

ZUR CHROMATOGRAPHIE EINIGER 1-DIMETHYLAMINO-NAPHTHALIN-5-SULFONYL-DERIVATE AUF KIESELGEL G-SCHICHTEN

N. SEILER UND M. WIECHMANN*

*Max-Planck-Institut für Hirnforschung, Arbeitsgruppe Neurochemie***, Frankfurt/M (Deutschland)*
(Eingegangen den 7. Oktober 1966)

In früheren Arbeiten haben wir Laufmittelgemische mitgeteilt, welche einerseits die nahezu vollständige Trennung der in einem Proteinhydrolysat vorkommenden Aminosäuren auf einem zweidimensionalen Dünnschichtchromatogramm¹, andererseits die Auftrennung einer grossen Reihe biologisch bedeutsamer Amine in Form ihrer 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonyl- (DANS-)Derivate^{***,4} gestatten. Für die Trennung von DANS-Aminosäuren auf Dünnschichtchromatogrammen wurden inzwischen auch von anderen Autoren Lösungsmittelgemische mitgeteilt^{5,6}.

Die Beobachtung von NEADLE UND POLLIT⁷ zeigte, dass DANS-Aminosäuren durch überschüssiges DANS-Cl in DANS-NH₂, CO und den entsprechenden Aldehyd gespalten werden. Nach unseren Versuchen lassen sich nahezu beliebige DANS-Aminosäuren durch einen genügenden Überschuss an DANS-Cl-Reagens in dieser Weise vollständig fragmentieren. Somit ist die quantitative Bestimmung von freien Aminosäuren in Form ihrer DANS-Derivate problematisch. Die Umsetzung von Aminen mit DANS-Cl verläuft hingegen nach unseren bisherigen Erfahrungen im allgemeinen ohne störende Nebenreaktionen. Unter günstigen Bedingungen ist daher die Bestimmung eines primären oder sekundärenamins noch in einer Menge von $5 \cdot 10^{-12}$ Mol Amin/Fleck durch direkte Auswertung der Dünnschichtchromatogramme möglich⁸.

Die grosse Anzahl der Amine, die in biologischem Material nach Umsetzung mit DANS-Cl häufig nachzuweisen ist, gestattet es nur in Ausnahmefällen eine quantitative Bestimmung der Amine nach ihrer Auftrennung mit den früher von uns mitgeteilten Lösungsmittelgemischen auf den Chromatogrammen auszuführen. Müssen infolge sehr geringer Aminkonzentrationen grössere Gewebemengen aufgearbeitet werden, so ist häufig eine Vortrennung erforderlich. Vorallem die hohen Konzentrationen an Ammoniak sowie an Spermidin und Spermin in fast allen Geweben, machen sich recht störend bemerkbar.

Um das Auffinden und die Identifizierung biogener Amine zu erleichtern, waren wir einerseits bestrebt die früher erarbeitete Fleckenkarte⁴ zu ergänzen und anderer-

* Unter Mitarbeit von Frau J. WIECHMANN.

** Leiter: Priv.-Doz. Dr. G. WERNER

*** DANS steht im folgenden für 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonyl-. Um Missverständnisse zu vermeiden möchten wir diese Abkürzung, die ursprünglich auch von HARTLEY benutzt wurde, vor einigen Jahren jedoch durch die Kurzbezeichnung DNS ersetzt wurde (vgl. z.B. Lit. 2), auch weiterhin beibehalten, denn im deutschen Schrifttum ist DNS für die abkürzende Bezeichnung von Desoxyribonucleinsäuren eingeführt. Leider ist die HARTLEY'sche Abkürzung bereits auch in der deutschsprachigen Literatur verwendet worden⁹.

seits Trennsysteme zu finden, welche die Lösung auch spezieller Probleme im Zusammenhang mit der Biochemie der Aminosäuren und der Amine gestatten.

DIE TRENnung VON DANS-VALIN UND -LEUCIN BZW. DER DISUBSTITUIERTEN DANS-DERIVATE VON TYROSIN, LYSIN UND ORNITHIN

In dem einen von uns früher angegebenen Laufmittelsystem trennten sich die DANS-Derivate der disubstituierten Aminosäuren Tyrosin, Lysin und Ornithin einerseits, sowie Valin und Leucin andererseits, nicht. Im anderen System waren DANS-Leucin, -Isoleucin, -Phenylalanin sowie Di-DANS-Tyrosin, -Lysin und -Ornithin auf sehr nahe benachbarten Punkten der Chromatogramme angeordnet¹.

TABELLE I

ZUSAMMENSETZUNG DER LAUFMITTELGEMISCHE, DEREN ANWENDUNG IN DER VORLIEGENDEN ARBEIT BESCHRIEBEN WIRD

Die Zahlenangaben sind Volumeneinheiten.

Laufmittel Nr.	Zusammensetzung
I	Chloroform-Essigsäure-Wasser (50:45:5)
II	Methylacetat-Isopropanol-25%ig. Ammoniaklösung (45:35:20)
III	Äthylacetat-Chloroform-Methanol-Essigsäure (50:30:20:1)
IV	Chloroform-Methanol-Essigsäure (75:20:5)
V	Äthylacetat-Chloroform-Äthanol-Essigsäure (70:45:4:4)
VI	Äthylacetat-Cyclohexan (75:50)
VII	Benzol-Cyclohexan-Methanol (85:10:5)
VIII	Benzol-Triäthylamin (100:20)
IX	Cyclohexan-Butylacetat (80:30)
X	Tetrachlormethan-Triäthylamin (100:20)
XI	Chloroform-Butylacetat (100:20)
XII	Diisopropyläther
XIII	Diisopropyläther-Triäthylamin (100:20)
XIV	Chloroform
XV	Butylacetat-Cyclohexan-Äthylacetat-Triäthylamin (55:50:20:20)
XVI	Butylacetat-Triäthylamin (100:20)
XVII	Triäthylamin-Diisopropyläther (100:20)
XVIII	Äthylacetat-Butylacetat (100:20)
XIX	Benzol-Methanol (90:10)
XX	Chloroform-Triäthylamin (100:20)
XXI	Tetrachlormethan-Methanol (90:6)
XXII	Chloroform-Triäthylamin (100:10)
XXIII	Trichloräthylen-Methanol (95:5)
XXIV	Benzol-Methanol (95:5)

