

ording to their charge/mass ratio. The R values of some hydrazides relative to acethydrazide, as the picryl derivatives formed *in situ*, appear in Table I (system 2).

This two-dimensional system fails to separate the diastereoisomers, compounds 9 and 10 (Table I). They are, however, well resolved by thin-layer chromatography on Silicagel G*, adsorbent thickness 250 μ , using benzene-ethanol (2:1) as developing solvent. This system is also suitable for many other hydrazides (Table I, system 3). The compounds are applied as solutions (1 μ l of 0.02 M) in ethanol, and detected with picryl chloride. This technique separates oleic and palmitic hydrazides (Table I, compounds 12 and 13) which are too insoluble for electrophoresis, and may be useful more generally for separating hydrazides of higher fatty acids.

Methods of preparation and properties of new compounds will be reported elsewhere.

It is a pleasure to thank Mrs. PAMELA RICHES for skilful assistance.

Twyford Laboratories**, London (Great Britain)

D. W. RUSSELL

- 1 V. A. GREULACH AND J. G. HAESLOP, *Anal. Chem.*, 33 (1961) 1446.
- 2 J. ASSELINEAU, *Bull. Soc. Chim. France*, (1952) 884.
- 3 K. SATAKE AND T. SEKI, *J. Japan. Chem.*, 4 (1950) 557; *C.A.*, 45 (1951) 4604.
- 4 R. L. HINMAN, *Anal. Chim. Acta*, 15 (1956) 125.
- 5 F. H. POLLARD AND A. J. BANISTER, *Anal. Chim. Acta*, 14 (1956) 70.

Received December 14th, 1964

* E. Merck, A.G., Darmstadt (Germany).

** Twyford Abbey Road, London, N.W.10.

J. Chromatog., 19 (1965) 199-201

Hochspannungselektrophorese von Adenin- und Inosinnucleotiden auf Cellulose-Schichten

Unter den säurelöslichen Verbindungen des Muskels finden sich die 5'-Mono-, Di- und Trinucleotide des Adenins und Inosins. Letztere werden durch enzymatische Desaminierung von Adeninnucleotiden vor allem post mortem im Muskel gebildet^{1,2}. Neben zahlreichen chromatographischen und elektrophoretischen Verfahren auf Papier^{3,4} wurden in der letzten Zeit Trennungen von Nucleotiden, Nucleosiden und den zugrundeliegenden Basen durch Dünnschichtchromatographie auf Schichten von normaler⁵ und modifizierter⁶ Cellulose bekannt. KECK UND HAGEN⁷ wandten bei ihrer kombinierten Methode zur Analyse von DNA-Bestandteilen die Elektrophorese auf Cellulose-Schichten an. Wir setzten dieses Verfahren unabhängig davon für die Auftrennung der oben genannten Adenin- und Inosin-Nucleotide ein. Es erwies sich als überlegen gegenüber den bisher bekannten Trennungen von ATP*, ADP* und IMP* auf Papier, die mit beträchtlichen Schwierigkeiten, vor allem Zeit-

* Folgende Abkürzungen werden verwendet: AMP, ADP, ATP = Adenosin-mono-, di- und triphosphat; IMP, IDP, ITP = Inosin-mono-, di- und triphosphat.

J. Chromatog., 19 (1965) 201-203

aufwand bei Chromatographie⁸⁻¹⁰, verbunden sind. Die 6 Nucleotide konnten in etwa 2 Stunden völlig getrennt werden.

Als Schichtmaterial wurden die Cellulose-Pulver (Macherey, Nagel u.Co., Düren) MN 300, MN 300 HR und ein von uns mit 8-Hydroxy-chinolin, Äthanol-Ameisensäure und Wasser gereinigtes Pulver MN 300 erprobt. Die Reinigung der Cellulose war vorteilhaft, da hierbei selbst nach mehrstündiger Elektrophorese kleine und scharf umgrenzte Flecken resultieren. Zudem ist die Beweglichkeit der Substanzen etwas höher als bei nicht vorbehandelten Pulvern. Die Glasplatten hatten die Standardgröße 200 × 200 mm; besonders gute Trennungen ergaben sich mit 200 × 400 mm grossen Platten. Die Schichten wurden in der von der Dünnschicht-Chromatographie her bekannten Weise aufgetragen (Streichgerät der Firma Desaga, Heidelberg). Es ist wichtig, mit Schichtdicken von mindestens 0.5 mm zu arbeiten, da bei

