

CHROM. 6129

BEEINFLUSSUNG DER TRENNUNG VON PURINEN UND PYRIMIDINEN AN SEPHADEX G-10*

C. WASTERNAK UND H. REINBOTHE

Sektion Biowissenschaften der Martin-Luther-Universität Halle, Fachbereich Biochemie, Biologische Abteilung, 40 Halle/Saale, Neuwerk 1 (D.D.R.)

(Eingegangen am 9. Februar 1972; geänderte Fassung am 18. April 1972)

SUMMARY

Factors which influence the separation of purine and pyrimidine compounds on Sephadex G-10

Sephadex adsorption chromatography can be used for separating pyrimidine and purine compounds. The separation is affected by a number of conditions. This paper describes the variation of temperature, ionic strength, pH, degree of crosslinking, concentration of *n*-propanol, dioxan and urea, and their influence on the adsorption behaviour of compounds.

The degree of adsorption decreases with increasing temperature. This relationship is valid for gel-solid interactions. The enthalpy values (ΔH^0) for hypoxanthine and adenosine are -2.35 and -1.92 kcal/mol, respectively, and suggest the existence of hydrogen bonding between the compounds and the gel. For purine and pyrimidine compounds different mechanisms of separation exist as a result of different ΔH^0 values. For most of the compounds examined the basic heterocyclic nitrogen atoms are the primary sites of adsorption. Therefore, hydrogen bonding between the unshared pairs of electrons of the heterocyclic nitrogen atoms and the hydroxy group or the oxygen of the gel matrix is discussed.

Dioxan, *n*-propanol and urea decrease the degree of adsorption, while an increase in ionic strength increases the adsorption. Elution values of compounds correspond to their degree of dissociation.

The adsorption chromatography of heterocyclic compounds on Sephadex gels is a useful technique for the separation of mixtures of compounds of synthetic or biological origin. A detailed paper on the chromatographic behaviour and chemical structure is published¹⁸.

EINLEITUNG

Häufig werden in letzter Zeit niedermolekulare Verbindungen geringer Molekulargewichtsunterschiede an Sephadex G-10 getrennt, da sie zu "reversibler Adsorption" befähigt sind (siehe Übersicht bei Lit. 1).

* Für Abkürzungen siehe S. 148.

Die "klassische" Gelfiltration ist für $K_D = 0$ bis $K_D = 1$ definiert. Durch Adsorption der zu trennenden Verbindungen an der Gelmatrix wird das Prinzip des Molekülsiebens überlagert, und die K_D -Werte liegen über 1. Dadurch ist der chromatographische Arbeitsbereich grösser als bei der Filtration von Molekülen entsprechend ihrer unterschiedlichen Grösse, und die Elutionsposition einer Verbindung hängt nicht allein vom Gelyp und der Molekülgrösse ab. Neben phenolischen Verbindungen sind besonders Nukleinsäurebausteine in beträchtlichem Ausmass zur "reversiblen Adsorption" befähigt und wurden an Sephadex G-10 und G-15 getrennt²⁻⁸. Die Gelchromatographie stellt für diese Verbindungen bei sorgfältiger Anwendung ein quantitatives Verfahren dar^{5,7}.

In der vorliegenden Arbeit werden Versuche zum Einfluss der chromatographischen Bedingungen auf das Ausmass der "reversiblen Adsorption" dargestellt. Neben dem Nachweis der Temperaturabhängigkeit der Trennung von Purin- und Pyrimidinverbindungen an Sephadex G-10 werden eine Anzahl adsorptionsbeeinflussender Faktoren vorgestellt.

MATERIAL AND METHODS

Präparation der Sephadex G-10 Säulen

Als Trennsäulen dienten Pharmacia-Chromatographierohre (0.9×30 cm bzw. 0.9×60 cm) sowie besonders zubereitete Glasrohre mit geringem Totvolumen und verschiedener Länge. Wenn erforderlich, wurden die Säulen mit einem Kühlmantel temperiert.

Als Trenngel benutzten wir Sephadex G-10 (normal, water regain 1.0 ± 0.1 g/g; Partikelgrösse $40-120 \mu$). Dieses wurde entsprechend den Angaben der Literatur mit destilliertem Wasser eingequollen und luftblasenfrei in die Säule gefüllt (Arbeitsdruck = Länge der Säule). Die Gelbettoberfläche wurde nach mehrstündigem Absitzen mit 1-2 Scheiben eines Dederongewebes (Porengrösse 40μ) bedeckt, und die Säule wurde mit dem Elutionsmittel $0.01 M (NH_4)_2CO_3$, pH 9.0, bis zum dreifachen Bettvolumen gewaschen. Bei der Messung der Temperaturabhängigkeit erfolgte die Gelvorbereitung und Säulenfüllung bei der zu untersuchenden Temperatur. Elutionsmittelvorrat und Säule wurden durch Wassermanteltemperierung (Abweichung im Gel $\pm 0.3^\circ$) bei einer konstanten Temperatur gehalten.

Messinstrumente

Die Registrierung des Trennvorganges erfolgte im Durchflussphotometer Uvicord II (LKB) bei 254 nm.

Als substanzspezifische chromatographische Grösse galt die Elutionskonstante V_e^0 , die den Quotienten aus der Differenz von Elutionsvolumen der Verbindung V_e minus Ausschlussvolumen V_0 und dem Ausschlussvolumen V_0 darstellt. Die ungenaue Bestimmung des inneren Volumens V_i , das für den häufig benutzten K_D -Wert

$$\left(K_D = \frac{V_e - V_0}{V_i} \right)$$

ermittelt werden muss, wird dadurch umgangen. Die Beziehungen zwischen der

bekanntem chromatographischen Grösse R_F , dem K_D -Wert und dem V_e^0 -Wert sind durch die Gleichungen

$$K_D = \frac{V_0}{V_i} \cdot \left(\frac{1}{R_F} - 1 \right) \quad (1)$$

bzw.

$$V_e^0 = \frac{1}{R_F} - 1 = \frac{V_e - V_0}{V_0} \quad (2)$$

gegeben. Der V_e^0 -Wert ist von der Durchflussgeschwindigkeit unabhängig. Das Ausschlussvolumen V_0 wurde mit Dextranblau 2000 bestimmt, während das innere Volumen V_i , für die Ermittlung von ΔG^0 und ΔS^0 nach den Gleichungen 3 und 4 erforderlich, mit Hilfe von Li-Ionen bestimmt wurde.

Die Anwendung des K_D -Wertes führt in Anbetracht des fehlenden Nachweises einer gleichmässigen Raumerfüllung von V_i durch grosse und kleine Moleküle zu theoretisch bedingten Widersprüchen⁹. Sie werden bei Verwendung des V_e^0 -Wertes umgangen. Er liefert eine lineare Beziehung zu dem thermodynamisch begründeten Verteilungskoeffizienten als Verhältnis der Konzentration eines Stoffes in stationärer und mobiler Phase

$$\left(K = \frac{c_s}{c_m} \right) \quad (\text{Lit. 9}).$$

Die symmetrische Gestalt der Elutionskurve galt als Ausdruck des Gleichgewichtszustandes der chromatographischen Anordnung.