Zur Trennung von DANS-Val und -Leu, sowie von Di-DANS-Tyr, -Lys und -Orn auf 250 μ Kieselgel G-Schichten erwies sich das Lösungsmittelgemisch I (Tabelle I) als geeignet, wie aus Fig. 1 hervorgeht. Kratzt man also aus dem zweidimensionalen Chromatogramm eines DANS-Aminosäurengemisches, welches mit den Lösungsmitteln II in der ersten und mit dem Gemisch III in der zweiten Laufrichtung entwickelt wurde (Einzelheiten der chromatographischen Bedingungen vgl.¹), den Fleck mit DANS-Leu und -Val einerseits und den Fleck mit den disubstituierten Derivaten andererseits aus, und eluiert man die DANS-Aminosäuren aus dem Kieselgel mit

Methanol, so erhält man durch eindimensionale Trennung dieser Extrakte mit dem Trenngemisch I eine vollständige Aufklärung über die Aminosäurezusammensetzung z.B. eines Proteinhydrolysates. Wählte man zur Trennung des Aminosäuregemisches in zweiter Phase das Laufmittel IV, so kann man das im Chromatogramm mit grösstem R_F -Wert laufende Aminosäuregemisch, welches DANS-Leu, -Ileu, -Val, -Phe und Di-DANS-Tyr, -Lys und -Orn enthält durch Kombination des Laufmittels III (in

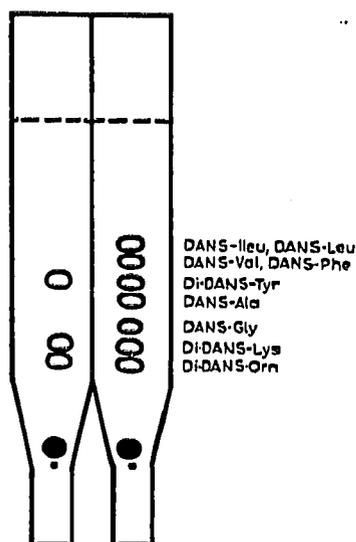


Fig. 1. Eindimensionale Dünnschichtchromatographie einiger DANS-Aminosäuren. Trennung von Di-DANS-Tyrosin, Di-DANS-Lysin und Di-DANS-Ornithin. Der schwarze Fleck entspricht DANS-OH. Laufmittel: Chloroform-Essigsäure-Wasser (50:45:5, V/V). 250 μ Kieselgel G-Schicht.

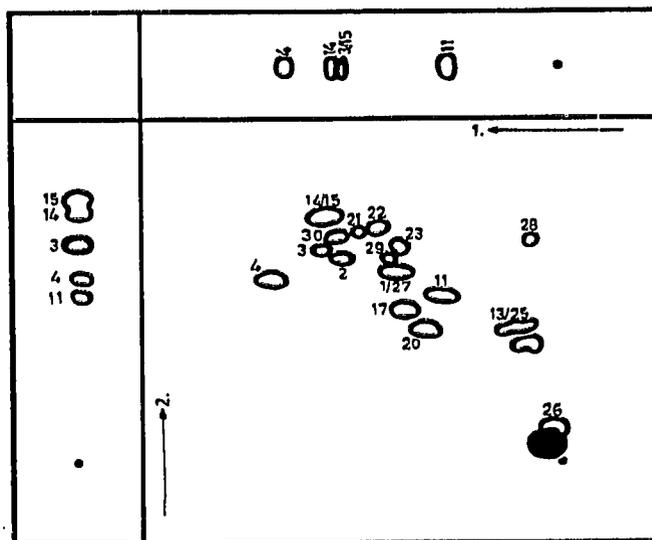


Fig. 2. Zweidimensionales Dünnschichtchromatogramm. Abtrennung von Di-DANS-Tyrosin, Di-DANS-Lysin und Di-DANS-Ornithin von den übrigen DANS-Aminosäuren. 1. Laufrichtung: Äthylacetat-Chloroform-Äthanol-Essigsäure (70:45:4:4, V/V); 2. Laufrichtung: Chloroform-Essigsäure-Wasser (50:45:5, V/V). 1 = Ala; 3 = GABA; 4 = Ammoniak; 11 = Gly; 13 = HO-Pro; 14 = Ileu; 15 = Leu; 17 = Di-Lys; 20 = Di-Orn; 21 = Phe; 22 = Pro; 23 = Sar; 25 = Tau; 26 = Thre; 27 = Try; 28 = Mono-O-Tyr; 29 = Di-Tyr; 30 = Val. Die übrigen Aminosäuren laufen zusammen mit DANS-OH (schwarzer Fleck).

erster Phase) und des Gemisches I (in zweiter Phase) bis auf -Leu und -Ileu, welche nur unvollständig getrennt werden, in seiner Zusammensetzung aufklären. Als noch günstiger erwies sich die Anwendung des Gemisches V in der ersten Laufrichtung in Kombination mit dem Gemisch I in der zweiten Laufrichtung (Fig. 2). In diesem Falle gelingt es sogar in einem vollständigen Aminosäuregemisch Di-DANS-Lys und -Orn eindeutig, Di-DANS-Tyr allerdings nur unter günstigen Umständen sicher nachzuweisen, da letzteres zwischen Sarkosin, Tryptophan und Alanin läuft (vgl. Fig. 2). DANS-Phe und -Pro sind nicht immer sauber getrennt, -Leu und -Ileu laufen in diesem System gemeinsam.

Verwendet man die Laufmittelkombination V/I, so ist eine Aktivierung der Kieselgel-Schicht zwischen den einzelnen Läufen unnötig, denn die Trennung durch Gemisch I erfolgt, wie in der Papierchromatographie, in erster Linie durch Verteilung der Substanzen zwischen einer stationären und einer mobilen Phase, während in der Chromatographie mit den von uns sonst benutzten Lösungsmitteln die Adsorption an das Kieselgel für die Trennung wesentlich ist.

TRENNUNG DER DANS-DERIVATE BIOLOGISCH BEDEUTSAMER AMINE MIT HILFE DER LÖSUNGSMITTELKOMBINATION VI/VIII

Als recht allgemein anwendbar erwies sich die Kombination der Lösungsmittelgemische VI und VIII zur Trennung einer Reihe von DANS-Derivaten biologisch bedeutsamer Amine. Wir waren daher bestrebt die früher publizierte Fleckenkarte so weit als möglich zu ergänzen.

