

CHROM. 3970

EINE METHODE ZUR DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHEN AUFTRENNUNG VON ^{14}C - UND ^{32}P -MARKIERTEN STOFFWECHSELPRODUKTEN

B. FEIGE, H. GIMMLER, W. D. JESCHKE UND W. SIMONIS

Botanisches Institut I der Universität Würzburg (B.R.D.)

(Eingegangen am 16. Dezember 1968; geänderte Fassung am 15. Januar 1969)

SUMMARY

A method for the thin-layer chromatographic separation of ^{14}C and ^{32}P labelled metabolic products

In order to measure ^{14}C and ^{32}P labelled metabolic compounds obtained from incorporation experiments with various plant species a handy method was developed, which permits the separation of labelled intermediates of plant metabolism by thin-layer chromatography on cellulose layers. This method is especially suitable for experiments with large numbers of samples. A preceding purification of the plant extracts from interfering compounds is not necessary.

EINLEITUNG

Schon seit einigen Jahren wird von verschiedenen Autoren mit grossem Erfolge die Dünnschichtchromatographie auf Celluloseplatten zur Auftrennung von Intermediärprodukten des pflanzlichen und tierischen Stoffwechsels an Stelle der herkömmlichen Methode der Papierchromatographie benutzt¹⁻¹¹.

Die in dieser Arbeit beschriebene Methode stellt eine Weiterentwicklung einer dieser älteren Methoden dar⁷, die als kurze Mitteilung im Rahmen dieser Zeitschrift publiziert wurde. Durch die Einführung eines zusätzlichen Laufmittels wurde die Trennung weiterer Stoffgruppen ermöglicht. Unsere Methode bietet den Vorteil, dass serienmässig aus Einlagerungsversuchen mit ^{32}P und ^{14}C gewonnene, pflanzliche Extrakte ohne zeitraubende Reinigung von störenden Begleitsubstanzen und unter geringem Aufwand von Material und Zeit in eine Vielzahl von Intermediärprodukten aufgetrennt und quantitativ erfasst werden können. So lassen sich z.B. auf einem einzigen Chromatogramm bis zu 80 verschiedene ^{14}C -markierte oder bis zu 35 ^{32}P -markierte Verbindungen voneinander trennen. Dadurch eignet sich unsere Methode besonders für vergleichende Untersuchungen des Primärstoffwechsels von photo-

synthetisierenden Pflanzen, aber auch für physiologisch-taxonomische Untersuchungen.

Die hier beschriebene Methode wurde bisher in unserem Institut mit gutem Erfolg bei folgenden Untersuchungsobjekten angewendet: *Anacystis nidulans*, *Ankistrodesmus braunii*, *Euglena gracilis*, *Trentepohlia aurea*, *Lemanea* spec., *Porphyridium cruentum*, *Cystococcus peltigerae variolosae*, *Lichenes* div. spec., *Hepaticae* div. spec., *Ophioglossum vulgatum*, *Ophioglossum lusitanicum*, *Selaginella denticulata*, *Isoetes duriei*, *Helodea densa*, *Lemna gibba*, *Tillandsia usneoides*, *Vicia faba*, *Sinapis alba*, *Cuscuta reflexa*, und Calluskulturen verschiedener höherer Pflanzen.

METHODIK

Extraktion

Nach der Einlagerung von ^{14}C bzw. ^{32}P in die Untersuchungsobjekte erfolgte zunächst eine möglichst schnelle Sistierung des Stoffwechsels. Diese Sistierung wurde bei den Thallophyten und höheren Pflanzen durch Einbringen der Proben in flüssigen Stickstoff erreicht. Einzellige Algen wurden auf einer Filternutsche abgesaugt, mit H_2O gewaschen und das Filter dann in ein auf -70° gekühltes Extraktionsgemisch aus Methanol-Chloroform-7 *M* Ameisensäure (12:5:3) (MCA) gebracht¹. Thallophyten und höhere Pflanzen wurden erst in dem flüssigen Stickstoff fein zermörsert und dann in das MCA-Gemisch überführt. Wie bei den einzelligen Algen erfolgte die Extraktion der unter diesen Bedingungen löslichen Stoffwechselprodukte bei etwa -20° , die unter Erneuerung des Extraktionsmittels zweimal über 8–10 h wiederholt wurde. Ein zweimalige Nachextraktion mit H_2O bei $1-3^\circ$ führte zu einer erschöpfenden Extraktion dieser löslichen Verbindungen. Der MCA-Extrakt wurde im Kühlraum bei etwa 0° im Luftstrom bis zur Trockne eingengt und mit den wässrigen Extrakten vereinigt. Die Menge des Extraktionsmittels war von der Menge des Untersuchungsmaterials abhängig. Die vereinigten Extrakte wurden eingefroren und über P_2O_5 gefriergetrocknet. Zur Gewinnung einer Lipidfraktion aus diesem Extrakt vergleiche Lit. 1. Auf die Hydrolyse der im Extraktionsrückstand verbleibenden radioaktiv markierten Stoffwechselprodukte und deren chromatographische Trennung kann im Rahmen dieser Arbeit nicht näher eingegangen werden.