Adsorptionsmessung

Die Messung der Adsorptionsfähigkeit von Sephadex G-10 erfolgte, abgewandelt nach DETERMANN UND WALTER¹⁰, u.a. durch Aufnahme der Dialysegeschwindigkeit einer Purin- oder Pyrimidinverbindung nach der in Fig. 1 dargestellten

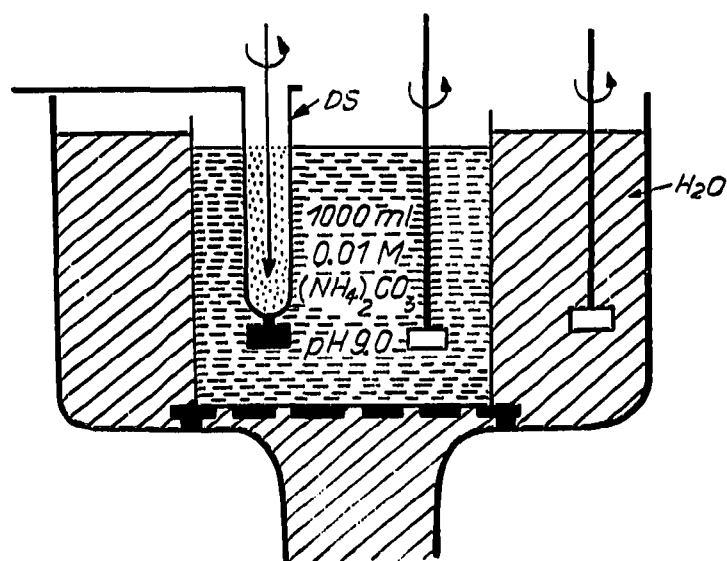


Fig. 1. Anordnung zur Messung der Dialysegeschwindigkeit als Mass der Geladsorption (vgl. Text).

Anordnung. Hierzu wurden 5.0 ml einer Adenin bzw. Uracillösung (10 mg/5 ml 0.01 M $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, pH 9.0) unter Rühren zu 5 g Sephadex G-10 (in 0.01 M $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, pH 9.0, gequollen) in den Dialyseschlauch (DS) gegeben und nach konstanten Zeiten im Puffergefäß (1000 ml 0.01 M $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, pH 9.0) durch Probenentnahme (3 ml) der Extinktionsanstieg am Beckman Spektrophotometer DB-G bei 260 nm verfolgt. Nach Probenentnahme wurde der Puffervorrat mit 0.01 M $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, pH 9.0, auf 1000 ml aufgefüllt.

Als Kontrolle galt ein Versuch ohne Gel mit adäquaten Puffermengen. Ausdruck der Adsorptionswirkung war das Verhältnis der Dialysegeschwindigkeitskurvenanstiege $-\text{Gel}/+\text{Gel}$ bei 60 min (Fig. 2). Es wird als Adsorptionswert K_{ad} bezeichnet.

Aufnahme der Adsorptionskinetik

Zur kontinuierlichen Registrierung der Geladsorption kam die in Fig. 3 dargestellte Umlauftechnik (nach Lit. 10 verändert) zur Anwendung. In einem Reak-

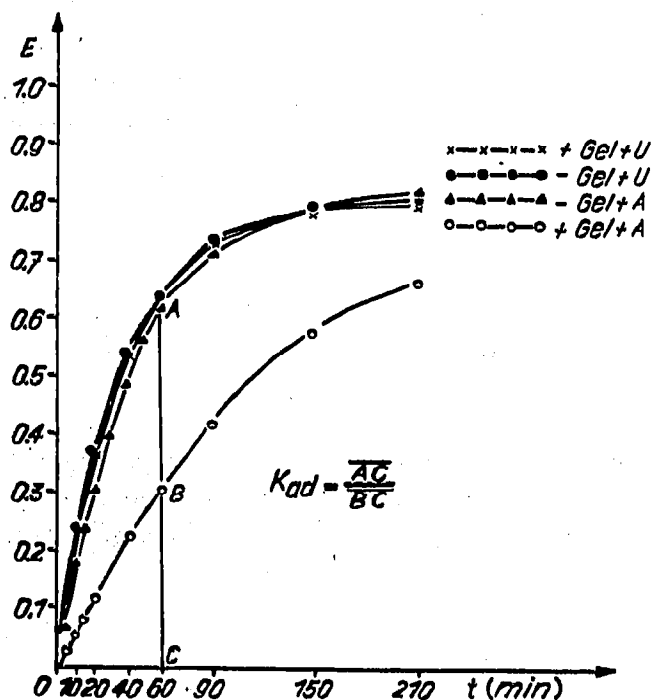


Fig. 2. Dialysegeschwindigkeit von Adenin (A) und Uracil (U) mit und ohne Gel (K_{ad} = Adsorptionswert).

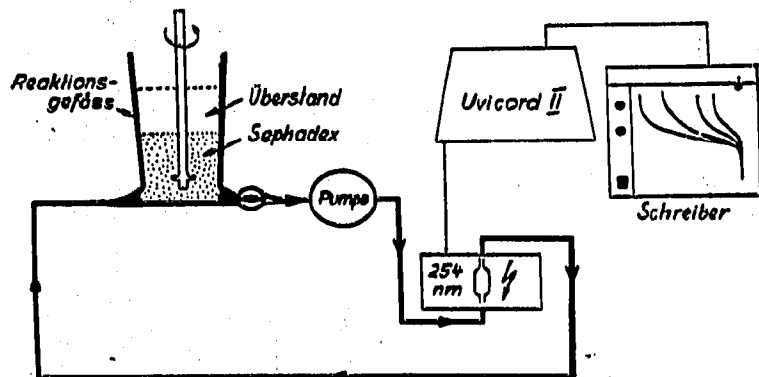


Fig. 3. Anordnung zur Aufnahme der Geladsorptionskinetik (Umlaufsystem) (vgl. Text).

tionsgefäß wurden unter Rühren zu 5 g Gel (Endvolumen der Reaktionsflüssigkeit, 25 ml) alle 30 sec 50 μ l = 100 μ g Adenin bzw. andere zu untersuchende Stoffe zu-pipettiert. Über eine peristaltische Pumpe strömte die Flüssigkeit (ohne Gel) in die Durchflussskivette des Uvicord II-Systems und führte zur Extinktionsänderung, die linear mit Hilfe eines Beckman-10 Zoltschreibers registriert wurde (Papiergeschwindigkeit des Schreibers, 1 Zoll/min). Die Extinktion des kreisförmig umge-pumpten Flüssigkeitsstromes nahm durch die Substanzzugabe kontinuierlich zu. Dadurch entstand ein linearer Abschnitt der S-förmigen Kurve, der zur Auswertung kam.

Als Kontrolle galt der unter gleichen Bedingungen erhaltene Kurvenanstieg bei Gelabwesenheit. Als Adsorptionswert K_{ad} galt wie bei den Dialysegeschwindigkeitskurven das Verhältnis der Kurvenanstiege von -Gel/+Gel (Fig. 8). Das Einstellen einer konstanten Transmission am Ende der Substanzzugabe wurde als Ausdruck des Gleichgewichtes zwischen mobiler und stationärer Phase gewertet.

Durch die Entfernung zwischen Reaktionsgefäß und Messzelle entstand eine Verzögerung des Extinktionsanstiegs, deren Höhe durch die Pumpgeschwindigkeit bestimmt wurde. Sie lag für $v = 150$ ml/h bei 30 sec und für $v = 50$ ml/h bei 90 sec. Der durch den molaren Absorptionskoeffizienten ϵ der Substanzen bedingte Unterschied des Kurvenanstiegs entfällt in den K_{ad} -Werten. Gelmenge, Rührgeschwindigkeit, Gel-Oberflächeneigenschaften und adsorptionsabhängige Diffusionsgeschwindigkeit beeinflussen den Zeitpunkt des Kurvenanstiegs, nicht aber seine Größe.

