

CHROM. 5733

## EINIGE ANOMALIEN BEI DER DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHIE VON AMINOSÄUREN IN GEGENWART VON TRICHLORESSIGSÄURE

HARALD STÜBCHEN-KIRCHNER

*Medizinische Universitätsklinik Graz\* (Österreich)*

(Eingegangen am 10. August 1971)

## SUMMARY

*Anomalous behaviour of amino acids on thin-layer chromatograms in the presence of trichloroacetic acid*

In thin-layer chromatography on cellulose plates especially the fast migrating amino acids show anomalous behaviour in the presence of trichloroacetic acid. They rarely appear on their characteristic sites, but instead migrate to an upper region where no conventional amino acid is ever found. This effect takes place with acidic developers containing butanol and acetic acid, a neutral one with *tert.*-butanol and acetone, but not with alkaline developers. The presence of HCl diminishes the interference caused by trichloroacetic acid.

By a pre-development (twice) in ether saturated with water, 10 % acetic acid, or 10 % formic acid, respectively, the trichloroacetic acid is tried to be removed from the applied solutions, so that subsequent normal chromatography will reveal the usual picture. The best results are achieved with ether saturated with formic acid: the described interference with trichloroacetic acid is removed almost entirely.

Serum extracts deproteinised by means of trichloroacetic acid can in this manner easily be examined by thin-layer chromatography without the necessity of a time-consuming removal of the excess deproteinisation agent by means of ion exchange or electrolytic desalting.

## EINFÜHRUNG

Ein wichtiges Reagens zur Enteiweissung und Aufarbeitung biologischer Substrate, vor allem von Körperflüssigkeiten, wie von Serum, Punktaten u.ä., ist die Trichloressigsäure (TCE). Die Entfernung ihres Überschusses kann entweder durch mehrstündiges Kochen des Filtrats (Zerfall in  $\text{CHCl}_3$  und  $\text{CO}_2$ ), durch Gefrier-trocknung oder durch mehrfaches Ausäthern geschehen. Da erstere Methode wegen der zu erwartenden Verluste und irreversiblen Veränderungen einiger Aminosäuren und Peptide nicht empfohlen werden kann, andererseits eine Gefriertrocknung doch mit erheblichem experimentellem Aufwand verknüpft ist, haben wir uns in unserem

\* Vorstand: Prof. Dr. K. GOTSCH.

Laboratorium für die mehrfache Ätherextraktion entschieden. Wir hielten uns dabei im Wesentlichen an die von CLOTTEN UND CLOTTEN<sup>1</sup> gegebene Vorschrift, wonach man der zu untersuchenden Lösung das doppelte Volumen 10%iger TCE zusetzt und hernach solange etwa mit dem gleichen Volumen Diäthyläther ausschüttelt, bis dieser nur mehr schwach sauer reagiert. Schliesslich wird die verbleibende wässrige Lösung eingedampft und im gewünschten Volumen Wasser, bezw. Pufferlösung aufgelöst. Die erhaltenen Lösungen wurden einerseits einer Hochspannungselektrophoretischen Trennung unterworfen und andererseits auch in verschiedenen Fließmitteln dünnschichtchromatographisch untersucht.

Während bei der Hochspannungselektrophorese keinerlei Abnormitäten auftraten, kam es bei der Dünnschichtchromatographie (DC) auf Celluloseplatten in mehreren Lösungsmitteln zu eigenartigen Erscheinungen. In den essigsäuren Butanol-Fließmitteln war bei der Auftrennung eines wie oben geschildert hergestellten Serumkonzentrates ausser den im Wesentlichen auf die Gegenwart von Elektrolyten (und Harnstoff sowie einiger anderer Verbindungen) beruhenden Störungen, vor allem im unteren Teil des Chromatogramms, noch andere zusätzliche Anomalien zu beobachten, die weder in den anderen von uns verwendeten Fließmitteln ("34", "13", "KHL"), noch bei anders hergestellten (z.B. durch Alkohol-fällung) Serumkonzentraten auch in den sauren Butanol-Fließmitteln in Erscheinung traten. Es handelt sich darum, dass die weit wandernden Aminosäuren (in erster Linie also die Leucine, Phenylalanin, Valin, Tryptophan usw.) zum Grossteil nicht an dem ihnen zukommenden Platz aufscheinen, sondern weiter hinauf verschleppt werden in ein Gebiet, in dem unter normalen Umständen keine (herkömmlichen) Aminosäuren mehr zu finden sind. Sie bilden dann meist halbmondförmige Flecke und liegen häufig relativ dicht bei einander.

