

# EINE MULTIDIMENSIONALE TECHNIK ZUR CHROMATOGRAPHISCHEN IDENTIFIZIERUNG VON AMINOSÄUREN

E. VON ARX UND R. NEHER

*Pharma-Wissenschaftliche Abteilung der CIBA A.G.,  
Basel (Schweiz)*

(Eingegangen den 12. März 1963)

## I. EINLEITUNG

Seit den grundlegenden Arbeiten von CONSDEN, GORDON UND MARTIN<sup>1</sup> ist die Trennung und Identifizierung von Aminosäuren durch zweidimensionale Papierchromatographie in zahlreichen Variationen immer wieder versucht worden (vgl. die übersichtlichen Darstellungen in Zit. 2-7). Verschiedene Autoren haben diese Methodik in den letzten Jahren auch für dünne Schichten von Silicagel modifiziert<sup>8-11</sup>.

Mit zunehmender Anzahl der aus Naturstoffen isolierten "seltenen" Aminosäuren liess sich eine chromatographische Auftrennung und Identifizierung dieser Stoffe mit der Kombination von nur zwei Lösungsmittelsystemen und einigen Farbreaktionen längst nicht mehr bewältigen. Elution der in unverändertem Zustand relativ schwierig zu lokalisierenden Aminosäuren bzw. ihrer Gemische und ein- oder mehrmalige Rechromatographie in anderen Systemen einschliesslich Elektrophorese erwiesen sich als unbedingt notwendig.

Um diese zeitraubenden, stufenweisen Operationen wie zerstörungsfreie Lokalisierung, Elution und Rechromatographie vieler Einzeleluate zu vermeiden, haben wir eine Kombination von vier Lösungsmittelsystemen und verschiedenen Farbreaktionen zu einer neuartigen quasi-4-dimensionalen Technik entwickelt; sie hat sich in den letzten anderthalb Jahren sowohl nach der Filterpapier- wie auch Cellulose-Dünnschicht-Technik im praktischen Gebrauch gut bewährt.

## 2. PRINZIP DER METHODE

Das Prinzip dieser multidimensionalen Technik lässt sich einfach anhand des Beispiels in Fig. 1 erläutern.

In den Ecken von 3 Celluloseblättern oder Cellulose-Dünnschichtplatten (A, B, C) wird das zu trennende Gemisch wie üblich aufgetropft, in diesem Beispiel ein Gemisch von Hydroxyprolin (Hypro), Glycin (Gly), Lysin (Lys), Histidin (Hist), Tryptophan (Try) und Leucin (Leu)\*. In der ersten Dimension (in Fig. 1 von oben nach unten) werden sowohl A wie B und C mit dem *gleichen* Lösungsmittelsystem I chromatographiert, wobei sich eine erste Auftrennung ergibt, z.B. in die Gruppen Hypro + Gly + Lys + His und Try + Leu, wie in Fig. 1 links aussen angedeutet.

\* Für die Kurzbezeichnung der Aminosäuren folgen wir den Vorschlägen von BRAND<sup>12</sup>; siehe Tabelle I.

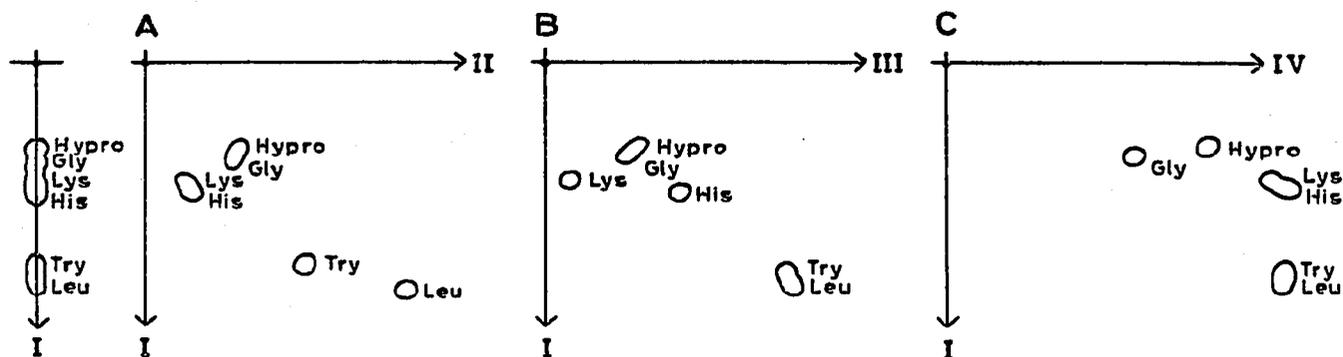


Fig. 1. Schema der multidimensionalen Technik für die Trennung und Zuordnung von Aminosäuren. Links aussen: Eindimensionales Chromatogramm mit System I allein. (A) zweidimensionales Chromatogramm, Lösungsmittelkombination: I + II; (B) zweidimensionales Chromatogramm, Lösungsmittelkombination: I + III; (C) zweidimensionales Chromatogramm, Lösungsmittelkombination: I + IV.