Bei der Änderung des Reaktionsmilieus kamen zur Anwendung:

deionisiertes Wasser

bidestilliertes Wasser

0.01 M $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ -Puffer, pH 9.0

steigende Molaritäten einer NaCl-Lösung

steigende Molaritäten einer Harnstoff-Lösung

verschiedener Vernetzungsgrad handelsüblicher Sephadextypen (G-10, G-15, G-25, G-50, G-75)

0.01 M Puffer (KCl/HCl, McIlvaine, Sörensen, Tris/HCl, Glycin/NaOH) im Bereich 1.5-12.0

steigende Mengen Dioxan bzw. *n*-Propanol (redest.) in% des 25 ml-Reaktionsvolumens.

Für die beiden zuletzt genannten Verbindungen erfolgte eine Gelvorbehandlung im Reaktionsgefäß unter Rühren und Umpumpen der Flüssigkeit (Neueinstellung der Grundlinie bei Dioxan) über 5 min. In den anderen Versuchen wurde das Gel mit 3×100 ml des jeweiligen Lösungsmittels vorbehandelt.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Einfluss der Temperatur

Substanz-Gel-Wechselwirkungen, wie sie an starkvernetzten Geltypen als "reversible Adsorption" aromatischer, heterozyklischer und aliphatischer Verbindungen seit etwa zehn Jahren bei der Gelchromatographie bekannt sind, haben nach neueren Untersuchungen auch für andere Verbindungsklassen Bedeutung^{11, 12}. So sind angesichts einer ausgeprägten Temperaturabhängigkeit der Trennung von Maltooligosacchariden an Bio-Gel P-2 bzw. Sephadex G-15¹¹⁻¹³ Glucose und ihre

Oligomeren nicht frei von Wechselwirkungen zum Gel. In Anbetracht der thermodynamischen Interpretation der Molekularsiebchromatographie durch HJERTÉN⁹ ist die Temperaturabhängigkeit einer gelchromatographischen Trennung nicht mehr Ausnahme und kann als Mass für die Wechselwirkungen einer Substanz zum Trenngel gelten, sofern Wechselwirkungen zwischen Substanz und Lösungsmittel vernachlässigbar sind.

Da bei der Gelchromatographie von Purinen und Pyrimidinen beträchtliche Wechselwirkungen zwischen Substanz und Gel auftreten^{5,7}, sollte die Temperaturabhängigkeit ihrer Trennung Rückschlüsse auf die Art und Grösse der Wechselwirkungen liefern.

Hierzu wurden Uridin, Inosin, Uracil, Thymin, Hypoxanthin und Adenosin bei verschiedenen Temperaturen getrennt. Es ergaben sich Elutionsprofile (Fig. 4), die mit steigender Temperatur eine Verkürzung der Elutionszeit sowie eine Verminderung der Elutionsvolumina und Zonenbreite, jedoch eine Verringerung des Auflösungsvermögens zeigten.

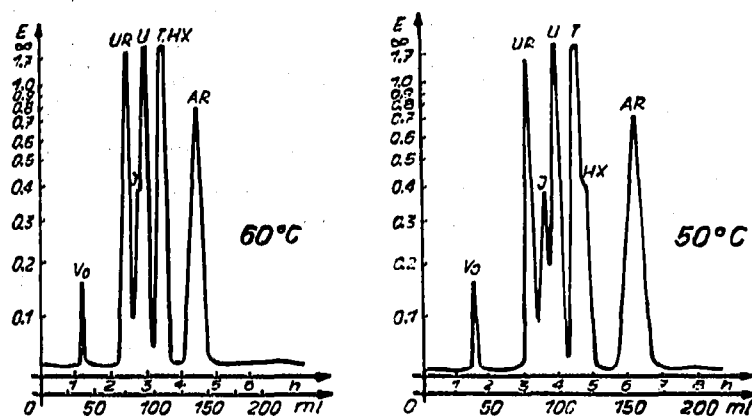


Fig. 4. Trennung von Uridin (UR), Inosin (J), Uracil (U), Thymin (T), Hypoxanthin (HX) und Adenosin (AR) an Sephadex G-10 bei 50° und 60°. Elutionsmittel, 0.01 M $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, pH 9.0; Fließgeschwindigkeit, 15 ml/h; Säule, 1.3 × 90 cm.

Die Verminderung der Elutionsvolumina bzw. Elutionskonstante V_e^0 (Tabelle I) wächst bei einigen Verbindungen nahezu proportional dem Anstieg der absoluten Temperatur. Eine Auftragung des dekadischen Logarithmus der Elutionskonstante V_e^0 gegen die reziproken Werte der absoluten Temperatur (Fig. 5) veranschaulicht die unterschiedliche Temperaturempfindlichkeit der untersuchten Substanzen und

TABELLE I

ELUTIONSKONSTANTEN V_e^0 FÜR PURINE UND PYRIMIDINE BEI VERSCHIEDENEN TEMPERATUREN (°C)

Verbindung	14°	20°	25°	30°	35°	40°	45°	50°	60°
Uridin	1.03	1.03	1.03	1.02	1.02	1.01	1.01	1.00	1.00
Inosin	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25	1.25
Uracil	1.70	1.70	1.71	1.63	1.55	1.48	1.47	1.46	1.43
Thymin	2.02	1.98	1.96	1.94	1.91	1.88	1.85	1.83	1.80
Hypoxanthin	3.15	2.90	2.75	2.60	2.45	2.30	2.15	2.00	1.80
Adenosin	4.20	3.95	3.80	3.64	3.45	3.32	3.15	2.98	2.65

die lineare Funktion zwischen $-\log V_e^0$ und $1/T$. Diese lineare Funktion leitet sich aus der Gleichung der freien Energie ab.

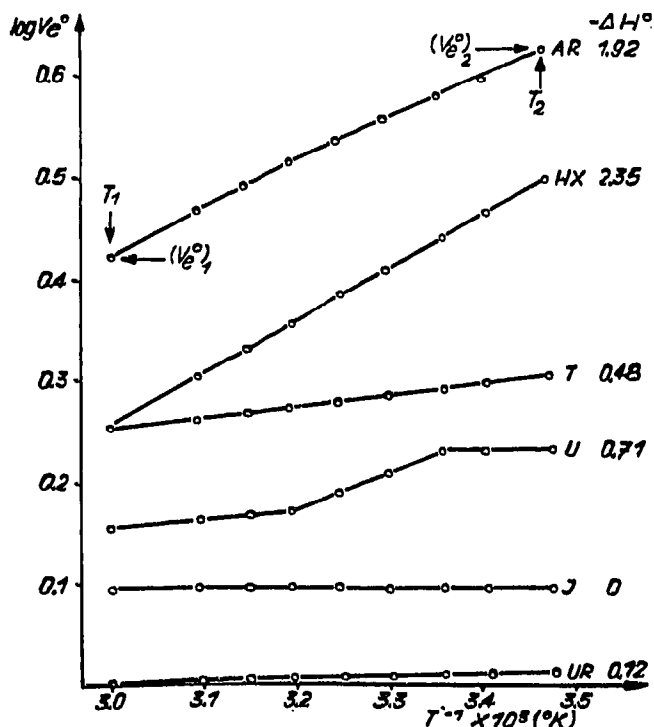


Fig. 5. Abhängigkeit der Elutionskonstanten von Uridin (UR), Inosin (J), Uracil (U), Thymin (T), Hypoxanthin (HX) und Adenosin (AR) von der Temperatur. Rechts sind die ermittelten Aktivierungsenthalpien ΔH^0 in kcal/mol genannt. Das Ausschlussvolumen V_0 war von der Temperatur unabhängig.

