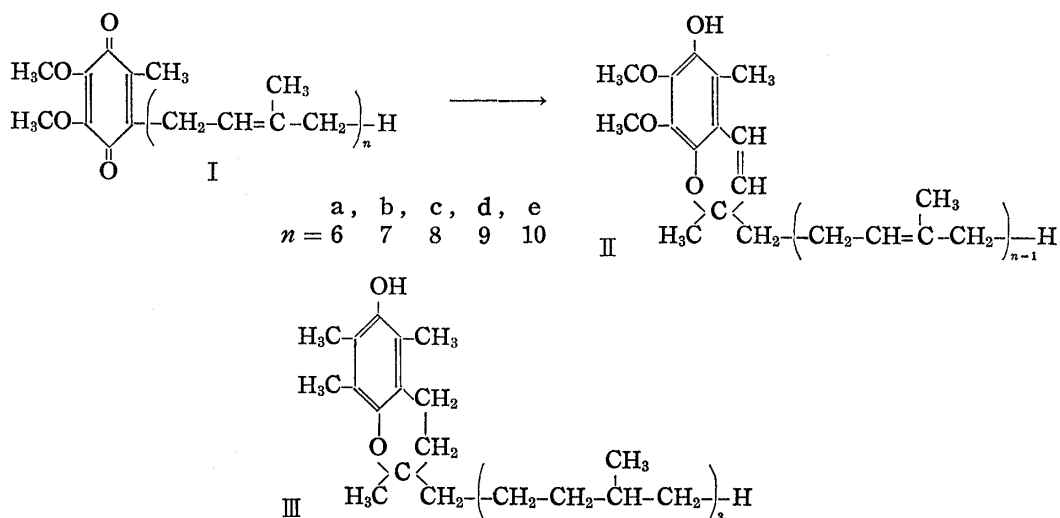
1) H. Morimoto, I. Imada: Dieses Bulletin, 13, 1164 (1965) (VIII. Mitt.).

2) I. Imada, H. Morimoto: Dieses Bulletin, 12, 1047 (1964).

3) R. L. Lester, T. Ramasarma, E. M. Welch: *J. Biol. Chem.*, 234, 672 (1959).

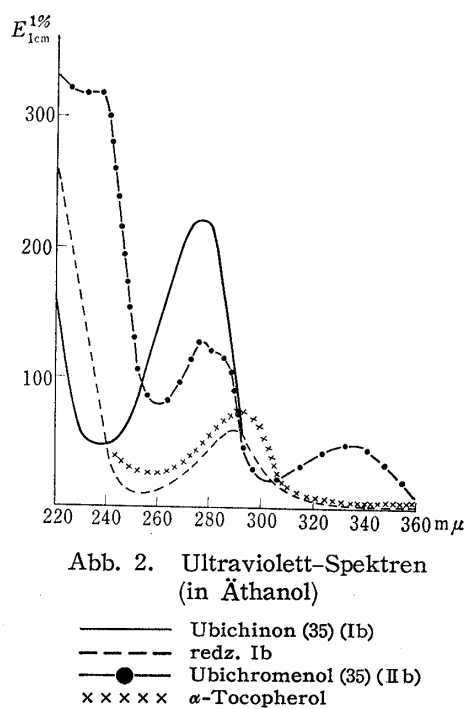
4) H. Wagner, B. Dengler: *Biochem. Z.*, 336, 380 (1962).

die Zahl der Isopreneinheiten ergaben (Abb. 1). Ubichromenol lieferte mit einem $\text{FeCl}_3\text{-K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ -Reagenz einen blauen Fleck auf weißem Untergrund, und bei Dünnschichtchromatographie ließ sich die Farbe durch Besprühen mit konz. Schwefelsäure verdeutlichen.