Dass diese merkwürdige Erscheinung aber nicht auf irgendwelche Komponenten des Serums zurückzuführen, sondern allein eine Folge der TCE-Behandlung ist, zeigt sich daran, dass sie ebenso auftritt, wenn man ein Gemisch von Testamino-säuren verdünnt, mit TCE versetzt, wiederholt ausäthert und auf ein entsprechendes Volumen wieder eindampft. Der Verdacht, dass sich die TCE auch nach 10–12-maligen Ausäthern nicht vollständig entfernen lässt, konnte durch positiven Ausfall der Fujiwara-Reaktion bestätigt werden. Auch in abgedampften Proben der einzelnen Äther-extrakte trat bis zuletzt stets positive Fujiwara-Reaktion auf.

Erwartungsgemäss zeigten sich die gleichen Verschleppungserscheinungen der schnellwandernden Aminosäuren, wenn man der Testamino-säurelösung von vornherein einige Prozent TCE zusetzt.

Von zahlreichen Autoren<sup>2–7</sup> waren ganz ähnliche Erscheinungen bei der Papierchromatographie in wasserhaltigen Butanol-Eisessig-Mischungen von verschiedenen Amininen (Adrenalin, Noradrenalin, Histamin, Tyramin, Ephedrin, Phenyläthylamin u.v.a.) in Gegenwart von TCE aber auch anderer organischer Säuren (Trifluoressigsäure, Pikrinsäure, teilw. auch Dichloressigsäure) beobachtet worden. Sie treten dann auf, wenn die organische Säure relativ stark ist (stärker als die Säure des verwendeten Fließmittels<sup>8</sup>) und ihr  $R_F$ -Wert relativ hoch liegt — bis TCE in Fließmittel "P" (vgl. unten) *ca.* 0.90 (Lit. 4 und 6). Auch bei diesen Verbindungen sind die Amine mit höherem  $R_F$ -Wert stärker betroffen, insofern ein grösserer Teil der Substanz im oberen Fleck zu finden ist, ja es kann vorkommen, dass bei genügendem Überschuss der organischen Säure (Intensität und Höhe des oberen Fleckens nehmen mit Stärke

und Konzentration der organischen Säure zu) nur mehr der obere Fleck auftritt, und der untere, dessen Lage der freien Base entspricht, gar nicht mehr zu sehen ist<sup>7</sup>.

BECKETT UND CHOULIS<sup>8</sup> studierten das Phänomen auch mit Hilfe der DC und fanden bei Celluloseplatten erwartungsgemäss ganz ähnliche Ergebnisse wie in der Papierchromatographie. Auf  $\text{SiO}_2$ -Platten aber kam es nicht zur Ausbildung dieser zwei Flecken, es trat nur ein einziger auf, der allerdings sehr langgestreckt war. Bei  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Platten zeigte sich überhaupt kein Einfluss der TCE (bezw. der anderen ähnlich wirkenden organischen Säuren). Die Autoren nehmen an, dass für die Verschleppungserscheinungen bei Cellulose, deren Carboxylgruppen verantwortlich sind, zumal sie nach einer Vorbehandlung der Schicht mit Diazomethan<sup>8</sup> nicht mehr festzustellen waren.

Auch WEST<sup>4</sup> hatte beobachtet, dass nach Ätherextraktion der trichloressigsäurehaltigen Lösungen der obere zusätzliche Fleck nicht verschwindet, sondern höchstens schwächer wird. Lediglich nach Anwendung eines Ionenaustauschers ist die Gesamtmenge des betreffenden Amins wieder an der normalen Stelle vereinigt<sup>2,4</sup>. Dass sich TCE auch durch sehr oft wiederholte Ätherextraktion aus einer wässrigen Lösung nicht vollständig entfernen lässt, darf nicht wundernehmen, da es sich ja doch um eine relativ starke organische Säure handelt, natürlich nur die nicht dissoziierte Form in Äther löslich ist, und bei fortschreitender Verdünnung der wässrigen Phase die Dissoziation zunimmt, sodass mit jeder neuerlichen Ätherextraktion der Verteilungskoeffizient immer ungünstiger wird.