Der Transport eines Moles einer Verbindung von der mobilen in die stationäre Phase (Gelinnenraum) erfordert eine freie Energie von

$$\Delta G^0 = -RT \cdot \ln \frac{c_s}{c_m} = -RT \ln \frac{V_0}{V_i} \left(\frac{1}{R_F} - 1 \right) = -RT \ln V_e^0 - RT \ln \frac{V_0}{V_i} \quad (3)$$

Die Elutionskonstante V_e^0 entspricht nach Gleichung 1 bei Multiplikation mit V_0/V_i dem als Verteilungskoeffizienten K benutzten K_D -Wert. Da mit steigender Temperatur bei Sephadex G-10 V_0 konstant bleibt und V_i nur unbedeutenden Veränderungen unterliegt¹⁴, kann V_e^0 unter Berücksichtigung des konstanten Gliedes V_0/V_i in den Gleichungen 3 und 5 Verwendung finden.

Eine Wechselwirkung zwischen Substanz und Gel, wie sie gerade bei der "reversiblen Adsorption" an starkvernetzten Gelen vorliegt, wird durch Berücksichtigung der freien Enthalpie ΔH^0 erfasst:

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T \cdot \Delta S^0 \quad (4)$$

Beide Gleichungen ergeben mit

$$-\ln V_e^0 = \frac{\Delta H^0}{RT} - \frac{\Delta S^0}{R} + \ln \frac{V_0}{V_i} \quad (5)$$

jenen linearen Zusammenhang zwischen $-\log V_e^0$ und $1/T$, wie ihn Fig. 5 zeigt. Die freie Enthalpie ΔH^0 kann aus Gleichung 5 nach Differentiation

$$\frac{d(\ln V_e^0)}{dT} = \frac{\Delta H^0}{RT^2}$$

bestimmt werden.

In Anbetracht des linearen Zusammenhangs zwischen $-\log V_e^0$ und $1/T$ wurde ΔH^0 in unserem Beispiel als Differenzenquotient nach

$$\log \frac{(V_e^0)_2}{(V_e^0)_1} = \frac{\Delta H^0}{R} \cdot \left(\frac{1}{T_2} - \frac{1}{T_1} \right) \quad (6)$$

mit den Endwerten der Anstiegsstrecken aus Fig. 5 bestimmt. Die freie Energie ΔG^0 und die Entropie ΔS^0 wurden mit den Gleichungen 3 und 4 errechnet.

Tabelle II zeigt die ermittelten thermodynamischen Parameter. Die berechneten thermodynamischen Parameter sind nur mittelbar mit Literaturwerten vergleichbar, da in den vorliegenden Untersuchungen ein anderes Lösungsmittel benutzt wurde. Die ΔH^0 -Werte der hier untersuchten Verbindungen liegen beträchtlich unter denen der Phenole bei deren Trennung an Sephadex G-10¹⁶, übersteigen aber die für Oligosaccharide an Bio-Gel P-2 und Sephadex G-15 ermittelten Werte¹¹⁻¹³.

TABELLE II

THERMODYNAMISCHE PARAMETER FÜR PURINE UND PYRIMIDINE AN SEPHADEX G-10 BEI 25°
Vgl. Text.

Verbindung	V_e^0	ΔG^0 (cal/mol)	ΔH^0 (cal/mol)	ΔS^0 (cal/mol/deg)
Uridin	1.03	+2504	- 120	- 8.8
Inosin	1.25	+2392	0	- 8.03
Uracil	1.71	+2207	- 710	- 9.8
Thymin	1.96	+2128	- 480	- 8.75
Hypoxanthin	2.75	+1927	-2350	-14.3
Adenosin	3.80	+1735	-1920	-12.2

Für Hypoxanthin und Adenosin ergibt die starke Temperaturabhängigkeit mit -2.35 und -1.92 kcal/mol (Tabelle II) ΔH^0 -Werte, die im Bereich schwacher Wasserstoffbrücken vom Typ $\text{NH} \dots \text{O}$ ($\Delta H^0 = -2.3$ kcal/mol) liegen. Die Vorstellung einer reversiblen Adsorption als Folge von Wasserstoffbrückenbildung zwischen Substanz und Gelmatrix wurde mehrfach geäußert (z.B. Lit. 16, 17) und wird bei den von uns untersuchten Verbindungen neben den dafür zu fordernden negativen ΔH^0 und ΔS^0 -Werten durch Verminderung der Substanz-Gel-Wechselwirkungen bei N-Methylierung gestützt¹⁸. Die unterschiedlichen ΔH^0 -Werte in Tabelle II trotz relativ ähnlicher Strukturen legen aber nahe, dass verschiedene Trennursachen bei der Gelchromatographie wirksam sein können und Wasserstoffbrückenbildung entgegen BROOK UND HOUSLEY¹⁷ nicht die einzige Art von Substanz-Gel-Wechselwirkungen darstellt. STREULI fand für Sephadex LH-20 mit aromatischen Verbindungen Molekülsiebung, π -Bindung, und Wasserstoffbrücken-

bildung als Trennursachen, wobei Lösungsmittel und Substanz den Mechanismus des Trennprozesses bestimmten und die Trennung selten ausschliesslich einem Typ zuzuordnen war^{19,20}.

Für Purine wurde eine Korrelation zwischen den an Sephadex G-10 ermittelten $\log V_e^0$ -Werten und der Delokalisationsenergie der π -Elektronen, den Elektronendonatoreigenschaften der N-Atome, den basischen pK_a -Werten sowie der Wasserlöslichkeit beobachtet²¹. Daraus wurden H-Brücken zwischen dem heterozyklischen Ringsystem und dem Dextrananteil von Sephadex abgeleitet²¹. Die Deutung des Trennmechanismus von Substanzen an quervernetzten Gelen aus vorwiegend chemisch-molekularen Grössen bleibt aber in Anbetracht der Untersuchungen von MARSDEN²² unvollständig. So fehlten bei dem Vergleich der Wechselwirkungen zwischen Purinen und Sephadex bzw. Dextran²¹ der zu fordernde Nachweis einer Mikrohomogenität dieser Gele bzw. des Lösungsmittels.

BROWN beobachtete bei der Trennung von Cellodextrinen an Bio-Gel P-2 und Sephadex G-15 mit steigender Anzahl von Glucoseeinheiten einen Übergang von sterischem Ausschluss zu Adsorption¹². Er betrachtet die Adsorption als Sonderfall des generell wirksamen Verteilungsmechanismus, das bei spezifischen Wechselwirkungen zwischen den funktionellen Gruppen von Substanz und Gelmatrix auftritt¹³.

Die Substanz-Gel-Wechselwirkungen bei der Gelchromatographie fordern mehr Aufmerksamkeit¹². Ihrer Interpretation auf der Grundlage der Temperaturabhängigkeit sind Grenzen gesetzt, weil mit der Erfassung thermodynamischer Grössen aus der $\log V_e^0$ oder $\log K_D/I/T$ -Auftragung Wechselwirkungen zwischen Substanz und Gel sowie Lösungsmittel, Diskontinuitäten des Lösungsmittels und Geles u.a. summarisch erfasst werden²². So würden für die Verwendung der aus V_e^0 -Werten gewonnenen thermodynamischen Parameter Zusatzannahmen erforderlich werden, wenn für zwei Substanzen Gelabschnitte verschieden gut zugänglich sind²².