In einigen Versuchen wurde die Extraktion auch mit 6 %iger Trichloressigsäure (3×10 min, 0°) durchgeführt. In diesem Falle wurde ohne vorherige Neutralisation die Trichloressigsäure (TCE) durch dreimaliges Ausschütteln mit Äther entfernt, bevor die Extrakte gefriergetrocknet wurden.

Dünnschichtchromatographie

Die bis zur Trockne eingengten Extrakte wurden mit H_2O aufgenommen und aliquote Teile davon (1/50–1/300 des Gesamtextrakts) mit geeichten Mikrokapillaren (Microcaps, Fa. Drummond Scientific Co., Broomall, U.S.A.) auf die Dünnschichtplatten aufgetragen.

Die Beschichtung der Platten (20×20 cm) erfolgte im Aufgussverfahren. Als Trägerschicht diente Cellulosepulver (MN 300 ohne Bindemittel, Fa. Macherey und Nagel, Düren, B.R.D.). Das Flächengewicht der Trägerschicht betrug 7 mg/cm^2 . Die Platten wurden bei Zimmertemperatur getrocknet und ohne zusätzliche Aktivierung zur Auftrennung der Extrakte benutzt.

*Laufmittelkombinationen**(A) ³²P-markierte Verbindungen*

1. Richtung¹³: Isobuttersäure–NH₃–H₂O–EDTA (1000:50:550:0.5, v/v/v/g);
Kammersättigung 5 h, Laufzeit 8 h.

2. Richtung, 1. Lauf⁷: *n*-Butanol–*n*-Propanol–*n*-Propionsäure–H₂O (400:175:285:373); Kammersättigung 3 h, Laufzeit 5 h.

2. Richtung, 2. Lauf⁴: *n*-Butanol–Essigsäure–H₂O (5:1:4) (obere Phase); Kammersättigung 3 h, Laufzeit 5 h.

(B) ¹⁴C-markierte Verbindungen

1. Richtung¹²: Isobuttersäure–*n*-Butanol–Isopropanol–*n*-Propanol–H₂O–NH₃–EDTA (1000:30:30:140:380:40:0.5, v/v/v/v/v/v/g).

2. Richtung: 1. und 2. Lauf wie bei (A), 2. Richtung.

Nach jedem Lauf wurden die Platten 6–8 h bei Zimmertemperatur getrocknet. Zum Entwickeln der Chromatogramme (ebenfalls bei Zimmertemperatur) wurde eine Glaskammer mit einem Einsatz aus V2A-Stahl (Fa. DeSaga, Heidelberg, B.R.D.) benutzt, der gleichzeitig 24 Platten aufnehmen konnte. Nach dem Entwickeln wurden die getrockneten Platten an den Ecken punktförmig mit radioaktiver Tinte (³⁵SO₄ eignet sich besonders gut) markiert und im Dunkeln zur Lokalisation der radioaktiv markierten Verbindungen auf Röntgenpapier (Fa. Agfa-Gevaert, Leverkusen, B.R.D.) exponiert. Die durchschnittliche Expositionszeit betrug sowohl bei Verwendung von ¹⁴C als auch von ³²P eine Woche, weil neben den stark markierten Verbindungen auch stets die Vielzahl der schwach markierten Verbindungen erfasst werden sollte. Nach Entwicklung der Röntgenpapiere wurden die autoradiographisch lokalisierten Flecke auf die Dünnschichtchromatogramme rückübertragen, wobei die radioaktiv markierten Tintenpunkte zur Orientierung dienten. Das Ausmessen der markierten Verbindungen wurde direkt auf der Platte mit einem Methandurchflusszähler vorgenommen^{7,8}, wobei die Strahlung benachbarter Flecke durch vorgefertigte Bleischablonen abgedeckt wurde, bei ¹⁴C genügten Schablonen aus Pappe.

Identifizierung

Die Identifizierung der getrennten, radioaktiv markierten Verbindungen erfolgte durch Mischchromatographie. Zur Lokalisation der authentischen Substanzen wurden folgende Sprühreagenzien verwendet²¹:

Phosphatester: Perchlorsäure–Ammoniummolybdat-Reagens nach HANES UND ISHERWOOD¹⁴;

Kohlenhydrate: Perjodat–Permanganat-Reagens nach LEMIEUX AND BAUER¹⁶;

Aldosen: Anilin–Phthalat-Reagens nach PARTRIDGE¹⁷;

Ketosen: Anthron-Reagens nach JOHANSON¹⁸;

Organische Säuren: Silbernitrat–Phenol-Reagens nach LÖFFLER UND REICHL¹⁹;

Ketosäuren: Dinitrophenylhydrazin-Reagens nach MEHLITZ *et al.*²²;

Aminosäuren: Methanolische Ninhydrinlösung nach RUHEMANN¹⁵;

Prolin und Hydroxyprolin: Isatin-Reagens nach ACHER *et al.*²⁰;

Nukleotide: Nachweis im U.V.-Licht und mit dem Perchlorsäure–Ammoniummolybdat-Reagens nach HANES UND ISHERWOOD¹⁴.