Anders verhält es sich, wenn man die Ätherextraktion in Gegenwart einer stärkeren Säure, also beispielsweise HCl, vornimmt, wodurch die Dissoziation der TCE zurückgedrängt wird. Wenn wir die Enteiweissung von Serum nach der von PATAKI<sup>9</sup> gegebenen Vorschrift, die im Wesentlichen auf KRAUT UND ZIMMERMANN-TELSCHOW<sup>10</sup> zurückgeht, durchführten, wobei die Ätherextraktion aus 0.1 N HCl erfolgt, zeigten sich dann bei der Chromatographie diese Anomalien nicht, die Fujiwara-Reaktion im Konzentrat erwies sich als (beinahe) negativ und auch die eingedampften Proben der einzelnen Ätherextrakte ergaben nur mehr bis einschliesslich der 6. oder 7. Ausätherung ein positives Ergebnis. Freilich ist zu bedenken, dass sich bei der weiteren Aufarbeitung auch wenn sie schonend durchgeführt wird, gewisse Folgen der Gegenwart von HCl, wie Spaltung einiger Peptide, Übergang von Asparagin- und vor allem Glutamin in die entsprechenden Säuren doch nicht ganz verhindern lassen.

Zweck vorliegender Untersuchung ist es, an Hand von Serumkonzentraten und Testamino-säurenmischungen, denen (meist etwa 2%) TCE zugesetzt wurde, diesen TCE-Störeffekt unter verschiedenen Bedingungen näher zu studieren und über Versuche zu berichten, ihn auch ohne Anwendung von Ionenaustauschern oder elektrolytischer Entsalzung zu beseitigen.

## EXPERIMENTELLES

### *Lösungen*

#### *Serumkonzentrate*

Nach CLOTTEN<sup>1</sup>. Ein Mischserum wurde mit dem doppelten Volumen 10%iger TCE unter Schütteln tropfenweise versetzt, mehrere Stunden im Eisschrank stehen gelassen, 10 min scharf zentrifugiert und der Rückstand mehrere Male mit 10%iger

TCE gewaschen. Die vereinigten Zentrifugate wurden mit etwa dem gleichen Volumen Diäthyläther ausgeschüttelt, die Ätherphase jeweils einmal mit einer geringen Menge Wasser gewaschen und dieses mit der wässrigen Lösung vereinigt. Die Ätherextraktion wurde etwa zehnmal wiederholt. Die schliesslich verbleibende wässrige Phase wurde im Rotationsverdampfer schonend (nicht über 50°) eingedampft und schliesslich in 1/10 des ursprünglichen Serum-Volumens Pyridinacetatpuffer von pH 3.6 gelöst (100 ml Eisessig, 10 ml Pyridin ad 1 l Wasser).

Nach PATAKI<sup>9</sup> (bezw. KRAUT UND ZIMMERMANN-TELESCHOW<sup>10</sup>). Zunächst analog, nur wurden dann die vereinigten Zentrifugate noch vor der Ätherextraktion weitestgehend (Rotavapor) eingedampft und in etwa denselben Volumen 0.1 N HCl gelöst. Die Ätherextraktionen und alle weiteren Schritte genau wie oben beschrieben.

#### *Aminosäuretestlösungen*

Verwendet wurden Reinstsubstanzen der Firmen Merck bzw. Serva oder Fluka. Die Substanzen wurden ebenfalls im oben erwähnten Pyridinacetatpuffer gelöst, da dieselben Lösungen auch für hochspannungselektrophoretische Trennungen in diesem Puffer verwendet wurden und andererseits durch das anwesende Pyridin auch eine gewisse Haltbarkeitsverbesserung der Lösungen erzielt wird. Im allgemeinen wurden von jeder Aminosäure 2 µg aufgetragen. In der Hauptsache diente uns zum Studium des TCE-Effekts ein Gemisch aus Leucin, Phenylalanin, Valin, Prolin, Threonin und Serin (je 0.67 mg pro ml). Durch Zusatz von 100 µl 20 %iger TCE zu 1 ml obiger Lösung wurde ein etwa 2 % (genauer 1.8 %) TCE enthaltendes Testgemisch hergestellt. Analog wurden weiters Lösungen mit niedrigerem und höherem (bis 10 %) Gehalt bereitet.

Um einen eventuellen Einfluss des Pyridin-Essigsäure-Puffers auszuschalten, wurde auch eine Lösung der oben angeführten Aminosäuren in 10 %igem Isopropanol angesetzt und ebenso mit (1.8 %) TCE versetzt. Gleichzeitig wurden Lösungen hergestellt (ausgehend von letzterer in 10 %igem Isopropanol), die ausser TCE verschiedene Mengen HCl enthielten und zwar eine die 0.1 N, und eine die 0.5 N an HCl war.

In ähnlicher Weise wurden auch verschiedene andere Aminosäurelösungen mit TCE versetzt.

