

## 181. Freie Aminosäuren im menschlichen Ejakulat

1. Mitteilung

### Dünnschichtchromatographischer Nachweis

von Max Keller und György Pataki

(1. VI. 63)

Über das Vorkommen der freien Aminosäuren im menschlichen Ejakulat ist bisher wenig bekannt geworden.

Einige Autoren<sup>1-7)</sup> haben papierchromatographisch 12 bis 22 freie Aminosäuren nachgewiesen, wobei die Ergebnisse der einzelnen Autoren zum Teil sehr stark voneinander abweichen; Ionenaustauscher-Chromatographie nach MOORE & STEIN<sup>8)</sup> erwies die Anwesenheit von 19 Aminosäuren<sup>9)</sup> (Summe der freien und peptidgebundenen Aminosäuren nach Totalhydrolyse).

KUBICEK *et al.*<sup>6)</sup> berichteten, dass die seminale Flüssigkeit unmittelbar nach dem Austritt nur geringe Mengen freier Aminosäuren enthält; nach KRAMPITZ<sup>10)</sup> sollen jedoch praktisch alle später nachweisbaren Aminosäuren bereits vorhanden sein. LUNDQUIST<sup>2)</sup> beobachtete, dass die *in vitro* Proteolyse eine halbe Stunde *post ejaculationem* abgeschlossen ist. Demgegenüber fanden QUATRINI<sup>3)</sup>, ADAM & KORTING<sup>4)</sup>, sowie KEUTEL & GABSCH<sup>5)</sup>, dass die Konzentration<sup>8)</sup> bzw. Anzahl<sup>4)</sup> der Aminosäuren noch über mehrere Stunden hindurch zunimmt.

Nachdem die Dünnschichtchromatographie zur Bestimmung von Aminosäuren im Urin<sup>11)</sup><sup>12)</sup> mit Erfolg angewandt wurde, haben wir diese einfache Methode zu «Aminoacidspermia»-Untersuchungen verwendet, um unsere papierchromatographischen<sup>13)</sup> Ergebnisse in ihrer Beweiskraft zu erhärten und dank der grossen Empfindlichkeit dieser Methode zu ergänzen.

Das enteweisste Ejakulat wird mit 2,4-Dinitrofluorbenzol (DNFB) umgesetzt. Nach Extraktionen mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln<sup>11)</sup> werden die Äther- und Säure-löslichen 2,4-Dinitrophenyl-aminosäuren (DNP-Aminosäuren) auf Kieselgel-G-Schichten chromatographiert.

1) L. JACOBSON, *Acta physiol. scand.* **20**, 88 (1950).

2) F. LUNDQUIST, *Acta physiol. scand.* **25**, 178 (1952).

3) U. QUATRINI, *Arch. fisiol. (Firenze)* **55**, 375 (1955).

4) W. ADAM & G. W. KORTING, *Dtsch. med. Wschr.* **80**, 249 (1955).

5) H. J. KEUTEL & H. C. GABSCH, *Urologia internat. (Basel)* **6**, 206 (1958).

6) R. KUBICEK, E. LINDER & F. SANTAVY, *Bull. Soc. Chim. biol.* **41**, 1345 (1959).

7) I. SMITH, in I. SMITH, *Chromatographic and Electrophoretic Techn.*, Interscience Publ. Inc., New York 1962, Vol. I, p. 120.

8) S. MOORE, D. H. SPACKMAN & W. H. STEIN, *Analyt. Chemistry* **30**, 1085 (1958); D. H. SPACKMAN, W. H. STEIN & S. MOORE, *ibid.* **30**, 1090 (1958) (in der Ausführung von G. KRAMPITZ, *Z. Tierphysiol. Futtermittelkunde* **15**, 40 (1960)).

9) G. KRAMPITZ & R. DOEFFMER, *Nature* **194**, 684 (1962).

10) G. KRAMPITZ, Privatmitteilung, 1963.

11) D. WALZ, A. R. FAHMY, G. PATAKI, A. NIEDERWIESER & M. BRENNER, *Experientia* **19**, 213 (1963).

