

rect counting of the peaks from the photographic records is feasible to about 600, beyond this range, it is necessary to use the technique of measuring accurately the ion accelerating voltage<sup>17</sup>.

**Zusammenfassung.** Ein einfaches Glas-Einlass-System wird beschrieben, das die direkte Einführung von organischen Substanzen in die Ionisationskammer eines Massenspektrometers gestattet. Es ist somit möglich Massen-

spektren von Substanzen zu bestimmen die man bisher nicht aufnehmen konnte. Beispiele werden angeführt.

J. F. LYNCH, J. M. WILSON,  
H. BUDZIKIEWICZ, and C. DJERASSI

*Department of Chemistry, Stanford University, Stanford (California, U.S.A.), Dezember 27, 1962.*

<sup>17</sup> See p. 40 in ref. <sup>3</sup>.

## Dünnschichtchromatographischer Nachweis der Aminosäuren im Urin

Dünnschichtchromatographie ist ein vorzügliches Instrument zur qualitativen Analyse von Eiweiss-hydrolysaten und anderen relativ salzarmen Aminosäuregemischen<sup>1-3</sup>. Sie versagt aber oft, ähnlich wie die Papierchromatographie, bei der Untersuchung von Urin, Blutplasma, Preßsäften und ähnlichem Material. Die in solchen Fällen durch den Salzeffekt bedingte Störung lässt sich umgehen, wenn die Aminosäuren in Derivate umgewandelt werden, die sich vor der Chromatographie dank ihrer Löslichkeit in organischen Solventien von den Salzen abtrennen lassen. Besonders geeignet ist die Umwandlung der Aminosäuren in Dinitrophenyl-(= DNP-)-

Aminosäuren mittels 2,4-Dinitrofluorbenzol (DNFB). Sie ist auch in verdünntesten Lösungen ohne langwierige Vorbereitungen rasch und praktisch quantitativ durchführbar. So haben zum Beispiel GERBER und GERBER<sup>4</sup> den  $\beta$ -Amino-isobuttersäure-Gehalt von Urin mittels Papierchromatographie des entsprechenden DNP-Derivates ermittelt; PERAINO und HARPER<sup>5</sup> beschreiben die Dinitrophenylierung von HClO<sub>4</sub>-enteiweisstem Blutplasma und die papierchromatographische Bestimmung der erhaltenen ätherlöslichen DNP-Aminosäuren. Ähnlich, aber dünnschichtchromatographisch, haben sich einige Aminosäuren in Gäransätzen von Traubenmost nachweisen lassen<sup>6</sup>.

Die Verwendung der Dünnschichtchromatographie bietet in der Tat grosse Vorteile<sup>7,8</sup>. Es ist uns inzwischen gelungen,

(a) durch Modifikation der Fließmittel und der Chromatographiertechnik den Trenneffekt bei den ätherlöslichen DNP-Aminosäuren noch weiter zu steigern, und  
(b) durch Essigester/Butanolextraktion auch die säurelöslichen DNP-Aminosäuren von den Salzen abzutrennen und damit chromatographierbar zu machen. Somit liegt jetzt ein Verfahren vor, das es gestattet, die 37 in der Tabelle aufgeführten Verbindungen, die bei der Dinitrophenylierung von biologischem Material auftreten können, nebeneinander nachzuweisen.

**Dinitrophenylierung der Urinaminosäuren.** Die üblichen Dinitrophenylierungsverfahren<sup>9</sup> beziehen sich auf Lösungen mit relativ hoher Aminosäurekonzentration. Im vorliegenden Fall arbeiten wir in Anlehnung an eine Vorschrift von PERAINO und HARPER<sup>5</sup>.

Die verwendete Menge DNFB (5facher Überschuss) haben wir anhand bekannter Daten<sup>10</sup> über die oberen Grenzen der Aminosäuremengen in 24-h-Urin festgelegt; die Zweckmässigkeit dieses Vorgehens ist durch Vergleichsversuche mit der 0,1-, 0,25-, 0,5- und 2fachen