#### *Dünnschichtchromatographie*

Es gelangten zwanzigmal 20-cm Fertigplatten Cellulose der Fa. Merck zur Anwendung. Die Substanzen wurden punktförmig, etwa 3.5 vom unteren Rand der Platte aufgetragen. Die Wanderungsstrecke betrug etwa 15–15.5 cm. Folgende Fließmittel wurden verwendet:

“P” (nach PARTRIDGE<sup>11</sup>) — *n*-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5) (Oberphase)

“8” (zitiert nach PATAKI<sup>9</sup> von dem auch die Nummerierung übernommen wurde) — *n*-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:1)

“Cul” (nach CULLEY<sup>12</sup>) — *n*-Butanol-Eisessig-Wasser (13:3:5)

“Mk” (nach der von der Fa. Merck herausgegebenen Vorschrift<sup>13</sup> in ihrer Fertigmethode zur DC von Aminosäuren im Plasma, die auf die Arbeit von BREMER *et al.*<sup>14</sup>, zurückgeht) — *n*-Butanol-Aceton-Eisessig-Wasser (7:7:2:4)

“ML” (nach der von der Fa. Merck herausgegebenen DC-Fertigmethode für Phenylalanin und Leucine<sup>15</sup>) — *tert.*-Butanol-Aceton-Wasser (13:2:5)

"34" (zitiert nach PATAKI<sup>9</sup>) — Methanol-Pyridin-Wasser (20:1:5)

"13" (zitiert nach PATAKI<sup>9</sup>) — Chloroform-Methanol-17 %iges NH<sub>3</sub> (2:2:1)

"KHL" (nach KRAFFCZYK *et al.*<sup>10</sup>) — Dioxan-Pyridin-25 %iges NH<sub>3</sub>-Wasser (7:7:3:3)

Alle Fließmittel, ausgenommen "Mk", wurden bei Kammersättigung angewandt. In "Mk" sowie in "KHL" wurde jeweils zweimal unter Zwischentrocknung entwickelt (Bezeichnungen hierfür "Mk<sup>2</sup>" bzw. "KHL<sup>2</sup>").

*Vorentwicklungen mit Diäthyläther.* Destilliertes Wasser, 10 %ige Essigsäure oder 10 %ige Ameisensäure wurden jeweils mit demselben Volumen Diäthyläther (p.a. Merck) 5 min intensiv geschüttelt. Nach etwa zweistündigem Stehen wurde die untere Schicht verworfen und die obere in eine mit Filterpapier ausgekleidete Kammer gebracht. Chromatographiert wurde dann in üblicher Weise, zumeist jedoch zweimal unter Zwischentrocknung, jedoch solange bis der Äther die obere Plattenkante erreichte, wogegen sonst, wie allgemein üblich die Chromatographie früher abgebrochen wurde. Nachweis der Aminosäuren: Nach Lufttrocknung wurde mit einer 0.4 %igen Ninhydrinlösung in Isopropanol, die 5 % Collidin enthielt<sup>1</sup>, besprüht. Eine weitere Differenzierung einzelner Aminosäuren erfolgte durch Übersprühen mit äthanolischer KOH<sup>17</sup>.

*Fujiwara-Reaktion.* Etwa 50 µl eines Serumkonzentrats bzw. 1 ml eines etwa 100 ml betragenden Ätherextrakts (nach Abdampfen des Äthers) wurden mit 1 ml 15 %iger NaOH und 1 ml Pyridin versetzt. Die Proben wurden 5 min in kochendem Wasser erhitzt. Es bildete sich eine intensive Rotfärbung der oberen Schicht. Auf eine genaue quantitative Bestimmung wurde verzichtet, aber durch Farbvergleich (evtl. nach Verdünnen mit 10 ml Äthanol) waren halbquantitative Schätzungen möglich.

## ERGEBNISSE

Wie beispielsweise aus den Fig. 1a, 2a und 2e zu sehen, verursachte bei den untersuchten Fließmitteln "P", "8", "Cul" und "MK" Anwesenheit von TCE in den aufgetragenen Proben — ob es sich jetzt um die Serumkonzentrate oder um künstlich mit TCE versetzte Testaminosäurelösungen handelte — stets diese geschilderte Verschleppung der weiter wandernden Aminosäuren. Im Falle der vorzugsweise untersuchten Testgemische von Leucin, Phenylalanin, Valin, Prolin, Threonin, Serin sind also die drei erstgenannten betroffen. Hierbei zeigt Leucin den Effekt am stärksten, Valin relativ vielleicht am wenigsten, dennoch kommt auch von dieser Aminosäure im allgemeinen immer noch recht wenig auf den sonst ihr zukommenden Platz. Auf derselben Platte aufgetragene andere — TCE-freie — Lösungen zeigten fast durchwegs normales Verhalten. Manchmal aber kam es vor (siehe z.B. Fig. 2a und e) dass, besonders bei höheren TCE-konzentrationen, auch daneben aufgetragene normale Proben — allerdings in viel geringerem Ausmass — noch von dem Störeffekt miterfasst werden.