Testsubstanzen wurden von den Firmen Boehringer, Mannheim, B.R.D., Serva, Heidelberg, B.R.D., Sigma, St. Louis, U.S.A., Calbiochem, Los Angeles, U.S.A., Ega-Chemie, Steinheim, B.R.D. und Fluka, Buchs, Schweiz bezogen.

Als Bezugswerte für die Lage der Verbindungen auf den Chromatogrammen wurde bei den ^{32}P -markierten Phosphateestern das Orthophosphat (R_P -Wert), bei den ^{14}C -markierten Produkten das Alanin (R_{ALA}) gewählt, da beide Verbindungen in den Extrakten stets markiert waren.

ERGEBNISSE

(A) Phosphatester

Fig. 1 und 2 zeigen Autoradiogramme dünn-schichtchromatographischer Auftrennungen ^{32}P -markierter Phosphatester, während Fig. 3 ein Schema eines solchen Chromatogramms wiedergibt. Das Chromatogramm in Fig. 1 wurde in der 1. Richtung mit dem Isobuttersäure- NH_3 - H_2O -EDTA-Gemisch entwickelt, das in der Regel zur Auftrennung von Phosphatestern benutzt wurde. Aus Fig. 2 ist ersichtlich, dass aber auch das Trennsystem, das normalerweise in der ersten Richtung zur Auftrennung

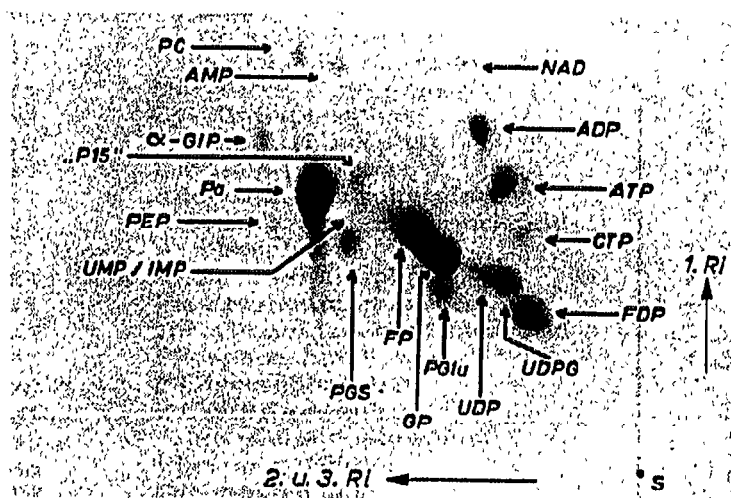


Fig. 1. Autoradiogramm einer dünn-schichtchromatographischen Auftrennung ^{32}P -markierter Phosphatester (Extrakt aus *Ankirodesmus braunii*). 1. Richtung: Isobuttersäure - NH_3 - H_2O -EDTA, 2. Richtung 1. Lauf: Butanol-Propanol-Propionsäure- H_2O , 2. Richtung 2. Lauf: Butanol-Essigsäure- H_2O . Abkürzungen vgl. Abkürzungsverzeichnis.

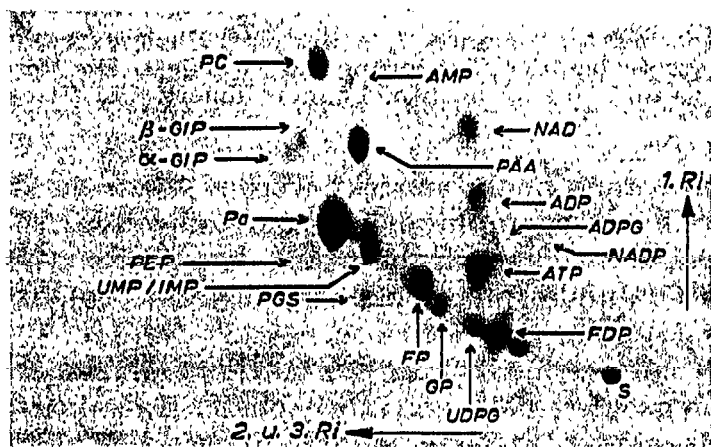


Fig. 2. Autoradiogramm einer dünn-schichtchromatographischen Auftrennung ^{32}P -markierter Phosphatester (Extrakt aus *Peltigera aphthosa*). 1. Richtung: Isobuttersäure-Butanol-Propanol-Isopropanol- H_2O - NH_3 -EDTA. Übrige Laufmittel wie Fig. 1.