In der *zweiten* Dimension (in Fig. 1 von links nach rechts) wird nun jedes Chromatogramm für sich mit einem Lösungsmittelsystem *unterschiedlicher* Zusammensetzung entwickelt (II für A, III für B und IV für C). Auf diese Art erhält man drei 2-dimensionale Chromatogramme (I + II, I + III, I + IV), in welchen die Reihenfolge der Aminosäuren in der ersten Dimension die gleiche ist, während ihre Sequenz in den zweiten Dimensionen durch die Auswahl geeigneter Systeme (II, III, IV) so stark variiert wird (Inversionen), dass in Kombination mit 2–5 Farbreaktionen eine sichere *Zuordnung* und *Unterscheidung* von 52 der in Tabelle I erwähnten 57 Amino-

TABELLE I

QUALITATIVE UND QUANTITATIVE NACHWEISBARKEIT VON 57 AMINOSÄUREN  
(ALPHABETISCHE REIHENFOLGE)

(In  $\mu\text{g}/\text{Fleck}$  auf dem zweidimensionalen Chromatogramm der Kombination I + II). NC = Ninhydrin-Collidin-Reagens; I = Isatinreagens; PD = Pauly's Diazo Reagens; RH = Reindel-Hoppe-Modifikation; NPK = Nitroprussid-Natrium-Kaliumferricyanid. Die quantitativen Angaben gelten nur für NC, und zwar stellen sie den unteren praktischen Bereich der Nachweisbarkeit dar; die unterste Grenze liegt in der Regel noch tiefer, variiert aber etwas je nach den Trocknungs-Bedingungen nach der Applikation von NC; die Angaben über die Färbungen mit den Reagentien I, PD, RH und NPK entsprechen einem Einsatz von je 0,5–5  $\gamma$  Aminosäuren. Bei PD bedeutet + eine gelbe bis rötliche Farbe, bei RH eine blauschwarze und bei NPK eine rote; (+) bedeutet eine nur schwache Farbreaktion.

Aminosäure	Kurzbezeichnung	NC	I	PD	RH	NPK
$\alpha$ -Alanin	Ala	0.05	violett	violett	—	
$\beta$ -Alanin	$\beta$ Ala	0.05	grün	lila	+	
$\alpha$ -Amino- <i>n</i> -buttersäure	Abu	0.05	violett	lila	(+)	
$\alpha$ -Aminoisobuttersäure	isoAbu	0.05	violett	gelb	(+)	
$\beta$ -Aminobuttersäure	$\beta$ Abu	0.05	lila	gelbl.	+	
$\beta$ -Aminoisobuttersäure	$\beta$ isoAbu	0.05	violett	lila	+	
$\gamma$ -Aminobuttersäure	$\gamma$ Abu	0.2	violett	lila	+	
$\epsilon$ -Amino- <i>n</i> -capronsäure	$\epsilon$ Acap	1.0	violett	rosa	+	
<i>p</i> -Aminohippursäure	<i>p</i> Ahip	10.0	violett	gelb	+	
Arginin	Arg	0.2	violett	rosa	+	+
Asparagin	Asp(NH) <sub>2</sub>	2.0	gelb	rosa	+	
Asparaginsäure	Asp	0.05	grün	violett	(+)	

(Fortsetzung P. 331)

TABELLE I (Forsetzung)

Aminosäure	Kurz- bezeichnung	NC		I	PD	RH	NPK
Canavaninsulfat	Can	0.2	violett	bräunl.		+	+
Citrullin	Cit	0.1	violett	rosa		+	
Cysteinsäure	CySO <sub>3</sub> H	0.05	violett	gelb		(+)	
Cystin	(Cys) <sub>2</sub>	1.0	braun	rosa		(gelb)	
α,γ-Diaminobuttersäure	Dabu	2.0	violett	rosa		+	
α,α-Diaminopimelinsäure	Dapim	2.0	violett	rot		(gelb)	
Dihydroxyphenylalanin	Dopa	10.0	grau	lila	+	(gelb)	
Dijodtyrosin	DiJtyr	5.0	violett	lila	(+)	+	
Dimethylcystein	Dimecys	0.2	violett	rosa		—	
Glutamin	Glu(NH <sub>2</sub> )	0.5	violett	rosa		(+)	
Glutaminsäure	Glu	0.05	violett	lila		—	
Glycin	Gly	0.05	braun	rosa		+	
Glycocystein	Gcy	—	—	rosa		(+)	+
Histidin	His	0.3	grau	lila	+	(gelb)	
Hydroxyglutaminsäure	Hyglu	0.05	violett	rosa		(+)	
Hydroxylysin	Hylys	0.5	violett	lila		+	
Hydroxyprolin	Hypro	1.0	gelb	blau		(+)	
β-Hydroxyvalin	Hyval	0.5	violett	rosa		(+)	
Isoleucin	Ileu	0.1	violett	rosa		(+)	
allo-Isoleucin	allo-Ileu	0.1	violett	rosa		(+)	
Kreatin	Kn	—	—	gelb	(+)	+	+
Kreatinin	Knin	—	—	gelb		+	+
Kynurenin	Kyn	0.5	braun	rosa		(gelb)	
Lanthionin	Lan	1.0	violett	orange		(rosa)	
Leucin	Leu	0.5	violett	rosa		—	
Lysin	Lys	0.5	violett	rot		+	
Methionin	Met	0.5	violett	rosa		—	
Methioninsulfon	MetSO <sub>2</sub>	0.2	violett	rosa		(+)	
Methioninsulfoxyd	MetSO	0.2	violett	rosa		(braun)	
Norleucin	Nleu	0.5	violett	lila		—	
Norvalin	Nval	0.05	violett	rot		(+)	
Ornithin	Orn	0.2	violett	rot		+	
α-Phenylalanin	Phe	0.2	violett	lila		(gelb)	
α-Phenylglycin	Phegly	5.0	gelb	gelb	(+)	(braun)	
Prolin	Pro	0.5	gelb	blau		(+)	
Sarkosin	Sar	0.1	grau	gelb		+	
Serin	Ser	0.2	violett	orange		gelb	
Taurin	Taur	0.2	violett	gelb		+	
Threonin	Thr	0.5	violett	rosa		(+)	
allo-Threonin	alloThr	0.5	violett	rosa		(+)	
Thyronin	Thyron	2.0	braun	braun		—	
Thyroxin	Thyrox	2.0	braun	gelb	+	(+)	
Tryptophan	Try	0.5	violett	lila		(braun)	
Tyrosin	Tyr	0.5	braun	rot	+	(rosa)	
Valin	Val	0.05	violett	rosa		(+)	

