Wellenlänge [m μ]	Dimerisierung von TpT [%]	Dimerenspaltung von T _D [%]
253	1,3	1,8
265	2,3	1,0
270	2,5	0,7
276	2,4	0,5
280	1,8	0,3
289	0,7	0,1
302	0,1	

Tab. 1. Dimerisierung von TpT und Spaltung von T_D mit UV-Licht verschiedener Wellenlänge. Strahlenquelle, eingestrahle Energie und Konzentrationen siehe Methodik. Das Absinken der Extinktion der TpT-Lösung bei 267 m μ und das Ansteigen der Extinktion der T_D-Lösung bei 264 m μ wurde als Maß für die Dimerisierung bzw. Dimeren-Spaltung verwendet.

spektrums der Dimerisierung scheint demnach im Vergleich zum UV-Absorptionsspektrum von TpT (267 m μ) etwas nach längeren Wellenlängen verschoben. Der Grund für diese Verschiebung liegt in der Lage des

Gleichgewichtes $[\text{Thymin}] \cdot [\text{Thymin}] \rightleftharpoons [\text{Thymin-Dimer}]$; bei kürzeren Wellenlängen überwiegt, wie aus der Tab. ersichtlich ist, die Spaltung des Thymin-Dimeren⁶.

Vergleicht man das vorliegende Aktionsspektrum der Thymin-Dimerisierung mit dem Aktionsspektrum der *E. coli*-Inaktivierung, so ergibt sich auch eine Erklärung für die unterschiedliche Reaktivierung von UV-Schäden. Wie STEIN und HARM⁷ fanden, lassen sich Inaktivierungen mit UV-Licht der Wellenlänge < 310 m μ teilweise reaktivieren, solche durch UV-Licht > 310 m μ dagegen nicht. Thymin-Dimeres, das durch UV-Licht der Wellenlänge < 310 m μ gebildet wird, kann unter den Bedingungen der Photoreaktivierung⁸ teilweise wieder gespalten werden⁹. Den Inaktivierungen mit UV-Licht > 310 m μ , wobei Thymin nicht mehr dimerisiert wird, liegt demnach ein anderer Mechanismus zugrunde.

Herrn Prof. W. STEIN danken wir für seine Hilfe bei der vorliegenden Arbeit, Fräulein GABRIELE RIEBE für technische Assistenz und der Deutschen Forschungsgemeinschaft sowie dem Herrn Bundesminister für Atomkernenergie und Wasserwirtschaft für finanzielle Unterstützung.

⁶ Vgl. hierzu die ausführlichen Untersuchungen von R. SETLOW, *Biochim. biophys. Acta* [Amsterdam] **49**, 237 [1961].

⁷ W. STEIN u. W. HARM, *Z. Naturforsch.* **10b**, 519 [1955].

⁸ C. S. RUPERT, S. H. GOODGAL u. R. M. HERRIOTT, *J. gen. Physiol.* **41**, 451 [1958].

⁹ A. WACKER, *J. Chim. physique* **58**, 1041 [1961].

Dünnschicht-Chromatographie an Polyacrylnitril-Perlon

VON LEONHARD BIRKOFER, CHRISTELMARGOT KAISER, HANS-ALBRECHT MEYER-STOLL* und FRIEDRICH SUPPAN**

Aus dem Institut für Organische Chemie der Universität Köln
(*Z. Naturforsch.* **17 b**, 352–355 [1962]; eingegangen am 27. März 1962)

Mit Hilfe der Dünnschicht-Chromatographie ließen sich verschiedene *Anthocyanidine* trennen (Abb. 1). Als Trägersubstanz wurde Polyacrylnitril¹ mit einem Zusatz von Perlon² (Verhältnis 7 : 2) verwendet, die Mischung mit 40 ccm einer 0,05-m. prim. Kaliumphosphatlösung gepuffert und mit einem Ultra-Turrax (8000 Umdrehungen/min) homogenisiert. Das Fließmittel bestand aus Alkohol, einer organischen Säure und Wasser. Die Polyacrylnitril-Schicht erlaubt eine verhältnismäßig große Variationsbreite des Fließmittelmisches, jedoch ist folgende Zusammensetzung günstig: n-Pentanol-(1)/Propanol-(1)/Essigsäure/Wasser (3 : 2 : 2 : 1), wobei ein Zusatz von 1–2 Tln. n-Hepentanol-(1) [oder n-Hexanol-(1)] die Schwanzbildung weiter unterdrückt. Auch die Verwendung von n-Buta-

nol-(1) oder Propionsäure führte zum Erfolg. Die Laufzeiten betrugen jeweils 120–150 Min. bei einer Steighöhe von 12 Zentimeter.

