

Short Communications

Dünnschicht-chromatographische Trennungen von Aminosäuren an Cellulose-Schichten

Die Dünnschicht-Chromatographie (DC) hat sich auf Grund hervorragender und der Papier-Chromatographie (PC) in mancherlei Hinsicht überlegenen Trennungen kleinster Mengen von Substanzgemischen innerhalb sehr kurzer Zeit einen festen Platz in der Chromatographie gesichert. Über Technik und praktische Durchführung der DC ist inzwischen in zahlreichen Arbeiten berichtet worden, so dass der Hinweis auf einige zusammenfassende Übersichten¹⁻³ genügen dürfte.

Obschon zahlreiche Methoden zur papier-chromatographischen Trennung von Aminosäuren bekannt sind, erschien es sinnvoll festzustellen, ob die bekannten Vorzüge der DC auch bei Aminosäuretrennungen auftreten und zwar besonders hinsichtlich der Trenndauer und der Empfindlichkeit. MUTSCHLER UND ROCHELMEYER⁴ trennten Aminosäuren auf gepufferten Kieselgel-Schichten; BRENNER UND NIEDERWIESER⁵ führen Aminosäuretrennungen auf normalen, d.h. ungepufferten Kieselgel-Schichten durch und halten eine Pufferung für überflüssig.*

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die systematische Untersuchung der Trennmöglichkeiten von Aminosäuren auf Cellulose-Schichten. TEICHERT, MUTSCHLER UND ROCHELMEYER³ haben schon kurz auf diese Trennmöglichkeiten hingewiesen, jedoch ohne Angabe von Einzelheiten.

Praktische Durchführung

Die Herstellung der Schichten aus Cellulosepulver erfolgte mit dem Streichgerät der Firma C. Desaga GmbH, Heidelberg. Dazu wurden 15 g Cellulosepulver MN 300 (ohne Gipszusatz) zur Dünnschicht-Chromatographie nach E. STAHL** mit 90 ml dest. Wasser in einem Mixergerät angerührt. Diese Menge ist ausreichend zum Beschichten von 5 Glasplatten 200 × 200 mm. Nach 10 Minuten Trocknen bei 105° sind die Platten gebrauchsfertig. Zur Chromatographie wurden etwa 0.5 μ l einer 0.1 %igen Lösung der Aminosäuren in 0.1 N HCl 1.5 cm vom unteren Plattenrand mit einer Mikropipette aufgetragen. Die schärfsten und saubersten Trennungen erzielte man bei Auftragung von 0.5–1.0 μ l einer 0.1 %igen Lösung je Komponente, d.h. also bei Auftragung von etwa 1 γ je Aminosäure. Die verwendeten Laufmittel sind in Tabelle I aufgeführt.

Nach erfolgter Trennung wurden die Platten mit Ninhydrinlösung besprüht (0.2–0.3 g Ninhydrin in 95 ml Methanol + 5 ml 2,4,6-Collidin). Die besprühten Platten wurden 30 Minuten auf etwa 70° erhitzt, wobei verschieden gefärbte Flecken

* Inzwischen wurde eine weitere Arbeit über die Dünnschicht-Chromatographie von Aminosäuren auf Kieselgel G-Schichten bekannt und zwar von FAHMY, NIEDERWIESER, PATAKI UND BRENNER⁷.

** Firma Macherey, Nagel & Co., 516 Düren-Rl. (Deutschland).

TABELLE I

ZUSAMMENSTELLUNG DER UNTERSUCHTEN LAUFMITTEL

L ₁	= <i>n</i> -Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5), obere Phase
L ₂	= Pyridin-Methyläthylketon-Wasser (15:70:15)
L ₃	= Propanol-Wasser (7:3)
L ₄	= Methanol-Wasser-Pyridin (80:20:4)
L ₅	= <i>n</i> -Butanol-Ameisensäure-Wasser (75:15:10)
L ₆	= Propanol-8,8 %iges Ammoniak (8:2)
L ₇	= Äthanol- <i>n</i> -Butanol-Wasser-Propionsäure (10:10:5:2)
L ₈	= Phenol-Wasser (8:2) (nicht geeignet!)
L ₉	= Phenol, mit Phosphatpufferlösung pH 12 gesättigt (Pufferlösung: 0.067 M NaOH + 0.67 M Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O (1:1) (nicht geeignet!).

langsam sichtbar wurden. Die von BRENNER UND NIEDERWIESER⁵ nachstehend beschriebene Beobachtung ist empfehlenswert. Sie markieren die bei Erwärmung der besprühten Platten langsam entstehenden Farbflecken *in statu nascendi*, d.h. die Flecken kommen oft punktförmig zum Vorschein und gehen dann leicht nach vollständiger Entwicklung langsam ineinander über, besonders bei nahe zusammenliegenden *R_F*-Werten.

TABELLE II

R_F-WERTE EINIGER AMINOSÄUREN

Laufmittel: siehe Tabelle I.

Schicht: Cellulosepulver MN 300 zur Dünnschicht-Chromatographie nach E. STAHL*.

Entwicklungsdauer: 30 min bei L₂ (aufsteigend).

60 min bei L₁, L₄, L₅, L₆, L₇ (aufsteigend).

90 min bei L₃ (aufsteigend).