TABELLE II

SUBSTANZEN, DIE IN FORM IHRER DANS-DERIVATE AUF IHR CHROMATOGRAPHISCHES VERHALTEN GEPRÜFT WURDEN

Die Numerierung in dieser Tabelle entspricht der Numerierung der Substanzflecke in den Fig. 3-10.

Nr.	Amin bzw. Phenol	Nr.	Amin bzw. Phenol
1	Ammoniak	36	3,4-Dimethoxy- β -phenäthylamin
2	Methylamin	37	α -Methyl-dopamin
3	Dimethylamin	38	Noradrenalin
4	Äthylamin	39	3-O-Methyl-noradrenalin (Normetanephrin)
5	Diäthylamin	40	α -Methyl-noradrenalin
6	Äthanolamin	41	Adrenalin
7	N-Methyl-äthanolamin	42	3-O-Methyl-adrenalin (Metanephrin)
8	2-Mercapto-äthylamin (Cysteamin)	43	N-Methyl-adrenalin
9	2,2'-Dithio-bis-(äthylamin) (Cystamin)	44	N-Methyl-metanephrin
10	<i>n</i> -Propylamin	45	α -Methyl-adrenalin
11	<i>n</i> -Butylamin	46	Isoproterenol
12	Isobutylamin	47	2,4-Dihydroxy-5-methoxy- β - phenäthylamin
13	Isoamylamin	48	2,3,4-Trimethoxy- β -phenäthylamin
14	Pyrrolidin	49	3,4,5-Trimethoxy- β -phenäthylamin (Mezcalin)
15	<i>n</i> -Hexylamin	50	2,4,5-Trimethoxy- β -phenäthylamin
16	Piperidin	51	Amphetamin
17	3-Hydroxy-piperidin	52	Pervitin
18	Äthylendiamin	53	Ephedrin
19	Trimethylendiamin	54	Pseudoephedrin
20	Tetramethylendiamin	55	Nor-pseudoephedrin (Catin)
21	Pentamethylendiamin	56	3,4-Dihydroxy-phenyl-äthanol
22	Hexamethylendiamin	57	3,4-Dihydroxy-phenylglykol
23	Spermidin	58	3-Methoxy-4-hydroxy-phenylglykol
24	Spermin	59	Adrenalon
25	β -Phenäthylamin	60	Tryptamin
26	β -Hydroxy- β -phenyläthylamin	61	N-Methyl-tryptamin
27	4-Hydroxy- β -phenäthylamin (Tyramin)	62	5-Hydroxy-tryptamin (Serotonin)
28	N-Acetyl-tyramin	63	N-Acetyl serotonin
29	Hordenin	64	Bufotenin
30	Octopamin	65	5-Methoxy-tryptamin
31	4-Methoxy- β -phenäthylamin	66	N-Methyl-5-methoxy-tryptamin
32	3-Methoxy- β -phenäthylamin	67	Imidazol
33	3,4-Dihydroxy- β -phenäthylamin (Dopamin)	68	Histamin
34	N-Acetyl-dopamin	69	N-Acetyl-histamin [4-(β -Acetaminoäthyl)-imidazol]
35	3-Methoxy-4-hydroxy- β -phenäthylamin	70	1-Methyl-4-histamin
		71	Pyridoxamin

Die Amine wurden nach unseren früheren Angaben⁸ umgesetzt und chromatographiert⁴. Die Fig. 3 gibt ein Chromatogramm aus einem Gemisch der DANS-Amide der Tabelle II wieder. (Die Fleckennumerierung in dieser und allen folgenden Abbil-

dungen bezieht sich auf die Kennziffern der Substanzen in Tabelle II.) In die Tabelle II sind nicht nur physiologischerweise vorkommende Substanzen aufgenommen worden, sondern in geringem Umfang auch solche, die den natürlichen β -Phenäthylaminen nahe verwandt sind und von pharmakologischem oder theoretischem Interesse sind.

Es ist selbstverständlich, dass ein so komplexes Gemisch z.T. nahe verwandter Verbindungen nicht in einem einzigen zweidimensionalen Chromatogramm vollständig aufgetrennt werden kann. Welche analytischen Probleme mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie der DANS-Amide zu lösen sind, lehrt aber ohne weiteres ein Blick auf die Fig. 3.