Die Trennung von *Anthocyanen* gelang auf derselben Trägerschicht und mit den gleichen Fließmitteln (Abb. 1).

Wie Abb. 2 zeigt, ist die Methode zur Konstitutionsbestimmung von Anthocyanen durch partielle saure Hydrolyse ebenfalls geeignet. Eine methanolische Malvinlösung wurde mit trockenem HCl-Gas gesättigt, bei 40 °C Wasserbadtemperatur hydrolysiert, und innerhalb von sechs Stdn. wurden zehn Proben entnommen und neben Malvin, Malvidin und Malvidin-3-monoglucosid auf die Platte aufgetragen.

Die *R_f*-Werte sind wie die Fleckengrößen konzentrationsabhängig und ändern sich bei Anwesenheit geringer Fremdstoffmengen. Außerdem spielen die Stärke der Dünnschicht und die Kammersättigung eine Rolle. So bleibt bei einem Gemisch doch mehr das Fleckenmuster als der einzelne *R_f*-Wert maßgebend, wie es z. B. auch bei Aminosäuren gefunden wurde³. Es wird zur Orientierung eine Zusammenstellung gemittelter *R_f*-Werte gegeben (Tab. 1).

* Diplom-Arbeit, Köln 1962.

** Diplom-Arbeit, Köln 1961.

¹ Für die liebenswürdige Überlassung von Polyacrylnitrilpulver sagen wir den Farbenfabriken Bayer, Werk Dormagen, unseren besten Dank.

² Das Polycaprolactam-Pulver wurde uns in dankenswerter Weise von den Farbwerken Hoechst, Werk Bobingen, zur Verfügung gestellt.

³ M. BRENNER u. A. NIEDERWIESER, *Experientia* [Basel] **16**, 378 [1960].

Abb. 1. Dünnschichtchromatogramm. Laufzeit: 150 Minuten.

1 Delphinidin,	11 Gemisch 9, 10,
2 Petunidin,	12 Cyanidin,
3 Malvidin,	13 Cyanidin-3-triglucosid,
4 Pelargonidin,	14 Cyanidin-3-mono-
5 Gemisch 1-4,	glucosid,
6 Cyanidin,	15 Gemisch 12-14,
7 Päonidin,	16 Päonidin,
8 Gemisch 6, 7,	17 Päonidin-3-di-5-mono-
9 Delphinidin,	glucosid,
10 Delphinidin-3-mono-	18 Gemisch 16, 17.
glucosid,	

Abb. 2. Dünnschichtchromatogramm.
 Gemisch in 4, 5 und 6 enthält Malvidin 3- und 5-monoglucosid (fast gleiche R_f -Werte).
 Trägerschicht: Polyacrylnitril 7, Polyamid 1, prim. K-Phosphat-Pufferlösung 0,05-mol., 40 cm. Hydrolyse-Temperatur: 40 °C, Laufzeit: 150 Minuten.

1 Malvidin,	6 wie 4 nach 10 Minuten,
2 Malvidin 3,5-diglucosid,	7 wie 4 nach 1 Stunde,
3 Malvidin 3-mono-glucosid,	8 wie 4 nach 2 Stunden,
4 wie 2 mit trockenem HCl gesättigt,	9 wie 4 nach 3 Stunden,
5 wie 4 nach 5 Minuten,	10 wie 4 nach 4 Stunden,
	11 wie 4 nach 5 Stunden,
	12 wie 4 nach 6 Stunden,
	13 wie 4 nach 7 Stunden.