Substanz-Gel-Wechselwirkungen können durch Temperaturerhöhung zur Verkürzung der Elutionszeit und Verschärfung der Elutionszonen genutzt werden. Durch Einschaltung eines Temperatursprunges während der Trennung wurden die Elutionszeit für Hypoxanthin, Adenosin und Adenin vorverlegt und die Zonenbreiten unter Verminderung des Auflösungsvermögens verringert (Fig. 6).

Einer Anwendung der Temperaturerhöhung sind durch ihren Einfluss auf die Dichte der Gelpackung Grenzen gesetzt.

Der bei der Säulentrennung beobachtete Temperatureinfluss lässt sich auch durch Aufnahme der Dialysegeschwindigkeit (Fig. 1) von Adenin bei verschiedenen Temperaturen unter Anwesenheit von Gel zeigen. Dabei entsteht ein charakteristischer Kurvenanstieg (Fig. 2), der unter dem der Kontrolle (Dialyse mit Adenin ohne Gel) liegt, sofern Adsorption auftritt. Das Verhältnis von $-Gel/+Gel$ im Bereich linearer Extinktionszunahme ergibt einen K_{ad} -Wert, dessen Höhe Ausdruck der Adsorption ist. Nimmt man die Dialysegeschwindigkeit mit steigender Temperatur auf, so wird der Unterschied zwischen $-Gel$ und $+Gel$ geringer (Fig. 7). Die Adsorption sinkt. In weiteren Versuchen wurde ein Umlaufsystem gewählt (Fig. 3). Werden im Reaktionsgefäss dieses Systems (Fig. 3) mit bzw. ohne Gel gleiche Mengen Adenin (Pfeile in Fig. 8) zugegeben, so kann die geringere Extinktion von $8 \times 100 \mu g$ Adenin bei Gelanwesenheit gegenüber der Extinktion gleicher Mengen Adenin bei Gelabwesenheit (ΔT in Fig. 8) durch Temperaturerhöhung des Reaktionsgefässes auf 70° aufgehoben werden.

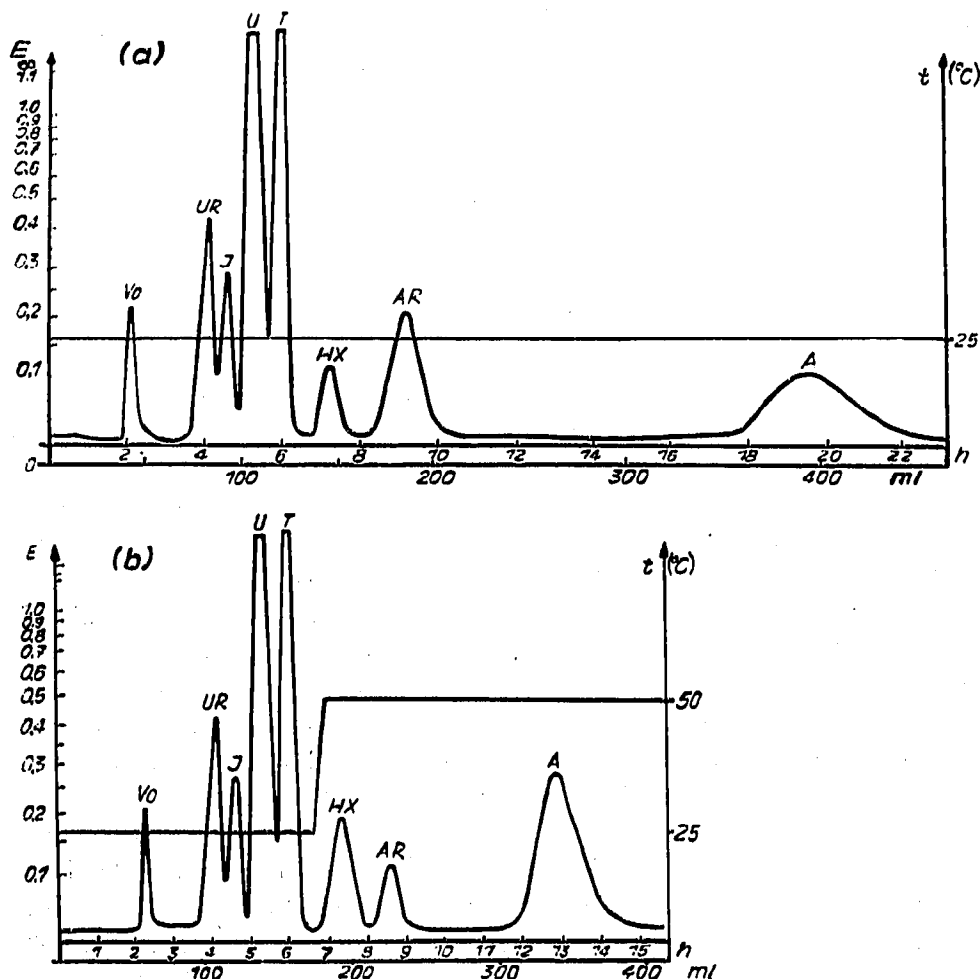


Fig. 6. Vergleich der Gelchromatographie bei konstanter (a) und verschiedener Temperatur (b). Benennung und Trennbedingungen wie in Fig. 5. A = Adenin.

Die aufgetretene Temperaturabhängigkeit lässt die gelchromatographische Trennung niedermolekularer Verbindungen als Adsorptionsvorgang erscheinen, der durch die substanzspezifischen Wechselwirkungen zum Gel bestimmt ist.

Bei Cellodextrinen werden diese spezifischen Wechselwirkungen zu Sephadex G-15 bzw. Bio-Gel P-2 erst bei grösserer Kettenlänge erkennbar¹². Der ΔG^0 -Beitrag eines Monomeren, nach der klassischen Formulierung von MARTIN²³ additiv den ΔG^0 -Beitrag einer Kette bildend, steigt mit der Kettenlänge von Cello- und Maltodextrinen schwach an, d.h. die Temperaturabhängigkeit und Adsorption nehmen zu^{11,12}. Die Natur dieses Adsorptionsvorganges könnte in der Ausbildung von π - oder Wasserstoffbrückenbindungen bestehen¹⁰⁻²¹. Die beobachtete Verminderung des Gesamtporenvolumens von Sephadex bei Temperaturerhöhung¹⁴ scheint nur bei Sephadex LH-20 den Trennvorgang erheblich zu beeinflussen.

Einfluss von Ionenstärke, Harnstoff, Dioxan, n-Propanol, pH-Wert und Vernetzungsgrad

Mit dem in Fig. 3 dargestellten Umlaufsystem wurden Bedingungen der Geladsorption untersucht.