12) J. OPIENSKA-BLAUTH, *Internat. Symposium on Thin Layer Chromatography*, Rom 1963.

13) D. DA RUGNA, M. KELLER & G. PATAKI, in Vorbereitung.

Die *ätherlöslichen DNP-Aminosäuren* wurden nach der wie folgt modifizierten Methode von WALZ *et al.*<sup>11)</sup> getrennt.

Man entwickelt gleichzeitig zwei Chromatoplaten (Chromatogramme I und II) im Fließmittel A. Nach Zwischentrocknung wird die Entwicklung im gleichen Fließmittel in der gleichen Richtung wiederholt.

Nach erneuter Zwischentrocknung beider Platten wird die eine (Chromatogramm I) in der 2. Dimension im Fließmittel B entwickelt. Die zweite Platte wird in der zweiten Dimension in der BN-Kammer<sup>14)</sup> im Fließmittel C 3–4 Std. durchlaufend chromatographiert (Chromatogramm II).

Im Chromatogramm I werden Di-DNP-Lysin und Di-DNP-Tyrosin nicht, und DNP-Leucin sowie DNP-Isoleucin nur unvollständig getrennt<sup>11)</sup>. Zur Trennung dieser DNP-Derivate verwenden WALZ *et al.*<sup>11)</sup> ein zweidimensionales Chromatogramm mit je einer Entwicklung im Fließmittel A und in der 2. Dimension im Fließmittel C. Wir ziehen (Chromatogramm II) die zweifache eindimensionale Entwicklung im Fließmittel A, gefolgt von Durchlaufchromatographie im Fließmittel C vor, weil dadurch nicht nur die DNP-Derivate von Lysin, Tyrosin bzw. Leucin und Isoleucin, sondern auch die übrigen<sup>11)</sup> DNP-Derivate getrennt werden. In unserem Chromatogramm II lassen sich alle von WALZ *et al.*<sup>11)</sup> untersuchten DNP-Verbindungen trennen; lediglich DNP- $\beta$ -Ala und DNP- $\gamma$ -Abu können gelegentlich überlappen.

Die Chromatogramme I und II gestatten die Trennung von 33 ätherlöslichen DNP-Verbindungen.

Bei der Trennung der Urin-Aminosäuren<sup>11)</sup> ist ein weiteres zweidimensionales Chromatogramm erforderlich.

Die *säurelöslichen DNP-Aminosäuren* werden durch eindimensionale Chromatographie im Fließmittel D (vgl. FAHMY<sup>15)</sup>) getrennt (Chromatogramm III).

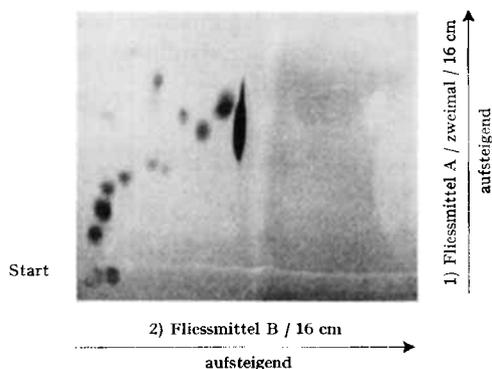


Fig. 1. *Ätherlösliche DNP-Aminosäuren aus 50  $\mu$ l Ejakulat. Normallichtphotographie<sup>11)</sup>*  
Zur Zuordnung der Flecke vgl. WALZ *et al.*<sup>11)</sup>

<sup>14)</sup> C. DESAGA G.M.B.H., Heidelberg.

<sup>15)</sup> A. R. FAHMY, unveröffentlicht, zitiert nach BRENNER *et al.*<sup>16)</sup>.

<sup>16)</sup> M. BRENNER, A. NIEDERWIESER & G. PATAKI, in E. STAHL, *Dünnschicht-Chromatographie*, Springer Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1962, S. 403 ff.