Anthocyanidine	R_f -Werte	Anthocyane	R_f -Werte
Delphinidin	0,21	Delphinidin-3-monoglucosid	0,36
Petunidin	0,27	Petunidin-3-monoglucosid	0,38
Cyanidin	0,31	Cyanidin-3-monoglucosid	0,46
Malvidin	0,37	Cyanidin-3-triglucosid	0,42
Päonidin	0,39	Malvidin-3-monoglucosid	0,57
Pelargonidin	0,41	Malvidin-3,5-diglucosid	0,54

Tab. 1. R_f -Werte. Fließmittel: Pentanol-(1)/Propanol-(1)/Essigsäure/Wasser/[Heptanol-(1)] (3 : 2 : 2 : 1) [: 2].

Die Trennungen erfolgten auch mit Hilfe einer von uns entwickelten absteigenden Methode (Abb. 3). Sie bietet — trotz längerer Laufzeit — den Vorteil, bei kleinen R_f -Wert-Unterschieden das Fließmittel durchlaufen zu lassen und so die Zonen weiter auseinanderzutreiben. Die Platte wird dabei mit den Seitenkanten

Abb. 3. Dünnschichtchromatogramm. Laufzeit: 6 Stunden.

Aufgetragene Substanzen:	Anthocyanidine:
1 Gemisch a c d f	a = Delphinidin,
2 Gemisch a b d f	b = Petunidin,
3 Gemisch a c e	c = Cyanidin,
4 Gemisch a c f	d = Malvidin,
5 Gemisch a b d	e = Päonidin,
6 Gemisch a b c	f = Pelargonidin.
7 Gemisch c d f	
8 Gemisch b d f	
9 Gemisch d e f	

in zwei Schienen geschoben und mit ihrer oberen Kante an eine Wanne herangebracht, die das Fließmittel enthält. Zwischen der Wanne und der Trägerschicht befindet sich eine Filterpapierrolle, die mit der einen Seite in das Fließmittel eintaucht und mit der anderen Seite dieses kontinuierlich auf die Platte überträgt (Abb. 4). Die gesamte Anordnung ist, wie bei der üblichen Methode, in einem abgeschlossenen Gefäß untergebracht. Die Durchlaufzeit beträgt durchschnittlich sechs Stunden.

Abb. 4. Versuchsanordnung zur absteigenden Dünnschicht-Chromatographie.

Bei der Untersuchung der Petunienpollen (*Petunia hybrida*) auf das Vorkommen von Hydroxyzimtsäuren und deren Glykosidester konnten wir durch Anwendung der Dünnschicht-Chromatographie *p*-Cumar-, Ferula- und Kaffeesäure⁴ sowie die *p*-Cumaroyl-, Feruloyl- und Kaffoyl-glucose eindeutig identifizieren. Dazu wurden die in einer 1,5-proz. Stärkelösung aufgeschlämmten Pollen mit Hilfe eines Pinsels direkt auf die Startlinie einer Perlon-Kieselgel-Dünnschicht [Kieselgel-G (7 g), Perlonpulver (4 g), Gelatine (0,5 g), Wasser (35 ccm)] in einem 0,5 cm breiten Streifen aufgetragen und in der mit dem Fließmittel n-Amylalkohol/n-Butanol/Essigester/Essigsäure/Wasser (60 : 20 : 30 : 10 : 5) beschickten Trennkammer aufsteigend chromatographiert. (Durch Befestigen mit Klammern konnten gleichzeitig 5 Plattenpaare in die Kammer eingesetzt werden.) Dem Fließmittel fielen dabei zwei Aufgaben zu: 1. Den Pollen zunächst einmal die erwähnten Substanzen zu entziehen und 2. zwischen den freien Zimtsäuren, ihren Glykosidestern und den stark überwiegenden Flavonen eine möglichst scharfe Trennung herbeizuführen. Wenn die Fließmittelfront eine Strecke von etwa 17 cm zurückgelegt hatte (ca. 2 Stdn.) wurden die Platten aus der Trennkammer entfernt, mit dem Heizlüfter getrocknet, die gewünschten Zonen unter der UV-Lampe markiert, abgeschabt und mit Methanol eluiert. Die Eluate wurden eingedampft und zur Identifizierung mit den entsprechenden Vergleichssubstanzen auf einer Dünnschicht aus Polyacrylnitril-Perlon [Polyacrylnitrilpulver (8 g), Perlonpulver (4 g), Wasser (45 ccm)] im Fließmittel n-Oktan/Essigester/n-Amylalkohol/Diäthyläther/Ameisensäure (40 : 50 : 15 : 15 : 10) chromatographiert. Nach einer Laufzeit von 50 Min. war bei einer Steighöhe von 17 cm ein Optimum der Trennung erreicht (Abb. 5). Lediglich

Abb. 5. Dünnschichtchromatogramm. Laufzeit: 50 Minuten.

