

Einfluss der Schichtqualität auf die dünn-schichtchromatographische Trennung von Aminosäuren

Zur Dünnschichtchromatographie (DC) von Aminosäuren eignet sich Aluminiumoxid¹, Kieselgel²⁻¹¹, Kieselgel/Kieselgur¹², Cellulose¹³⁻¹⁶ und DEAE-Cellulose¹⁷ als Träger.

Kieselgel-Schichten bewährten sich zum Nachweis der Aminosäuren in Proteinhydrolysaten^{5,6}, im Urin^{8,9}, im Blut^{7,18}, im Gifte der Gelbbauchunke¹⁰ und im Maisquellwasser¹¹.

Die meisten Autoren verwendeten Kieselgel-G-(Merck)-Schichten²⁻¹⁰; Kieselgel (Woelm)⁹ (ohne Bindemittel) und Supergel (AGFA-Wolfen)¹¹ wurden gelegentlich auch benutzt. Heute stehen zur DC zahlreiche Kieselgel-Sorten zur Verfügung; in der vorliegenden Arbeit soll ihre Eignung zur Trennung von Aminosäuren untersucht werden.

BRENNER *et al.*^{19,20} sowie LISBOA UND DICZFALUSY²¹ haben darauf hingewiesen, dass die Qualität des Sorptionsmittels die R_F -Werte z.T. erheblich beeinflusst. Wir haben einerseits Kieselgele verschiedener Provenienz und andererseits verschiedene "Chargen" ein und derselben Kieselgel-Sorte untersucht.

Experimentelles

Die Herstellung der Sorptionsschichten erfolgte nach den Angaben von BRENNER *et al.*²² unter Anwendung des Streichgerätes von STAHL. Das Verhältnis Sorptionsmittel/Wasser betrug für eine Schichtdicke von 0.25 mm:

- 1:2 bei Kieselgel-G (Merck A.G., Darmstadt, Deutschland);
- 1:2 bei Kieselgel-H (Merck A.G., Darmstadt, Deutschland);
- 1:2 bei MN-Kieselgel-G-HR (Macherey & Nagel A.G., Düren, Deutschland);
- 6:9 bei Kieselgel-Woelm (Woelm A.G., Eschwege, Deutschland);
- 2:5 bei Kieselgel-D5-Camag (Camag A.G., Muttenz B.L., Schweiz).

Die Platten wurden über Nacht an der Luft getrocknet²². Die Chromatographie erfolgte bei Zimmertemperatur in der "grossen" Trennkammer der Fa. Desaga*, welche zur Sättigung mit Filterpapier ausgekleidet wurde. Vor Einstellung der Platten wurden die Kammer kräftig geschüttelt²².

Als Fliessmittelkomponente verwendeten wir Lösungsmittel zur Chromatographie oder p.a. Qualität.

Sämtliche Chromatogramme wurden zur gleichen Zeit ausgeführt. Das Volumen des Fliessmittels betrug jeweils 150 ml.

Aufgetragen wurden je 1 μ g Aminosäure in 1 μ l 0.1 N HCl. Zur Revelation benutzten wir Ninhydrin⁴. Bei schwertrennbaren Substanzen bewährte sich die Arbeitsweise von BRENNER UND NIEDERWIESER⁴ und die kalte Ninhydrin-Reaktion nach OPIENSKA-BLAUTH *et al.*²³.

Ergebnisse

Die Figs. 1-5 zeigen die zweidimensionale Trennung der wichtigsten Aminosäuren unter identischen Versuchsbedingungen. Die Trennleistung der einzelnen Kiesel-

* Desega, G.m.b.H., Heidelberg (Deutschland).

