

- [16] C. G. HONEGGER, *Helv.* **46**, 1730 (1963).
 [17] M. BRENNER & A. NIEDERWIESER, *Experientia* **16**, 378 (1960); V. ČERNÝ, J. JOSKA & L. LABLER, *Coll. czech. chem. Comm.* **26**, 1658 (1961); E. STAHL & U. KALTENBACH, *J. Chromatogr.* **5**, 351 (1961).
 [18] E. STAHL, *Dünnschichtchromatographie*, Springer, Berlin 1962.
 [19] W. A. SCHROEDER, J. R. SHELTON, J. B. SHELTON, J. CORMICK & R. T. JONES, *Biochemistry* **2**, 992 (1963).
 [20] V. V. RACHINSKII in [2], Seite 47.
 [21] E. STAHL, *Chemiker Ztg.* **82**, 323 (1958).
 [22] L. HÖRHAMMER, H. WAGNER & G. BITTNER, *Der Deutsche Apotheker* **14**, 148 (1962).
 [23] P. R. BHANDARI, B. LERCH & G. WOHLLEBEN, *Pharm. Ztg.* **107**, 1618 (1962).
 [24] G. PATAKI & J. KELEMEN, *J. Chromatogr.* **11**, 50 (1963).

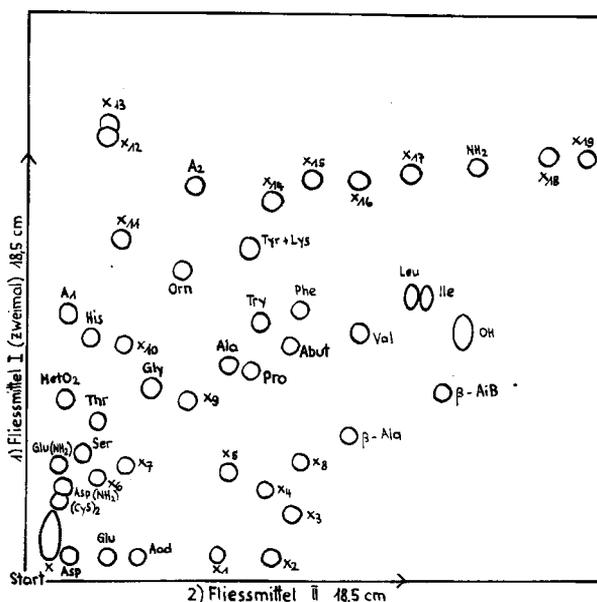
86. Aminosäuren und Peptide im Urin

1. Mitteilung

von György Pataki und Max Keller

(19. II. 64)

Die Dünnschichtchromatographie eignet sich vorzüglich zur Trennung und Charakterisierung von Aminosäuren im biologischen Material (für Zusammenfassung vgl. [1]¹). Im Rahmen unserer Untersuchungen über die Anwendung der Dünnschicht-



Übersichtschromatogramm der im Urin nachgewiesenen ätherlöslichen DNP-Verbindungen (vgl. Tab.)

I: Toluol/2-Chloräthanol/Pyridin/25-proz. Ammoniak (50:35:15:7).

II: Chloroform/Benzylalkohol/Eisessig (70:30:3), jeweils Volumenverhältnisse.

¹) Die Zahlen in eckigen Klammern verweisen auf das Literaturverzeichnis, S. 789.

chromatographie zur Sequenzanalyse von Peptiden [2] haben wir, um die Leistungsfähigkeit der Methode zur Erfassung kleinster Mengen zu prüfen, versucht möglichst viele, auch in Spuren vorhandene, Aminosäuren im menschlichen Urin nachzuweisen.

Die Urin-Aminosäuren wurden in dinitrophenylierter Form [3] [4] auf Kieselgelschichten chromatographiert [3] [4]. In der vorliegenden Mitteilung beschäftigen wir uns mit der Charakterisierung der ätherlöslichen Dinitrophenyl (DNP)-Derivate.

Wie ein Übersichtschromatogramm (s. Fig.) zeigt, liessen sich im Urin nach Dinitrophenylierung 45 ätherlösliche DNP-Verbindungen nachweisen. Ein Teil der Flecke ist nur bei grösseren Auftragsmengen sichtbar; hierbei können andere verdeckt werden (Tab.). Zur Charakterisierung wurden die einzelnen Flecke aus mehreren Chromatogrammen mit Essigester eluiert und mit authentischen DNP-Amino-