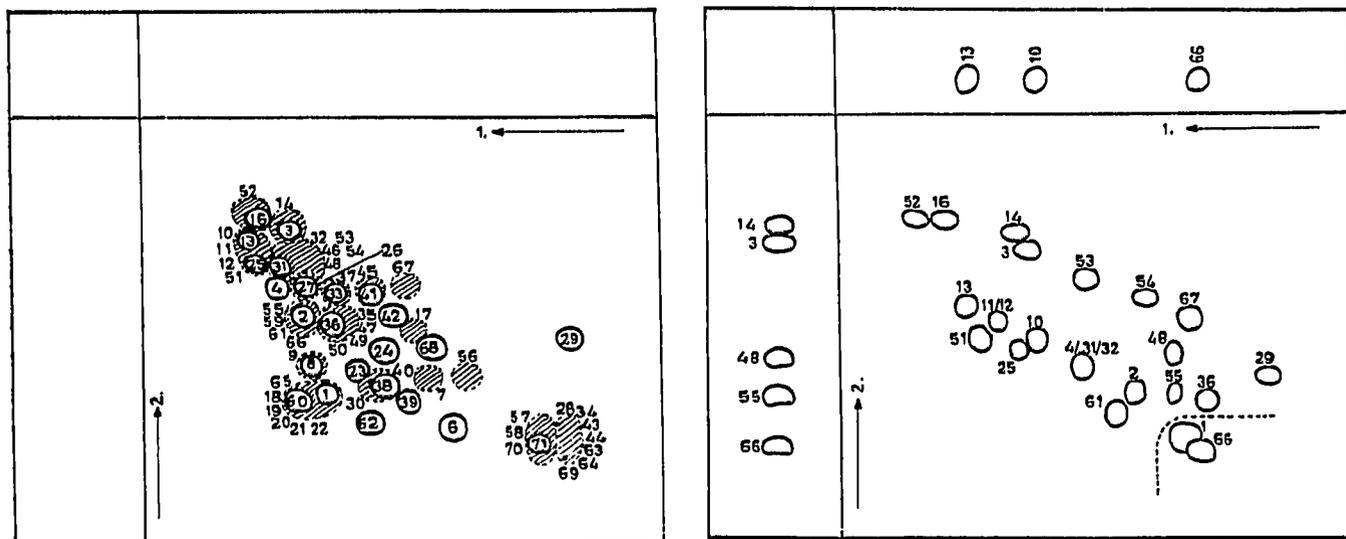


Fig. 3. Zweidimensionales Dünnschichtchromatogramm der DANS-Derivate der Substanzen in Tabelle II. Die dick umrandeten Zonen geben die Lage der in der früheren Mitteilung⁴ chromatographierten DANS-Amide wieder. Die schraffierten Flächen entsprechen der Lage der Flecken der übrigen in Tabelle II aufgeführten Verbindungen. 1. Laufrichtung: Äthylacetat-Cyclohexan (75:50, V/V); 2. Laufrichtung: Benzol-Triäthylamin (100:20, V/V).

Fig. 4. Zweidimensionales Dünnschichtchromatogramm. Trennung der DANS-Derivate aliphatischer Amine und im Benzolkern nicht substituierter β -Phenäthylamine. 1. Laufrichtung: Cyclohexan-Butylacetat (80 + 30, V/V); 2. Laufrichtung: Tetrachlormethan-Triäthylamin (100 + 20, V/V) (zweimalige Chromatographie in jeder Richtung). Die in dem Chromatogramm nicht aufgeführten Substanzen der Tabelle II laufen innerhalb der umgrenzten Zone in Startnähe.

TRENNUNG DER DANS-DERIVATIVE ALIPHATISCHER AMINE UND EINIGER IN WENIG POLAREN LÖSUNGSMITTELN CHROMATOGRAPHIERBARER DANS-AMIDE

Die DANS-Derivate der aliphatischen Amine sowie eine Reihe zumeist im Benzolkern nicht substituierte Abkömmlinge des β -Phenäthylamins laufen in den früher beschriebenen Laufmitteln VI-VIII (Tabelle I) mit wenig Ausnahmen ziemlich rasch⁴. Es ergibt sich daraus, dass diese Gruppe von Aminen auf Kieselgel G durch relativ unpolare Lösungsmittelgemische zum Wandern gebracht werden kann, was ihre Abtrennung von den übrigen Aminen und damit ihre bessere Identifizierung und Bestimmung neben einer Vielzahl anderer Amine, Aminosäuren, Phenolcarbonsäuren usw. ermöglicht.

Für die Trennung der aliphatischen Amine in Form ihrer DANS-Derivate fanden wir die Laufmittel IX und X am vorteilhaftesten. In der Fig. 4 ist das zwei-

dimensionale Chromatogramm dargestellt, das man nach Trennung der Substanzen der Tabelle II durch kombinierte Anwendung der beiden Laufmittel erhält. Man chromatographiert zweimal in der gleichen Richtung über eine Strecke von 13 cm zunächst mit dem Laufmittelgemisch IX und dann senkrecht dazu ebenfalls zweimal mit dem frisch angesetzten Gemisch X. Die Verwendung von aktivierten Platten ist zu empfehlen, zwischen den einzelnen Läufen ist jedoch eine Reaktivierung der Schicht nicht erforderlich. Die in der Fig. 4 umrandete Zone um den Startfleck wird von dem Grossteil der in der Tabelle II aufgeführten DANS-Amiden eingenommen. In Startnähe laufende Substanzen können daher in diesem Lösungsmittelsystem im allgemeinen nicht identifiziert werden. Einen zweiten Weg für die Trennung der im System VI/VII und VI/VIII rasch laufenden DANS-Amide fanden wir in der aufeinanderfolgenden Anwendung der Lösungsmittel XI, XII und XIII. Man chromatographiert zunächst über eine Strecke von 15 cm mit dem Gemisch XI, dann senkrecht zur ersten Laufrichtung je zweimal mit Diisopropyläther (XII) und noch weiter zweimal in der gleichen Richtung mit dem Gemisch XIII. Die Reaktivierung der Platten ist auch in diesem Falle nicht nötig. Der Zeitbedarf für diese Trennung beträgt etwa 3.5 Stdn. Ausser für die Auftrennung der aliphatischen Amine ist diese Lösungsmittelkombination insbesondere auch für den Nachweis einiger seltener Tryptamin-derivate geeignet, wie aus der Fig. 5 hervorgeht. In Startnähe laufende Substanzen sind naturgemäss auf diesem Chromatogramm nicht zu identifizieren. Auf eine weitere einfache Möglichkeit zur Trennung der DANS-Derivate einiger aliphatischer Amine soll noch kurz hingewiesen werden, da sie zur Identifizierung unbekannter Flecke in manchen Fällen gute Dienste leisten kann: Die Dünnschichtelektrophorese. Wir verwendeten eine Desaga-Dünnschichtelektrophoresekammer. Die Platten wurden in der