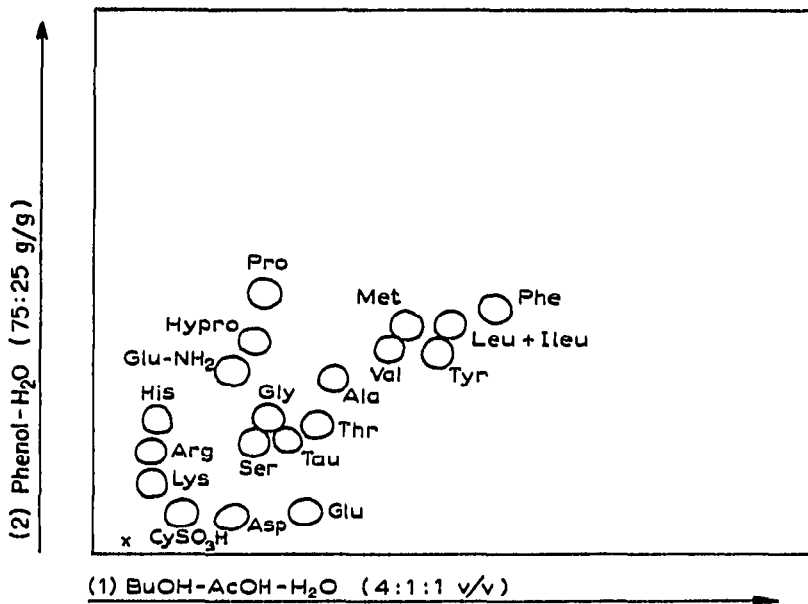


Fig. 1 Zweidimensionale Trennung der Aminosäuren auf Kieselgel-G-Schichten.

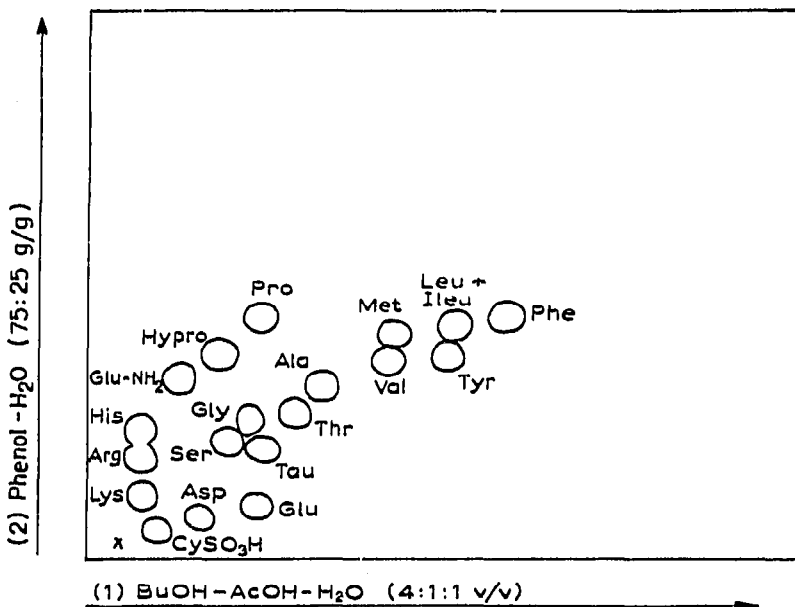


Fig. 2. Zweidimensionale Trennung der Aminosäuren auf MN-Kieselgel-G-HR-Schichten.

gele lässt sich beurteilen, wenn man die Trennung der Komponente einiger Verbindungsgruppen miteinander vergleicht*.

Basische Aminosäuren. Die Trennung von *Lysin*, *Arginin* und *Histidin* gelingt am besten mit Kieselgel-G. Auf Kieselgel-H-Schichten und auf MN-Kieselgel-G-HR-Schichten rücken diese Verbindungen näher zueinander. Hierdurch wird jedoch die Unterscheidung kaum beeinträchtigt. Alle drei basischen Aminosäuren überlappen

* Eine Deformation der Flecken (vgl. dazu *Whatman Technical Bulletin C3*) konnte unter unseren Versuchsbedingungen nicht beobachtet werden.

