

## Dünnschichtchromatographische Abtrennung von $\gamma$ -Aminobuttersäure aus Hirnextrakten

Im Stoffwechsel der freien Aminosäuren des Gehirns spielt die  $\gamma$ -Aminobuttersäure neben der Glutaminsäure und deren Halbamid, dem Glutamin, eine entscheidende Rolle. Da für Glutaminsäure und Glutamin einfache Bestimmungsmethoden existieren (enzymatische Bestimmung der Glutaminsäure mit Glutamatdehydrogenase<sup>1</sup> bzw. Hydrolyse des Amidstickstoffs des Glutamins<sup>2</sup>), andererseits die spezifische enzymatische Bestimmung der  $\gamma$ -Aminobuttersäure<sup>3-7</sup> wegen der schwierigen Enzympräparation sehr aufwendig ist, wurde eine einfache chromatographische Methode zur Abtrennung der  $\gamma$ -Aminobuttersäure ausgearbeitet.

Die aus der Literatur bekannten papierchromatographischen zweidimensionalen Verfahren zur Abtrennung aus Hirnextrakten<sup>8,9</sup> sind ebenso wie die säulenchromatographischen Verfahren<sup>10,11</sup> sehr zeitaufwendig, die eindimensionalen papierchromatographischen Methoden<sup>12-14</sup> lassen sich nicht ohne weiteres auf Dünnschichtplatten übertragen.

Die üblichen bekannten eindimensionalen<sup>15-17</sup> und zweidimensionalen<sup>18-20</sup> dünnschichtchromatographischen Verfahren enthalten keine Angaben über  $\gamma$ -Aminobuttersäure<sup>15-19</sup> und erwiesen sich für die Abtrennung aus Hirnextrakten wenig geeignet.

Aus den angeführten Gründen wurde ein neues dünnschichtchromatographisches Trennverfahren entwickelt, wobei der eindimensionalen Methode wegen besserer Reproduzierbarkeit sowie Zeit- und Materialersparnis der Vorzug gegeben wurde.

### *Material und Methoden*

(1) *Extraktbereitung.* Mit flüssiger Luft eingefrorenes Gehirn äthernarkotisierter Albinoratten wurde mit 10 Teilen (Gew./Vol.) 80 %igem Äthanol homogenisiert, der Überstand nach Zentrifugieren in der Kälte 2 St. bei  $-15^{\circ}$  gehalten und die ausgefallenen Lipide erneut abzentrifugiert. Dieser Extrakt wurde direkt zur Bestimmung verwendet (beim Eindampfen im Wasserbad bis zur Trockne und anschliessendem Aufnehmen mit Wasser oder Alkohol<sup>8</sup> treten Verluste von 12 bis 15 % auf!).

(2) *Bereitung der Platten und Aufbringen der Proben.* Glasplatten  $20 \times 20$  cm und  $10 \times 20$  cm wurden in üblicher Weise mit Kieselgel D (VEB Chemiewerk Greiz-Dölau\*) in ca.  $250 \mu$  dicker Schicht beschichtet und nach dem Trocknen in 1 cm breite Bahnen mittels eines spitz ausgezogenen Glasstabes entlang der Laufrichtung eingeteilt. Am Startpunkt, 1.5 cm vom unteren Ende, wurden auf jede Bahn 20 oder  $30 \mu$ l des alkoholischen Extraktes in Portionen von ca.  $1 \mu$ l aufgebracht, ferner auf zwei Bahnen jeder Platte  $0.01 \mu$ Mol. eines  $\gamma$ -Aminobuttersäurestandards ( $10 \mu$ l). Die Entwicklung erfolgte aufsteigend bei einer Gesamtlaufstrecke von 10 cm und einer Laufzeit von 1.5–2.5 St.

(3) *Quantitative Auswertung.* Zur quantitativen Auswertung wurde das Verfahren von BARROLIER *et al.*<sup>21,22</sup> benutzt. Die Platten wurden nach Chromatographie mit dem Cadmiumacetat-Ninhydrin-Reagenz besprüht und 20 Min. bei  $105^{\circ}$  getrocknet (bei 20 Min. liegt das Maximum der Farbentwicklung). Die angefärbten

\* Kieselgel D (VEB Chemiewerk Greiz-Dölau) enthält 13 % Gips und ist bei der Trennung von Aminosäuren dem Kieselgel G (Merck) gleichwertig.