Die Identifizierung der DNP-Aminosäuren in den Chromatogrammen I und II erfolgt nach *eigenen* Fleckenmustern, welche für *jedes Laboratorium* bereitet werden sollten. Man kann z. B. ein Gemisch aller in Frage kommenden *freien* Aminosäuren nach Dinitrophenylierung auf die oben beschriebene Art weiterverarbeiten.

Die Zuordnung der Flecke im Chromatogramm III bereitet keine Schwierigkeiten, wenn eine Modellmischung der säurelöslichen DNP-Aminosäuren auf der gleichen Platte mitchromatographiert wird.

**Ergebnisse.** – In den Chromatogrammen I und II (Fig. 1 und 2) lassen sich alle Flecke, mit einer einzigen Ausnahme, als DNP-Aminosäuren identifizieren. Im Chromatogramm III (Fig. 3) werden im langwelligen UV.-Licht viele fluoreszierende Flecke sichtbar; diese Flecke stören die Identifizierung nicht.

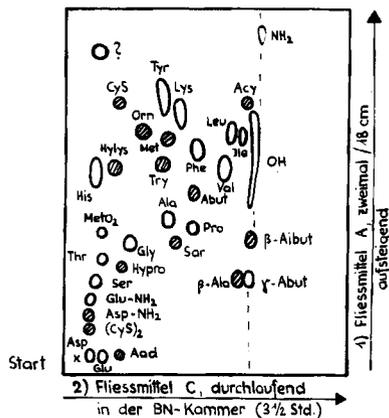


Fig. 2. Ätherlösliche DNP-Aminosäuren aus 50 µl Ejakulat. Schematische, massgetreue Darstellung

○ : Bezeichnung der im Ejakulat vorhandenen Aminosäuren.

⊗ : Bezeichnung der Lage der übrigen in Körperflüssigkeiten anzutreffenden Aminosäuren. Abkürzungen: vgl. 11).

In 50 µl Sperma (optimale Auftragsmenge nach unseren Erfahrungen) finden wir folgende Aminosäuren:

*Grössere Mengen:* Arg, Glu-NH<sub>2</sub>, Gly, His, Ile, Leu, Ser, Val

*Mittlere Mengen:* Ala, Asp, Glu, Phe, Thr, Tyr

*Kleine Mengen:* γ-Abut, CySO<sub>3</sub>H, Pro, Tau

*Spuren:* Lys, MetO<sub>2</sub>

Trägt man grössere Mengen auf, so überlappen mehrere Flecke; es ist indessen zu bemerken, dass in 100 µl Sperma 4 zusätzliche Flecke in den Chromatogrammen I und II auftreten. Es handelt sich mit grosser Wahrscheinlichkeit um die DNP-Derivate von β-Ala, β-Aibut, Orn und Try.

Im Gegensatz zu den Literaturangaben<sup>1-7)</sup> finden wir sowohl Papier-<sup>13)</sup> als Dünnschicht-chromatographisch Glu-NH<sub>2</sub>. Die Anwesenheit dieser Aminosäure wurde durch direkten Vergleich bewiesen.

Chromatographiert man steigende Mengen des Ejakulats, so lassen sich einerseits die in Spuren vorhandenen Aminosäuren erfassen, andererseits ist es möglich, halb-

quantitative Angaben zu machen. Wir werden darauf an anderer Stelle zurückkommen.

Wir verwenden die beschriebene Methode zu Studien über die Wirkung proteolytischer Enzyme im menschlichen Ejakulat.

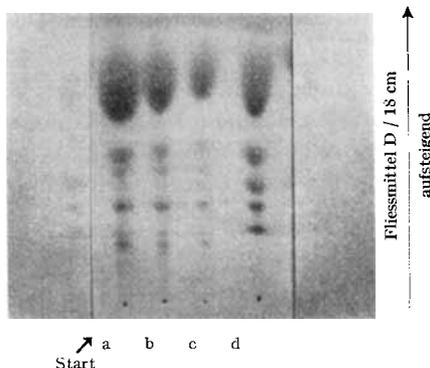


Fig. 3. Säurelösliche DNP-Aminosäuren. Normallichtphotographie<sup>11)</sup>

a: 50  $\mu$ l Ejakulat; b: 25  $\mu$ l Ejakulat; c: 12,6  $\mu$ l Ejakulat; d: je 5  $\mu$ g der säurelöslichen DNP-Aminosäuren. Reihenfolge von unten nach oben:  $\text{CySO}_3\text{H}$ , Arg, Cit, Tau, His.  $R_f_{\text{His}} \sim 0,5$ . Abkürzungen vgl. <sup>11)</sup>.