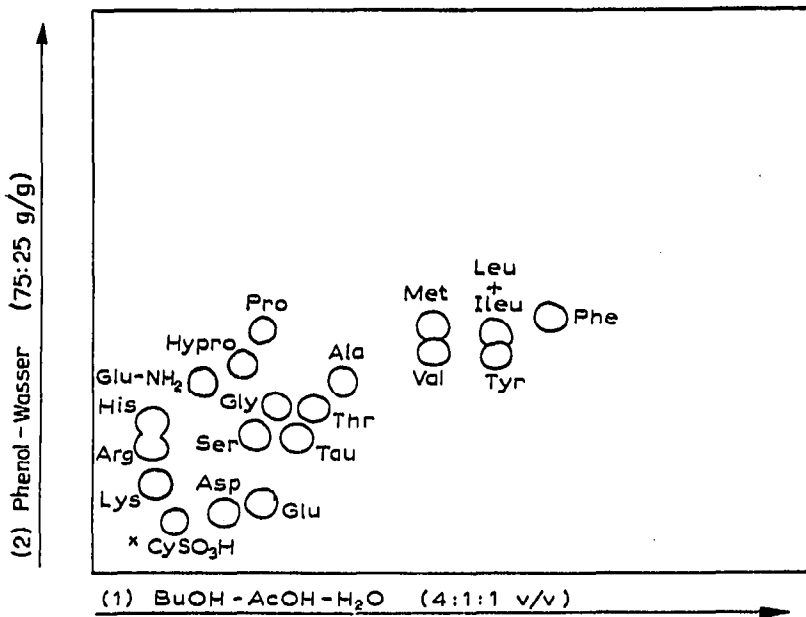


Fig. 3. Zweidimensionale Trennung der Aminosäuren auf Kieselgel-H-Schichten.

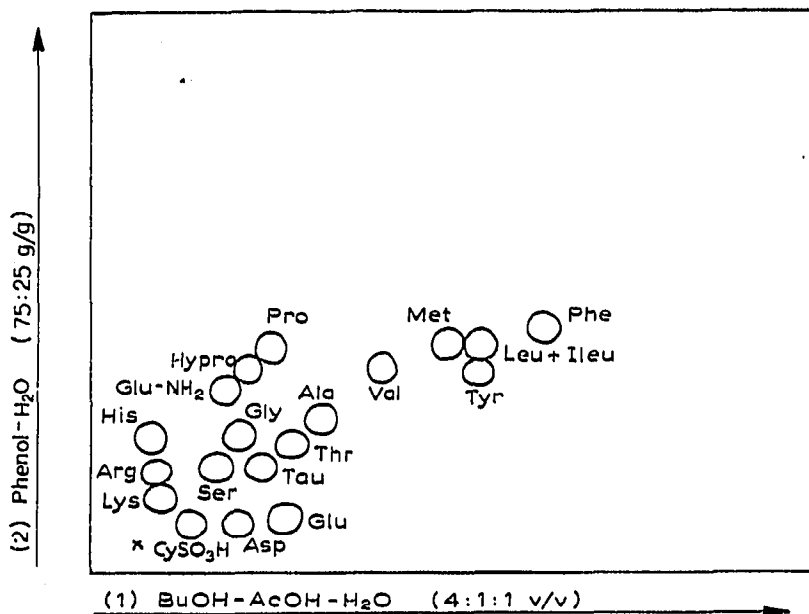


Fig. 4. Zweidimensionale Trennung der Aminosäuren auf Kieselgel-Woelm-Schichten.

teilweise auf Kieselgel-Woelm und auf Kieselgel-Camag. Sie lassen sich jedoch ohne besondere Schwierigkeit unterscheiden, wenn die Arbeitsweise von BRENNER UND NIEDERWIESER⁴ oder von OPIENSKA-BLAUTH *et al.*²³ zur Revelation angewandt wird.

Serin, Glycin und Taurin. Verwendet man Kieselgel-H oder Kieselgel-Woelm-Schichten (beide ohne Bindemittel), so ist die Trennung dieser Aminosäuren vorzüglich. Die Wanderungsgeschwindigkeit von *Serin* und *Glycin* ist auf Kieselgel-G nur wenig verschieden, auch *Taurin* liegt in der unmittelbaren Nähe. Auf Kieselgel-Camag und auf MN-Kieselgel-G-HR überlappen *Serin, Glycin* und *Taurin* bzw. *Serin* und *Glycin* ohne dass die Unterscheidung dadurch verunmöglicht würde.