^{14}C -markierter Verbindungen dient, gute Auftrennungen gibt, wenn auch die R_F -Werte (R_F -Werte bezogen auf Orthophosphat) vieler Verbindungen in diesem System niedriger liegen. In Tabelle I sind die R_F -Werte der getrennten Verbindungen zusammengefasst. (Die R_F -Werte stellen Mittelwerte aus 20 Chromatogrammen dar). Für nicht identifizierte Verbindungen wurden keine Laufwerte gemessen. Dagegen wurde die Lage einiger Verbindungen durch Mischchromatographie ermittelt, deren Markierung mit ^{32}P in unseren Versuchen nicht nachgewiesen werden konnte. Dazu gehören z.B. das Thiaminpyrophosphat, das zwischen dem Adenosinmonophosphat (AMP) und den Glycerophosphate liegt, das Kreatinphosphat, das oberhalb des Orthophosphats zwischen den Glycerophosphaten und dem Phosphoäthanolamin liegt und das Mannosephosphat, das in der Region des Fructosephosphats liegt. Die Verbindung Nr. 24 in Fig. 3 ist möglicherweise mit Flavinadeninucleotid (FAD) identisch. Ferner liegt direkt unterhalb des Orthophosphats in Fig. 3 das Phosphoglycolat (Nr. 38), das durch die häufig auftretende Schwanzbildung des Orthophosphats nicht immer von dieser Verbindung abzutrennen ist. Phosphoserin und Phosphothreonin liegen in der Region der Zuckermonophosphate.

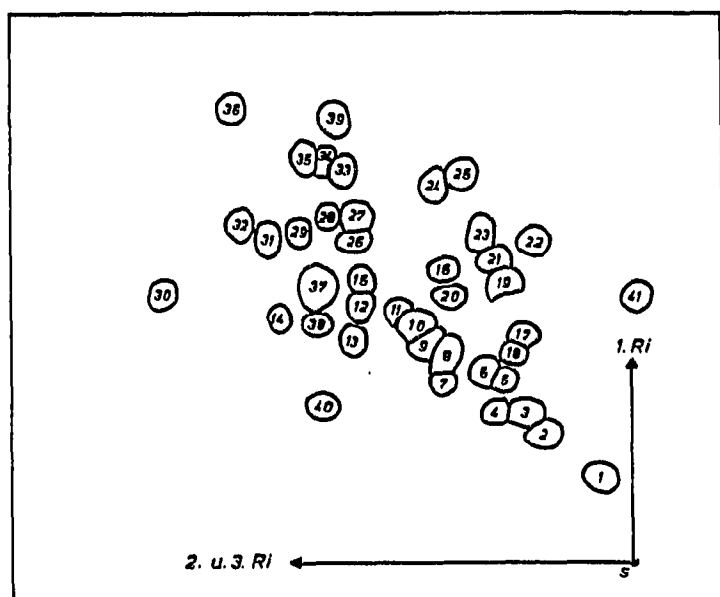


Fig. 3. Schema einer dünnschichtchromatographischen Auftrennung ^{32}P -markierter Phosphatester. Laufmittelsysteme wie in Fig. 1. Die Zahlen entsprechen der Bezifferung der Tabelle I. Die Verbindungen Nr. 1, 2, 11, 16, 18, 26, 30, 32, 34, 36 und 39 sind noch nicht identifiziert. Der Fleck Nr. 41 stellt ebenfalls Orthophosphat dar.

In Bezug auf die Zuckerdiphosphate muss noch bemerkt werden, dass deren grosse Hydrolyseempfindlichkeit bei der Chromatographie häufig zur teilweisen Abspaltung einer Phosphatgruppe führt. Dieses macht sich dann auf dem Chromatogramm durch die Bildung eines zweiten Orthophosphatfleckes (Fig. 3, Nr. 40) bemerkbar.

Orientierende Untersuchungen mit unterschiedlichen Extraktionsmitteln ergaben, dass markiertes Glycerophosphat in grösseren Mengen nur nach der Extraktion mit lipophilen Extraktionsmitteln, insbesondere mit MCA, anfällt. Es ist aber nicht zu entscheiden, ob diese Verbindung nur als Spaltprodukt anfällt oder erst nach Veränderungen der Membranstruktur extrahierbar wird.

TABELLE I

R_P-WERTE DER ³²P-MARKIERTEN PHOSPHATESTER

Laufmittel wie in Fig. 1. Die Nummerierung der Verbindungen entspricht den Zahlen in Fig. 3. (Die Laufwerte stellen Mittel aus 20 verschiedenen Chromatogrammen dar.)