1 <i>p</i> -Cumarsäure,	6 Kaffoyl-glucose,
2 Ferulasäure,	7 Gemisch 1—6,
3 Kaffeesäure,	8 Zonen aus Pollen,
4 <i>p</i> -Cumaroyl-glucose,	9 Chlorogensäure.
5 Feruloyl-glucose,	

die Chlorogensäure besitzt die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit wie die Kaffoyl-glucose. Eine Unterscheidung war durch die Stufentechnik möglich; man chromatographierte zuerst das Substanzgemisch in n-Butanol/n-Amylalkohol/Essigester/Essigsäure/Wasser (60 : 20 : 30 : 5 : 2), trocknete die Platte, wenn die Fließmittelfront eine Höhe von 7 cm erreicht hatte, brachte sie hierauf in das erstgenannte Fließmittel und ließ dabei die Front eine Steighöhe von 17 cm erreichen. Dabei wandert die Chlorogensäure im Gegensatz zu den anderen Substanzen, die alle einen nahezu gleichen R_F -Wert von 0,76 besitzen, kaum. Im 2. Gemisch

Abb. 6. Dünnschichtchromatogramm. Laufzeit: 170 Minuten.

1 Hydrolysat der Zucker-	4 Arabinose,
ester aus Pollen,	5 Xylose,
2 Galaktose,	6 Rhamnose,
3 Glucose,	7 Gemisch 2—6.

⁴ E. STAHL u. P. J. SCHORN, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **325**, 263 [1961] gelang es, auf einer Kieselgel-G-Schicht Phenolcarbonsäuren und Chlorogensäure zu trennen.

erfolgt eine erneute Auftrennung, die dann eine eindeutige Zuordnung erlaubt.

Eine dünn-schicht-chromatographische Trennung von Hexosen und Pentosen (Abb. 6) führten wir auf einer mit sek. Natriumphosphat gepufferten Schicht von Kieselgur-G/Aluminiumoxyd-G/Polyacrylnitril [Kieselgur-G (6 g), Aluminiumoxyd-G (1 g), Polyacrylnitrilpulver (5 g), 0,02-m. sek. Natriumphosphatlösung (40 ccm)] durch. Die Laufzeit im Fließmittel n-Amyl-

alkohol/Isopropanol/Essigester/Wasser (55:15:110:30) betrug dabei 3 Stunden. Die Trennung von Glucose und Galaktose ist hierbei besser als bei der von STAHL⁵ angegebenen Methode auf einer mit Na-acetat gepufferten Dünnschicht von Kieselgur-G. Allerdings muß eine längere Laufzeit in Kauf genommen werden.

⁵ E. STAHL, Z. analyt. Chem. **181**, 303 [1961].

Erhebungen über eine neue, mit Alkohol ausfällbare und mit Essigsäure extrahierbare Bilirubinfraktion im Blut

Von G. LOMBARDO und G. TAMBURINO

Istituto di Semeiotica Medica dell'Università di Catania
(Direktor: Prof. G. M. RASARIO)

(Z. Naturforsch. **17 b**, 355 [1962]; eingegangen am 2. März 1962)

Es ist bekannt, daß es im Serum von Patienten, die an einer mit Ikterus einhergehenden Leberkrankheit leiden, eine Bilirubinfraktion gibt, die mit den Proteinen ausfällt, wenn das Serum einer Behandlung mit 95-proz. Äthylalkohol unterzogen wird. Die Beobachtungen von GAMBIGLIANI-ZOCCOLI und FRANZINI¹ haben ergeben, daß sich innerhalb des mit Alkohol ausfällbaren Bilirubins eine Pigmentfraktion nachweisen läßt, die aus dem Proteinpräzipitat durch Auswaschen desselben mit Alkohol extrahiert werden kann. Daneben besteht aber noch eine andere, stärker an das Protein gebundene Fraktion, die sich nicht durch weiteres Auswaschen mit 95-proz. Alkohol extrahieren läßt. Diese letztere, von den Verfassern als „ausfällbares“ Bilirubin bezeichnete Pigmentfraktion wäre mit dem Bili-

rubin 1' von DUCCI und WATSON sowie mit dem Diglykuronid des Bilirubins zu identifizieren².