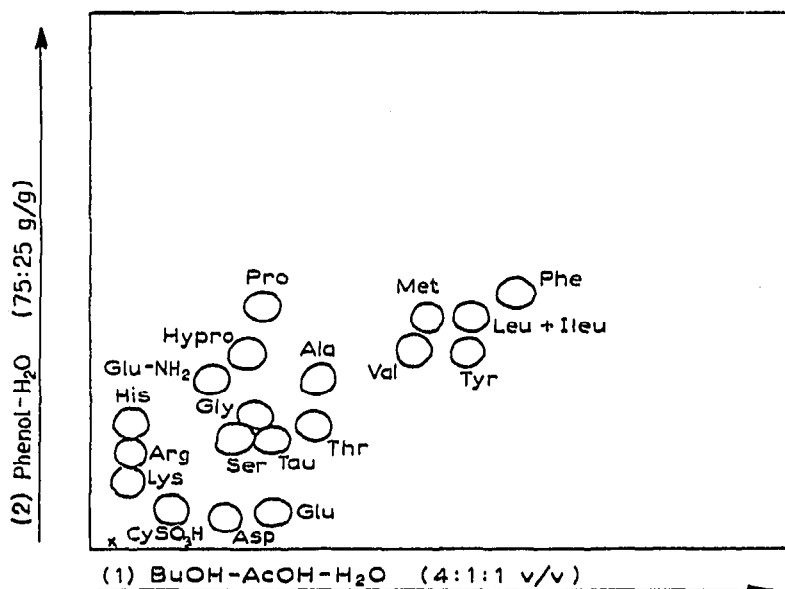


Fig. 5. Zweidimensionale Trennung der Aminosäuren auf Kieselgel-Camag-D5-Schichten.

Schnellwandernde Aminosäuren. Valin, Methionin, Tyrosin, Leucin (Isoleucin) und Phenylalanin lassen sich mit Kieselgel-Camag bzw. Kieselgel-G als stationäre Phase vorzüglich bzw. befriedigend trennen. Ihre Unterscheidung ist zwar möglich, jedoch die Trennung unvollständig auf MN-Kieselgel-G-HR und auf Kieselgel-Woelm (Met + Val und Tyr + Leu bzw. Met + Leu + Tyr). Zur Trennung von Leucin und Isoleucin ist die Durchlaufchromatographie erforderlich (FAHMY *et al.*⁵).

Glutamin, Hydroxyprolin und Prolin. Die Trennung dieser Gruppe bereitet allgemein keine Schwierigkeiten; die Auflösung ist jedoch auf Kieselgel-Woelm-Schichten nur unvollständig.

Nimmt man an, dass die Trennung der Aminosäuren von Qualitätsschwankungen in der Fabrikation bei ein und derselben Kieselgel-Sorte unabhängig ist, so kann man auf Grund der bisherigen Betrachtungen für jedes Trennproblem die geeignete stationäre Phase aussuchen. Hierbei ist von besonderer Bedeutung, dass man *hochgereinigte Kieselgele* (z.B. MN-Kieselgel-G-HR) zur Trennung verwenden kann. Verwendet man nämlich zum Nachweis der Aminosäuren an Stelle von Ninhydrin

TABELLE I

VERGLEICH VERSCHIEDENER KIESELGEL-CHARGEN UNTER IDENTISCHEN VERSUCHSBEDINGUNGEN

+++ = gute Trennung; ++ = befriedigende Trennung; + = teilweise Trennung.

Charge	Basische Aminosäuren	Serin, Glycin und Taurin	Schnellwandernde Aminosäuren	Glutamin, Hydroxyprolin und Prolin
I	+++	+*	++	+++
II	++	+*	++	+++
III	++	+*	++	+++

* Die Unterscheidung gelingt mit der kalten Ninhydrin-Reaktion oder beim vorsichtigen Erwärmen und sofortiger Markierung der Flecken.

andere Reagenzien, welche die Aminosäuren nicht zerstören, so kann man nach Elution der Substanzen ihre Identität durch Rechromatographie sicherstellen. Ein solches Vorgehen ist insbesondere bei der Untersuchung vom komplexen biologischen Material bedeutungsvoll. Auch die quantitative Bestimmung wird bei dieser Arbeitsweise erleichtert, weil keine, oder nur wenige, Verunreinigungen eine U.V.-Bestimmung stören. Geeignete Reagenzien sind z.B. 2,4-Dinitrofluorbenzol oder Phenylisothiocyanat. Auf die zerstörungsfreie Revelation von Aminosäuren auf Dünnschichtchromatogrammen werden wir einer folgenden Arbeit zurückkommen.