säuren möglich wird (Cystein wird hierbei als Cystin oder Cysteinsulfosäure chromatographiert). Dihydroxyphenylalanin (Dopa) verteilt sich auf eine so grosse Fläche (siehe Fig. 2-4), dass sich seine Identifizierung als schwierig erweist. Die restlichen vier Aminosäuren Leucin, Norleucin, Isoleucin und *allo*-Isoleucin trennen sich zwar von allen andern 53, untereinander aber nur in die Gruppen Leu + Nleu und Isoleu + *allo*-Isoleu auf. Während sich das Diastereomeren-Paar Threonin und *allo*-Threonin dank der stärkeren Wechselwirkung zwischen NH<sub>2</sub>- und OH-Gruppen ohne weiteres nach obiger Technik trennen lässt, ist dies für Isoleu und *allo*-Isoleu chromato-

graphisch sehr schwierig (Wechselwirkung zwischen  $\text{NH}_2$ - und  $\text{CH}_3$ -Gruppen zu schwach). Leu und Nleu sind hingegen in einem Spezialsystem gut differenzierbar (System Nr. 22 von Tabelle II auf Cellulose-Dünnschicht, zweimaliger Lauf).

### 3. AUSWAHL DER SYSTEME UND DURCHFÜHRUNG DER METHODE

Die Methode wurde ursprünglich für die konventionelle Filterpapierchromatographie entwickelt und schliesslich unter Beibehaltung der Lösungsmittelsysteme auf die Cellulose-Dünnschichtchromatographie übertragen, wodurch in erster Linie eine 5–10-fach höhere Empfindlichkeit erreicht worden ist. Aus einer grösseren Anzahl bekannter oder neuer Lösungsmittelsysteme kamen nach eindimensionalem Lauf der verschiedensten Aminosäuren 28 Systeme (siehe Tabelle II) in die engere Auswahl;

TABELLE II

LÖSUNGSMITTELSYSTEME DER ENGEREN AUSWAHL FÜR DIE TRENNUNG VON AMINOSÄUREN AUF CELLULOSE (Nr. 1–28) UND SILICAGEL (Nr. 1–31)\*

1	<i>n</i> -Butanol-Äthanol-Wasser (10:10:5)
2	<i>n</i> -Propanol-Äthylacetat-Wasser (7:1:2)
3	<i>tert.</i> -Amylalkohol-Isopropanol-Wasser (100:40:55)
4	<i>tert.</i> -Amylalkohol-Dimethylformamid-Wasser (100:15:45)
5	Äthanol-8 % ig. wässr. NaCl (3:1)
6	<i>n</i> -Butanol-Essigsäure-Wasser (4:1:5)
7	<i>n</i> -Butanol-Essigsäure-Wasser (100:10) bis zur Sättigung (ca. 30)
8	Isopropanol-Ameisensäure-Wasser (40:2:10) = <i>System II</i>
9	<i>n</i> -Butanol-Ameisensäure-Wasser (480:6:314)
10	<i>n</i> -Propanol-Propionsäure-Wasser (70:5:20)
11	Isopropanol-Zitronensäure-Wasser (40:2:10)
12	<i>sec.</i> -Butanol-Isopropanol-Monochloressigsäure-Wasser (70:10:3 g:40)
13	Phenol-Wasser (75:25)
14	Phenol-Wasser (75:25) (+7.5 mg Na-cyanid) Sättigung der Gasphase mit 3 % ig. wässr. $\text{NH}_4\text{OH}$ = <i>System IV</i>
15	Collidin-Lutidin-Wasser (1:1) ges.
16	Methyläthylketon-Pyridin-Wasser (60:15:25)
17	<i>n</i> -Butanol-Pyridin-Wasser (10:3:3)
18	Chloroform-Methanol-17 % ig. $\text{NH}_4\text{OH}$ (20:20:9)
19	<i>sec.</i> -Butanol-3 % ig. wässr. $\text{NH}_4\text{OH}$ (100:44)
20	<i>n</i> -Butanol-Äthanol-Diäthylamin-Wasser (10:10:2:5)
21	<i>n</i> -Butanol-Aceton-Diäthylamin-Wasser (10:10:2:5) = <i>System I</i>
22	<i>tert.</i> -Amylalkohol-Isopropanol-Triäthylamin-Veronal-Wasser (100:40:0.8:1.8 g:50)
23	<i>sec.</i> -Butanol-Methyläthylketon-Dicyclohexylamin-Wasser (10:10:2:5) = <i>System III</i>
24	<i>sec.</i> -Butanol-Äthanol-Dicyclohexylamin-Wasser (100:25:15:35)
25	<i>n</i> -Propanol-Pyridin-Essigsäure-Wasser (15:10:3:12)
26	<i>sec.</i> -Butanol-Isopropanol-Wasser-Veronal-Na (5 % ig. in Wasser) (100:15:60:10)
27	<i>sec.</i> -Butanol-Isopropanol-Triäthylamin-Veronal-Wasser (100:10:0.8:1.8g:60)
28	<i>sec.</i> -Butanol-Isopropanol-Phosphatpuffer, pH 8-Wasser (35:35:10:25)
29	Benzol-Aceton-Methanol-Essigsäure (70:5:20:5)
30	Äthylacetat-Methyläthylketon-Ameisensäure-Wasser (5:3:1:1)
31	Äthylacetat-Pyridin-Wasser (20:10:11)