Nr.	DNP-Aminosäure	Abkürzung für die zugehörige Aminosäure
1	DNP-Alanin	Ala
2	DNP- $\beta$ -Alanin	$\beta$ -Ala
3	DNP- $\alpha$ -Aminoadipinsäure	Aad
4	DNP- $\alpha$ -Aminobuttersäure	Abut
5	DNP- $\gamma$ -Aminobuttersäure	$\gamma$ -Abut
6	DNP- $\alpha$ -Aminocaprylsäure	Acy
7	DNP- $\beta$ -Aminoisobuttersäure	$\beta$ -AiB
8	DNP-Asparagin	Asp (NH <sub>2</sub> )
9	DNP-Asparaginsäure	Asp
10	Di-DNP-Cystein	Cys
11	Di-DNP-Cystin	(Cys) <sub>2</sub>
12	DNP-Glutamin	Glu (NH <sub>2</sub> )
13	DNP-Glutaminsäure	Glu
14	DNP-Glycin	Gly
15	Di-DNP-Histidin	His
16	Di-DNP-Hydroxylysin	Hylys
17	DNP-Hydroxyprolin	Hypro
18	DNP-Isoleucin	Ileu
19	DNP-Leucin	Leu
20	Di-DNP-Lysin	Lys
21	DNP-Methionin	Met
22	DNP-Methiononsulfon	MetO <sub>2</sub>
23	Di-DNP-Ornithin	Orn
24	DNP-Phenylalanin	Phe
25	DNP-Prolin	Pro
26	DNP-Sarkosin	Sar
27	DNP-Serin	Ser
28	DNP-Threonin	Thr
29	DNP-Tryptophan	Try
30	Di-DNP-Tyrosin	Tyr
31	DNP-Valin	Val
32	2,4-Dinitrophenol	DNP-OH
33	2,4-Dinitroanilin	DNP-NH <sub>2</sub>
34	$\alpha$ -DNP-Arginin	Arg
35	DNP-Citrullin	Cit
36	DNP-Cysteinsäure	CySO <sub>3</sub> H
37	DNP-Taurin	Tau

<sup>1</sup> E. NÜRNBERG, Arch. Pharm. 292, 610 (1959). – E. MUTSCHLER und H. ROCHELMEYER, Arch. Pharm. 292, 449 (1959).

<sup>2</sup> M. BRENNER und A. NIEDERWIESER, Exper. 16, 378 (1960).

<sup>3</sup> A. R. FAHMY, A. NIEDERWIESER, G. PATAKI und M. BRENNER, Helv. chim. Acta 44, 2022 (1961).

<sup>4</sup> G. B. GERBER und G. GERBER, Clin. chim. Acta 5, 607 (1960).

<sup>5</sup> C. PERAINO und A. E. HARPER, Anal. Chem. 33, 1863 (1961).

<sup>6</sup> F. DRAWERT, O. BACHMANN und K. H. REUTHER, J. Chromatogr. 9, 376 (1962).

<sup>7</sup> M. BRENNER, A. NIEDERWIESER und G. PATAKI, Exper. 17, 145 (1961).

<sup>8</sup> M. BRENNER, A. NIEDERWIESER und G. PATAKI, in E. STAHL, Dünnschicht-Chromatographie (Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg 1962), p. 403.

<sup>9</sup> Vgl. <sup>8</sup> und G. BISERTE, J. W. HOLLEMAN, J. HOLLEMAN-DEHOVE und P. SAUTIERE, J. Chromatogr. 2, 225 (1959).

<sup>10</sup> W. H. STEIN, J. biol. Chem. 201, 45 (1953). – D. MÜNTING, Z. physiol. Chem. 297, 61 (1954). – D. F. EVERED, Biochem. J. 62, 416 (1956).

Menge DNFB bestätigt worden: Mit der 0,25fachen Menge ist die Dinitrophenylierung unvollständig, und mit der doppelten Menge bildet sich sehr viel störendes Dinitrophenol. Dinitrophenylierungsausbeute und Dinitrophenolbildung dienen auch zur Ermittlung der optimalen Reaktionsdauer (1 h). Lange Reaktionszeit und hohe DNFB-Konzentration können nach TONGE<sup>11</sup> zur Bildung von unerwünschten Reaktionsprodukten intermediär entstehender DNP-Aminosäuredinitrophenylester führen. Der Ausschluss von Tageslicht<sup>5</sup> ist nach einer Untersuchung von POLLARA und KORF<sup>12</sup> und nach unseren eigenen Erfahrungen bei Durchführung qualitativer Analysen nicht unbedingt notwendig. Die vorgeschriebene Puffermenge hält den pH-Wert bis zur Säurezugabe (Vorbereitung zur Extraktion der DNP-Aminosäuren) zwischen 8,5 und 9.

**Vorschrift.** Man versetzt 25 ml frischen Harn tropfenweise mit 5 N NaOH bis zur schwachen Rosafärbung von Phenolphthaleinpapier, filtriert durch ein trockenes Faltenfilter, versetzt 20 ml Filtrat mit 5 ml Carbonatpuffer (s.u.) und 2 ml frisch bereiteter absolut alkoholischer 10%iger (g/v) DNFB-Lösung<sup>13</sup>, und schüttelt das milchige Gemisch in einer braunen Flasche während 1 h in einem Wasserbad von 40°C. Das Reaktionsgemisch wird auf Zimmertemperatur gekühlt und mit wenig H<sub>2</sub>O dest. sowie etwa 10 ml Äther in einem 100 ml Scheidetrichter gespült. Man schüttelt kräftig durch, trennt die wässrige Phase ab und extrahiert sie noch zweimal mit je 10 ml Äther. Die 3 Ätherextrakte werden verworfen, da sie ausser dem überschüssigen DNFB im wesentlichen nur 2,4-Dinitroanilin und eventuell 2,4-Dinitrophenyläthanolamin enthalten. Falls gallertiges, mit Luftblasen beladenes Material im Äther die Phasentrennung erschwert, trennt man zunächst den grösseren Teil der wässrigen Phase so gut als möglich ab, giesst die restliche Flüssigkeit durch etwas Glaswatte in einen anderen Scheidetrichter und spült die Watte mit etwas Äther und schwach alkalisiertem Wasser nach (Phenolphthaleinpapier rosa). Die endgültige Phasentrennung bereitet jetzt keine Schwierigkeiten mehr; der wässrige Anteil wird mit der Hauptmenge der Wasserphase vereinigt und nach Vorschrift weiter verarbeitet. Dasselbe Prozedere ist eventuell nötig bei der im folgenden beschriebenen Extraktion der DNP-Aminosäuren aus der angesäuerten wässrigen Lösung (Waschwasser mit Salzsäure kongo-sauer stellen).

