

CHROM. 6433

## Note

### Säulenchromatographie von Nukleotiden am Anionenaustauscher DEAE-Sephadex A-25

Die Trennung komplexer Nukleotidgemische erfolgt vorwiegend durch Ionenaustausch-Chromatographie. Neben den Anionenaustauschern auf Cellulose- und Polystyren-Basis wurden in letzter Zeit auch Polyacrylamid-Gel (Bio-Gel DM 2)<sup>1</sup> und die Polydextran-Gele DEAE-Sephadex A-25<sup>2-12</sup> bzw. QAE-Sephadex A-25<sup>13</sup> zur Trennung von Mononukleotiden (Reinsubstanzen und Gewebesnukleotide) eingesetzt.

Diese Austauscher sind oft einem speziellen Nutzungsbereich angepasst oder besitzen für komplexe Gemische unzureichendes Trennvermögen.

In dieser Mitteilung wird eine schnelle und einfache Methode für die Bestimmung von Nukleotiden an dem Anionenaustauscher DEAE-Sephadex A-25 mit einem LiCl-Lineargradienten beschrieben. Die Dünnschichtchromatographie der entsalzten Substanzproben auf PEI-Cellulose (mit Polyäthylenimin imprägnierte Cellulose) und MN 300 UV<sub>254</sub>-Cellulose (Cellulose mit Fluoreszenzindikator) erweitert den Anwendungsbereich des säulenchromatographischen Verfahrens.

#### Material und Methoden

Die Adsorbentien und Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen: DEAE-Sephadex A-25 (Pharmacia, Uppsala, Schweden); Cellulosepulver MN 300 UV<sub>254</sub> (Macherey, Nagel & Co., Düren, B.R.D.); Cellulose-Ionenaustauscher PEI-TLC (Serva, Heidelberg, B.R.D.); Nukleotide, Nukleotidzucker, Nukleoside (C. F. Boehringer, Mannheim, B.R.D.; Serva, Heidelberg, B.R.D.; Merck, Berlin, (West); Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo., U.S.A.; Calbiochem, Luzern, Schweiz; Reanal, Budapest, Ungarn; VEB Arzneimittelwerk, Dresden, D.D.R.).

Der Anionenaustauscher DEAE-Sephadex A-25 (Kapazität  $3.5 \pm 0.5$  mÄquiv./g, Partikelgrösse 40-120  $\mu$ ) wurde zur Äquilibrierung 2 h mit 100 ml 0.07 M LiCl-Lösung geführt, nach dem Füllen der Säule mit 50 ml 0.07 M LiCl-Lösung gewaschen und mit aqua bidest. gespült (42 ml/h). Die Regeneration des Austauschers erfolgte mit 0.5 N NaOH.

Durchschnittlich wurden 100  $\mu$ g der Reinsubstanzen chromatographiert. Im Falle der Nukleosid-di- und -triphosphate wurden manchmal grössere Substanzmengen verwendet, da diese Proben teilweise einen geringen Gehalt an Mono- bzw. Mono- und Diphosphaten der Nukleoside aufwiesen (Reinheitsprüfung an DEAE-Cellulose<sup>14-16</sup>).

Die Nukleotidgemische wurden in einer Sephadex-Säule Kg/60 (60  $\times$  0.9 cm) mit Wassermanteltemperierung bei 20° chromatographiert. Die Elution erfolgte mit einem Lineargradienten aus 500 ml 0.3 M LiCl/500 ml aqua bidest. und einer Durchflussgeschwindigkeit von 42 ml/h (LKB Perpexpumpe).

Die Transmission wurde im Durchflussphotometer Uvicord II (LKB) bei 254

nm gemessen und die Fraktionen zu 8-9 ml im Uvicord-Fraktionssammler (LKB) aufgefangen.

Die Entsalzung der Proben fand direkt nach dem Auftragen auf die Dünnschichten durch Einlegen der Platten in Methanol statt<sup>17</sup>. Vorteilhafter für die Entfernung grösserer LiCl-Konzentrationen ist die Entsalzung der Fraktionen mit ZnSO<sub>4</sub> (refs. 18 und 19).