Nr.	Verbindung	<i>R_P</i> -Werte	
		1. Richtung	2. Richtung
3	Fructosediphosphat	57	32
4	Ribulosediphosphat	58	38
5	Uridindiphosphatglucose	68	42
6	Uridindiphosphat und Guanosin- diphosphat	73	51
7	Phosphogluconat	65	62
8	Glucose-6-phosphat	77	61
9	Fructose-6-phosphat	81	66
10	Fructose-1-phosphat	87	71
12	Uridinmonophosphat und Inosin- monophosphat	92	86
13	Phosphoglycerinsäure	80	88
14	Phosphoenolbrenztraubensäure	88	111
15	Dihydroxyacetonphosphat (?)	104	87
17	Cytidintriphosphat	86	36
19	Adenosintriphosphat	105	45
20	Ribose-5-phosphat	109	62
21	Adenosindiphosphatglucose	113	49
22	Nicotinamidadeninucleotid- phosphat	104	36
23	Adenosindiphosphat	122	52
24	Flavinadeninucleotid (?)	—	—
25	Nicotinamidadeninucleotid	137	60
27	Phosphoäthanolamin	129	91
29	β-Glycerophosphat	121	114
31	α-Glycerophosphat	119	118
33	Adenosinmonophosphat	142	95
35	Phosphorylcholin	145	105
37	Orthophosphat	100	100
38	Phosphoglycolsäure	—	—

Bei Nachextraktion des mit MCA und H₂O erschöpfend behandelten Versuchsmaterials mit 6 %iger TCE liessen sich, abhängig von der vorangehenden Inkubationszeit mit ³²P, noch gewisse Mengen markierter Verbindungen herauslösen, sodass ein direkter Vergleich der Extraktion phosphorylierter Verbindungen mit dem MCA-Gemisch und mit TCE nicht möglich ist. Bei den zusätzlich mit TCE herausgelösten Verbindungen handelte es sich im wesentlichen um Orthophosphat (wohl aus der Hydrolyse von Polyphosphaten), kurzkettige Polyphosphate und in geringerer Menge auch Nucleotide.

(B) ¹⁴C-markierte Verbindungen

Fig. 4 zeigt das Autoradiogramm einer Trennung der löslichen ¹⁴C-markierten Verbindungen der Flechte *Peltigera aphyta* nach 10 stündiger Inkubation mit ¹⁴C-Bicarbonat. Fig. 5 entspricht einer Auftrennung von ¹⁴C-Markierungsprodukten der einzelligen Grünalge *Ankistrodesmus braunii*. Fig. 6 zeigt schliesslich das Schema eines solchen Dünnschichtchromatogramms. Die dazu gehörigen Laufwerte sind in Tabelle II zusammengefasst.

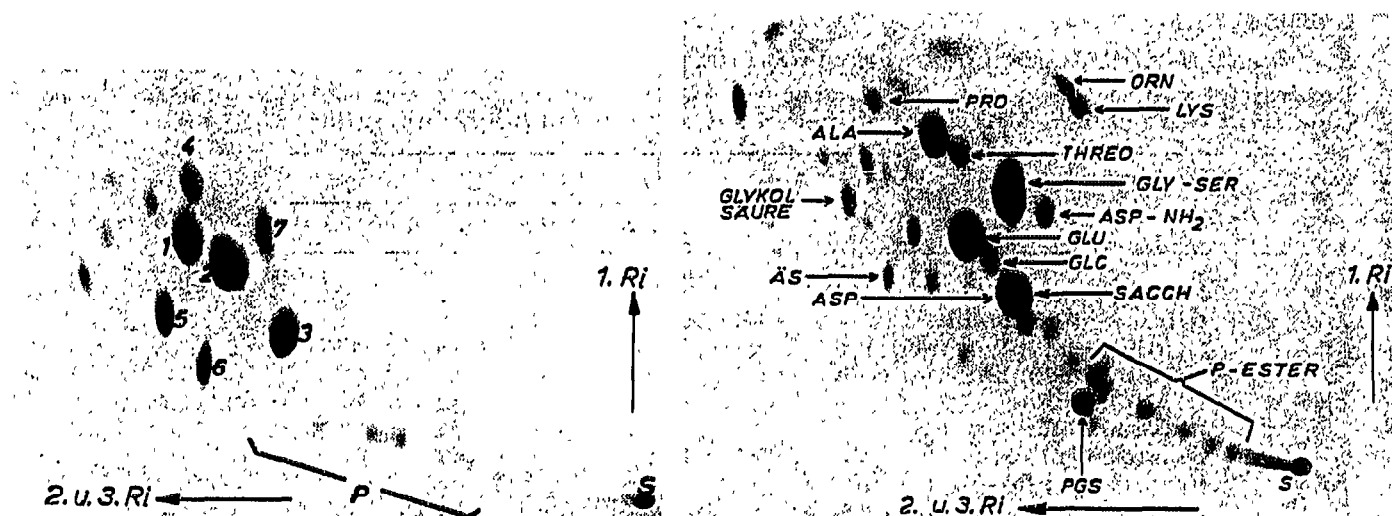


Fig. 4. Autoradiogramm einer dünn-schichtchromatographischen Auftrennung ^{14}C -markierter Stoffwechselprodukte (Extrakt aus *Peltigera aphthosa*). Laufmittelsysteme wie Fig. 2. 1 = Pentit, 2 = Mannit, 3 = Asparaginsäure-Saccharose, 4 = Alanin, 5 = Äpfelsäure, 6 = Zitronensäure, P = Phosphatester, S = Startfleck.