Flecken wurden mit 30–50  $\mu$ l einer 2 %igen Collodium-Lösung bedeckt, der nach dem Abdunsten des Lösungsmittels sich von der Platte abhebende Film mit einer Nadel in ein Zentrifugenglas überführt und mit 1 ml Cadmiumacetat-haltigem Methanol unter mehrmaligem Rühren extrahiert. Nach 30 Min. wurde das Kieselgel abzentrifugiert und der Überstand bei 1 cm Schichtdicke im monochromatischen Licht bei 500 nm gemessen. Die Extinktionen steigen laufend an, vermutlich durch den Ammoniakgehalt der Luft, jedoch beträgt die Extinktionszunahme im Zeitraum von 1–2 St. nach Beginn der Extraktion weniger als 3 %.

Obwohl die Ablösung des Farbstoffs vom Kieselgel nicht quantitativ ist, wird das LAMBERT-BEERSche Gesetz bis zu 0.1  $\mu$ Mol.  $\gamma$ -Aminobuttersäure streng erfüllt.

Bei Verwendung von Ammoniak-haltigen Laufmitteln müssen die Platten vor der Anfärbung 2 St. bei mindestens 105° ausgeheizt werden.

### Ergebnisse

Folgende Lösungsmittelsysteme wurden zur eindimensionalen Abtrennung der  $\gamma$ -Aminobuttersäure aus Hirnextrakten untersucht. (Mischungsverhältnisse in Volumenanteilen, Nr. 1 und 2 in Gewichtsanteilen.)

1. Phenol-Wasser (3:1).
2. *n*-Butanol-Eisessig-Wasser (6:2:2).
3. Methanol-Chloroform-Wasser (2:2:1).
4. Methanol-Chloroform-17 % Ammoniak (2:2:1).
5. Methanol-Chloroform-25 % Ammoniak (2:2:1).
6. 96 % Äthanol-Wasser (7:3).
7. 96 % Äthanol-25 % Ammoniak (7:3).
8. *n*-Propanol-Wasser (7:3).
9. *n*-Propanol-25 % Ammoniak (7:3).
10. Isopropanol-Wasser (7:3).
11. Isopropanol-5 % Ammoniak (7:3).
12. Isopropanol-10 % Ammoniak (7:3).
13. Isopropanol-17 % Ammoniak (7:3).
14. Isopropanol-25 % Ammoniak (7:3).
15. Isopropanol-35 % Ammoniak (7:3).
16. Collidin, wassergesättigt.

Von den untersuchten Laufmitteln erwiesen sich Nr. 6, 8, 10, 11 und 12 geeignet. In diesen Systemen wandert die  $\gamma$ -Aminobuttersäure am langsamsten. System Nr. 15 kann ausserdem zur Abtrennung von Glutaminsäure, Glutamin, Asparaginsäure und  $\gamma$ -Aminobuttersäure aus Hirnextrakten verwendet werden. Die  $R_F$ -Werte der brauchbaren Lösungsmittelsysteme sind für die wichtigsten freien Aminosäuren des Gehirns in Tabelle I dargestellt. Das stets der Front am nächsten laufende Taurin kann mit allen Systemen gut abgetrennt werden. Von den Alkohol-Wasser-Gemischen ergibt das System Nr. 10 die am schärfsten begrenzten Flecke.

Die eindimensionale Abtrennung der  $\gamma$ -Aminobuttersäure an gepufferten Kieselgel-Platten<sup>16</sup> (0.1 *M* Phosphatpuffer, pH 7.0, 9.7, 10.2 und 12.0) gelang in den Lösungsmitteln Nr. 6, 8 und 10 nicht, ebenso versagte in den gleichen Laufmittelsystemen und in Nr. 1 die Abtrennung über die Kupferkomplexbildung der  $\alpha$ -Aminosäuren<sup>23</sup> durch Aufgeben von basischem Kupfercarbonat, einer Suspension von

TABELLE I

$R_F$ -WERTE DER WICHTIGSTEN FREIEN AMINOSÄUREN DES GEHIRNS IN DEN ZUR ABTRENNUNG DER  $\gamma$ -AMINO BUTTERSÄURE GEEIGNETEN LAUFMITTELN