Wir haben nun feststellen können, daß man aus dem ausfällbaren Bilirubin — nachdem eine weitere Extrahierung von Bilirubin nicht mehr möglich ist —, noch eine Pigmentfraktion extrahieren kann, indem man das Eiweißpräzipitat mit Eisessig behandelt. Die quantitative Bestimmung dieser mit Alkohol ausfällbaren und mit Essigsäure extrahierbaren Fraktion kann kolorimetrisch mit dem Diazo-Reagens erfolgen³.

In vorhergehenden Untersuchungen haben wir feststellen können, daß die Menge dieser mit Alkohol ausfällbaren und mit Essigsäure extrahierbaren Bilirubinfraktion im Blut, je nach der klinischen Form der Lebererkrankung wechselt. Das Prozentverhältnis des mit Alkohol ausfällbaren und mit Essigsäure extrahierbaren Bilirubins hält sich gegenüber dem „ausfällbaren“ Bilirubin von GAMBIGLIANI-ZOCCOLI über 50% bei den cholestatischen Ikterusformen und erreicht manchmal Werte bis zu 75 Prozent. Bei den Virus-Lebererkrankungen hat sich das mit Alkohol ausfällbare und mit Essigsäure extrahierbare Bilirubin gegenüber dem „ausfällbaren“, je nach dem klinischen Stadium der Krankheit als schwankend erwiesen, mit Werten, die jedoch stets unter 50% lagen.

¹ A. GAMBIGLIANI-ZOCCOLI u. C. FRANZINI, La diagnostica funzionale delle epatopatie. Ed. Minerva Medica. Torino 1952.

² A. GAMBIGLIANI-ZOCCOLI, L. NEBBIA, L. CHIRINGHELLI u. M. DE BLASIS, Min. Med. **50**, 69 [1959].

³ G. LOMBARDO u. G. TAMBURINO, Min. Med., im Druck.

Die Stereochemie der Mycaminose¹

Von W. HOFHEINZ und H. GRISEBACH

Chemisches Laboratorium der Universität Freiburg i. Br.
(Z. Naturforsch. **17 b**, 355—356 [1962]; eingegangen am 4. Januar 1962)

Für die Mycaminose² (I) (3,6-Didesoxy-3-dimethylaminohexose) aus Magnamycin hat WOODWARD³ auf Grund der Unterschiede in den pK -Werten verschiedener Derivate eine *altro*-Konfiguration vorgeschlagen. Das Kernresonanzspektrum des Mycaminosetriacetats

(Abb. 1) zeigt jedoch eindeutig, daß I eine Glucose-Konfiguration besitzt.

Bei höchster Feldstärke ($\tau = 8,84$) liegt die Resonanzabsorption der C-Methylgruppe. Durch Spin-Spin-Kopplung mit dem Ringproton an C-5 erscheint sie als Dublett mit der Kopplungskonstante $J_{5,6} = 6,4$ Herz. Die 3 Acetoxygruppen ergeben bei $\tau = 7,94$; 7,98 und 8,01 drei Signale; die chemische Verschiebung spricht für äquatoriale Konformation^{4,5}. Die bei 7,63 liegende Bande ist den beiden N-Methylgruppen zuzuordnen. Das Spektrum der 5 Ringprotonen zerfällt in 4 Grup-

¹ VII. Mitt.: Zur Biogenese der Makrolide. VI. Mitt., Z. Naturforsch. **17 b**, 64 [1962].

² F. A. HOCHSTEIN u. K. MURAI, J. Amer. chem. Soc. **76**, 5080 [1954]; F. A. HOCHSTEIN u. P. P. REGNA, **77**, 3353 [1955].

³ R. B. WOODWARD, Angew. Chem. **69**, 50 [1957].

⁴ R. U. LEMIEUX, R. K. KULLNIG, H. J. BERNSTEIN u. W. G. SCHNEIDER, J. Amer. chem. Soc. **80**, 6098 [1958].

⁵ F. W. LICHTENTHALER, Chem. Ber. **94**, 3071 [1961].