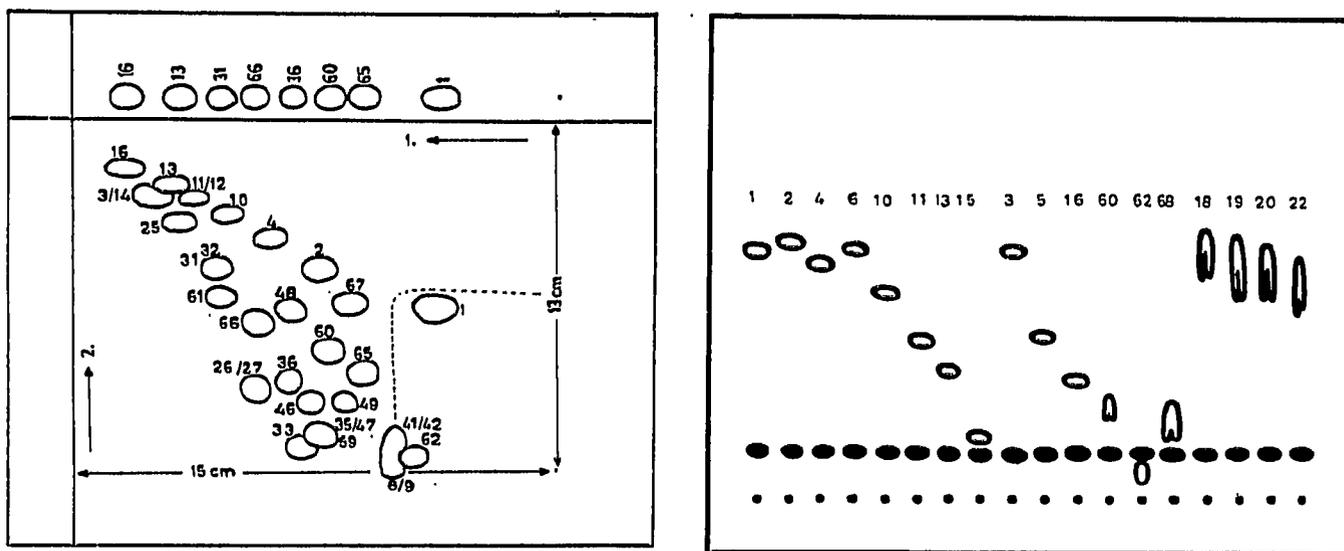


Fig. 5. Zweidimensionales Dünnschichtchromatogramm. Trennung der im System VI/VIII rasch laufenden DANS-Amide. 1. Laufrichtung: Chloroform-Butylacetat (100:20, V/V); 2. Laufrichtung: (a) Diisopropyläther (zweimalige Chromatographie); (b) Diisopropyläther-Triäthylamin (100 + 20, V/V) (zweimalige Chromatographie).

Fig. 6. Dünnschichtelektrophoretische Trennung einiger DANS-Amide. 250 μ Cellulose-Schicht (MN-Cellulosepulver 300; Macherey, Nagel & Co). Puffer: 120 g Essigsäure + 23.7 g Ameisensäure im Liter; pH 2.1; 480 V, 1.5 Stdn. Desaga Dünnschichtelektrophoresekammer. Schwarze Flecke: DANS-OH.

üblichen Weise⁹ mit einer Celluloseschicht (MN-Cellulose 300; Macherey, Nagel & Co., Düren) versehen. Als Puffer diente ein Essigsäure–Ameisensäure–Wasser-Gemisch (120 g Essigsäure + 23.7 g Ameisensäure im Liter) vom pH 2.1. Ebenso geeignet ist 1.5 M Propionsäure als Puffer. Nach Anlegen einer Spannung von 480 V (24 V/cm) erhält man nach 1.5 Stdn. eine Trennung der DANS-Amide, wie sie aus der Fig. 6 ersichtlich ist. Infolge der geringen Löslichkeit im Puffer und der Adsorption der DANS-Amide an der Celluloseschicht laufen unter den geschilderten Bedingungen die meisten der in der Tabelle II aufgeführten Substanzen nicht oder nur in geringem Masse unter Schwanzbildung. Lediglich die DANS-Derivate der aliphatischen Amine geben runde Flecke.

Erhöht man die Löslichkeit der DANS-Amide im Puffer durch Zugabe von Alkohol, so bewegen sie sich mit nahezu gleicher Geschwindigkeit, so dass nur sehr unvollständige Trennungen erzielt werden. Auch die Anwendung verschiedener alkalischer Pufferlösungen führte im Falle der DANS-Aminderivate nicht zu befriedigenden Trennungen durch Elektrophorese. Auf Kieselgel G-Schichten sind die Laufstrecken der DANS-Amide für praktische Zwecke etwas zu gering, wenn man den Essigsäure–Ameisensäure-Puffer verwendet. Die erzielten Trennungen beruhen in erster Linie auf der Ausnutzung der geringen Löslichkeit der DANS-Derivate in wässrigem Milieu. Die Fleckenform kann zusätzliche Auskunft über die Art eines Amins geben.

TRENNUNG EINIGER DANS-BRENCATECHIN-DERIVATE

Brenzcatechinderivate können z.B. durch Adsorption an Aluminiumoxid von anderen Phenolen und von Aminen abgetrennt werden¹⁰, so dass man sie als einheitliche analytische Gruppe betrachten darf. Ihre Trennung in Form der DANS-Derivate suchten wir so auszuführen, dass gleichzeitig auch die Separierung von ihren zwar physiologischerweise nicht vorkommenden, aber sowohl vom pharmakologischen als auch vom theoretischen Standpunkt aus interessanten α -Methylderivaten möglich wurde.

Wir fanden eine Reihe von Lösungsmittelkombinationen als geeignet zur Lösung dieses Problems. Zwei chromatographische Systeme sollen hier besprochen werden. Eine grössere Auswahl an geeigneten Trenngemischen macht die Identifizierung unbekannter Flecke zuverlässiger und lässt hoffen, dass Substanzen, die wir noch nicht auf ihre chromatographischen Eigenschaften hin haben prüfen können, sich in dem einen oder anderen Trenngemisch von den in die Fleckenkarte bereits aufgenommenen Substanzen werden abtrennen lassen.

In dem einen System chromatographiert man in der ersten Richtung zweimal mit Chloroform (XIV) und in der zweiten Richtung ebenfalls zweimal mit dem Lösungsmittelgemisch XV. Das Ergebnis einer solchen Trennung zeigt die Fig. 7. Da die zweite Lösungsmittelkombination in beiden Gemischen Triäthylamin enthält, chromatographieren wir in diesem Fall in der ersten Richtung zunächst mit XII, um Spuren von nicht verseiftem Säurechlorid zu entfernen und daraufhin noch zweimal in der gleichen Richtung mit dem Trenngemisch XVI. Senkrecht dazu wird das Chromatogramm ebenfalls zweimal mit dem Gemisch XVII entwickelt. (Fig. 8). Zwischen den einzelnen Läufen werden die Chromatogramme jeweils nur 3–4 Min an der Luft getrocknet.