\* Zum grössten Teil handelt es sich um publizierte Systeme (vgl. Zit. 2) oder Modifikationen davon.

von diesen wurden erst nach rechnerischer und schliesslich experimenteller Kombination von Systempaaren folgende vier Lösungsmittelsysteme in der gegebenen Reihenfolge ausgewählt.

*System I* (erste Dimension für A, B und C):

*n*-Butanol–Aceton–Diäthylamin–Wasser (10:10:2:5), nach HARDY *et al.*<sup>13</sup>, pH 12.0 (auf Cellulose 11.05–11.4).

*System II* (zweite Dimension für A):

Isopropanol–Ameisensäure (99 %-ig)–Wasser (40:2:10), pH 2.5 (auf Cellulose 2.7–2.8).

*System III* (zweite Dimension für B):

*sec.*-Butanol–Methyläthylketon–Dicyclohexylamin–Wasser (10:10:2:5), modifiziert nach HARDY *et al.*<sup>13</sup>, pH 11.0 (auf Cellulose 10.9–11.0).

*System IV* (zweite Dimension für C):

Phenol–Wasser (75:25), Gasphase equilibriert mit 3 %igem wässrigen NH<sub>4</sub>OH, vgl. Zit. 2–7 (auf Cellulose pH 7.1–7.3).

Wie ersichtlich unterscheiden sich diese Systeme u.a. durch ihr pH und ihre Eigenschaft als Wasserstoff-Akzeptoren bzw.-Donatoren.

Die festgelegte Reihenfolge der Systeme richtete sich nicht nur nach der Güte der damit zu erzielenden Trennungen sondern auch nach Gesichtspunkten der Flüchtigkeit und der Verträglichkeit mit nachfolgenden Systemen und Farbreaktionen. Von letzteren verwendeten wir Ninhydrin–Collidin (NC)<sup>2–7</sup>, Isatin (I)<sup>14</sup>, Pauly's Diazo-Reagens (PD)<sup>2–7</sup>, das modifizierte Reagens nach Reindel-Hoppe (RH)<sup>15</sup> und Nitroprussid-Natrium–Kaliumferricyanid (NPK)<sup>3</sup>; über deren Spezifität und Empfindlichkeit gibt Tabelle I Auskunft. Nach der Kombination I + II sind alle fünf Farbreaktionen anwendbar, nach I + III noch NC, I, PD und NPK (RH fällt aus), nach I + IV wegen der schwierig zu entfernenden Phenolreste noch NC, I und NPK (PD und RH fallen aus).

Als Cellulose-Träger dienten entweder Whatmanpapiere No. 1 oder dünne Schichten von Cellulosepulver Macherey und Nagel MN 300. Im folgenden geben wir unsere Präparation nach der Methode von STAHL<sup>16</sup> mit dem Applikator der Firma Desaga an.

8 g Cellulosepulver werden in 48 ml Wasser und 2 ml Äthanol suspendiert und 2–3 Min. mit einem elektrischen Mixer (Handmixer Arria, 1. Stufe, Teflonscheibe, 25 mm Durchmesser mit 3 Einschnitten) homogenisiert; der Brei wird bei 250  $\mu$  Schlitzbreite über 5 Glasplatten (20  $\times$  20 cm) gestrichen; Trocknung über Nacht horizontal bei Raumtemperatur. Für das Phenol-System IV erweist sich eine Vorwaschung der Schicht mit System I aufsteigend und quer zur Streichrichtung (entsprechend der Laufrichtung der zweiten Dimension) als sehr vorteilhaft; Trocknung wie oben.

Bei Verwendung aller drei Lösungsmittelsysteme (II, III, IV) für die zweiten Dimensionen und nur einer Farbreaktion benötigt man drei Cellulose-Dünnschichtplatten (CP); da wir in der Regel noch drei weitere Farbreaktionen für die erste Kombination I + II vorsehen, geben wir den Arbeitsgang für total sechs CP wieder.

Man legt sechs CP nebeneinander, mit der Streichrichtung von oben nach unten und zeichnet die Startpunkte in der Ecke rechts unten je 25 mm vom Plattenrand entfernt oberflächlich an. Die wässrige Aminosäurelösung wird mit Mikropipette in Portionen von 1  $\mu$ l oder weniger aufgetropft (Fleckendurchmesser 3 mm oder weniger) und mit kalter oder warmer Luft angetrocknet. Die Konzentration der einzelnen Aminosäuren soll 10  $\mu$ g möglichst nicht überschreiten. Bei Gemischen mit sehr

grossen Konzentrationsunterschied der Komponenten sind notfalls Chromatogramme mit verschiedener Beladung auszuführen.