**Experimentelles.** – *Vorbereitung des Ejakulats:* 2 ml Ejakulat werden mit 2 ml Aceton geschüttelt und dann 15 min zentrifugiert. Die klare Lösung wird mit 5 N NaOH phenolphthaleinrosa eingestellt. Man gibt 3 ml Pufferlösung<sup>11)</sup> und 1 ml absolut-alkoholische DNFB-Lösung (10% g/v) zu.

Die Mischung wird 1 Std. im Dunkeln bei 37° in einem geschlossenen Erlenmeyer-Kolben mit Hilfe eines Magnetrührers gerührt. Man spült das abgekühlte Reaktionsgemisch mit 8 ml Äther und wenig Wasser in einen Scheidetrichter. Nach dreimaligem Ausschütteln mit je 8 ml Äther (Äther verwerfen<sup>11)</sup>) wird die wässrige Lösung mit 6 N HCl kongosauer eingestellt. Man extrahiert sie mit 5  $\times$  8 ml Äther (ätherlösliche DNP-Aminosäuren<sup>11)</sup>). Die zurückgebliebene wässrige Lösung wird darauf mit 5  $\times$  8 ml Essigester/*n*-Butylalkohol (1:1 v/v<sup>11)</sup>) extrahiert (säurelösliche DNP-Aminosäuren<sup>11)</sup>).

Beide Extrakte werden mit  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet<sup>11)</sup> und im Vakuum zur Trockne eingedampft. Die ätherlöslichen DNP-Aminosäuren löst man in 0,6 bis 1,2 ml Aceton, die säurelöslichen DNP-Aminosäuren in 0,6 bis 1,2 ml Essigester/Eisessig/*n*-Butylalkohol (10 ml Essigester + 0,1 ml Eisessig + 9,9 ml *n*-Butylalkohol).

*Chromatographie:* zur allgemeinen Arbeitstechnik vgl. <sup>16)</sup><sup>17)</sup>. Die Durchlaufchromatographie erfolgt nach <sup>18)</sup>. Bei Zweifachentwicklung oder zweidimensionaler Chromatographie sind Zwischentrocknungen erforderlich<sup>11)</sup>. – *Zweifachentwicklung:* Zur Zwischentrocknung lässt man die Platten 3 min bei Zimmertemperatur im Abzug liegen<sup>11)</sup>. – *Zweidimensionale Chromatographie:* man erhält die besten Trennungen, wenn die Platten zur Zwischentrocknung 22 Std. an der Luft im Dunkeln liegen gelassen werden. Man kann sie auch 10 min im Abzug liegen lassen, 10 min auf 60° erhitzen und 15 min im Abzug abkühlen lassen<sup>11)</sup>. Bei der letzteren Trocknungsweise wandern die Substanzen in der zweiten Dimension allgemein weniger weit.

Zur Trennung der ätherlöslichen DNP-Aminosäuren (Chromatogramme I und II) trägt man aus der acetonischen Lösung je ein Volumen entsprechend 50  $\mu$ l Sperma auf. – Die Konzentrationsverhältnisse der einzelnen Aminosäuren lassen sich in einem Reihenversuch ermitteln. – Man ent-

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

<sup>18)</sup> Montage und Betriebserläuterungen zu der BN-Kammer. Firmenschrift DESAGA G.M.B.H.<sup>14)</sup>, S. 6, Variante A.

wickelt zwei Chromatoplaten im Fliessmittel A; nach Zwischentrocknung (vgl. oben: Zweifachentwicklung) wird die Entwicklung im gleichen Fliessmittel in der gleichen Richtung wiederholt. Vor der Chromatographie in der zweiten Dimension werden beide Platten getrocknet (vgl. oben: Zweidimensionale Chromatographie); dann wird eine der Platten (Chromatogramm I) im Fliessmittel B aufsteigend und die zweite Platte (Chromatogramm II) durchlaufend im Fliessmittel C (3–4 Std. in der BN-Kammer<sup>14</sup>)<sup>18</sup>) entwickelt.