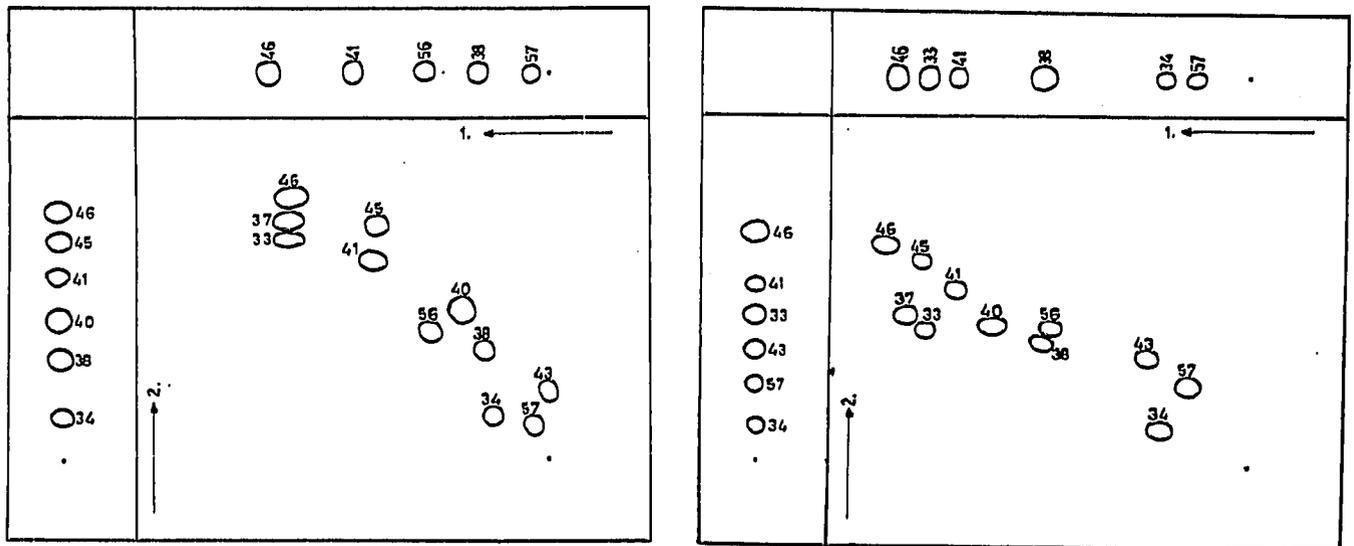


Fig. 7. Zweidimensionales Dünnschichtchromatogramm. Trennung von Brenzcatechinaminen und anderen Brenzcatechinderivaten in Form ihrer DANS-Derivate. 1. Laufrichtung: Chloroform; 2. Laufrichtung: Butylacetat-Cyclohexan-Äthylacetat-Triäthylamin (55:50:20:20, V/V) (zweimalige Chromatographie in jeder Richtung).

Fig. 8. Zweidimensionales Dünnschichtchromatogramm. Trennung von Brenzcatechinaminen und anderen Brenzcatechinderivaten in Form ihrer DANS-Derivate. 1. Laufrichtung: (a) Diisopropyläther; (b) Butylacetat-Triäthylamin (100:20, V/V) (zweimalige Chromatographie); 2. Laufrichtung: Triäthylamin-Diisopropyläther (100 + 20, V/V) (zweimalige Chromatographie).

TRENNUNG VON N-ACETYLDERIVATEN BIOGENER AMINE SOWIE VON AMINOPHENOLEN MIT TERTIÄREM STICKSTOFF

In allen bisher beschriebenen Laufmitteln wanderten die an der primären Aminogruppe acetylierten Amine, wie N-Acetyl-dopamin, -Tyramin, -Histamin und -Serotonin, sowie die Aminophenole mit einer tertiären Aminogruppe (N-Methyladrenalin, Hordenin, Bufotenin usw.) und auch 1-Methyl-histamin nur sehr wenig. Es erschien lohnend, diese langsam wandernde Gruppe von Substanzen von den übrigen Aminen und Phenolen abzutrennen, da ihre Identifizierung in biologischem Material von Bedeutung ist, handelt es sich doch z.T. um sehr bedeutsame Stoffwechselprodukte biogener Amine.

Chromatographiert man das Gemisch der DANS-Derivate der Substanzen, die in der Tabelle II aufgeführt sind, zunächst in einer Richtung bis zum Plattenrand (Laufstrecke 17 cm) mit dem Gemisch XVIII und dann noch zweimal in der gleichen Richtung mit Gemisch XIX, so hat man die Abtrennung sämtlicher Amine von der Gruppe der N-Acetyl-derivate und der Dimethylamino-phenole erreicht. Nunmehr kann man hinter dem DANS-Äthanolamin-Fleck eine Begrenzungslinie ziehen und nach kurzem Trocknen der Platte bei Raumtemperatur in der zweiten Richtung mit dem Trenngemisch XX entwickeln. Man erhält ein Chromatogramm, wie es in der Fig. 9 dargestellt ist. (In die Fig. 9 sind lediglich die Fleckenlagen der hier interessierenden Amine sowie zur Orientierung die von Ammoniak und Äthanolamin eingezeichnet. Alle übrigen DANS-Amide der Tabelle II befinden sich vor der Begrenzungslinie. Die DANS-Aminosäuren laufen, wie in allen beschriebenen chromatographischen Systemen, unmittelbar in Startnähe, so dass sie die Chromatographie der Amine nicht stören).