**Puffer:** Eine Lösung von 8,4 g NaHCO<sub>3</sub> in Wasser (nicht erwärmen!) wird mit 2,5 ml 1 N NaOH und Wasser auf 100 ml aufgefüllt: pH 8,8.

**Extraktion der ätherlöslichen<sup>9</sup> DNP-Aminosäuren.** Man versetzt die alkalische ätherextrahierte Reaktionslösung vorsichtig (CO<sub>2</sub>-Entwicklung!) unter Umrühren mit 6 N HCl bis zur deutlichen Blaufärbung von Kongopapier, extrahiert sechsmal<sup>14</sup> mit je 10 ml Äther, trocknet die vereinigten Ätherextrakte über ausgeglühtem Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, giesst den Äther durch Watte ab, wäscht das Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> mit frischem Äther farblos, vereinigt Ätherlösung und Waschéther und verdampft im Vakuum zur Trockne. Der Rückstand wird in 1 ml Aceton aufgenommen. Die resultierende Lösung enthält praktisch die gesamte Menge der ätherlöslichen DNP-Aminosäuren: Probelösung 1. Sie ist, wenn nicht sofort chromatographiert wird, verschlossen, im Dunkeln und kalt aufzubewahren. Di-DNP-Histidin ist so wasserlöslich, dass es sich nur zum Teil im Ätherextrakt befindet; der Rest begleitet die säurelöslichen<sup>15</sup> DNP-Aminosäuren.

**Extraktion der säurelöslichen<sup>9,15</sup> DNP-Aminosäuren.** Schüttelt man die nach erfolgter Extraktion der ätherlöslichen DNP-Aminosäuren verbleibende saure wässrige Lösung (30–40 ml, vgl. oben) sechsmal<sup>14</sup> mit je 10 ml eines

aus gleichen Volumenteilen bereiteten Gemisches von Essigsäureäthylester und *n*-Butanol, so enthält der Extrakt überraschenderweise die Hauptmenge der säurelöslichen DNP-Aminosäuren. Weitere Extrakte sind kaum mehr gefärbt; in ihrem Trockenrückstand können chromatographisch keine DNP-Aminosäuren mehr nachgewiesen werden<sup>16</sup>. Die vereinigten Essigester-Butanolauszüge werden über ausgeglühtem Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und durch Watte filtriert. Man wäscht Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und Filterwatte mit etwas Essigester/Butanol farblos, verdampft die Filtrate im Vakuum zur Trockne und nimmt den Rückstand in 2 ml Essigester/Butanol auf: Probelösung 2. Diese Lösung enthält die säurelöslichen DNP-Aminosäuren; sie ist, wenn nicht sofort chromatographiert wird, verschlossen, im Dunkeln und kalt aufzubewahren.

#### Chromatographie

**Technik.** In früheren Publikationen befinden sich alle notwendigen Angaben über die Zubereitung der Schicht<sup>8,17</sup>, das Auftragen der Substanzen<sup>8,17</sup>, die ein- und zweidimensionale<sup>7,8</sup> und die Durchlauf-Technik<sup>18</sup>. Sollen die Chromatogramme im kurzwelligen UV-Licht photographiert werden, so ist dem Kieselgel 2% Zinksilikat<sup>19</sup> beizumischen<sup>20</sup>. Wir wiederholen, dass wir die Schichten nach dem Streichen über Nacht bei Zimmertemperatur trocknen. Bei Mehrfach-Entwicklung (vgl. Text) oder zweidimensionaler Chromatographie sind jeweils Zwischentrocknungen notwendig.

**Zwischentrocknung M** (Mehrfach-Entwicklung): Luftzug, Zimmertemperatur, rund 3 min, Schicht wird weiss.

**Zwischentrocknung Z** (zweidimensionale Chromatographie)<sup>7,8</sup>: 10 min Luftzug, 10 min Heizschrank 60°C, 15 min Luftzug.

**Fliessmittel.** *Fliessmittel I:* Toluol/2-Chloräthanol/Pyridin/25%iges Ammoniak (50:35:15:7 v/v). *Fliessmittel II:* Chloroform/Benzylalkohol/Eisessig (70:30:3 v/v). *Fliessmittel III:* Chloroform/Methylalkohol/Eisessig (95:5:1 v/v). *Fliessmittel IV:* Chloroform/Methylalkohol/Eisessig (70:30:5 v/v). *Fliessmittel V:* Pyridin. *Fliessmittel VI:* *n*-Butylalkohol mit 25%igem Ammoniak bei Zimmertemperatur gesättigt. Qualität der Fliessmittelkomponenten<sup>7,8</sup>: Es empfiehlt sich, Lösungsmittel «für Chromatographie»<sup>13</sup> zu benutzen.