Fig. 5. Autoradiogramm einer dünn-schichtchromatographischen Auftrennung ^{14}C -markierter Stoffwechselprodukte (Extrakt aus *Ankistrodesmus braunii*). Laufmittelsysteme wie Fig. 2.

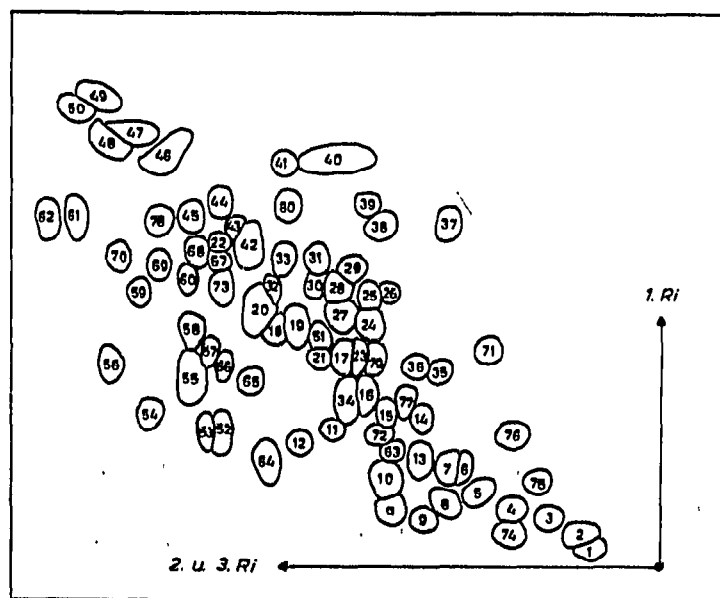


Fig. 6. Schema einer dünn-schichtchromatographischen Auftrennung ^{14}C -markierter Stoffwechselprodukte. Laufmittelsysteme wie Fig. 2. Die Zahlen entsprechen der Bezifferung der Tabelle II.

Folgende Kohlenhydrate sind der Übersichtlichkeit halber nicht mit in dem Schema aufgeführt worden: Ribose, in der 2. Richtung mit Arabit überlappend; Galactose, gleiche Lage wie Phosphoäthanolamin; Arabinose, mit Mannit in der zweiten Richtung überlappend; Sorbose, zwischen Glucose und Glutaminsäure; Rhamnose, zwischen Oxalessigsäure und Erythrit.

Für einige Aminosäuren können keine R_{ALA} -Werte aufgeführt werden, da ihre

Markierung auf den Chromatogrammen stets nur in Spuren vorlag: Cystein, Cystin, Aminobuttersäure, sowie Diaminopimelinsäure.

Die Verbindungen Leucin, Methionin, Phenylalanin und Tryptophan liefen fast mit der Laufmittelfront. Infolgedessen waren die Laufwerte dieser Aminosäuren nicht sehr gut reproduzierbar. Deshalb wurde in diesem Falle auf eine Mittelung der Laufwerte verzichtet.

Zu einigen der in Tabelle II aufgeführten ^{14}C -Markierungsprodukte sollen noch einige ergänzende Bemerkungen gemacht werden.

β -Alanin: Nicht immer vom α -Alanin abgetrennt. Eindeutig markiert in Flechten nachgewiesen. Ninhydrinreaktion mehr blau als violett.

Asparagin: Bei niederen Pflanzen fast stets nur in geringen Mengen markiert, mit zunehmender Organisationshöhe im Pflanzenreich in grösseren Mengen nachweisbar.

Asparaginsäure: Stets in grösseren Mengen markiert, häufig nicht von der Saccharose abgetrennt. Zur Bestimmung der Saccharose wurde in solchen Fällen diese mit TCE hydrolysiert und die im Vergleich zum nicht hydrolysierten Extrakt zusätzlich auftretende Summe an Fructose und Glucose gemessen.

Trehalose: Trehalose wurde bisher von uns in einigen Blaualgenflechten, *Euglena gracilis*, *Isoetes sp.* und *Selaginella sp.* nachgewiesen.

Maltose: Maltose wurde in unseren Versuchen nur selten und auch dann nur in geringen Mengen markiert.

Mannit: Mannit wurde mit einer Ausnahme bisher in allen 70 untersuchten Flechten-Arten nachgewiesen. Es wird in Blaualgenflechten bereits nach sehr kurzen Inkubationszeiten markiert.

Volemit: Mit Sicherheit bisher nur bei der pyrenocarpen Flechte *Dermatocarpon* markiert nachgewiesen. Die Mischchromatographie dieses Heptits wurde mit einem gereinigten Extrakt aus den Wurzeln von *Primula elatior* durchgeführt, in denen Volemit angehäuft wird.

Bernsteinsäure: In markierter Form bisher nur nach sehr langen Dunkeleinlagerungen nachweisbar.