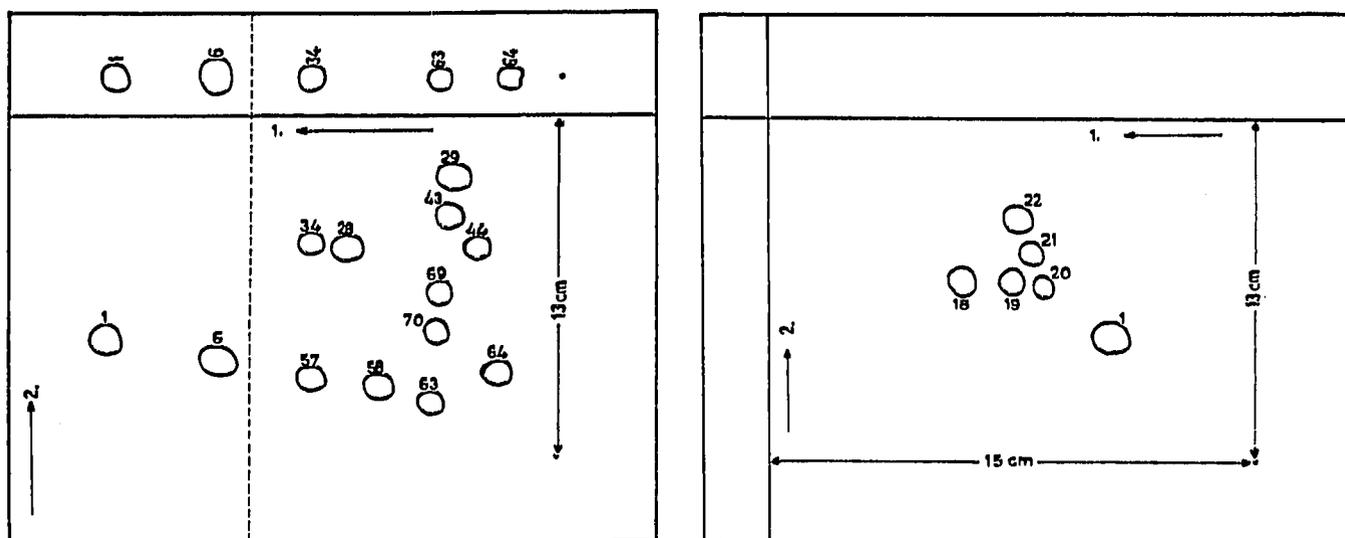


Fig. 9. Zweidimensionales Dünnschichtchromatogramm. Trennung der N-Acetylderivate biogener Amine sowie von Aminophenolen mit tertiärer Aminogruppe. 1. Laufrichtung: (a) Äthylacetat-Butylacetat (100 + 20, V/V); (b) Benzol-Methanol (90 + 10, V/V) (zweimalige Chromatographie); 2. Laufrichtung: Chloroform-Triäthylamin (100 + 20, V/V).

Fig. 10. Zweidimensionales Dünnschichtchromatogramm. Trennung der Di-DANS-Derivate aliphatischer Diamine. 1. Laufrichtung: Tetrachlormethan-Methanol (90 + 6, V/V) (fünfmalige Chromatographie); 2. Laufrichtung: Chloroform-Triäthylamin (100:10, V/V).

DIE TRENNUNG DER DI-DANS-DERIVATE EINIGER ALIPHATISCHER DIAMINE

In der homologen Reihe der aliphatischen Diamine haben vorallem Putrescin (Tetramethyldiamin) und Cadaverin (Pentamethyldiamin), sowie als struktureller Bestandteil des Spermins und des Spermidins auch Trimethyldiamin, biologische Bedeutung. Diese Amine, Äthyldiamin und Hexamethyldiamin laufen auf einem zweidimensionalen Dünnschichtchromatogramm nach dem Entwickeln mit der Lösungsmittelkombination VI/VII gemeinsam mit Ammoniak; nach der Chromatographie mit den Trenngemischen VI/VIII sind auch noch Tryptamin und 5-Methoxytryptamin auf dem gleichen Fleck (vgl. Fig. 3).

Bisher gelang es nicht Laufmittelgemische zu finden, welche die Abtrennung der DANS-Derivate der Diamine von den übrigen DANS-Amiden der Tabelle II und gleichzeitig die Separierung der Diamine gestatten würden. Trennt man jedoch die DANS-Amide mit Hilfe der Trenngemische VI/VII vor und gewinnt man durch Extraktion des Kieselgels mit Methanol oder einem anderen geeigneten Lösungsmittel⁸ das Gemisch der DANS-Derivate des Ammoniaks und der Diamine, so können auch in Gegenwart einer sehr grossen Menge DANS-Amid die Diamine (vom Äthyldiamin bis zum Hexamethyldiamin) auf die folgende Weise vollständig getrennt werden: Man chromatographiert in der ersten Laufrichtung fünfmal mit dem Laufmittelgemisch XXI in der üblichen Weise mit Zwischentrocknung bei Raumtemperatur und dann in der zweiten Richtung einmal mit dem Gemisch XXII. Trotz dieser häufigen Chromatographie erhält man kleine, scharf umgrenzte Flecken. Die Fig. 10 gibt das Ergebnis einer Trennung nach diesem Verfahren wieder. Die beiden erwähnten Tryptamine laufen gemeinsam mit Tetramethyldiamin, so dass ihre Abwesenheit gesichert sein muss. Im Hinblick auf die Bedeutung des Problems scheint uns der nicht

geringe Arbeitsaufwand gerechtfertigt, insbesondere, wenn man auf eine quantitative Bestimmung dieser Amine hinzielt.

Eine für qualitative Zwecke ausreichende Trennung der Diamine (auch in Gegenwart der beiden Tryptamine anwendbar) erzielt man durch jeweils einmalige Chromatographie mit den Trenngemischen XXIII und XXIV in der ersten und mit Gemisch XXII in der zweiten Laufrichtung. Die Güte der Trennung von Äthylendiamin, Trimethyldiamin und Tetramethyldiamin, und insbesondere die Abtrennung von Tryptamin und 5-Methoxy-tryptamin von den Diaminen, hängt in hohem Masse von den chromatographischen Bedingungen, vorallem von der Kammersättigung ab. Chromatographiert man z.B. nur eine Platte in einem Chromatographietank üblicher Grösse, so wird der Fleck mit den beiden Tryptaminen in unmittelbare Nähe des Äthylendiaminflecks versetzt. Es ist daher empfehlenswert in diesem Falle immer zwei Platten gleichzeitig zu entwickeln. Wenig beeinflusst ist die Trennung von Tetra-, Penta- und Hexamethyldiamin. Sie entspricht etwa der in der Fig. 10 dargestellten Fleckenverteilung.