Quantitative Bestimmung des Ubichromenols in Tierischen Geweben

Zur Analyse einer verhältnismäßig labilen Substanz wie Ubichromenol aus tierischen Geweben ist es wünschenswert, daß das Verfahren leicht und kurz, sogar mit kleinen Mengen durchführbar ist. Wagner, *et al.*⁴⁾ hatten Ubichinon in Lipidextrakten durch eine Kombination von dünn-schichtchromatographischer Vortrennung und spektrophotometrischer Messung bei $272 \text{ m}\mu$ elegant quantitativ bestimmt. Das Ubichromenol hat ein UV-Maximum bei $332 \text{ m}\mu$, und diese Methode ist für seine Analyse verwendbar. Da das tierische Gewebe voraussichtlich keine Ubichromenole enthielt, wurde zur Untersuchung dieser Methode der Rattenleber eine bekannte Menge von IIb zugesetzt und diese in einem Homogenisator mit Aceton-Äthanol extrahiert. Eine aliquote Menge des Extraktes ließ sich an einer nach Stahl⁵⁾ hergestellten Kieselgel G-Platte mit Benzol entwickeln. Der für den Rf-Wert des authentischen IIb verantwortliche Teil wurde mit Äthanol extrahiert und der Extinktionswert x bei $332 \text{ m}\mu$ erhalten, während ein Blindwert y aus einer gleichgroßen Menge der Bahn Y in gleicher Weise erhalten wurde. Eine durchschnittliche Ausbeute von wiedergefundenem IIb ergab 94.4% nach einer Umrechnung auf $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 49$, und die Methode erwies sich als befriedigend für die quantitative Bestimmung von IIb. Bei dieser quantitativen Analyse erwies sich eine paraffinierte Kieselgel G-Schicht nicht geeignet, da sie einen zu hohen Blindwert ergab. Ferner müssen die Verfahren, u.a. Extraktion, Kondensation,



5) E. Stahl: Chemiker-Ztg., 82, 323 (1958).

bis zur Steighöhe von 10 cm aus der Startlinie mit Benzol entwickelt und dann bei Zimmertemperatur in der Dunkelheit 30 Min. getrocknet. Die mittleren Laufbahnen (X, Y) wurden mit einer Glasplatte abgedeckt, beide Seiten (W) mit $\text{FeCl}_3\text{-K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ -Reagenz besprüht. Auf den mittleren unbesprühten Bahnen (X bzw. Y) in Höhe von IIb wurde die Kieselgel G-Fläche abgelöst und in Zentrifugenröhrchen mit 3 ml EtOH 30 Min. kräftig geschüttelt und anschließend zentrifugiert. 1 ml der überstehenden klaren Lösung wurden bei $332\text{ m}\mu$ in einem Hitachi-Spektrophotometer (EPU-2A) gegen einen Blindwert gemessen und ergab einen Extinktionswert x bzw. y (Blindwert). Der wiedergefundene Wert (mg) an IIb wurde auf $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 49$ und Formel $(x-y) \frac{10}{49} \times 3 \times 20$ umgerechnet (Tabelle I).

TABELLE I.

| Exp. | Extinktionswert ($E_{1\text{cm}}$) | | | Wiedergefundenes (IIb) | |
|------|--------------------------------------|-------|-------|------------------------|---------------|
| | x | y | $x-y$ | mg | % |
| I | 0.309 | 0.032 | 0.277 | 3.39 | 95.2 |
| II | 0.298 | 0.026 | 0.272 | 3.33 | 93.5 |
| | | | | | 94.4 (Mittel) |

Alkalische Verseifung des mit Aceton-Äthanol extrahierten Leber-Rückstandes—Der mit Aceton-EtOH extrahierte Leber-Rückstand in 30 ml H_2O und 30 ml 15%iger methanolischer NaOH-Lösung wurde in Gegenwart von Pyrogallol unter N_2 30 Min. unter Rückfluß gekocht und nach Erkalten dreimal mit je 30 ml *n*-Hexan extrahiert. Im Hexanextrakt ließen sich kein Ubichinon (45) sowie Cholesterin papier- und dünnschichtchromatographisch nachweisen.

Die Autoren möchten Herrn Dr. K. Tanaka, Abteilungsleiter dieses Institutes, für die Unterstützung der Arbeit und Herrn R. Negishi in diesem Laboratorium für seine technische Hilfe bei den Experimenten herzlichst danken.

Zusammenfassung

Die Ubichromenol-Gruppe wurde mit Hilfe der imprägnierten Chromatographie qualitativ nachgewiesen. Eine quantitative Bestimmungsmethode an Ubichromenol (35) (IIb) wurde ebenfalls nach einer kombinierten Methode mit Dünnschichtchromatographie und Extinktionswert bei $332\text{ m}\mu$ festgestellt.

(Eingegangen am 5. Februar 1965)