

Short Communication

Anwendung der Dünnschichtchromatographie zur Sequenzanalyse von Peptiden

3. Mitt. Zerstörungsfreie Revelation von Aminosäuren auf Dünnschichtchromatogrammen*

Zum Nachweis der freien Aminosäuren wird in der Dünnschichtchromatographie allgemein die Ninhydrin-Reaktion verwendet¹. Dieses Vorgehen lässt jedoch eine Elution und Rechromatographie nicht zu, obschon dies insbesondere bei der Untersuchung von komplexem biologischen Material von Bedeutung wäre.

Im Zusammenhang mit Untersuchungen über die Schichtqualität und Aminosäuretrennung, haben wir darauf hingewiesen, dass zur zerstörungsfreien Revelation von Aminosäuren 2,4-Dinitrofluorbenzol und Phenylisothiocyanat geeignete Reagenzien sind². In der Zwischenzeit benutzten BAXTER *et al.*³ Trinitrobenzol-1-sulfonsäure zum Nachweis von ¹⁴C-Aminosäuren auf Papierchromatogrammen.

In der vorliegenden Arbeit möchten wir über die zerstörungsfreie Revelation der Aminosäuren mittels 2,4-Dinitrofluorbenzol (DNFB) berichten.

Chromatographie

30 g Kieselgel-G (Merck, Darmstadt, Deutschland) + 60 ml Wasser bzw. 10 g Cellulosepulver D (CAMAG, Muttenz, Bl., Schweiz) + 65 ml Wasser werden nach STAHL⁴ bei einer Schichtdickeneinstellung von 0.25 mm auf 20 × 20 mm Glasplatten aufgebracht. Man lässt die Platten über Nacht an der Luft trocknen. Die Chromatographie erfolgt aufsteigend nach den Angaben von BRENNER *et al.*⁵ mit *n*-Propylalkohol-Wasser (7:3, v/v) als Fließmittel. Die aufgetragene Aminosäure beträgt $5 \times 10^{-2} \mu\text{M}$ in 10 % Isopropylalkohol (Aminoacids Standard Solutions, Shandon, London, Great Britain).

Revelation

Die getrocknete Platte wird mit einer Pufferlösung⁶ (8.4 g NaHCO₃ + Wasser + 2.5 ml 1 N NaOH + Wasser ad 100 ml) und mit einer 10 % (g/v) methanolischen DNFB-Lösung⁶ besprüht.

Die Schicht wird an den beiden Plattenrändern in einer Breite von je 5 mm abgestreift. Auf die blanken Rändern legt man zwei Polyäthylenstreifen passender Breite. Man bedeckt nun die Schicht mit einer zweiten Glasplatte und erwärmt im Dunkeln 1 Std. auf 40°. Die Trägerplatte wird abgekühlt und in ein Ätherbad gelegt. Nach 10 min trocknet man kurz und zeichnet die Flecken an. Die Platte kann auch photographiert werden. Die Markierung der Flecken bzw. die Photographie muss rasch

* 2. Mitteilung; G. PATAKI, *Helv. Chim. Acta*, im Druck.

erfolgen, da die Platte mit der Zeit eine gelbe Farbe annimmt und die Flecken verschwinden.

Die Abbildung zeigt die Tageslichtphotographie eines Chromatogramms. Mit der beschriebenen Methode kann man etwa 10^{-2} bis $10^{-3} \mu M$ Aminosäure nachweisen. Die Kapazität von Kieselgel und von Cellulose ist unter unseren Versuchsbedingungen etwa gleich gross; auf Cellulose-Schichten beobachtet man jedoch bei grösseren Auftragsmengen eine grössere Neigung zur "Schwanzbildung".

Unsere Arbeitsweise eröffnet einige interessante Möglichkeiten bei der Dünnschichtchromatographie von Aminosäuren. Man kann z.B. ein unbekanntes Aminosäuregemisch eindimensional chromatographieren und nach Revelation mit DNFB mit einem geeigneten Fließmittel in der zweiten Dimension entwickeln. Hierbei