ALLGEMEINE BEMERKUNGEN ZUR CHROMATOGRAPHIE DER DANS-DERIVATE

Geringfügige Verunreinigungen bestimmter Art in den für die Umsetzung der Amine mit DANS-Cl benutzten Lösungsmitteln und Chemikalien können die Chromatographie u.U. erheblich stören. So reagieren z.B. Methanol, Äthanol und weniger leicht auch höhere Alkohole in Gegenwart von Soda mit DANS-Cl. Der DANS-Methylester läuft in System VI/VIII ähnlich wie DANS-Piperidid. Sollen aus grösseren Gewebemengen Amine durch Extraktion angereichert werden, so muss auf grosse Reinheit der Lösungsmittel geachtet werden. Aus dem Reaktionsansatz verschleppte Alkalispuren können das Ergebnis der Trennung, je nach Trenngemisch, u.U. erheblich beeinflussen. Sie können auch zu Zersetzungsreaktionen der DANS-Derivate Anlass geben. Peroxide (im Äther) sind ebenfalls eine mögliche Ursache für Zersetzungen. Die Trenngemische sollten daher, wie in der Dünnschichtchromatographie meist üblich, im allgemeinen unmittelbar vor dem Gebrauch hergestellt werden. Die in der vorliegenden Arbeit aufgeführten Chromatogramme erhielten wir ausschliesslich durch Chromatographie auf selbstbeschichteten Platten (Kieselgel G der Firma Merck A.G., Darmstadt), wobei auf sorgfältige Beschichtung grosser Wert gelegt wurde, um eine gute Reproduzierbarkeit der Fleckenmuster zu gewährleisten. Diese ist bei genauer Einhaltung der beschriebenen chromatographischen Bedingungen auch ohne weiteres gegeben. Wichtig ist, dass die Platten vor der Chromatographie durch 2 Stdn. langes Erhitzen auf 100° aktiviert werden. Sie sind nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur sofort verwendbar. Die Trocknungszeiten von 3–4 Min (bei Raumtemperatur) zwischen den einzelnen Läufen sind möglichst einzuhalten.

Von den von uns bisher geprüften handelsüblichen, fertig beschichteten Dünnschichtplatten, ermöglichte lediglich die Selektta-Platte Nr. 1500 (Kieselgel mit Stärkebinder) der Firma C. Schleicher & Schüll, Dassel, sowie die DC-Fertigplatte "Merck", Kieselgel F₂₅₄ Trennungen mit den beschriebenen Laufmittelgemischen, die mit den Trennungen auf selbstbeschichteten Platten vergleichbar sind. Die leicht erhöhte Laufzeit dieser Platten i. Vgl. zu den selbstbeschichteten Dünnschichtplatten fällt nicht sehr ins Gewicht. Die Fertigplatte der Firma Merck A.G., Darmstadt enthält jedoch den für die Chromatographie der DANS-Derivate entbehrlichen Fluores-

zenzindikator, der die vermutliche Ursache geringer, mit einigen Lösungsmitteln eluierbarer Verunreinigungen ist, welche die quantitative Auswertung der Chromatogramme stören können.

Die Güte der Trennungen wird erheblich durch die Grösse des Startflecks beeinflusst. Es zeigte sich als günstig eine Lösung der DANS-Amide in Benzol auf die Chromatogramme aufzutragen. Auf diese Weise erreicht man eine Adsorption der Substanzen auf geringster Fläche.

Auf den photochemischen Zerfall der DANS-Derivate wurde wiederholt hingewiesen^{1,8}. Um Zersetzungen durch Lichteinfluss zu vermeiden ist es ratsam, sämtliche Arbeitsgänge in einem leicht abgedunkelten Raum auszuführen. Im Verlaufe von qualitativen Untersuchungen kann die Güte der Trennung z.B. nach dem Entwickeln der Platte in der ersten Laufrichtung jedoch ohne Schaden durch kurzes Betrachten der Chromatogramme unter der U.V.-Lampe beurteilt werden, längere Belichtungszeiten sind aber zu vermeiden.

DANK

Dr. J. AXELROD, Bethesda, Dr. J. DALY, Bethesda, Dr. L. R. GJESSING, Asker, Dr. H. GROBECKER, Frankfurt/M, Prof. P. KARLSON, Marburg, Dr. G. LEGLER, Bonn, Dr. C. E. SEKERIS, Marburg, Dr. N. MATUSSEK, München, Prof. K. H. SLOTTA, Miami und Prof. R. TSCHESCHE, Bonn, möchten wir herzlich für die uns grosszügig überlassenen, z.T. sehr wertvollen Vergleichssubstanzen, danken.

ZUSAMMENFASSUNG

Es werden Lösungsmittelsysteme für die ein- und zweidimensionale Trennung einer grossen Anzahl 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonyl-Derivate biogener Amine auf 250 Kieselgel G-Schichten beschrieben. Spezielle Lösungsmittelsysteme für die Trennung von aliphatischen Aminen, Brenzcatechinderivaten, N-Acetylaminophenolen und Dimethylaminophenolen (N-Methyl-adrenalin, Hordenin, Bufotenin usw.) werden mitgeteilt. Einige DANS-Amide konnten auch durch Dünnschichtelektrophorese getrennt werden. Die früher publizierten Trennungen von DANS-Aminosäuren wurden durch neue Lösungsmittelgemische vervollständigt.

SUMMARY

Solvent systems are described for the one- and two-dimensional separation of a large number of 1-Dimethylaminonaphthalene-5-sulphonyl (DANS)-derivatives of biogenic amines on thin layers of Silica Gel G. Special solvent systems are presented for the separation of a number of aliphatic amines, catechols, N-acetylaminophenols and dimethylaminophenols (N-methylepinephrine, Hordenin, Bufotenin etc.). DANS-amides were separated also by thin-layer electrophoresis. The formerly published DANS-amino acid separations have now been completed.

LITERATUR

- 1 N. SEILER UND J. WIECHMANN, *Experientia*, 20 (1964) 559.
- 2 W. R. GRAY UND B. S. HARTLEY, *Biochem. J.*, 89 (1963) 59P.
- 3 G. PATAKI, *Dünnschichtchromatographie in der Aminosäure- und Peptid-Chemie*, Walter De Gruyter, Berlin, 1966.
- 4 N. SEILER UND M. WIECHMANN, *Experientia*, 21 (1965) 203.
- 5 I. B. DAVID, T. C. FRENCH UND J. M. BUCHANAN, *J. Biol. Chem.*, 238 (1963) 2178.
- 6 D. MORSE UND B. L. HORECKER, *Anal. Biochem.*, 14 (1966) 429.
- 7 D. J. NEADLE UND R. J. POLLIT, *Biochem. J.*, 97 (1965) 607.
- 8 N. SEILER UND M. WIECHMANN, *Z. Anal. Chem.*, 220 (1966) 109.
- 9 D. WALDI, in E. STAHL (Herausgeber) *Dünnschichtchromatographie*, Springer, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1962, S. 31.
- 10 T. L. SOURKES UND B. D. DRUJAN, *Can. J. Biochem. Physiol.*, 35 (1957) 711.

J. Chromatog., 28 (1967) 351-362