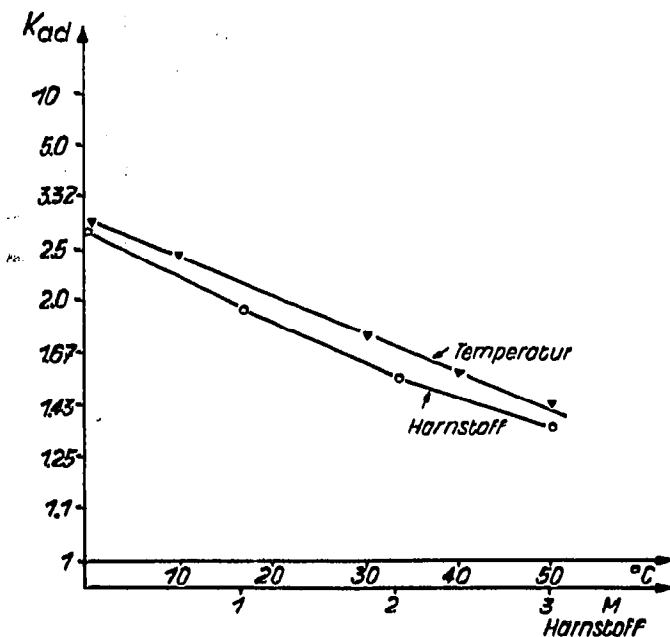


Fig. 7. Adsorptionsabnahme von Adenin an Sephadex G-10 bei steigender Temperatur oder Molaritätszunahme einer Harnstofflösung bei 1°; K_{ad} wurde aus der Dialysegeschwindigkeit ermittelt.

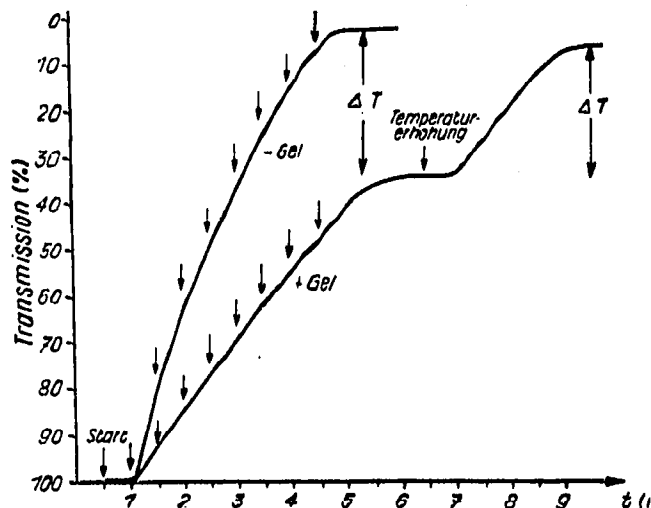


Fig. 8. Adsorptionskinetik von Adenin und Einfluss der Temperaturerhöhung auf 70°. Die Pfeile geben den Zeitpunkt der Zugabe von 100 µg Adenin an.

Die Adsorption von N-Heterozyklen an Sephadex scheint massgeblich durch die Protonendonatoreigenschaften dieser Stoffe bestimmt zu sein, weil die Anwesenheit von Heteroatomen in planaren oder nichtplanaren aromatischen Verbindungen zu einer Adsorption dieser Substanzen an Sephadex führt, die weit über der durch die Resonanzenergie voraussagbaren π -Bindung liegt¹⁹. Dadurch würden alle jene Milieufaktoren einschliesslich der mobilen Phase den Adsorptionsvorgang beeinflussen, die diese Art von Wechselwirkungen verändern.

Ionenstärke. Nimmt man die Adsorptionskinetik von Adenin an Sephadex G-10 in verschiedenen molaren NaCl-Lösungen auf, so steigt die Adsorption mit zunehmender Ionenstärke (Fig. 9). Extrem labil ist das System in deionisiertem Wasser. Hier hebt Ionenzugabe die Adsorption von Adenin am Gel schnell und vollständig auf.

Diese stärkere Substanz-Gel-Wechselwirkung unter Ioneneinfluss wurde mehrfach bei niedermolekularen Verbindungen beobachtet²⁴⁻²⁶. Das grössere Elutionsvolumen bei steigender Ionenstärke könnte die Summe aus erhöhter Wechselwirkung und besserer Penetration in das Gelinnere infolge geringerer Hydrathülle sein²⁴.

Ionenmangel führt dagegen zu jenen Ionenaustauscheffekten, die auf den geringen Carboxylgruppengehalt von Sephadex zurückgeführt werden²⁵.

Der Einfluss der Ionenstärke muss auch bei Peptidtrennungen berücksichtigt werden. AKERKAR beobachtete irreguläre Elution von Poly(-Asp-L-Lys) an Sephadex G-50 und erhöhte Elutionsvolumina bei steigender Ionenstärke²⁶. Sie könnten infolge aliphatischer Adsorption von Lysin entstehen²⁶.

Harnstoff, Dioxan, n-Propanol. Harnstoff senkt die Adsorption an Sephadex G-10^{10,27}. Mit steigender Molarität bindet das Gel weniger Adenin reversibel (Fig. 7

und 9). Offensichtlich tritt Harnstoff als universeller Protonenakzeptor bzw. -donator mit den adsorptionsfähigen Gruppen der Gelmatrix in Wechselwirkung. Die beträchtlich hohen K_{ad} -Werte von Harnstoff und Thioharnstoff an DVS-9 bzw. Sephadex G-25 und deren Abnahme mit steigender Temperatur zeigen, dass für diese Verbindungen Wechselwirkungen zum Gel energetisch begünstigt sind²². Der Harnstoffeinfluss wird bei 1° (Fig. 7) deutlicher als bei 25° (Fig. 9), weil die Wechselwirkungen von Harnstoff zum Gel hier grösser sind (nach Lit. 22 beträgt ΔH^0 für Harnstoff bei 25° -1020 cal/mol). In Anbetracht der Kenntnis über die Adsorption von Harnstoff an Dextrangelen²² erscheint seine Wirkung auf die Adenin-Gel-Wechselwirkung als Verdrängung im Sinne einer "Kapazitätsminderung".

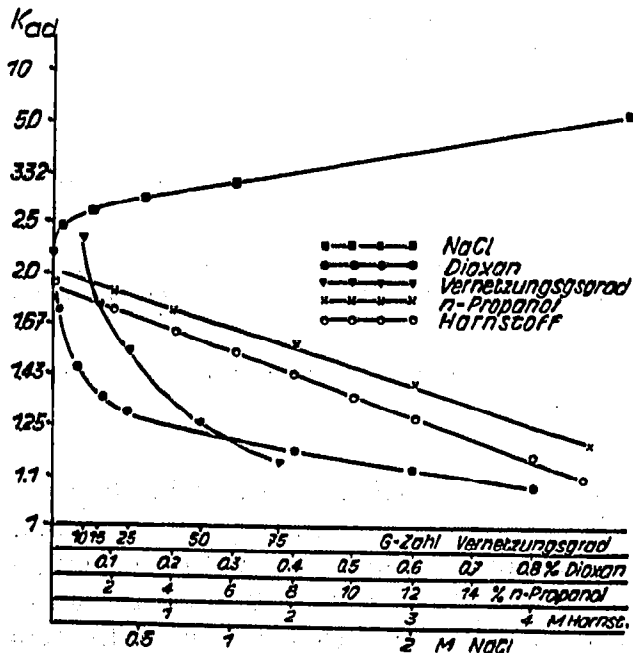


Fig. 9. Einfluss von Dioxan, *n*-Propanol, Harnstoff, Gelvernetzungsgrad und Ionenstärke auf die Adsorptionsfähigkeit von Adenin bei 25°; K_{ad} wurde mit dem Umlaufsystem ermittelt.

n-Propanol führt zur gleichen Adsorptionsabnahme wie Harnstoff, während Dioxan 20 × wirksamer ist. Mit 1 % Dioxan im Reaktionsansatz der Umlauftechnik kann eine vollständige Adsorptionsaufhebung erzielt werden ($K_{ad} = 1$).