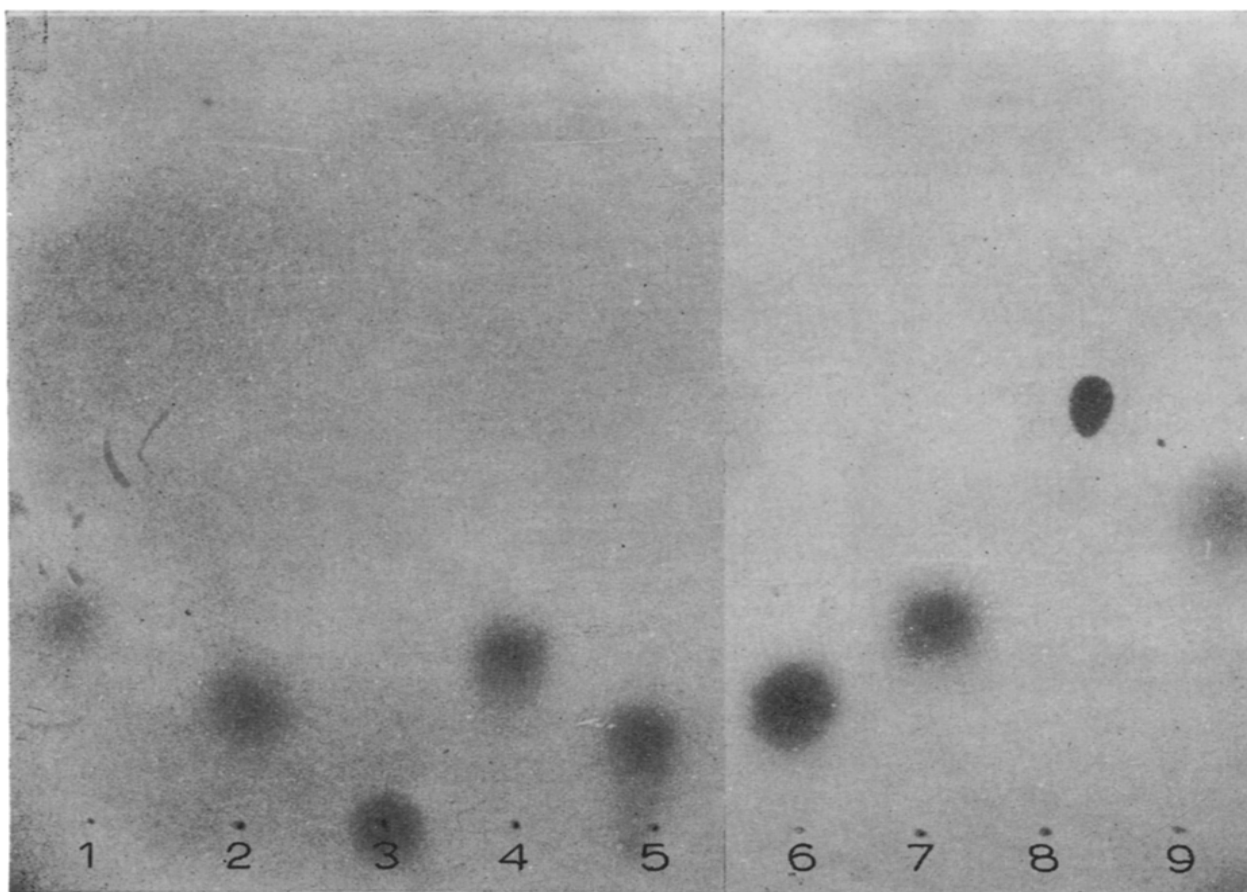


Fig. 1. Tageslichtphotographie eines Chromatogramms von freien Aminosäuren auf Kieselgel-G mit *n*-Propylalkohol-Wasser (7:3, v/v) als Fließmittel. Revelation mit Dinitrofluorbenzol. 1 = Alanin, 2 = Asparaginsäure, 3 = Arginin, 4 = Glycin, 5 = Histidin, 6 = Prolin, 7 = Serin, 8 = Tyrosin, 9 = Valin.

werden selbstverständlich die Dinitrophenyl-Aminosäuren in der zweiten Dimension chromatographiert. Ein Vergleich des Fleckenmusters mit demjenigen eines "normalen" zweidimensionalen Chromatogramms erhöht die Sicherheit der Identifizierung. Die mit DNFB angefärbten Aminosäuren können selbstverständlich eluiert und rechromatographiert werden. Dieses Vorgehen dürfte auch zur quantitativen Aminosäurebestimmung geeignet sein.

Abschliessend sei bemerkt, dass die beschriebene Methode auch zur zerstörungsfreien Revelation von Peptiden angewandt werden kann. In Verbindung mit der "Dünnschicht-Fingerprint"-Technik nach WIELAND UND GEORGOPOULOS⁷ erleichtert sie die Sequenzanalyse von Peptiden.

Laboratorium* der Universitäts-Frauenklinik**,
Basel (Schweiz)

GYÖRGY PATAKI

- ¹ M. BRENNER, A. NIEDERWIESER UND G. PATAKI, in E. STAHL (Herausgeber), *Dünnschichtchromatographie*, Springer, Berlin, 1962.
² G. PATAKI, *J. Chromatog.*, im Druck.
³ C. F. BAXTER UND I. SENONER, *Anal. Biochem.*, 7 (1961) 55.
⁴ E. STAHL, in E. STAHL (Herausgeber), *Dünnschichtchromatographie*, Springer, Berlin, 1962.
⁵ M. BRENNER, A. NIEDERWIESER, G. PATAKI UND A. R. FAHMY, *Experientia*, 18 (1962) 101.
⁶ D. WALZ, A. R. FAHMY, G. PATAKI, A. NIEDERWIESER UND M. BRENNER, *Experientia*, 19 (1963) 213.
⁷ TH. WIELAND UND D. GEORGOPOULOS, *Biochem. Z.*, im Druck.

Eingegangen den 17. September 1964

* Leiter: Dr. M. KELLER.

** Direktor: Prof. Dr. TH. KOLLER.

J. Chromatog., 16 (1964) 541-543

Notes

Non-ideality of the gas phase in frontal analysis

The activity coefficient at infinite dilution f_2^∞ of a volatile solute in an involatile solvent determined by gas-liquid chromatography is:

$$f_2^\infty = \frac{n_1^L RT}{p_2^0 V^G} \quad (1)$$

where n_1^L is the number of moles of solvent in the column,

p_2^0 is the vapour pressure of the solute at the column temperature T ,

V^G is the true retention volume.

Equation (1) is derived by assuming, amongst other things, that the gas phase is ideal and that the activity coefficient is pressure independent. However, corrections must be made for the invalidity of these assumptions if activity coefficients measured by gas-liquid chromatography are to agree with static results¹⁻³.

These corrections will be more important if the carrier gas is a mixture of an inert gas (by this is meant a gas that is virtually insoluble in the involatile solvent) and the solute, e.g. an elution peak is superimposed on the plateau obtained in frontal analysis. These "plateau" experiments would give the activity coefficient as a function of solute concentration thus allowing one to test solution theories in a concentration region which is inaccessible to static techniques.

J. Chromatog., 16 (1964) 543-545