Vorläufige Versuche haben ergeben, dass die Trennung der Aminosäuren auf verschiedenen "Chargen" von Kieselgel-G nur wenig verschieden ist. Obschon die R_F Werte bei den untersuchten drei "Chargen" voneinander abweichen, ist lediglich die Trenngüte von Lysin und Arginin geringfügig unterschiedlich (Tabelle I).

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

- 1 M. MOTTIER, *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.*, 49 (1958) 454.
- 2 E. MUTSCHLER UND H. ROCHELMAYER, *Arch. Pharm.*, 292 (1959) 449.
- 3 E. NÜRNBERG, *Arch. Pharm.*, 292 (1959) 610.
- 4 M. BRENNER UND A. NIEDERWIESER, *Experientia*, 16 (1960) 378.
- 5 A. R. FAHMY, A. NIEDERWIESER, G. PATAKI UND M. BRENNER, *Helv. Chim. Acta*, 44 (1961) 2022.
- 6 M. BRENNER, A. NIEDERWIESER UND G. PATAKI, in L. J. MORRIS, *New Biochemical Separations*, Van Nostrand, London, 1964, S. 123.
- 7 H. VON EULER, H. HASSELQUIST UND I. LIMNELL, *Arkiv Kemi*, 21 (1963) 259.
- 8 J. OPIENSKA-BLAUTH, H. KRACZKOWSKI AND H. BRZUSKIEWICZ, in G. B. MARINI-BETTÒLO, *Thin-Layer Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, 1964, S. 165.
- 9 D. N. BARON UND J. ECONOMIDIS, *J. Clin. Pathol.*, 16 (1963) 484.
- 10 H. MICHL UND H. BACHMEYER, *Monatsh. Chem.*, 95 (1964) 480.
- 11 J. HUBER, W. SCHIKNIES UND J. RÜCKBEIL, *Pharmazie*, 18 (1963) 37.
- 12 E. BANCHER, H. SCHERZ UND V. PREY, *Mikrochim. Acta*, (1963) 712.
- 13 P. WOLLENWEBER, *J. Chromatog.*, 9 (1962) 369.
- 14 E. VON ARX UND R. NEHER, *J. Chromatog.*, 12 (1963) 329.
- 15 J. DITTMANN, *Z. Klin. Chem.*, 1 (1963) 190.
- 16 M. JUTISZ UND P. DE LA LLOSA, *Bull. Chim. France*, (1963) 2913.
- 17 P. DE LA LLOSA, C. TERTRIN UND M. JUTISZ, *J. Chromatog.*, 14 (1964) 136.
- 18 J. OPIENSKA-BLAUTH, Privatmitteilung, zitiert nach G. PATAKI, *Z. Klin. Chem.*, 2 (1964) 138.
- 19 M. BRENNER, G. PATAKI UND A. NIEDERWIESER, in G. B. MARINI-BETTÒLO, *Thin-Layer Chromatography*, Elsevier, Amsterdam, 1964, S. 116.
- 20 G. PATAKI, *Dissertation*, Universität Basel, 1962.
- 21 B. P. LISBOA UND E. DICZFALUSY, *Acta Endocrinol.*, 40 (1962) 60.
- 22 M. BRENNER, A. NIEDERWIESER, G. PATAKI UND A. R. FAHMY, *Experientia*, 18 (1962) 101.
- 23 J. OPIENSKA-BLAUTH, J. KARBOWNITZKA UND O. SAKLAWSKA-SZYMONOVA, *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, Lublin-Polonia, Sect. D*, 14 (1958) 109.

Eingegangen den 14. Juli 1964

* Leiter: Dr. M. KELLER.

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