Zitronensäure: Nicht immer von der Isozitronensäure und der *cis*-Aconitsäure abgetrennt. Diese Verbindung wird bei Blaualgenflechten akkumuliert.

Glycolsäure: Bei fast allen niedrigen Pflanzen als wichtigstes Ausscheidungsprodukt während der Photosynthese in ^{14}C -Bicarbonat nachgewiesen. Wird durch Luftsauerstoff oxydiert.

Brenztraubensäure: Gleiche Lage wie Glycolsäure. Unterscheidung durch Reaktion mit Dinitrophenylhydrazin nach Elution von der Platte möglich.

Phosphatester: Gegenüber der bereits im Teil A beschriebenen Chromatographie der ^{32}P -markierten Phosphatester zeigten die gleichen Verbindungen in dem Laufmittelsystem für die Chromatographie von ^{14}C -markierten Verbindungen eine geringere Wanderungsgeschwindigkeit (Fig. 2), vor allem bei den Nukleotiden und den Zuckerphosphaten. Die Laufwerte der Phosphatester wurden deshalb bei dieser Laufmittelkombination nicht gemessen. Bei Doppelmarkierungen mit ^{14}C und ^{32}P wurde allerdings dieses Laufmittelsystem verwendet. Zur Radioautographie bei Doppelmarkierungen wurden zwei Lagen Röntgenpapier verwendet, sodass nach geeigneter Expositionszeit ein Autoradiogramm das Bild der Doppelmarkierung, das andere nur das Bild der ^{32}P -Markierung lieferte.

TABELLE II

*R*_{ALA}-WERTE ¹⁴C-MARKIERTER STOFFWECHSELPRODUKTE

Die Nummerierung der Verbindungen entspricht den Zahlen in Fig. 6. (Die Laufwerte stellen Mittel aus 20 verschiedenen Chromatogrammen dar.) Laufmittelsystem wie in Fig. 4 angegeben. Die Verbindungen Nr. 1, 2, 9, 65, 66, 69, 70, 71, 72, 75 und 76 sind noch nicht identifiziert. Die Verbindungen Nr. 25, 26, 32 und 80 sind ebenfalls noch unbekannt, aber ninhydrinpositiv. Laufwert des Alanins = 100.

Nr.	Verbindung	<i>R</i> _{ALA} -Werte	
		1. Richtung	2. Richtung
3-8	Phosphatester	—	—
10	Phosphoglycerinsäure	—	—
11	Orotsäure	—	—
12	Phosphoenolbrenztraubensäure	—	—
13	Lactose und Raffinose	—	—
14	Maltose	—	—
15	Trehalose	53	73
16	Saccharose	54	78
17	Glucose	61	85
18	Fructose und Xylose	72	93
19	Mannit und Sorbit	79	91
20	Arabit, Xylit und Ribit	82	99
21	Volemit	—	—
22	Glycolaldehyd	—	—
23	Phosphoäthanolamin	—	—
24	Asparagin	74	75
27	Serin	82	81
28	Glycin	82	81
29	Glutamin	89	79
30	Hydroxyprolin	—	—
31	Citrullin	98	87
33	Threonin	97	88
34	Asparaginsäure	54	79
35	Cystin	—	—
36	Diaminopimelinsäure	—	—
37	Cystein	—	—
38	Lysin	108	65
39	Ornithin	112	69
40	Histidin	—	—
41	Arginin	—	—
42	α-Alanin	100	100
43	β-Alanin	—	—
44	Prolin	118	112
45	Tyrosin	109	115
46	Valin	—	—
47	Aminobuttersäure	—	—
48	Methionin	—	—
49	Leucin	—	—
50	Phenylalanin	—	—
51	Glutaminsäure	69	89
52	Zitronensäure	45	99
53	Aconitsäure	—	—
54	Glyoxylsäure	—	—
55	Äpfelsäure	60	107
56	Fumarsäure	63	120
57	Ketoglutarsäure	—	—
58	Glycerinsäure	69	—
59	Glycolsäure und Brenztraubensäure	79	114
60	Oxallessigsäure	—	—

TABELLE II (Fortsetzung)

Nr.	Verbindung	R_{ALA} -Werte	
		1. Richtung	2. Richtung
61	Bernsteinsäure	105	128
62	Milchsäure	—	—
63	Glukuronsäure und Galakturonsäure	—	—
64	Weinsäure	—	—
67	Glycerinaldehyd	—	—
73	Erythrit	93	113
74	Ribulosediphosphat	—	—
77	Floridosid	—	—
78	Glycerin	—	—
79	Taurin	—	—