**(A) Ätherlösliche DNP-Aminosäuren.** Man trennt das Gemisch der ätherlöslichen DNP-Aminosäuren (Probelösung 1) durch zweidimensionale Chromatographie in den Fliessmitteln I und II, wobei die Entwicklung im

<sup>11</sup> B. L. TONGE, Nature 195, 491 (1962).

<sup>12</sup> B. POLLARA und R. W. VON KORF, Biochem. biophys. Acta 39, 364 (1960).

<sup>13</sup> Fluka AG Buchs (Schweiz), Merck AG, Darmstadt (Deutschland), Riedel-de Haen AG, Seelze bei Hannover (Deutschland).

<sup>14</sup> Th. W. EVANS, Ind. eng. Chem. 26, 439 (1934).

<sup>15</sup> Wir folgen mit der Bezeichnung «säurelöslich» einem eingebürgerten Gebrauch; der Ausdruck wasserlöslich wäre richtiger.

<sup>16</sup> Dies ist auch in einem Modellversuch bestätigt worden. Bei sechsmaliger Extraktion (Phasenverhältnis 1:3) verschwinden aus der wässrigen Phase zuerst Di-DNP-His und DNP-Cit, dann nacheinander DNP-Arg, DNP-CySO<sub>3</sub>H und DNP-Tau. Nach der sechsten Extraktion ist DNP-Tau als einziges noch ganz schwach nachweisbar.

<sup>17</sup> M. BRENNER, A. NIEDERWIESER, G. PATAKI und A. R. FAHMY, Exper. 18, 101 (1962).

<sup>18</sup> M. BRENNER und A. NIEDERWIESER, Exper. 17, 237 (1961). Eine entsprechende einfach zu handhabende Vorrichtung wird von der Firma C. Desaga GmbH, Heidelberg (Deutschland), in den Handel gebracht.

<sup>19</sup> Mn-aktiviertes Zinksilikat Leuchtstoffwerk GmbH, Heidelberg (Deutschland).

<sup>20</sup> Fertige Kieselgel-Leuchtstoffmischungen werden u.a. von den Firmen Fluka<sup>13</sup> und Merck<sup>13</sup> vertrieben.

Fließmittel I nach Zwischentrocknung M einmal wiederholt und dann eine Zwischentrocknung Z eingeschaltet wird. Die Zwischentrocknungsbedingungen sind sorgfältigst einzuhalten. Die jeweilige Laufstrecke der Fließmittel soll 10 bis 15 cm betragen, der erforderliche Zeitaufwand beläuft sich auf  $90 + 5 + 60 + 35 + 120 \text{ min} = 310 \text{ min}$  oder etwa 5 h. Die optimale Chromatogrammbeladung ist gegebenenfalls durch einen Reihenversuch zu ermitteln. In Figur 1 zeigen wir ein Beispiel einer Urinanalyse.

Zur Interpretation von Chromatogrammen nach Figur 1 bedient man sich eines Fleckenmusters, das man durch Chromatographie einer Standardmischung erhält. Man löst zum Beispiel je 1 mg der Verbindungen<sup>23</sup> Nr. 1-33 (siehe Tabelle) in total 5 ml Aceton, trägt zweimal  $1 \mu\text{l}$  dieser Lösung am Startpunkt auf<sup>21</sup> und chromatographiert (Beladung  $0,4 \mu\text{g}$  pro Verbindung). Die Standardlösung hält sich im Kühlschrank mindestens vier Wochen lang. Zur Zuordnung der Flecken vergleiche Figur 2.

Aus dem Vergleich von Figur 1 und 2 ergibt sich die folgende Aussage über die Zusammensetzung der Probe-

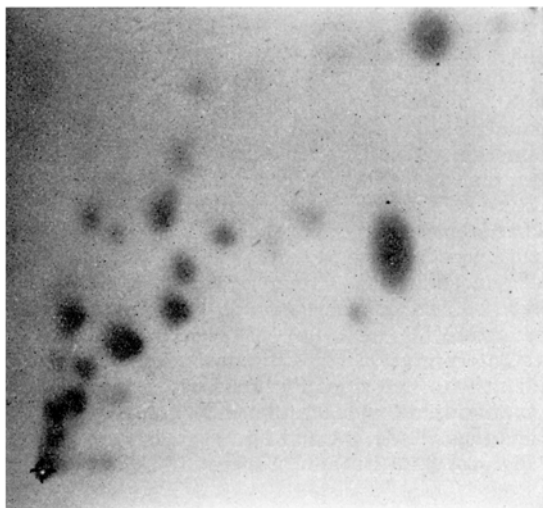


Fig. 1. Probelösung 1 entsprechend 20 ml Morgenurin. Beladung viermal  $1 \mu\text{l}$ <sup>21</sup>. Normallichtphotographie (vgl. Text). Originalgröße  $11 \times 12 \text{ cm}$ <sup>22</sup>. + Start. Fließmittel wie in Figur 2.