Aminosäure	<i>R_F</i> -Werte						
	L ₁	L ₂	L ₃	L ₄	L ₅	L ₆	L ₇
DL- α -Alanin	0.38	0.06	0.48	0.60	— ^{xx}	0.16	0.38
L(+)-Argininium-monochlorid	0.46	0	0.09	0.07	0.15	0.09	0.16
L-Asparagin	0.41	0.04	0.18	0.27	0.15	0.09	0.15
L-Asparaginsäure	0.46	0	0.18	0.54	0.26	0.03	0.34 0.20 ⁿ
L-Cystin	0.14	0	0.13 ^a	0.13 ^{xx}	0.07	0	0.04
L-Glutaminsäure	0.35	0	0.42	0.66	0.34	0	0.29 ^x
Glykokoll (Glycin)	0.29	0.03	0.35 ^x	0.39	0.29	0.08	0.23 ^x
DL-Isoleucin	0.67	0.24	0.69	0.82	— ^{xx}	0.47	0.64
L-Leucin	0.70 ^x 0.50 ⁿ	0.27 0.24 ⁿ	0.71 0.59 ⁿ	0.80 0.63 ⁿ	— ^{xx} —	0.50 —	0.68 —
L(+)-Lysinium-monochlorid	0.42	0	0.08	0.09	0.11	0.07	0.14
DL-Methionin	0.50	0.25	0.58	0.68	— ^{xx}	0.30	0.53
DL-Serin	0.46	0.04	0.25	0.45	0.21	0.11	0.22 0.28 ⁿ
DL-Tryptophan	0.60	0.34	0.48 0.51 ⁿ	0.46	— ^{xx}	0.35	0.52
L(-)-Tyrosin	0.46	0.30	0.56	0.60	— ^{xx}	0.18	0.45
DL-Valin	0.54	0.15	0.59	0.77	— ^{xx}	0.35	0.55

* Firma Macherey, Nagel & Co., 516 Düren-Rl. (Deutschland).

ⁿ = Nebenleck; ^a = schwach angefärbt; ^x = gezogen; ^{xx} = sehr lang gezogen.

Laufmittel L_5 , L_8 und L_9 eignen sich bei den angewandten Bedingungen nicht zur Trennung von Aminosäuren auf Cellulose-Schichten. Entweder erscheinen die Flecken nach dem Besprühen mit Ninhydrin garnicht oder aber sehr lang gezogen und verformt. Dagegen liefern die übrigen Laufmittel in den meisten Fällen schöne runde Flecken. Die sauren Aminosäuren bleiben bei Anwendung basischer Laufmittel am Start (vgl. R_F -Werte in Tabelle II).

Diskussion der Ergebnisse

Auch mit Hilfe der DC lassen sich auf Cellulose-Schichten nicht alle Aminosäuren bei Einsatz nur eines Laufmittels trennen. Eine Anzahl Laufmittel können aus der PC übernommen werden. Aminosäuretrennungen auf Cellulose-Schichten MN 300* (ohne Gipszusatz) verlaufen wesentlich besser und schärfer als auf Cellulose-Schichten mit Gipszusatz. Weil diese Tendenz bei allen angewendeten Laufmitteln deutlich wurde, wird auf eine Wiedergabe der R_F -Werte bei Schichten mit Gipszusatz verzichtet. Die Laufzeit der Trennungen auf Cellulose-Schichten liegt zwischen 30 und 90 Minuten und damit weit unter dem Zeitbedarf für papier-chromatographische Methoden. Mengen von 0.5 bis 1 μ können eindeutig und leicht nachgewiesen werden. Die Empfindlichkeit der dünn-schicht-chromatographischen Methode ist also wesentlich grösser als die bei papier-chromatographischen Methoden.

Wissenschaftliche Abteilung der Firma Macherey, Nagel & Co., PAUL WOLLENWEBER
Düren-Rl. (Deutschland)

¹ E. STAHL, *Angew. Chem.*, 73 (1961) 646; *Z. anal. Chem.*, 181 (1961) 303.

² E. DEMOLE, *J. Chromatog.*, 1 (1958) 24; 6 (1961) 2.

³ H. K. MANGOLD, *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, 38 (1961) 708.

⁴ E. MUTSCHLER UND H. ROCHELMAYER, *Arch. Pharm.*, 292 (1959) 449.

⁵ M. BRENNER UND A. NIEDERWIESER, *Experientia*, 16 (1960) 378.

⁶ K. TEICHERT, E. MUTSCHLER UND H. ROCHELMAYER, *Deut. Apotheker-Ztg.*, 100 (1960) 283.

⁷ A. R. FAHMY, A. NIEDERWIESER, G. PATAKI UND M. BRENNER, *Helv. Chim. Acta*, 44 (1961) 2022.

Eingegangen den 29. März 1962

* Firma Macherey, Nagel & Co., 516 Düren-Rl. (Deutschland).

Thin-layer chromatography

Chromatoplate analysis of the bufadienolides isolated from toad venoms

Chromatoplate analysis, owing to its versatility, is receiving extensive attention from organic chemists¹. It has been successfully applied to the analysis of steroids¹ and recently STAHL has extended its use to the rapid resolution of cardiac glycosides².

Work on the isolation and identification of the cardiotoxic principles (bufadienolides or "bufogenins") from Brazilian toad venoms (*Bufo ictericus* Spix, *Bufo crucifer* Wied and *Bufo paracnemis* Lutz) has been undertaken in this laboratory³, and in connection with these studies, we wish to report the results of chromatoplate analysis of this group of substances.