Der Zusatz von Dioxan bedingt eine pH-Wertverschiebung, die noch nicht im Bereich veränderter Adsorption liegt. Wie die Temperatur hebt Dioxan die Substanz-Gel-Wechselwirkungen schnell und vollständig auf (Fig. 10). Subtrahiert man in der Messanordnung die dioxanbedingte Extinktionszunahme (Fig. 10 rechts oben), so erhält man bei Adsorptionsaufhebung durch Dioxan den gleichen Extinktionswert für eine bestimmte Adeninmenge wie bei der Kontrolle. Die Wechselwirkungen einer Substanz zum Gel bzw. ihr Lösungsgleichgewicht zur mobilen Phase werden offensichtlich durch den starken Protonenakzeptor Dioxan verringert bzw. verschoben.

Darüberhinaus vermindert Dioxan die Menge des Imbibitionswassers während der Quellung und erzeugt einen Verteilungsvorgang der Verbindungen zwischen (Gel + unpolares Lösungsmittel + Wasser) und der mobilen Phase (unpolares Lösungs-

mittel + Wasser)²⁸. Eine Anwendung kann die Dioxanwirkung in der gezielten Adsorptionserniedrigung für bestimmte Stoffe finden. Hierzu sind analog der Temperaturennutzung lineare Dioxangradienten u.ä. möglich.

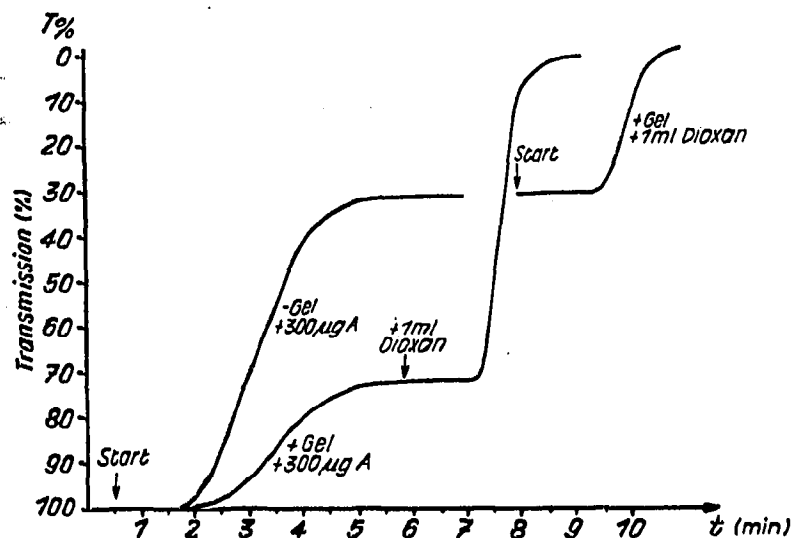


Fig. 10. Einfluss von 1.0 ml Dioxan auf die Adsorptionskinetik von Adenin (A) im Umlaufsystem.

pH-Wert. Der Dissoziationszustand einer Verbindung bestimmt massgeblich die Adsorption am Gel¹. Als schwache Base liegt Adenin in saurem Bereich weitgehend dissoziiert vor, und ihre Wechselwirkung mit den Ätherbrücken der Gelmatrix wird durch eine starke Hydrathülle verhindert. Im pH/ K_D -Diagramm ergeben sich charakteristische Dissoziationskurven, bei denen die Lote der Wendepunktstangenten den pK_a -Wert der Verbindung anzeigen. Auf diese Weise ermittelten BROOK UND HOUSLEY^{17,20} für Nukleinsäurebausteine, Phenole, Anilinverbindungen und Benzoesäuren pH-abhängige Elutionskonstanten, deren pH/ K_D -Auftragung die Ermittlung von pK_a -Werten gestattete^{17,20}. Mit Hilfe der Umlauftechnik (Fig. 3) ermittelten wir die Adsorptionsintensität als K_{ad} -Wert in ihrer pH-Abhängigkeit und fanden einen pK_a -Wert für Adenin von 4.3 (Fig. 11) (Literatur, 4.2). Die Kurve gleicht weitgehend der von BROOK mitgeteilten²⁰. Die mehrfach beschriebene Beziehung zwischen pH-Wert und Gelchromatographiekonstante erhält mit dem von BROOK diskutierten Zusammenhang zum Dissoziationszustand der Verbindung eine Erklärung²⁰. Unverständlich bleiben dann die hohen K_D -Werte im sauren pH-Bereich für Adenin und Cytosin von KHYM UND UZIEL³⁰.

SWEETMAN UND NYHAM²¹ zeigten mit Hilfe von Korrelationskoeffizienten zwischen pK_a - und $\log V_e^0$ -Werten, dass eine hohe Elektronendichte am Ringstickstoff von Purinen in der Lactimform (z.B. Adenin) eine Adsorptionsvergrößerung bewirkt, weil die ungepaarten Elektronen des Stickstoffs besser zur H-Brückenbildung mit den OH-Gruppen von Sephadex befähigt sind. Verbindungen in der Lactamform (z.B. Xanthin, Guanin) adsorbieren dagegen bei hoher Elektronendichte am Ringstickstoff schwächer, weil der Wasserstoff des Lactamstickstoffs, sonst H-Brücken zu Äthergruppen der Gelmatrix von Sephadex bildend, fester gebunden ist²¹. Dies wird durch die pH/ K_D -Auftragung für Guanin bestätigt²⁰.

In Anbetracht der Abnahme der $\log V_e^0$ -Werte von Purinen mit steigender

Löslichkeit²¹ müsste bei der Beurteilung des pH-Einflusses auf die Gel-Substanz-Wechselwirkungen auch die mobile Phase berücksichtigt werden.

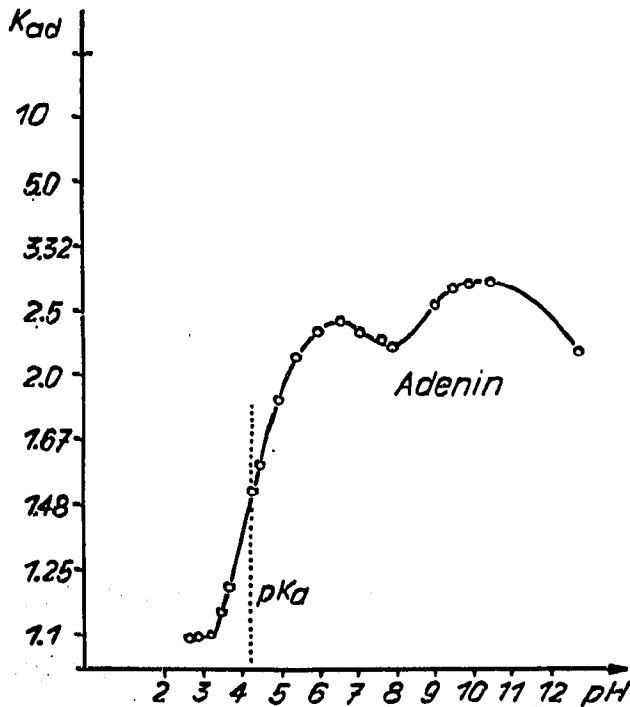


Fig. 11. pH-Abhängigkeit der Adsorption von Adenin (als K_{ad} -Wert), in der Umlauftechnik gemessen.

Um durch Adsorptionserhöhung für niedermolekulare Verbindungen einen grösseren Arbeitsbereich bei der Gelchromatographie zu schaffen, erscheint es zweckmässig, ihre Trennung im Bereich geringer Dissoziation durchzuführen¹.