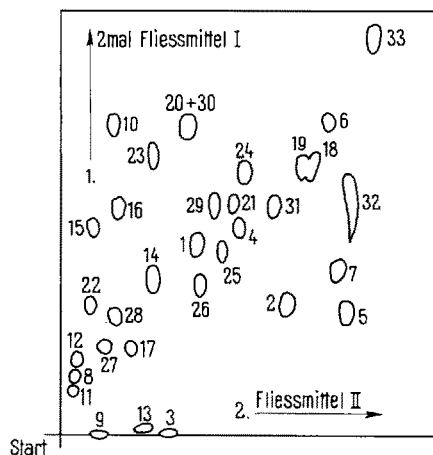


Fig. 2. Ätherlösliche DNP-Aminosäuren: Fleckenmuster und Fleckenzuordnung. Originalgröße  $14 \times 12 \text{ cm}$ <sup>22</sup>. Die Nummern entsprechen der Numerierung der DNP-Derivate in der Tabelle.

lösung 1 (DNP-Derivate): *Größere Mengen*: Ala, (Cys)<sub>2</sub>, Glu (NH<sub>2</sub>), Gly, His, Lys, Ser. *Mittlere Mengen*:  $\beta$ -Ala, Phe, Thr, Try, Tyr. *Kleine Mengen*: Glu, Ileu, Leu, MetO<sub>2</sub>, Orn, Val. *Sehr kleine Mengen* (nur auf UV-Photographie sichtbar): Aad, Abut,  $\beta$ -Ala, Asp, Pro. Unbekannte Substanzen: Die Figur 1 weist eine Anzahl (rund 10) Flecken auf, die nach Hydrolyse ( $6N \text{ HCl}$ , 8 h,  $110^\circ\text{C}$ ) grösstenteils verschwinden und deshalb vermutlich als DNP-Peptidflecken anzusprechen sind<sup>24</sup>.

Weist das Chromatogramm der Probelösung 1 nur wenige Flecken auf, so kann die Interpretation unsicher

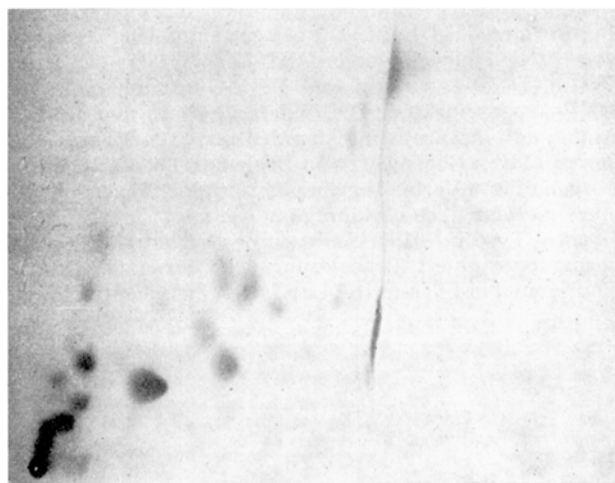


Fig. 3. Nachweis der DNP-Derivate von Tyrosin, Lysin, Leucin und Isoleucin. Probelösung 1 entsprechend 20 ml Morgenurin. Beladung viermal  $1 \mu\text{l}$ <sup>21</sup>. Normallichtphotographie (vgl. Text). Originalgröße  $13 \times 18 \text{ cm}$ . + Start. Fließmittel wie in Figur 4.

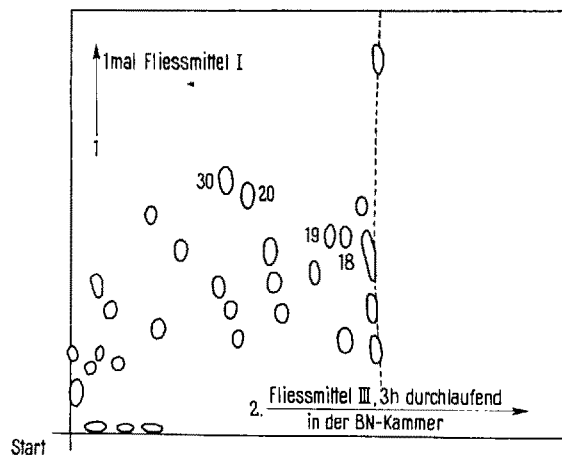


Fig. 4. Fleckenmuster und Fleckenzuordnung zur Interpretation von Chromatogrammen nach Figur 3. Originalgröße  $14 \times 18 \text{ cm}$ . Die Nummern entsprechen der Numerierung der DNP-Derivate in der Tabelle. - - - - beobachtbare Entmischungslinie des Fließmittels (vgl. M. BRENNER, A. NIEDERWIESER, G. PATAKI und R. WEBER, in E. STAHL, *Dünnschichtchromatographie* (Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg 1962), p. 118).