Für den ersten Lauf werden die sechs CP entweder gemeinsam in einem passenden Messingrahmen (Plattenabstand 5 mm, Schicht gegen Schicht) oder paarweise (je eine an der Wand, Schicht gegen innen) so in die Trennkammern gestellt, dass die Laufrichtung (aufsteigend) mit der Streichrichtung identisch ist. Die Trennkammern werden bereits vorher mit soviel Lösungsmittelsystem I gefüllt, dass der Abstand zwischen Flüssigkeitsniveau und Startpunkt 15–20 mm beträgt (ca. 150–200 ml pro Trennkammer je nach ihrer Form und Beladung); die Eintauchhöhe der CP selbst ist hierbei weitgehend belanglos. Wichtig ist, dass die Kammern vorher *nicht* mit Hilfe von Filtrierpapierstreifen oder sonstigen Massnahmen maximal mit Dampf gesättigt worden sind; eine gewisse *Untersättigung* ist für den guten Lauf Vorbedingung und kann leicht reproduziert werden, indem man das Lösungsmittel erst unmittelbar vor der Chromatographie einfüllt. Der Lauf (bei 22°) wird unterbrochen, sobald die Lösungsmittelfront das obere CP-Ende erreicht hat (Zeit siehe Tabelle III). Die CP

TABELLE III

VERGLEICH DER LAUFZEITEN (STUNDEN) DER EINZELNEN SYSTEME AUF VERSCHIEDENEN TRÄGERN ÜBER DIE ERFORDERLICHE DISTANZ UNTER VERWENDUNG DER GEGEBENEN EINRICHTUNGEN

	Whatman Nr. 1 (absteigend, 35 cm)	CMN 300 (50 $\mu$ ) (aufsteigend, 15 cm)	Kieselgel G (20 $\mu$ ) (aufsteigend, 15 cm)
System I	5	2.25	3
System II	9	3.5	5
System III	5.25	2	4
System IV	13.5 (aufsteigend)	4	5

werden in gleicher Stellung wie in den Kammern 5–10 Min. bei 90° (Trockenschrank) oder 12 Std. bei Raumtemperatur getrocknet. Nun tropft man ein Gemisch von Leit-substanzen (0.5  $\mu$ g Gly, 1  $\mu$ g Tyr, 1  $\mu$ g Nleu in total 1  $\mu$ l) seitlich auf die Startlinie für den Lauf in der zweiten Dimension (identisch mit der Linie der Chromatographie in der ersten Dimension) und zwar so, dass es einerseits 5–10 mm links vom ursprünglichen Startpunkt andererseits in gleicher Richtung 20 mm vor der ersten Front (= Plattenrand) placiert ist (auf Fig. 2–4 als "Test" bezeichnet).

Nun werden die CP mit der neuen Startlinie nach unten (senkrecht zum ersten Lauf) in anderen Trennkammern in der zweiten Dimension chromatographiert: je zwei CP in zwei Kammern mit System II, eine CP in je eine Kammer mit System III und IV (Systeme frisch einfüllen, Untersättigung, Füllvolumen bzw. Abstand Niveau-Startlinie wie beim ersten Lauf). Nach aufsteigender Chromatographie bis zum oberen Rand werden die Platten 20 Min. bei 90° getrocknet.

Wird aus irgendwelchen Gründen die konventionelle Papierchromatographie vorgezogen, nimmt man drei Bögen Whatmanpapier No. 1, z.B. 45 × 45 cm, zeichnet den Startpunkt je 9 cm von den Rändern in einer Ecke an und chromatographiert nach Auftropfen im System I absteigend im Durchlauf so lange bis das als Leitfarbstoff dienende Kresolrot (unmittelbar neben dem Startpunkt aufgetropft) 80 % der

Bogenlänge zurückgelegt hat. Nach Trocknen chromatographiert man wie üblich senkrecht zur ersten Dimension: im System II absteigend bis das Kresolrot den unteren Papierrand erreicht, bzw. im System III absteigend bis Tartrazin als Leitfarbstoff noch 3 cm vom unteren Bogenrand entfernt ist, bzw. im System IV aufsteigend (technisch einfacher mit dem Phenol-System). Nach üblicher Trocknung sind die Chromatogramme bereit zur Behandlung mit Nachweisreagenzien.

#### Nachweis

(a) *Ninhydrin-Collidin-Reagens (NC)*. 1 g Ninhydrin in 700 ml Äthanol abs., 29 ml 2,4,6-Collidin und 210 ml Essigsäure. Gleichmässig auf je eine CP der drei Kombinationen sprühen und trocknen bei 90° bis Flecke erscheinen (Untergrund bleibt noch weiss); die sofort sichtbaren Flecke werden zur Erleichterung der Auswertung mit weichem Bleistift markiert. Nach einigen Stunden bei Raumtemperatur werden sie bedeutend intensiver und "fliessen" eventuell zusammen, zum Teil (je nach Aminosäure und Konzentration) erscheinen sie erst dann deutlich.

(b) *Isatin (I) nach BARROLIER et al.*<sup>14</sup>. Stark sprühen und trocknen 30 Min., 90°; besser differenzierte Farben entstehen jedoch beim Trocknenlassen bei 20° (20 Std.).

(c) *Pauly's Diazo-Reagens (PD)*. Lösung 1:0.4 M Natriumsulfanilat in Wasser; Lösung 2:0.4 M Natriumnitrit in Wasser. Vor Gebrauch mischt man 1 Vol. Lösung 1, 1 Vol. Lösung 2, 8 Vol. 0.25 N Salzsäure und 10 Vol. 2 N Sodalösung und besprüht die Chromatogramme.