Aminosäure	$R_F$ -Wert* in Laufmittel Nr.					
	6	8	10	11	12	15
Glycin	0.43	0.33	0.50	0.32	0.31	0.29
Alanin	0.46	0.40	0.52	0.38	0.41	0.39
Asparaginsäure	0.49	0.40	0.52	0.32	0.28	0.11
Glutaminsäure	0.48	0.40	0.48	0.40	0.34	0.15
Glutamin	0.43	0.37	0.48	0.48	0.46	0.37
$\gamma$ -Aminobuttersäure	0.34	0.27	0.35	0.22	0.18	0.23
Taurin	0.59	0.53	0.62	0.52	0.51	0.48

\* Mittelwerte aus mindestens 4 Einzelbestimmungen.

basischem Kupfercarbonat oder Auftropfen einer Kupfersulfatlösung am Startpunkt vor Aufgabe der zu trennenden Substanzen. Bei 17 Paralleluntersuchungen eines Extraktes wurde eine Streuung von  $\pm 12.6\%$  ermittelt (Laufmittel Nr. 10).

Der Gehalt an  $\gamma$ -Aminobuttersäure im Hirn äthernarkotisierter Albinoratten beträgt  $2.58 \pm 0.29 \mu\text{Mol./g}$  Hirn-Frischgewicht (N = 13).

Deutsche Akademie der Wissenschaften zu Berlin,  
Institut für Kortiko-Viszerale Pathologie und Therapie\*,  
Berlin-Buch (Deutschland)

SIEGFRIED VOIGT  
MARGIT SOLLE  
KLAUS KONITZER

- 1 E. BERNT UND H.-U. BERGMAYER, in H.-U. BERGMAYER, (Herausgeber), *Methoden der enzymatischen Analyse*, Verlag Chemie, Weinheim, 1962, S. 384.
- 2 M. M. HARRIS, *J. Clin. Invest.*, 22 (1943) 569.
- 3 E. M. SCOTT UND W. B. JACOBY, *J. Biol. Chem.*, 234 (1959) 932.
- 4 W. B. JACOBY UND E. M. SCOTT, *J. Biol. Chem.*, 234 (1959) 937.
- 5 C. L. BAXTER UND E. ROBERTS, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 101 (1959) 811.
- 6 R. A. LOVELL, S. J. ELLIOTT UND K. A. C. ELLIOTT, *J. Neurochem.*, 10 (1963) 479.
- 7 H.-M. HÄKKINEN UND E. KULONEN, *J. Neurochem.*, 10 (1963) 489.
- 8 E. ROBERTS UND S. FRANKEL, *J. Biol. Chem.*, 187 (1950) 55.
- 9 J. AWAPARA, A. J. LANDUA, R. FUERST UND B. SEALE, *J. Biol. Chem.*, 187 (1950) 35.
- 10 S. BERL UND H. WAELSCH, *J. Neurochem.*, 3 (1958) 161.
- 11 R. P. SANDMAN, *Anal. Biochem.*, 3 (1962) 158.
- 12 R. S. DE ROPP UND E. H. SNEDEKER, *Anal. Biochem.*, 1 (1960) 424.
- 13 H.-M. HÄKKINEN UND E. KULONEN, *Biochem. J.*, 78 (1961) 588.
- 14 E. LEVIN, R. A. LOVELL UND K. A. C. ELLIOTT, *J. Neurochem.*, 7 (1961) 147.
- 15 M. MOTTIER, *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.*, 49 (1958) 454.
- 16 E. MUTSCHLER UND H. ROCHELMAYER, *Arch. Pharm.*, 292 (1959) 449.
- 17 P. WOLLENWEBER, *J. Chromatog.*, 9 (1963) 369.
- 18 E. NÜRNBERG, *Arch. Pharm.*, 292 (1959) 610.
- 19 M. BRENNER UND A. NIEDERWIESER, *Experientia*, 16 (1960) 378.
- 20 A. R. FAHMY, A. NIEDERWIESER, G. PATAKI UND M. BRENNER, *Helv. Chim. Acta*, 44 (1961) 2022.
- 21 J. BARROLLIER, *Naturwiss.*, 48 (1961) 404.
- 22 J. HEILMANN, J. BARROLLIER UND E. WATZKE, *Z. Physiol. Chem.*, 309 (1957) 219.
- 23 H. R. CRUMPLER UND C. E. DENT, *Nature*, 164 (1949) 441.

Eingegangen den 11. Mai 1964

\* Direktor: Prof. Dr. R. BAUMANN.