<sup>21</sup> Unter jeweiliger Zwischentrocknung; keinen Föhn verwenden.

<sup>22</sup> Oberer und rechter Bildrand entsprechen den Fließmittelfronten. <sup>23</sup> Kollektionen sind z. B. erhältlich bei Mann Res. Lab. Inc., 136 Liberty Street, New York; Vorschriften zur Herstellung vgl. <sup>7,8</sup>.

<sup>24</sup> S. ANSORGE, S. FITTKAU und H. HANSON, *Z. physiol. Chem.* **324**, 17 (1961). - D. L. BUCHANAN, E. E. HALEY und R. T. MARKIV, *Biochemistry* **1**, 612 (1962).

werden. In solchen Fällen empfiehlt es sich, Probelösung und Standardmischung gemeinsam vom gleichen Startpunkt aus zu chromatographieren. Belädt man mit nur  $0,2 \mu\text{g}$  pro Verbindung der Standardmischung ( $1 \mu\text{l}$  Standardlösung), so resultiert ein eben noch sichtbares Fleckenmuster und die in der Probelösung 1 vorhandenen DNP-Aminosäuren geben sich dann durch eine Intensitätszunahme der ihnen zukommenden Flecken zu erkennen<sup>7,8</sup>. Innerhalb des nun vorliegenden Fleckenmusters bietet die Zuordnung keine Schwierigkeiten mehr. Die unbekannten Flecken stören im allgemeinen nicht.

Im Chromatogramm nach Figur 1 erscheinen Di-DNP-Tyrosin und Di-DNP-Lysin nie getrennt. Die Trenngüte von DNP-Isoleucin und DNP-Leucin, von Di-DNP-Cystin, DNP-Asparagin und DNP-Glutamin sowie von DNP-Asparaginsäure, DNP-Glutaminsäure und DNP- $\alpha$ -Amino-adipinsäure hängt von den relativen Mengen und der zufälligen Gegenwart von Begleitstoffen ab. Will man die genannten Verbindungen nicht gruppenweise, sondern einzeln erfassen, so verfährt man wie folgt: Trennung der Lysin-, Tyrosin- und Isoleucin-, Leucinderivate. Man chromatographiert Probelösung 1 in der ersten Dimension einmal in Fließmittel I und nach Zwischentrocknung

Z in der zweiten Dimension durchlaufend<sup>18</sup> 3 h in Fließmittel III. Die Trennung und die Zuordnung der Flecken ist aus Figur 3 und 4 ersichtlich. Der Erfolg bei der Auftrennung der Leucine hängt von der absoluten und relativen Menge ab. Wenn sich nur ein Leucin-Isoleucin-Fleck bildet und sich dieser bei Verringerung der Chromatogrammbeladung nicht in zwei separate Flecken auflöst, so chromatographiert man in der zweiten Dimension in Benzol/Pyridin/Eisessig (80:20:2 v/v)<sup>7,8</sup>.

Trennung der Cystin-, Asparagin- und Glutamin-derivate, sowie der Asparaginsäure-, Glutaminsäure- und  $\alpha$ -Amino-adipinsäurederivate. Man chromatographiert Probelösung 1 in der ersten Dimension dreimal (vgl. oben) im Fließmittel I und nach Zwischentrocknung Z<sup>7,8</sup> in der zweiten Dimension in Fließmittel IV. Die Trennung und Zuordnung der Flecken ist aus Figur 5 und 6 ersichtlich.

(B) *Säurelösliche DNP-Aminosäuren.* Man trennt das Gemisch der säurelöslichen DNP-Aminosäuren (Probelösung 2) durch zweidimensionale Chromatographie, verwendet in der ersten Dimension Fließmittel V und entwickelt damit dreimal unter jeweiliger Zwischentrocknung M, schaltet nach dem dritten Lauf eine Zwischentrocknung Z ein und chromatographiert einmal in der zweiten Dimension mit Fließmittel VI. Als Laufstrecke genügt jeweils 8 bis 10 cm. Der Zeitbedarf ergibt sich zu ungefähr  $26 + 5 + 18 + 5 + 12 + 35 + 100 \text{ min} = 201 \text{ min}$  oder etwa  $3\frac{1}{2} \text{ h}$ . In Figur 7 zeigen wir ein Beispiel einer Urinalyse.

Anmerkung: Die Dreifachentwicklung in Fließmittel V erweist sich trotz der unvermeidlichen Fleckendeformation als zweckmässig, indem dadurch eine ganze Reihe unbekannter störender Substanzen aus dem Bereich der nachzuweisenden (vgl. Figur 8) DNP-Aminosäuren verschwinden. Für die Trennung einer Modellmischung genügt bereits eindimensionale Chromatographie in Fließmittel VI<sup>25</sup>.