(d) *Reindel-Hoppe-Reagens (RH)*, modifiziert nach GREIG UND LEABACK<sup>15</sup>. Lösung 1:2 % ige wässrige Kaliumhypochloritlösung; Lösung 2: gleiche Volumina einer gesättigten Lösung von *o*-Tolidin in 2 % iger Essigsäure und einer 0.85 % igen wässrigen Lösung von Kaliumjodid werden vor Gebrauch gemischt. Die Chromatogramme werden leicht mit Lösung 1 besprüht und 1-1.5 Std. bei Raumtemperatur stehen gelassen (gewisse Lösungsmitteldämpfe beeinträchtigen die Chlorierung!). Darauf mit Lösung 2 gleichmässig besprühen: schwarzblaue Flecken aufweissem Untergrund.

(e) *Nitroprussid-Natrium-Kaliumferricyanid (NPK)* nach Vorschrift D 106 in Zit. 3: Je 1 Vol. 10 % ige Natronlauge, 10 % ige Nitroprussid-Natriumlösung und 10 % ige Kaliumferricyanidlösung werden mit 3 Vol. Wasser gemischt; nach 0.5 stündigem Stehenlassen sprühen.

#### 4. AUSWERTUNG

Wir beschreiben die Auswertung anhand der Cellulose-Dünnschicht-Chromatogramme.

In Schema 1 sind die Aminosäuren in der Reihenfolge ihrer zunehmenden  $R_F$ -Werte im System 1 (erste Dimension) angeordnet wobei ihre  $R_F$ -Bereiche durch einen fetten senkrechten Strich gekennzeichnet sind. Darunter, mit den einzelnen Aminosäuren durch feine Striche verbunden, finden sich die zugehörigen  $R_F$ -Werte in den drei für die zweiten Dimensionen verwendeten Systemen II, III und IV, und zwar bereits unter Berücksichtigung allfälliger leichter Verdrängungseffekte wenn alle Aminosäuren zugleich chromatographiert werden. *Dadurch ist die Position für jede Aminosäure in den drei zweidimensionalen Chromatogrammen eindeutig fixiert:* Unsicherheiten in der Zuordnung sind durch die erzielten Unterschiede und Inversionen in den zweiten Dimensionen bei gleichbleibender Sequenz in der ersten Dimension so gut wie ausgeschlossen. Voraussetzung dazu ist selbstverständlich eine gute



Reproduzierbarkeit, zu deren Realisierung die methodischen Einzelheiten von grosser Wichtigkeit sind (siehe oben unter Ausführung und unten unter Diskussion). Trotzdem lässt sich eine gesamthafte mässige Verschiebung der für die Systeme II, III und IV angegebenen  $R_F$ -Werte nach oben oder unten nicht immer vermeiden. Eine einfache Kontrolle der Reproduzierbarkeit und Zuordnung lässt sich dadurch erreichen, dass man jeweils *nach* der ersten Dimension zu beiden Seiten der neuen Startlinie für die zweite Dimension ein Gemisch von Gly, Try und Nleu auftröpft, welche dann nach Sichtbarmachung des fertigen zweidimensionalen Chromatogrammes als Leit-substanzen für die Zuordnung dienen (gelegentliche Verdrängungseffekte auf dem zweidimensionalen Chromatogramm sind hierbei zu berücksichtigen); dies ist insbesondere dann von Vorteil, wenn keine Aminosäuren vorliegen, die sich durch eine besondere charakteristische Färbung hervorheben. Letztere ist ein weiteres, wertvolles Hilfsmittel für die Zuordnung und damit Identifizierung, weshalb die Kombination I + II von Anfang an 3-fach ausgeführt wird. Je ein Chromatogramm der Kombination I + II, I + III und I + IV wird mit Ninhydrin-Collidin entwickelt, je eines der Kombination I + II zusätzlich mit Diazo-Reagens und Isatin oder gegebenenfalls mit weiteren Spezialindikatoren. Die qualitativen und quantitativen Aspekte der Farbreaktionen sind aus Tabelle I ersichtlich. Bei der Chromatographie aller erwähnten Aminosäuren erhält man Flecken-Muster wie sie aus Fig. 2-4 ersichtlich sind. Es handelt sich um Photographien von Originalchromatogrammen auf denen die Flecke (auch die hierbei weniger gut reproduzierbaren) leicht angezeichnet und beschriftet worden sind.