DISKUSSION

Im Rahmen unserer Arbeit stellte sich heraus, dass selbst bei extrem unterschiedlichen Anteilen der Stoffwechselprodukte an dem Pflanzenextrakt, wie z.B. dem grossen Gehalt an Zuckeralkoholen bei den Flechten gegenüber anderen Intermediärprodukten oder im Falle der Lebermoose oder höheren Pflanzen der starke Anteil der Äpfelsäure, dieses nur geringfügige Auswirkungen auf die Wanderungsgeschwindigkeit der Verbindungen und damit auf die Reproduzierbarkeit der Trennschärfe hat. Gleichzeitig fanden wir eine grosse Wirtschaftlichkeit des Verfahrens infolge Zeit- und Kostenersparnis gegenüber der herkömmlichen papierchromatographischen Methode. Ein gewisser Nachteil der Methode ist, dass bei extrem niedrigen spezifischen Aktivitäten, wie sie sich z.B. bei der Dunkelfixierung von ^{14}C kaum vermeiden lassen, die zum autoradiographischen Nachweis erforderliche Auftragsmenge leicht die Kapazität der Platte übersteigt.

Durch die ausgezeichnete Eignung für Versuche mit grossen Serien ergibt sich für diese Methode ein umfangreiches Anwendungsfeld mit unterschiedlichsten Fragestellungen.

DANK

Für die sorgfältige technische Assistenz danken wir Fr. INGE EILMANN. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sind wir für personelle und materielle Unterstützung zu Dank verpflichtet.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADP	Adenosindiphosphat	MCA	Methanol-Chloroform- 7 M Ameisensäure (12:5:3)
ADPG	Adenosindiphosphatglukose	NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
ÄS	Äpfelsäure	NADP	Nicotinamidadenindinukleotid- phosphat
ALA	Alanin	ORN	Ornithin
AMP	Adenosinmonophosphat	PÄA	Phosphoäthanolamin
ASP	Asparaginsäure	PC	Phosphorycholin
ASP-NH ₂	Asparagin	Pa	Orthophosphat
ATP	Adenosintriphosphat	PEP	Phosphocnolbrenztraubensäure
CTP	Cytidintriphosphat		
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure		

FDP	Fruktosediphosphat	PGS	Phosphoglycerinsäure
FP	Fruktosephosphat	PRO	Prolin
GLC	Glukose	P-15	bisher nicht identifizierter
GIP	Glycerophosphat		Phosphatester
GLU	Glutaminsäure	S	Startfleck
GLY	Glycin	SACCH	Saccharose
GP	Glukosephosphat	SER	Serin
IMP	Inosinmonophosphat	THREO	Threonin
LYS	Lysin		

LITERATUR

- 1 R. L. BIELESKI UND R. E. YOUNG, *Anal. Biochem.*, 6 (1963) 54.
 - 2 R. L. BIELESKI, *Anal. Biochem.*, 12 (1965) 230.
 - 3 I. W. F. DAVIDSON UND W. G. DREW, *J. Chromatog.*, 21 (1966) 319.
 - 4 N. A. TURNER UND R. J. REDGWELL, *J. Chromatog.*, 21 (1966) 129.
 - 5 K. RANDERATH, *Dünnschichtchromatographie*, Verlag Chemie, Weinheim, 1962.
 - 6 E. STAHL, *Dünnschichtchromatographie*, Springer Verlag, Berlin, 1967.
 - 7 W. SIMONIS UND H. GIMMLER, *J. Chromatog.*, 19 (1965) 440.
 - 8 W. SIMONIS UND B. FEIGE, *Flora, Abt. A*, 158 (1967) 599.
 - 9 W. D. JESCHKE, H. GIMMLER UND W. SIMONIS, *Plant Physiol.*, 142 (1967) 380.
 - 10 B. FEIGE, *Dissertation*, Universität Würzburg, 1967.
 - 11 H. GIMMLER, *Dissertation*, Universität Würzburg, 1967.
 - 12 G. J. CROWLEY, V. MOSES UND J. ULLRICH, *J. Chromatog.*, 12 (1963) 219.
 - 13 E. TYSKIEWICZ, *Anal. Biochem.*, 3 (1962) 164.
 - 14 C. S. HANES UND F. A. ISHERWOOD, *Nature*, 164 (1949) 1107.
 - 15 S. RUHEMANN, *J. Chem. Soc.*, 97 (1910) 1438.
 - 16 R. U. LEMIEUX UND H. F. BAUER, *Anal. Chem.*, 26 (1954) 920.
 - 17 S. M. PARTRIDGE, *Nature*, 164 (1949) 443.
 - 18 R. JOHANSON, *Nature*, 172 (1953) 956.
 - 19 J. E. LÖFFLER UND E. R. REICHL, *Mikrochim. Acta*, 41 (1953) 79.
 - 20 R. ACHER, C. FROMAGEOT UND M. JUTISZ, *Biochim. Biophys. Acta*, 5 (1950) 81.
 - 21 I. M. HAIS UND K. MACEK, *Handbuch der Papierchromatographie*, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1963.
 - 22 A. MEHLITZ, K. GIERSCHNER UND T. MINAS, *Chemiker-Ztg.*, 87 (1963) 573.
- J. Chromatog.*, 41 (1969) 80-90