Zur Interpretation von Chromatogrammen nach Figur 7 bedient man sich eines Fleckenmusters, das man durch Chromatographie einer Standardmischung von je 1 mg der Verbindungen<sup>23</sup> Nr. 15 und Nr. 34-37 (siehe Tabelle), gelöst in total 2 ml Butanol/Essigester (Beladung fünfmal

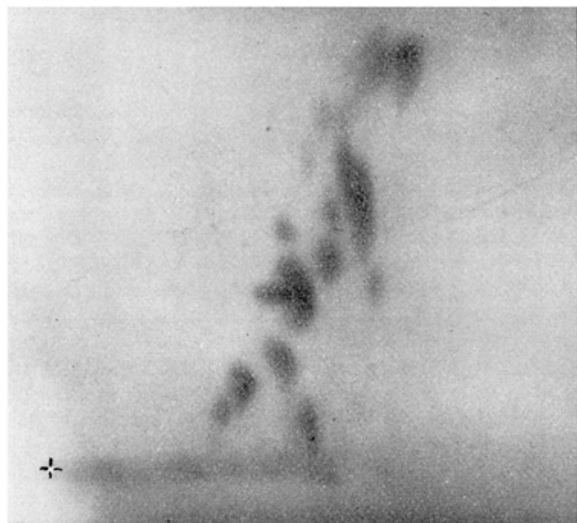


Fig. 5. Nachweis der DNP-Derivate von Cystin, Asparagin und Glutamin sowie von Asparaginsäure, Glutaminsäure und  $\alpha$ -Amino-adipinsäure. Probelösung 1 entsprechend 20 ml Morgenurin. Beladung viermal  $1 \mu\text{l}$ <sup>21</sup>. Normallichtphotographie (vgl. Text). Originalgrösse  $10,5 \times 14 \text{ cm}$ <sup>22</sup>. + Start. Fließmittel wie in Figur 6.

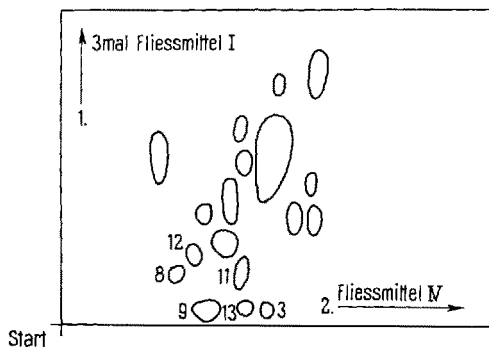


Fig. 6. Fleckenmuster und Fleckenzuordnung zur Interpretation von Chromatogrammen nach Figur 5. Originalgrösse  $10,5 \times 14 \text{ cm}$ <sup>22</sup>. Die Nummern entsprechen der Numerierung der DNP-Derivate in der Tabelle.



Fig. 7. Probelösung 2 entsprechend 20 ml Morgenurin. Beladung fünfmal  $1 \mu\text{l}$ <sup>21</sup>. Normallichtphotographie (vgl. Text). Originalgrösse  $10 \times 10 \text{ cm}$ <sup>22</sup>. + Start. Fließmittel wie in Figur 8.

<sup>25</sup> Vgl. auch p. 432 in <sup>8</sup>.

1  $\mu\text{l}^{21}$ ), erhält. Zur Zuordnung der Flecken vgl. Figur 8. In Zweifelsfällen empfiehlt sich auch hier, Probelösung und Standardmischung wie unter A) beschrieben vom gleichen Startpunkt aus zu chromatographieren. Aus dem Vergleich von Figur 7 und 8 ergibt sich die folgende Aussage über die Zusammensetzung der Probelösung 2 (DNP-Derivate): *Mittlere Mengen*: Tau, Arg, His. *Kleine Mengen*:  $\text{CySO}_3\text{H}$ . *Sehr kleine Mengen* (nur auf UV-Photographie gut sichtbar): Cit.

**Photographiertechnik.** Die gelben DNP-Aminosäuren sind im durchfallenden Tageslicht von blossen Auge sichtbar, wenn auf dem Chromatogramm je Fleck wenigstens 0,2  $\mu\text{g}$  vorliegen. Da im Urin von den einzelnen Aminosäuren sehr verschiedene Mengen enthalten sind, beobachtet man bei der Analyse sehr schwache neben sehr starken Flecken. Diese Unterschiede werden leicht verwischt, wenn man zur Auswertung und Dokumentation die früher beschriebene UV-Photokopiertechnik<sup>7,8</sup> benützt. Der visuelle Eindruck lässt sich nach den folgenden Verfahren wesentlich besser festhalten.

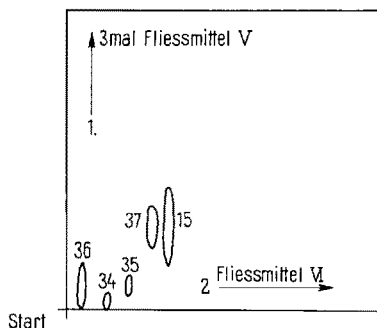


Fig. 8. Säurelösliche DNP-Aminosäuren: Fleckenmuster und Fleckenzuordnung. Originalgrösse  $10 \times 10 \text{ cm}^{22}$ . Die Nummern entsprechen der Numerierung der DNP-Aminosäuren in Tabelle II.