TABELLE I

ELUTIONSVOLUMINA DER GETRENNTEN VERBINDUNGEN<sup>a</sup>

Verbindung	V <sub>e</sub> (ml)
Cytidin	46
Cytidin-5'-monophosphat	292
Cytidin-5'-diphosphat	404
Cytidin-5'-triphosphat	460
Uridin	218
Uridin-5'-monophosphat	472
Uridin-5'-diphosphat	536
Uridin-5'-triphosphat	580
Uridin-5'-diphosphat-glucose	480
Thymidin	353
Thymidin-5'-monophosphat	478
Thymidin-5'-diphosphat	536
Thymidin-5'-triphosphat	600
Adenosin	107
Adenosin-5'-monophosphat	376
Adenosin-5'-diphosphat	460
Adenosin-5'-triphosphat	514
Adenosin-5'-diphosphat-glucose	357
Adenosin-5'-diphosphat-ribose	339
Guanosin	354
Guanosin-5'-monophosphat	570
Guanosin-5'-diphosphat	620
Guanosin-5'-triphosphat	667
Inosin	353
Inosin-5'-monophosphat	591
Inosin-5'-diphosphat	649
Inosin-5'-triphosphat	706
Xanthosin	350
Xanthosin-5'-monophosphat	605
Nikotinamid-adenin-dinukleotid	174
Nikotinamid-adenin-dinukleotid reduziert	342
Nikotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat	336
Nikotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat reduziert	462
Riboflavin	224
Flavin-mononukleotid	436
Flavin-adenin-dinukleotid	441

<sup>a</sup> Mittelwerte aus fünf bis zehn Bestimmungen.

Die Identifizierung der Verbindungen erfolgte anhand ihrer Absorptionsspektren sowie dünnschichtchromatographisch auf PEI-Cellulose<sup>17,20-23</sup> und MN 300 UV<sub>254</sub>-Cellulose. Zur Herstellung der MN 300 UV<sub>254</sub>-Cellulose-Schichten wurden 8,4 g Cellulose in 28 ml Methanol und 21 ml Wasser homogenisiert und auf Glasplatten (20 × 20 cm) gestrichen (Schichtdicke 250 µm).

Die Lokalisierung der Substanzen auf den Dünnschichtchromatogrammen erfolgte im UV-Licht bei 254 nm mit einer Quarzlampe "Fluotest Universal", Original Hanau, B.R.D.

### Ergebnisse und Diskussion

Die ermittelten Elutionsvolumina von neun 5'-Pyrimidin-, zehn 5'-Purin-, vier Pyridin- und zwei Flavin-Nukleotiden sowie Riboflavin, drei Nukleotidzuckern und sieben Nucleosiden sind in Tabelle I zusammengestellt. Der relative Fehler der  $V_e$ -Werte lag bei 2-4%. Die Werte sind auch ohne Pufferung reproduzierbar.

Es ergab sich für Nucleotide gleichen Phosphatgehaltes stets die gleiche Elutionsreihenfolge: CMP < AMP < UMP < GMP (Fig. 1).

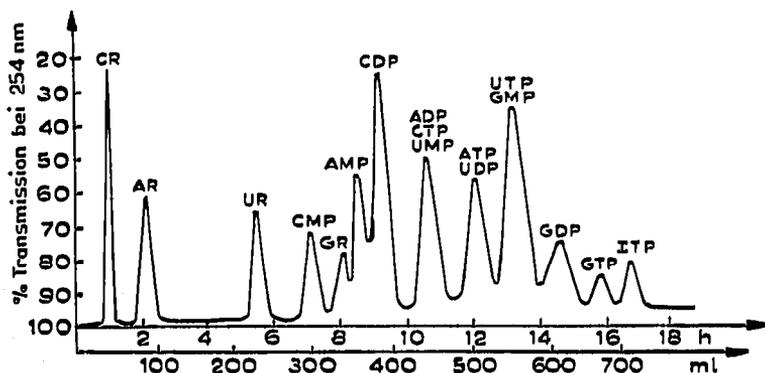


Fig. 1. Trennung von 5'-Nucleotiden und Nucleosiden an DEAE-Sephadex A-25. Abkürzungen: AMP = Adenosin-5'-monophosphat; ADP = Adenosin-5'-diphosphat; ATP = Adenosin-5'-triphosphat; AR = Adenosin; CMP = Cytidin-5'-monophosphat; CDP = Cytidin-5'-diphosphat; CTP = Cytidin-5'-triphosphat; CR = Cytidin; GMP = Guanosin-5'-monophosphat; GDP = Guanosin-5'-diphosphat; GTP = Guanosin-5'-triphosphat; GR = Guanosin; ITP = Inosin-5'-triphosphat; UMP = Uridin-5'-monophosphat; UDP = Uridin-5'-diphosphat; UTP = Uridin-5'-triphosphat; UR = Uridin.

Die Gesamtanalysenzeit betrug 17 h. Sämtliche mit der Säulenchromatographie nicht getrennte Verbindungen (Tabelle I, Fig. 1) konnten mittels ein- und zwei-dimensionaler Gradientenentwicklung auf PEI-Cellulose-Schichten<sup>17,20-23</sup> und durch eindimensionale Cochromatographie auf MN 300 UV<sub>254</sub>-Cellulose in verschiedenen mobilen Phasen<sup>24-27</sup> identifiziert werden.

