

Cellulose-Pulver kann hierbei mit einer 0.5%igen Lösung von Versen (Äthylendiamintetraessigsäure) vorbehandelt werden (Entfernung von Kationen).

Mit Hilfe des Verfahrens können sehr kleine Substanzmengen identifiziert werden. Die Nachweisgrenze bei Anfärbung mit Anisidinphthalat lag für Hexosen und Methylpentosen bei 0.5 μg , für Pentosen und Uronsäuren bei 0.1–0.2 μg . Optimal sind Konzentrationen von ca. 2 μg für Hexosen und ca. 1 μg für Pentosen.

Versuche zu einer quantitativen Auswertung der Chromatogramme sind im Gange.

Institut für Chemie und Physik,
Bundesanstalt für Fleischforschung,
Kulmbach (Deutschland)*

A. SCHWEIGER

- ¹ E. STAHL, *Z. Anal. Chem.*, 181 (1961) 311.
- ² E. STAHL UND U. KALTENBACH, *J. Chromatog.*, 5 (1961) 351.
- ³ R. GRAU UND A. SCHWEIGER, *Z. Lebensm. Untersuch. u. Forsch.*, (in Vorbereitung).
- ⁴ F. A. ISHERWOOD UND M. A. JERMYN, *Biochem. J.*, 48 (1951) 515.
- ⁵ S. M. PARTRIDGE, *Biochem. J.*, 42 (1948) 238.
- ⁶ H. SULSER, *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.*, 48 (1957) 19.
- ⁷ E. STAHL, *Pharm. Rundschau*, 1 (1959) Nr. 2.
- ⁸ J. B. PRIDHAM, *Anal. Chem.*, 28 (1956) 1967.

Eingegangen den 21. Juni 1962

* Direktor: Prof. Dr. R. GRAU.

J. Chromatog., 9 (1962) 374–376

Notes

Dünnschicht-Chromatographie von ¹⁴C-Dinitrophenyl-aminosäuren

Zur Abtrennung von ¹⁴C-Aminosäuren wurden Substanzgemische mit 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol (DNFB) umgesetzt. Nach allgemein bekannten, bewährten Verfahren sind die entsprechenden Dinitrophenyl-aminosäuren (DNP-Aminosäuren) in praktisch quantitativen Ausbeuten zu erhalten. Zur Auftrennung der ¹⁴C-DNP-Aminosäuren wurde die Dünnschicht-Chromatographie angewandt.

Dieses Vorgehen bringt folgende wesentliche Vorteile für ¹⁴C-Aminosäuren:

Zeitsparende, methodisch einfache Abtrennung der DNP-Aminosäuren von anderen Stoffgruppen und damit relativ geringer Verlust an Aktivität;

Erhaltung der C-Zahl der Aminosäuren;

Eigenindikation der farbigen DNP-Aminosäuren auf dem Chromatogramm.

Methoden

Aus Gäransätzen von Traubenmost mit Weinhefe unter Zusatz von L-¹⁴C-Glutaminsäure* isolierten wir neben ¹⁴C-Alkoholen unter anderen auch ¹⁴C-Aminosäuren. Die

* CFB 10 uniformly labelled, Radiochemical Centre, Amersham.

Hefen wurden aus den Versuchs-Ansätzen durch Zentrifugieren entfernt; alle flüchtigen Bestandteile im Vakuum abdestilliert. 0.05–0.1 g Destillations-Rückstand (entsprechend dem von BRENNER, NIEDERWIESER UND PATAKI¹ angegebenen Konzentrationsbereich für Aminosäuren) wurden mit einer Lösung von 0.3 g NaHCO₃ in 2 ml Wasser und anschliessend mit einer Lösung von 0.2 ml DNFB* in 4 ml Äthanol versetzt. Der Ansatz wird 2 Stunden bei Zimmertemperatur geschüttelt (verdunkelt). Anschliessend wird in einem Wasserbad von 40° der Alkohol im Vakuum entfernt und der Rückstand mit 2–5 ml Wasser in einen Schütteltrichter überführt. Durch dreifaches Ausziehen mit je 15 ml Äther ist der Überschuss an DNFB sowie Dinitrophenol (DNP-OH) zu entfernen. Nach Ansäuern der wässrigen Unterphase werden die DNP-Aminosäuren mit Äther (3 × 15 ml) oder Essigester extrahiert, die Extrakte getrocknet (Na₂SO₄) und das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Die zurückbleibenden DNP-Aminosäuren werden zur Chromatographie in Aceton bzw. Essigester aufgenommen.

Zur *Chromatographie* der ¹⁴C-DNP-Aminosäuren ist die nach STAHL standardisierte Dünnschicht-Chromatographie geeignet:

Dünnschicht-Platten (200 × 200 mm) wurden mit Kieselgel G (Merck) beschichtet**. Vorbehandlung der beschichteten Platten und Chromatographie der DNP-Aminosäuren analog zu BRENNER *et al.*¹.

Fliessmittel 1 (I. Dimension): Toluol–Pyridin–2-Chloräthanol–0.8 N Ammoniak (100:30:60:60). Unterphase zum Äquilibrieren der Platten; Oberphase als Fliessmittel.