Zur *Trennung der säurelöslichen DNP-Aminosäuren* (Chromatogramm III) trägt man aus der Essigester/Eisessig/*n*-Butylalkohol-Lösung verschiedene Volumina, z. B. entsprechend 12,5, 25 und 50  $\mu$ l Sperma, auf die gleiche Platte auf. Zuletzt wird eine Modellmischung der säurelöslichen DNP-Aminosäuren aufgetragen. Die Chromatographie erfolgt eindimensional im Fliessmittel D.

*Fliessmittel.* A<sup>11</sup>): Toluol/2-Chloräthanol/Pyridin/25-proz. Ammoniak (50:35:15:7 *v/v*). – B<sup>11</sup>): Chloroform/Benzylalkohol/Eisessig (70:30:3 *v/v*). – C<sup>16</sup>): Chloroform/Methylalkohol/Eisessig (95:5:1 *v/v*)<sup>19</sup>). – D<sup>15</sup>): *n*-Butylalkohol mit 25-proz. Ammoniak bei Zimmertemperatur gesättigt.

#### SUMMARY

A thin-layer chromatographic method is described for separation and identification of free amino-acids in human ejaculate.

Laboratorium der Universitäts-Frauenklinik  
(Direktor Prof. Dr. TH. KOLLER), Basel

<sup>18</sup>) Die Laufstrecken der Substanzen sind bei der Durchlaufchromatographie im Fliessmittel C oft unterschiedlich (vermutlich durch Schwankungen der Luftfeuchtigkeit; vgl. F. GEISS & H. SCHLITT, *Naturwiss.* 50, 350 (1963). Manchmal besitzt deshalb Chloroform/Methylalkohol/Eisessig (98:2:1 *v/v*) bessere Trenneigenschaften.

## 182. Die Cardenolide von *Beaumontia grandiflora* WALLICH

### 2. Mitteilung: Strukturaufklärung von Wallichosid, Beaumontosid und Beauwallosid<sup>1)</sup>

Glykoside und Aglykone, 250. Mitteilung<sup>2)</sup>

von A. F. KRASSO, Ek. WEISS und T. REICHSTEIN

(I. VI. 63)

Kürzlich wurde über die Isolierung von vier krist. Cardenolidglykosiden (A, B, C und D) aus den Samen von *Beaumontia grandiflora* WALLICH berichtet<sup>2)</sup>. Eines davon (D) war mit dem bekannten Oleandrin (VIII) identisch. Die drei andern waren neu und wurden als Wallichosid (A), Beaumontosid (B) und Beauwallosid (C) bezeichnet. Hier wird über ihre Konstitutionsermittlung berichtet.

Alle drei Glykoside gaben positive Xanthidrol-Reaktion<sup>3)</sup> und liessen sich dementsprechend bereits unter sehr milden Bedingungen hydrolysieren<sup>4)</sup>.

<sup>1)</sup> Auszug aus Diss. ANNA F. KRASSO, Basel 1963.

<sup>2)</sup> 249. Mitteilung: A. F. KRASSO, Ek. WEISS & T. REICHSTEIN, *Pharmac. Acta Helv.*, im Druck.

<sup>3)</sup> M. PESEZ, *Ann. pharmac. franç.* 70, 104 (1952), und frühere Lit. daselbst. Alle Glykoside von 2-Desoxyzuckern geben bei dieser Reaktion eine rote Färbung.

<sup>4)</sup> Hydrolyse ausgeführt nach S. RANGASWAMI & T. REICHSTEIN, *Helv.* 32, 939 (1949).