Die Vorteile der Methode bestehen im einfachen apparativen Aufbau, einem einstufigen Lineargradienten unter Verwendung der neutralen Elektrolytlösung LiCl in niedriger Konzentration und damit der Trennung unter milden Bedingungen. Vorteilhaft sind weiterhin die geringen Elutionsvolumina für die Verbindungen sowie die Entsalzung nach der Fraktionierung<sup>17-19</sup>. Die Durchflussgeschwindigkeit von 42 ml/h und die LiCl-Konzentration von 0,3 M liefern nach den Untersuchungen einen optimalen Austauschvorgang.

Die Methode erlaubt eine schnelle Erfassung der qualitativen Zusammensetzung von Nukleotidgemischen synthetischer und biologischer Herkunft. Die quantitative Anwendung auf das biologische Objekt wird zur Zeit erarbeitet.

*Sektion Biowissenschaften der  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,  
Fachbereich Biochemie (Biologische Abteilung),  
Neuerwerk 1, 402 Halle/Saale (D.D.R.)*

GUDRUN KRAUSS  
CLAUS WASTERNAK  
HORST REINBOHE

- 1 R. K. FUJIMURA, *Anal. Biochem.*, 36 (1970) 62.
- 2 R. W. HOLLEY, J. APGAR, S. H. MERRILL UND P. I. ZUBKOFF, *J. Amer. Chem. Soc.*, 83 (1961) 4861.
- 3 TH. WIELAND, G. LÜBEN UND H. DETERMANN, *Experientia*, 18 (1962) 430.
- 4 T. HASHIZUME UND Y. SASAKI, *Agr. Biol. Chem.*, 27 (1963) 881.
- 5 P. A. ÜCKERMAN, *Biochim. Biophys. Acta*, 74 (1963) 588.
- 6 I. C. CALDWELL, *Fed. Proc.*, 26 (1967) 812.
- 7 I. C. CALDWELL, F. J. HENDERSON, F. M. ROSENBLUM, W. N. KELLER UND I. E. SEEGMILLER *J. Biochem.* 243 (1968) 1166.
- 8 I. C. CALDWELL, *J. Chromatogr.*, 44 (1969) 331.
- 9 D. F. CUMMING, *Biochem. J.*, 116 (1970) 189.
- 10 T. ROSETT, J. G. SMITH, JR., J. MATSUO, P. A. BAILEY, D. B. SMITH UND S. SURAKIAT, *J. Chromatogr.* 49 (1970) 308.
- 11 I. REIFER, K. STRZALKA UND E. MACHOWICZ, *Bull. Acad. Pol. Sci., Ser. Sci. Biol.*, 19 (1971) 1.
- 12 I. REIFER UND K. STRZALKA, *Bull. Acad. Pol. Sci., Ser. Sci. Biol.*, 20 (1972) 75.
- 13 D. G. KAUFMANN UND J. W. GRISHAM, *J. Chromatogr.*, 57 (1971) 275.
- 14 K. RANDEPATH, *Angew. Chem.*, 74 (1962) 484.
- 15 K. RANDEPATH, *Angew. Chem.*, 74 (1962) 780.
- 16 K. RANDEPATH, *Biochim. Biophys. Acta*, 61 (1962) 852.
- 17 K. RANDEPATH UND E. RANDEPATH, *J. Chromatogr.*, 16 (1964) 111.
- 18 K. DANECK, G. WEIMANN UND F. CRAMER, *Experientia*, 21 (1965) 1.
- 19 G. KRAUSS, unveröffentlicht.
- 20 E. RANDEPATH UND K. RANDEPATH, *J. Chromatogr.*, 16 (1964) 126.
- 21 K. RANDEPATH, *Dünnschicht-Chromatographie*, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr., 1965, S. 236.
- 22 E. RANDEPATH UND K. RANDEPATH, *Anal. Biochem.*, 12 (1965) 83.
- 23 K. RANDEPATH UND E. RANDEPATH, *Anal. Biochem.*, 13 (1965) 575.
- 24 R. MARKHAM UND J. D. SMITH, *Biochem. J.*, 49 (1951) 401.
- 25 *Reference Guide Catalog No. 102*, Pabst Laboratories Biochemicals, Inc., Milwaukee, Wisc., 1970, S. 11.
- 26 K. RANDEPATH UND H. STRUCK, *J. Chromatogr.*, 6 (1961) 365.
- 27 G. PATAKI, *J. Chromatogr.*, 29 (1967) 126.

Eingegangen am 18. Juli 1972; geänderte Fassung am 19. Oktober 1972