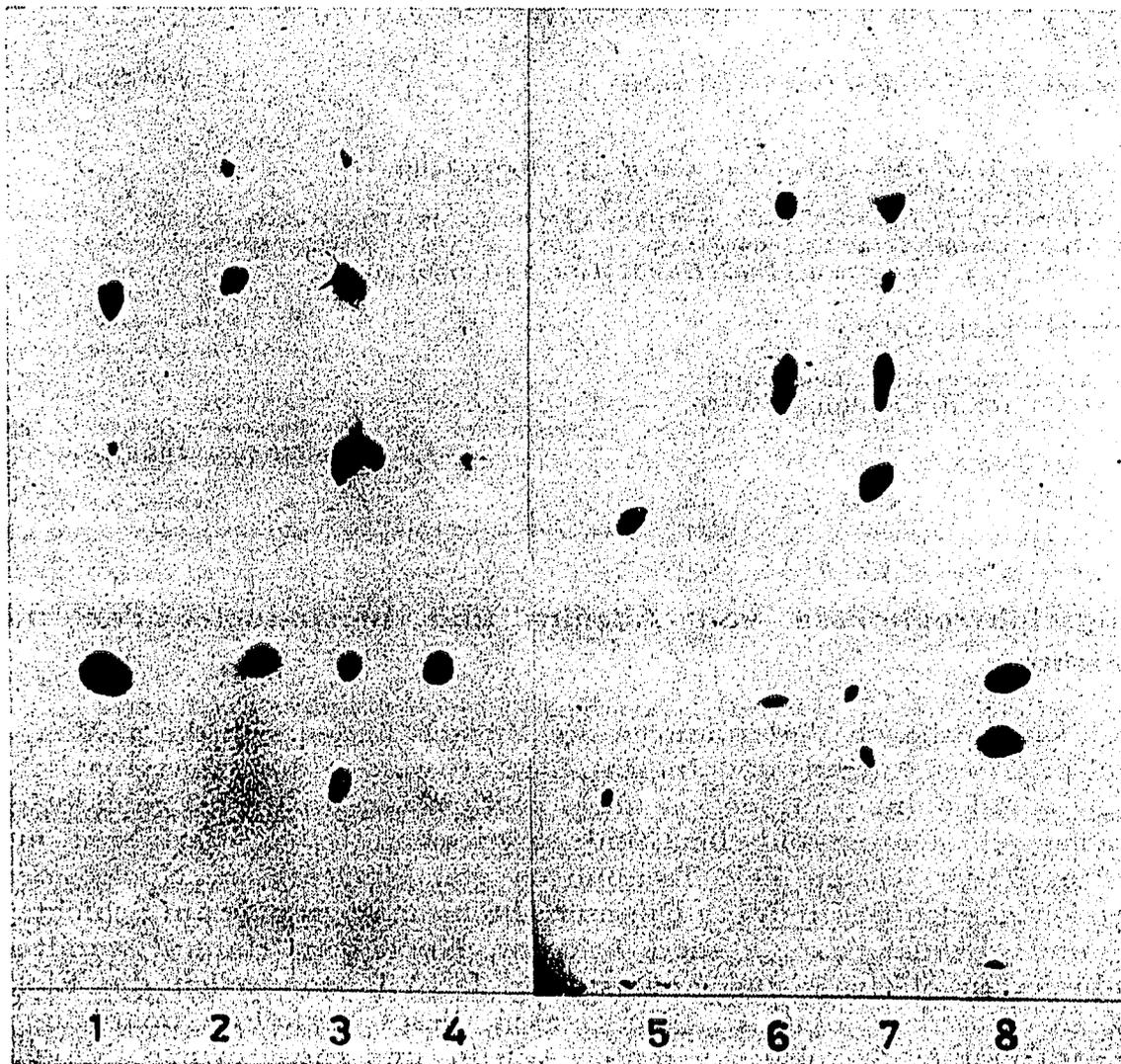


Fig. 1. Trennung der 5'-Adenin- und Inosin-Nucleotide durch Hochspannungselektrophorese auf einer Cellulose-Schicht 200 × 400 mm (U.V. Photographie); Citrat-Puffer, 0.05 M, Spuren 1-4 bei pH 4.8, Spuren 5-8 bei pH 5.1; 30 V/cm. (1) von unten nach oben IMP, ADP, ATP; (2) IMP, IDP, ITP; (3) Gemisch von (1) und (2), AMP (ATP und IDP nicht getrennt); (4) IMP, ADP; (5) AMP, ADP; (6) IMP, IDP, ITP; (7) AMP, IMP, ADP, IDP, ATP, ITP; (8) AMP, IMP.

dünnen Schichten die Trennung gestört wird. Nach Auftragen der Substanzen wird die Cellulose-Schicht mit der entsprechenden Pufferlösung aus einem Sprührohr bis zu einer gleichmässigen nicht zu starken Durchtränkung besprüht.