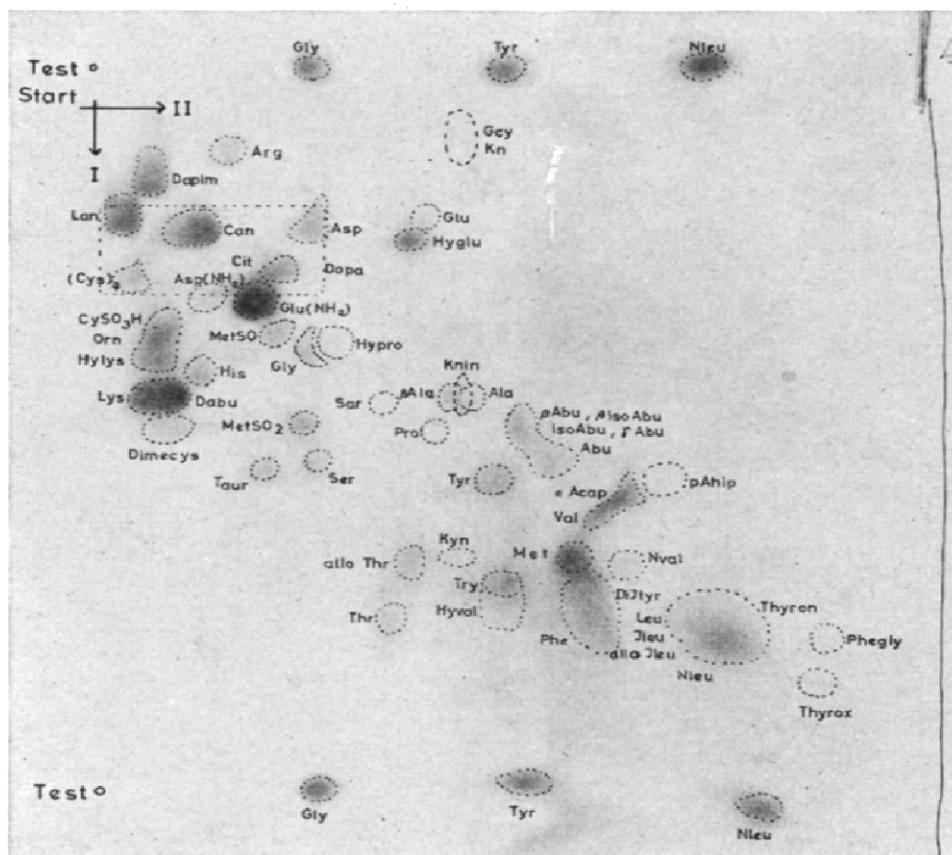


Fig. 2.



Die Zuordnung der einzelnen Flecken zu den Aminosäuren erfolgt z.B. so, dass man alle drei Chromatogramme, mit dem ursprünglichen Startpunkt links oben, nebeneinander auflegt (vgl. in Fig. 2-4). Zweckmässigerweise bedient man sich eines Lineales über alle drei Platten und beginnt mit der Zuordnung reihenweise von oben nach unten mit Hilfe der Fleckenkarten (Fig. 2-4) oder des Schema 1; andererseits kann man auch bei einem Fleck mit prägnanter Färbung oder Position beginnen. Ausser zur Identifizierung unbekannter Aminosäureflecken lässt sich Schema 1 auch zur Auswahl der besten Kombinationen für die Auftrennung vorbekannter Aminosäuregemische heranziehen; oft werden für diese Zwecke 1-2 zweidimensionale Chromatogramme genügen; als Beispiel sei die Analyse der Hydrolyseprodukte synthetischer Peptide angeführt, sei es zur qualitativen Kontrolle des Aminosäuregehaltes, sei es zur Untersuchung von Hydrolysemethoden. Im diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass Di- und Oligopeptide in den hier verwendeten Systemen stets kleinere  $R_F$ -Werte aufweisen als ihre Bausteine.

### 5. DISKUSSION

In der Regel ziehen wir die Dünnschichttechnik für unser Verfahren vor, da sie geringere Laufzeiten (siehe Tabelle III) und vor allem 5-10-fach geringere Substanzmengen erfordert als die konventionelle Papierchromatographie; bei letzterer fällt dafür die Plattenbereitung weg und die Reproduzierbarkeit verlangt keine so strenge Standardisierung.

Die Wahl des geeigneten *Trägermaterials* für die Dünnschicht richtete sich sowohl nach Trenneffekt wie Nachweisempfindlichkeit. Bei Verwendung der gleichen Lösungsmittelsysteme (I-IV) mit Silicagel als Träger (Kieselgel G Merck) war der Trenneffekt ganz ungenügend; einerseits verursachten die basischen Systeme auf Silicagel besonders häufig störende Doppelfronten, andererseits durchschnittlich weniger ausgeprägte Inversionen als auf Cellulose. Wir versuchten daher, aus einer engeren Auswahl von ca. 30 Lösungsmittelsystemen (siehe Tabelle II), darunter auch die von BRENNER *et al.*<sup>10,11</sup> angegebenen, auf die gleiche Art wie vorher für Cellulose solche auszuwählen, die nach der quasi-4-dimensionalen Technik auch auf Silicagel eine vollständige Auftrennung der 53 Aminosäuren ermöglichen sollte. Als optimale Kombinationen der Systeme (siehe Tabelle II) fanden wir die Paare Nr. 18 + 30, 18 + 12 und 18 + 14. So konnten wir zwar mit Nr. 18 + 14 z.B. das Gemisch von Fig. 1 bereits völlig auftrennen, bei der Chromatographie der übrigen Aminosäuren ergaben sich jedoch immer wieder zahlreiche Paare oder sogar Triplets, die sich nicht auftrennen liessen. Wir verzichteten daher auf Silicagel als Träger zugunsten von Cellulosepulver, obwohl die Nachweisempfindlichkeit auf ersterem für einige Aminosäuren noch etwas höher liegt als auf letzterem.

Von allen geprüften Cellulosequalitäten gab das Pulver MN 300 die schönsten Schichten und Chromatogramme, und zwar nach Homogenisation wie oben beschrieben; für den Trenneffekt war es belanglos ob die Streichdicke 250 oder 500  $\mu$  gewählt wurde; bei einer solchen von 250  $\mu$  mass die getrocknete Celluloseschicht nur 50  $\mu$ . Unhomogenisiertes Cellulosepulver hatte Flecke mit wellenförmigen Rändern zur Folge. Aufsprühen statt Streichen der Suspension erwies sich technisch als schwer durchführbar (Verstopfung). Eine gute *Reproduzierbarkeit* der Chromatogramme ist ausser von der Cellulosequalität, Schichtpräparation, Lösungsmittelalter, Trock-

nung zwischen beiden Läufen, usw. noch ganz besonders von der Kammersättigung abhängig. Maximale Kammersättigung verursacht zu raschen Lauf des Lösungsmittels bei aufsteigender Chromatographie so dass die Aminosäuren nur ungenügend aufgetrennt werden und zusammengeschoben erscheinen. Bei maximaler Sättigung dürfte nur im Durchlaufverfahren mit den angegebenen Lösungsmittelsystemen eine genügende Trennung zu erreichen sein. Es ist daher wichtig, dass bei unserem aufsteigenden Verfahren eine *Untersättigung* gewährleistet ist, wie im Abschnitt 3 beschrieben; dies trifft insbesondere für die Läufe in der zweiten Dimension zu.