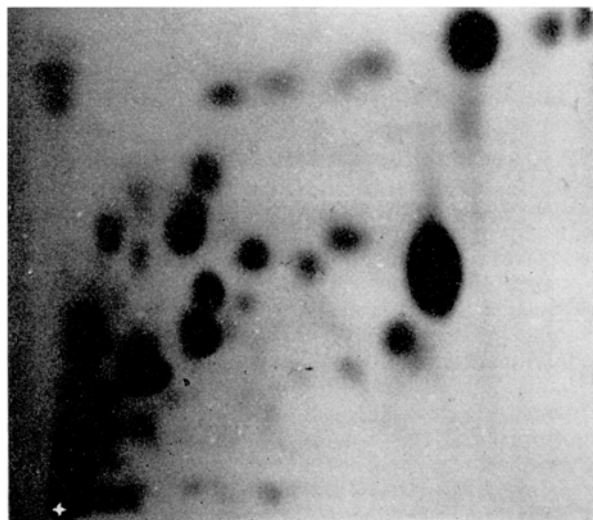


Fig. 9. UV-Photographie. Man vergleiche dazu Figur 1. Es handelt sich in beiden Fällen um dasselbe Chromatogramm. + Start.

**Normallichtphotographie<sup>26</sup>:** Man beleuchtet das Chromatogramm von links und von rechts durch zwei 8 Watt Sylvania-Leuchten<sup>27</sup> (Abstand 30 cm), exponiert ca. 1/15 sec (Rolleicord Va mit Rollinar-Vorsatzlinse Nr. 2, Blende 8, Agfa-Isopan IFF 13/10 DIN) und entwickelt in üblicher Weise.

**UV-Photographie<sup>26</sup>:** Sehr schwache Flecken kommen bei Photographie im langwelligen UV (365 m $\mu$ ) deutlicher zum Ausdruck. Dies kann in Zweifelsfällen nützlich sein. Es gelingt auf diese Weise oft, sehr schwache Flecken, die sich in unmittelbarer Nähe sehr starker Flecken befinden, mit Sicherheit als solche zu erkennen. Selbstverständlich werden der grösseren Empfindlichkeit wegen auf der UV-Photographie gewisse, eventuell unbekannte Substanzen zusätzlich sichtbar (vgl. Figur 9). Die Fleckenzuordnung erfolgt deshalb einfacher und sicherer auf der Normallichtphotographie. Man beleuchtet das Chromatogramm von links und von rechts durch zwei 8 Watt Sylvania-UV-Leuchten<sup>27</sup> (F 8 T 5/BLB; Abstand 30 cm), exponiert 5 bis 10 sec (Rolleicord Va mit Rollinar-Vorsatzlinse Nr. 2 und UV-Filter, Blende 5.6 bis 8, Agfa-Isopan IFF 13/10 DIN) und entwickelt in üblicher Weise.

**Modifizierte UV-Photokopie:** Röntgenfilm oder Photopapier, zum Beispiel Agfa Brovira Normal, wird mit der empfindlichen Seite direkt auf die Dünnschicht gelegt und mit einer Glasplatte angepresst. Man lässt dann UV-Licht (360 m $\mu$ )<sup>28</sup> durch die Schicht hindurch auf das Photopapier fallen und entwickelt in üblicher Weise. Die grösste Empfindlichkeit resultiert bei einer Belichtungszeit, welche den Hintergrund noch nicht schwarz, sondern erst grau erscheinen lässt. Bei längerer Belichtungszeit wird der Hintergrund zunehmend schwärzer; gleichzeitig vermindern die hellen Substanzflecken ihren Durchmesser, um bei Überbelichtung schliesslich ganz zu verschwinden. Hiervon lässt sich Gebrauch machen, um grosse Flecken, die sich teilweise überdecken, in kleinere getrennte Flecken aufzulösen.

**Summary.** Urinary amino acids are converted into DNP-derivatives. Extraction by organic solvents yields both ether- and acid-soluble DNP-derivatives in a form suitable for separation and identification by thin-layer chromatography. Solvent systems and techniques for the detection of 35 urinary constituents are described. The method is applicable to the qualitative analysis of other biological fluids.

D. WALZ, A. R. FAHMY, G. PATAKI,  
A. NIEDERWIESER, und M. BRENNER

*Institut für Organische Chemie der Universität Basel (Schweiz), 23. Januar 1963.*

<sup>26</sup> Wir danken der Direktion sowie den Herren Dr. H. R. BOLLIGER und W. BÜRKI der Firma Hoffmann-La Roche & Co. AG, Basel, die uns ihre Erfahrung zur Verfügung gestellt und uns die in den Figuren reproduzierten Aufnahmen freundlicherweise überlassen haben.

<sup>27</sup> Bezugsquelle: Draco & Co., Ltd., Zürich, Jenatschstrasse 1.

<sup>28</sup> UVANALYS-Laborgerät 57 US der Firma W. Bälz & Sohn KG, Heilbronn (Deutschland).