Für die Hochspannungselektrophorese wurde das Gerät "Pherograph-Original-Frankfurt" nach Wieland und Pfeleiderer verwendet (Fa. Hormuth und Vetter, Heidelberg-Wiesloch). Die Platte wird auf die Kühlkammer gelegt; die Elektroden werden in der üblichen Weise angeschlossen. Wir erprobten einige Elektrolyt-Lösungen, die bei der Papierelektrophorese von Nucleotiden angewandt werden. Die besten Ergebnisse wurden mit 0.05 M Citrat-Puffer erzielt (vergl.¹¹). Die Trennung war stark pH-abhängig und es zeigte sich, dass die 6 Nucleotide bei einem pH von 5.1 getrennt werden können. Die angelegte Spannung betrug 2000–2500 V (etwa 30 V/cm); die Stromstärke war hierbei 30–40 mA. Unter diesen Bedingungen war für die 200 mm-Platten eine Laufzeit von 60 min nötig, für die 400 mm-Platten eine Zeit von etwa 120 min.

In Fig. 1 ist die Trennung eines Nucleotidgemisches auf der Cellulose-Schicht 200 × 400 mm wiedergegeben. Die Adenin- und Inosin-Nucleotide haben in dem Citrat-Puffer pH 5.1 verschiedene Beweglichkeit und werden voneinander getrennt. Es ist bemerkenswert, dass die Flecken bei allen diesen Versuchen sehr viel kompakter erscheinen als bei der Papier-Elektrophorese unter gleichen Bedingungen. Aus diesem Grunde ist es möglich, Mengen von etwa 10^{-3} bis $5 \cdot 10^{-3}$ μ Mol der Nucleotide unter der U.V. Lampe nachzuweisen. Zur Dokumentation können die Flecken entweder auf Transparentpapier nachgezeichnet werden oder man fotografiert die Substanzen unter dem U.V. Licht (Dokumentenfilm, Sperrfilter).

Das hier beschriebene Verfahren soll angewandt werden bei Untersuchungen über den Abbau von Adenin-Nucleotiden in Fleisch, das unter verschiedenen Bedingungen post mortem aufbewahrt wird.

Institut für Chemie und Physik, Bundesanstalt für
Fleischforschung, Kulmbach/Ofr. (Deutschland)*

A. SCHWEIGER**
H. GÜNTHER

- 1 W. A. ENGELHARDT, *Proc. 2nd Intern. Congr. Biochem., Paris, 1952.*
- 2 H. L. WEBSTER, *Nature*, 172 (1953) 453.
- 3 E. LEDERER UND M. LEDERER, *Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, 1957, S. 373.
- 4 M. LEDERER, *Paper Electrophoresis*, Elsevier, Amsterdam, 1957, S. 131.
- 5 H. K. MANGOLD in E. STAHL, *Dünnschichtchromatographie*, Springer, Berlin, 1962, S. 452; Macheroy, Nagel und Co., Düren, *Literaturzusammenfassung*, 1964, S. 26.
- 6 K. RANDEATH, *Angew. Chem.*, 74 (1962) 484;
K. RANDEATH UND E. RANDEATH, *J. Chromatog.*, 10 (1963) 509.
- 7 K. KECK UND U. HAGEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 87 (1964) 685.
- 8 J. R. BENDALL UND C. L. DAVEY, *Biochim. Biophys. Acta*, 26 (1957) 93.
- 9 D. F. CAIN, M. J. KUSHMERICK UND R. E. DAVIES, *Biochim. Biophys. Acta*, 74 (1963) 735.
- 10 H. M. KLOUWEN, *J. Chromatog.*, 7 (1962) 216.
- 11 Z. STRANSKY, *J. Chromatog.*, 10 (1963) 456.

Eingegangen den 21. Dezember 1964

* Direktor: Prof. Dr. R. HAMM.

** Gegenwärtige Anschrift: Max-Planck-Institut für Eiweiss- u. Lederforschung, München 15, Schillerstr. 42.