Nachweisbarkeit der ätherlöslichen Dinitrophenyl-Verbindungen*) im Urin

+ = nachweisbar; - = nicht nachweisbar; v = verdeckt

DNP- μl Urin	μl Urin				DNP- μl Urin	μl Urin			
	40	80	160	320		40	80	160	320
Ala	+	+	+	v	X ₆	-	-	-	+
β-Ala	-	+	+	+	X ₇	-	-	-	+
Aad	-	-	+	+	X ₈	-	-	+	+
Abut	-	-	+	+	X ₉	-	-	-	+
β-Aib	+	+	+	v	X ₁₀	-	-	-	+
Asp-NH ₂	+	v	v	v	X ₁₁	-	+	+	+
Asp	-	-	-	+	X ₁₂	-	+	+	+
(CyS) ₂	+	v	v	v	X ₁₃	-	-	-	+
Glu-NH ₂	+	v	v	v	X ₁₄	+	+	+	+
Glu	+	+	+	+	X ₁₅	+	+	+	+
Gly	+	+	+	+	X ₁₆	-	-	-	+
His	-	-	+	v	X ₁₇	-	-	-	+
Ile	+	+	v	v	X ₁₈	+	+	+	v
Leu	+	+	v	v	X ₁₉	+	+	+	v
Lys+Tyr**)	+	+	+	+					
MetO ₂	-	-	+	+					
Orn	-	+	+	+	Anzahl				
Phe	+	+	+	+	nachweisbarer				
Pro	-	-	-	v**)	DNP-				
Ser	+	+	+	v	Verbindungen	19	22	26	30
Thr	+	+	+	v					
Try	-	-	-	v**)					
Val	-	+	+	+					
A ₁ ***)	+	+	+	v					
A ₂ ***)	-	+	+	+					
X ₁	-	-	+	+					
X ₂	-	-	-	+					
X ₃	-	-	-	+					
X ₄	-	-	-	+					
X ₅	-	-	-	+					

*) Abkürzungen vgl. [3].

***) Durch Rechromatographie nachgewiesen.

***) Artefakt.

säuren²⁾ gemeinsam rechromatographiert. Die in der Figur mit dem Namen der einzelnen Aminosäuren bezeichneten Flecke stimmen in ihrem dünn-schichtchromatographischen Verhalten mit den entsprechenden DNP-Aminosäuren überein.

Die mit X bezeichneten Flecke konnten keiner der untersuchten DNP-Aminosäuren [3] [4] zugeordnet werden³⁾. Bei den meisten dürfte es sich um Peptide handeln [5]. Hydrolysiert man nämlich den Urin vor der Aufarbeitung mit 6N HCl, so verschwinden im Chromatogramm eine Anzahl der unbekanntes Flecke. Erwartungsgemäss nimmt die Intensität mancher Aminosäuren dabei zu [5]; es ist indessen zu bemerken, dass bei der Hydrolyse auch neue zum Teil unbekanntes «Flecke» entstehen. Über die präparative Isolierung der unbekanntes Verbindungen und über ihre Struktur wird in folgenden Mitteilungen berichtet.

Unsere Befunde stimmen mit der Literatur [6] im wesentlichen überein.

ZUSAMMENFASSUNG

Nach Umsetzung mit 2,4-Dinitrofluorbenzol konnten im menschlichen Urin dünn-schichtchromatographisch 45 ätherlösliche Dinitrophenyl-Verbindungen nachgewiesen werden; davon stimmen 24 in ihrem dünn-schichtchromatographischen Verhalten mit authentischen Dinitrophenylaminosäuren überein.

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

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] G. PATAKI, Z. klin. Chem., im Druck.
- [2] G. PATAKI, *Chimia* 18, 24 (1964).
- [3] D. WALZ, A.-R. FAHMY, G. PATAKI, A. NIEDERWIESER & M. BRENNER, *Experientia* 19, 213 (1963).
- [4] M. KELLER & G. PATAKI, *Helv.* 46, 1687 (1963); G. PATAKI & M. KELLER, *Z. klin. Chem.* 1, 158 (1963).
- [5] B. SKARŻYŃSKI & M. SARNECKA-KELLER, *Advances clin. Chemistry* 5, 107 (1962); A. L. BUCHANAN, E. E. HALEY & R. T. MARKIV, *Biochemistry* 1, 612 (1962); A. HOCK & H. WEISS, *Acta biol. med. germanica* 10, 262 (1963).
- [6] J. OPIENSKA-BLAUTH, *Clin. chim. Acta* 4, 841 (1959); E. J. BIGWOOD, R. CROCOART, E. SCHRAMM, P. SOUPART & H. VIS, *Advances clin. Chemistry* 2, 201 (1959); M. A. RELVAS, *Clin. chim. Acta* 8, 12 (1963).

²⁾ SERVA Entwicklungslaboratorium, Heidelberg (Deutschland).

³⁾ Bei der chromatographischen Zuordnung ist Vorsicht geboten! Die beiden Flecke X₇ und X₁₁ lassen sich durch ihre Lage im zweidimensionalen Chromatogramm [3] [4] als Di-DNP-Cystein bzw. DNP-Hydroxyprolin interpretieren. Chromatographiert man sie nach Elution gemeinsam (Auftragen: X₇, X₇ + Di-DNP-Cystein, Di-DNP-Cystein; für X₁₁ analog) mit den Vergleichs-substanzen, so stimmen einerseits ihre R_f-Werte nicht überein, und andererseits erkennt man im Durchlaufchromatogramm [4] jeweils zwei Flecke.