Fliessmittel 2 (II. Dimension): Chloroform–Benzylalkohol–Eisessig (70:30:3).

Auswertung

Zur Auswertung der Spots auf ihren Gehalt an ¹⁴C werden die Chromatogramme folgendermassen vorbereitet:

1. Imprägnieren mit einem Material, das mit Kieselgel einen elastischen Film bildet, der von der Platte abgezogen werden kann.

2. Abheben oder Absaugen einzelner Flecke von der Platte und Elution der DNP-Aminosäuren; gegebenenfalls Rechromatographie mangelhaft getrennter Komponenten.

Ein dünner Film wird erzielt, wenn z.B. nach BAROLLIER² mit Collodium–Glycerin oder nach LICHTENBERGER³ mit Kunststoffdispersionen (Polyacrylsäureester, Polyvinylidenchlorid, Polyvinylpropionat***) imprägniert wird.

Die Impulsgehalte der ¹⁴C-DNP-Aminosäuren können nach verschiedenen Methoden mit unterschiedlicher Impulsausbeute bestimmt werden:

(a) Aufsetzen eines Endfenster-Zählrohres auf die Zonen der DNP-Aminosäuren.

(b) Ausstanzen der Zonen, Überführen der Plättchen in einen Probenwechsler mit Methan-Durchflusszähler.

(c) Schneiden des Filmes in Streifen und Auswerten mit einem Radio-Papierchromatographen.

(d) Verbrennen der Proben und Messen der Aktivität des ¹⁴CO₂ in der Gasphase⁴.

(e) Autoradiographische Identifizierung der aktiven Zonen⁵.

* Fluka AG, Chem. Fabrik, Buchs, Schweiz.

** Streichgerät und Ausrüstung zur Dünnschicht-Chromatographie nach E. STAHL der Firma Desaga, Heidelberg.

*** "Neatan" der Firma E. Merck, Darmstadt.

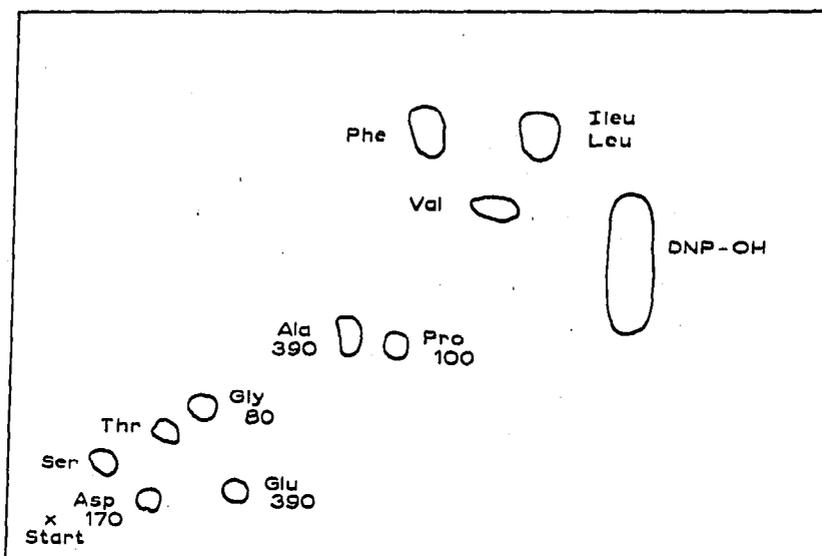


Fig. 1. Dünnschicht-Chromatogramm von ^{14}C -DNP-Aminosäuren.

Aus Fig. 1 wird die Trennung von DNP-Aminosäuren eines Destillations-Rückstandes ersichtlich. Die angegebenen, um den Wert des Untergrundes korrigierten, Impulse wurden nach Imprägnieren des Dünnschicht-Chromatogrammes mit Colloidium, Abziehen des Filmes und Ausstanzen der Flecke mit einem Handprobenwechsler* gewonnen.

*Forschungs-Institut für Rebenzüchtung, Geilweilerhof,
Abteilung Biochemie und Physiologie,
Siebeldingen/Pfalz (Deutschland)*

F. DRAWERT
O. BACHMANN
K.-H. REUTHER

¹ M. BRENNER, A. NIEDERWIESER UND G. PATAKI, *Experientia*, 17 (1961) 145.

² J. BAROLLIER, *Naturwiss.*, 48 (1961) 404.

³ W. LICHTENBERGER, *Z. Anal. Chem.*, 185 (1962) 111.

⁴ R. F. GLASCOCK, *Isotopic Gas Analysis for Biochemists*, Academic Press, New York, 1954;

H. SIMON, *Angew. Chem.*, 71 (1959) 303;

K. H. SCHWEER, *Atompraxis*, 7 (1961) 453.

⁵ G. A. BOYD, *Autoradiography*, Academic Press, New York, 1955.

Eingegangen den 24. April 1962

* Messgerätekombination der Firma Frieseke u. Hoepfner, Erlangen.