Vernetzungsgrad. Die Adsorption an Sephadex nimmt mit zunehmender Vernetzung ab, da bei Verwendung gleicher Gelvolumina der Anteil an Gelmatrix geringer wird (Fig. 9). Man könnte diesen Umstand als eine verminderte Kapazität auffassen, jedoch scheint uns die Adsorption auch an eine bestimmte strukturelle Zuordnung der vernetzten Glucoseketten, d.h. an eine genügende Dichte des Maschenwerkes, gebunden zu sein.

Die Tendenz der Adsorptionsabnahme bei fallendem Vernetzungsgrad entspricht der Abnahme des Adeninaustausches in der Gleichgewichtsdialyse von Adenin zwischen Puffer und fallender Sephadex G-10-Konzentration²¹.

Während bei der Gleichgewichtsdialyse die zu erwartende Linearität von Adeninaustausch und Polymerkonzentration auftritt²¹, deutet die überproportionale Adsorptionsabnahme bei fallendem Vernetzungsgrad in Fig. 9 den Anteil des Raumnetzes als mechanische Hinderung an.

ABKÜRZUNGEN

Folgende Abkürzungen wurden verwendet:

c_m = Konzentration einer Verbindung in der mobilen Phase

c_s = Konzentration einer Verbindung in der stationären Phase

DS = Dialyseschlauch

DVS = Dextrangel, das durch Divinylsulfon quervernetzt ist

ϵ = molarer Absorptionskoeffizient

ΔG^0 = freie Energie

ΔH^0 = Enthalpie

K_{ad} = Adsorptionswert (vgl. S. 137 und Fig. 2)

K_D = Gelfiltrationskonstante =

$$\frac{V_e - V_0}{V_i} = \frac{V_0}{V_i} \cdot V_e^0$$

R = Gaskonstante

R_F = Chromatographiekonstante; Verhältnis aus den Wanderungstrecken von Substanz und Laufmittelfront

ΔS^0 = Entropie

T = absolute Temperatur

ΔT = Transmissionsdifferenz

v = Geschwindigkeit des Flüssigkeitstransportes bei der Umlauftechnik (Fig. 3)

V_e = Elutionsvolumen einer Substanz

V_e^0 = verwendete Elutionskonstante =

$$\frac{V_e - V_0}{V_0} = \frac{1}{R_F} - 1$$

V_i = inneres Volumen der Gelkörner

V_0 = Ausschlussvolumen

DANK

Für die Hilfe bei der Durchführung der Versuche danken wir Frau B. SAUER.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Adsorptionschromatographie an Sephadex kann zur Trennung von Purinen und Pyrimidinen dienen¹⁻⁸. Die Trennung wird durch eine Anzahl chromatographischer Bedingungen beeinflusst. Diese Arbeit beschreibt den Einfluss der Temperatur, der Ionenstärke, des pH-Wertes, des Vernetzungsgrades und der Konzentrationen von *n*-Propanol, Dioxan und Harnstoff auf das Adsorptionsverhalten der Verbindungen.

Die Adsorptionsintensität nimmt mit steigender Temperatur ab. Diese Beziehung kann als Mass der Gel-Substanz-Wechselwirkungen dienen. Enthalpiewerte (ΔH^0) für Hypoxanthin und Adenosin von -2.35 bzw. -1.92 kcal/mol lassen die Existenz von Wasserstoffbrücken zwischen Substanz und Gel als möglich erscheinen. Für Purin- und Pyrimidinverbindungen sind infolge verschiedener ΔH^0 -Werte verschiedene Trennursachen anzunehmen. Für die meisten der hier untersuchten Verbindungen ist das basische N-Atom des Heterozyklus Adsorptionszentrum.

Dioxan, *n*-Propanol und Harnstoff senken die Adsorption, während sie mit der Ionenstärke zunimmt. Die Elutionswerte der Verbindungen hängen von ihrem Dissoziationszustand ab.

Die Adsorptionschromatographie von heterozyklischen Verbindungen an Sephadexgelen ist eine geeignete Technik für die Trennung von Verbindungen synthetischer oder biologischer Herkunft. Die Beziehung zwischen Struktur und gel-chromatographischem Verhalten von Pyrimidinen wurde in einer anderen Arbeit ausgeführt¹⁸.

LITERATUR

- 1 C. WASTERACK, *Pharmazie*, 27 (1972) 67.
- 2 G. GORBACH UND J. HENKE, *J. Chromatogr.*, 37 (1968) 225.
- 3 T. HOHN UND W. POLLMANN, *Z. Naturforsch.*, 18b (1963) 919.
- 4 T. HOHN UND H. SCHALLER, *Biochim. Biophys. Acta*, 138 (1967) 466.
- 5 L. SWEETMAN UND W. L. NYHAM, *J. Chromatogr.*, 32 (1968) 662.
- 6 R. BROWN, *Biochim. Biophys. Acta*, 142 (1967) 267.
- 7 C. WASTERACK, *Pharmazie*, 25 (1970) 748.
- 8 J. REIFER, K. STRZALKA UND E. MACHOWICZ, *Bull. Acad. Pol. Sci., Ser. Sci. Biol.*, 19 (1971) 1.
- 9 S. HJERTÉN, *J. Chromatogr.*, 50 (1970) 189.
- 10 H. DETERMANN UND I. WALTER, *Nature*, 219 (1968) 604.
- 11 H. DELLWEG, M. JOHN UND G. TRENEL, *J. Chromatogr.*, 57 (1971) 89.
- 12 W. BROWN, *J. Chromatogr.*, 52 (1970) 273.
- 13 W. BROWN, *J. Chromatogr.*, 59 (1971) 335.
- 14 K. LAMPERT UND H. DETERMANN, *J. Chromatogr.*, 56 (1971) 140.
- 15 A. J. W. BROOK UND K. C. MUNDAY, *J. Chromatogr.*, 51 (1970) 307.
- 16 A. J. W. BROOK UND K. C. MUNDAY, *J. Chromatogr.*, 47 (1970) 1.
- 17 A. J. W. BROOK UND S. HOUSLEY, *J. Chromatogr.*, 41 (1969) 200; *J. Chromatogr.*, 42 (1969) 112.
- 18 C. WASTERACK, *J. Chromatogr.*, 71 (1972) 67.
- 19 C. A. STREULI, *J. Chromatogr.*, 56 (1971) 219.
- 20 C. A. STREULI, *J. Chromatogr.*, 56 (1971) 225.
- 21 L. SWEETMAN UND W. L. NYHAM, *J. Chromatogr.*, 59 (1971) 349.
- 22 N. V. B. MARSDEN, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 125 (1965) 428.
- 23 A. J. MARTIN, *Biochem. Soc. Symp. (Cambridge, Great Britain)*, 3 (1950) 4.
- 24 N. YOZA UND S. OHASHI, *J. Chromatogr.*, 41 (1969) 429.
- 25 H. DETERMANN, *Gelchromatographie*, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1967.
- 26 A. S. AKERKAR, *J. Chromatogr.*, 51 (1970) 543.
- 27 B. GELOTTE UND J. PORATH, in E. HEFTMANN (Editor), *Chromatography*, Reinhold, New York, 1967, p. 343.
- 28 B. BUSH, T. E. L. JONES UND D. THORBURN BURNS, *J. Chromatogr.*, 49 (1970) 448.
- 29 A. J. W. BROOK, *J. Chromatogr.*, 47 (1970) 100.
- 30 J. X. KHYM UND M. UZIEL, *J. Chromatogr.*, 47 (1970) 9.

J. Chromatogr., 73 (1972) 135-150