Die Empfindlichkeit des *Nachweises* der Aminosäuren mit Ninhydrin erwies sich als stark abhängig von (a) Trägermaterial, (b) Lösungsmittelsystem, (c) den Aminosäuren selbst und (d) der Reagenszusammensetzung.

So ist das Ninhydrin-Essigsäure-Reagens (NE)\* für Silicagelschichten, das Ninhydrin-Collidin-Reagens (NC) aber für Celluloseschichten am empfindlichsten; ein Vergleich ist daher nur unter Berücksichtigung dieser optimalen Bedingungen sinnvoll; er ergab eine ähnliche Empfindlichkeit für beide Trägersysteme mit Ausnahme einiger Aminosäuren wie, Alanin, Ornithin und Arginin, die auf Silicagel mit NE noch besser nachweisbar sind als auf Cellulose mit NC.

#### DANK

Frau D. HODEL-V. WESTERNHAGEN danken wir für ihre wertvolle und unermüdete technische Hilfe bei der Ausführung der Chromatogramme.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Für die chromatographische Differenzierung und Charakterisierung von 52 Aminosäuren wurde eine Kombination von vier Lösungsmittelsystemen und verschiedenen Farbreaktionen zu einer neuartigen multi-dimensionalen Technik entwickelt. Sie beruht auf drei zwei-dimensionalen Cellulose-Dünnschicht-Chromatogrammen, wobei für die erste Dimension immer das gleiche Lösungsmittelsystem, für die zweite Dimension 3 verschiedene Systeme geeigneter Zusammensetzung verwendet werden. Dadurch ist die Position jeder Aminosäure eindeutig fixiert. Die Vor- und Nachteile von Cellulose und Silicagel als Träger werden hinsichtlich Trennbarkeit, Reproduzierbarkeit und Nachweisempfindlichkeit des Verfahrens diskutiert.

#### SUMMARY

A novel multidimensional technique has been elaborated and found suitable for the chromatographic identification of 52 amino acids. This technique is based on three two-dimensional cellulose thin-layer chromatograms using the same solvent system for the first dimension and three different systems of suitable properties for the second dimensions. With this method all amino acids can be differentiated and characterized by fixed positions, and in addition by some colour reactions. The relative merits of cellulose and silicagel as carriers are discussed in relation to separation efficiency, reproducibility and sensitivity of detection.

\* Reagens Nr. 108, zitiert von M. BRENNER, A. NIEDERWIESER UND G. PATAKI in Zit. 16.

## LITERATUR

- <sup>1</sup> R. CONSDEN, A. H. GORDON UND A. J. P. MARTIN, *Biochem. J.*, 38 (1944) 224.
- <sup>2</sup> F. CRAMER, *Papierchromatographie*, 4. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr., 1958.
- <sup>3</sup> I. M. HAIS UND K. MACEK, *Handbuch der Papierchromatographie*, Bd. 1, Fischer Verlag, Jena, 1958.
- <sup>4</sup> R. J. BLOCK, E. L. DURRUM UND G. ZWEIG, *A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis*, Academic Press, New York, 1958.
- <sup>5</sup> I. SMITH, *Chromatographic Techniques*, Vol. 1, Heinemann-Interscience, London-New York, 1958.
- <sup>6</sup> H. F. LINSKENS, *Papierchromatographie in der Botanik*, 2. Aufl., Springer, Berlin, 1959.
- <sup>7</sup> E. LEDERER (Éditeur), *Chromatographie en Chimie Organique et Biologique*, Vol. 2, Masson, Paris, 1960.
- <sup>8</sup> E. NÜRNBERG, *Arch. Pharm.*, 292/64 (1959) 610.
- <sup>9</sup> E. MUTSCHLER UND H. ROCHELMMEYER, *Arch. Pharm.*, 292/64 (1959) 449.
- <sup>10</sup> M. BRENNER UND A. NIEDERWIESER, *Experientia*, 16 (1960) 378.
- <sup>11</sup> A. R. FAHMY, A. NIEDERWIESER, G. PATAKI UND M. BRENNER, *Helv. Chim. Acta*, 44 (1961) 2022.
- <sup>12</sup> E. BRAND, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 47 (1946) 187.
- <sup>13</sup> T. L. HARDY, D. O. HOLLAND UND J. H. C. NAYLER, *Anal. Chem.*, 27 (1955) 971.
- <sup>14</sup> J. BARROLIER, J. HEILMAN UND E. WATZKE, *Z. Physiol. Chem.*, 304 (1956) 21.
- <sup>15</sup> C. G. GREIG UND D. H. LEABACK, *Nature*, 188 (1960) 310.
- <sup>16</sup> E. STAHL, *Dünnschichtchromatographie*, Springer, Berlin, 1962.

*J. Chromatog.*, 12 (1963) 329-341