In Übereinstimmung mit den Befunden von BECKETT und Mitarbeitern<sup>6,7</sup> war auch im Falle der Aminosäuren beim Vergleich von Testlösungen verschiedenen TCE-gehalts eine Zunahme an Wanderungstrecke und Intensität der hinauf verschleppten Anteile mit zunehmender TCE-menge zu beobachten.

Im Falle der Aminosäuren von mittlerer Wanderungstrecke erwies sich die

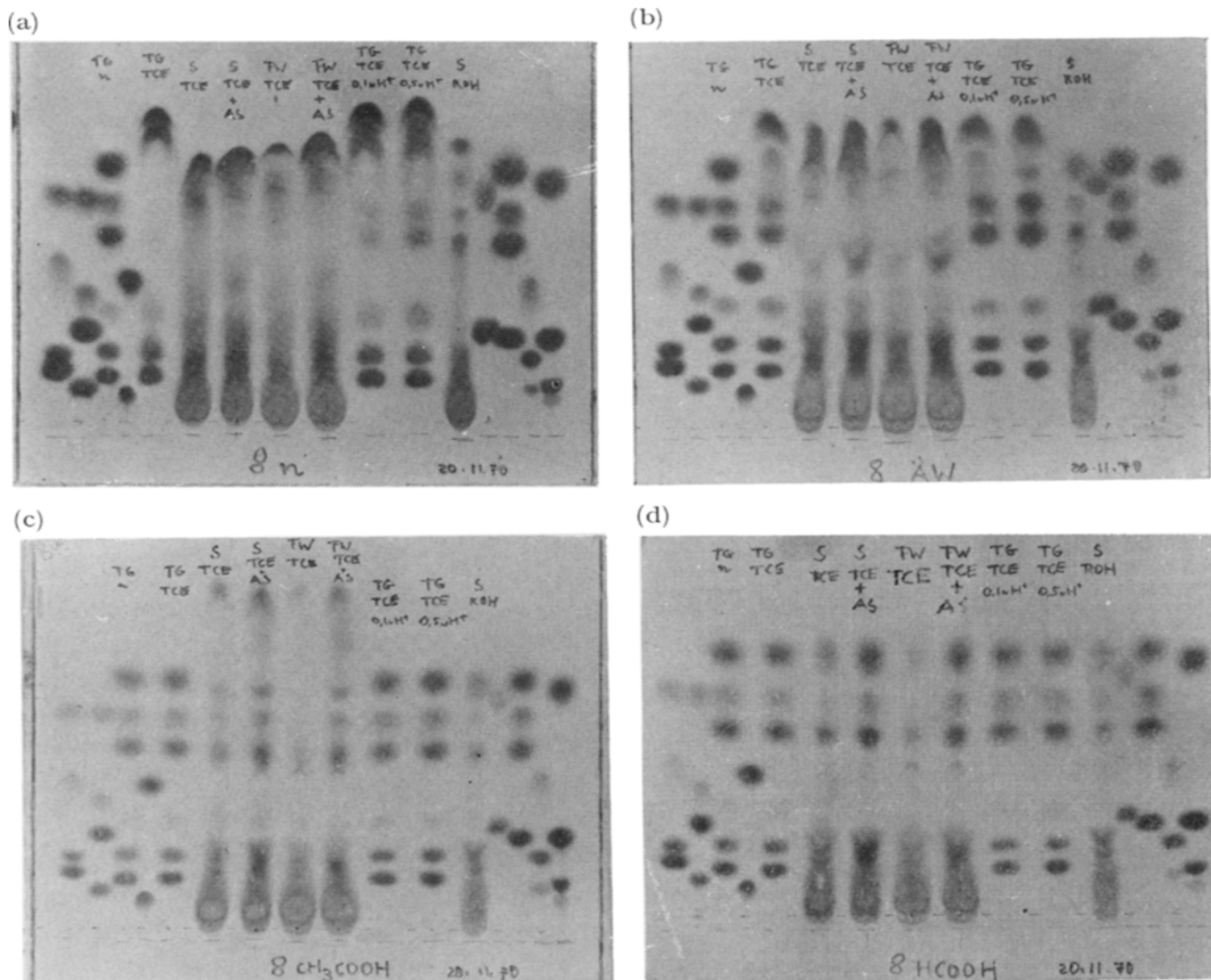


Fig. 1. Dünnschichtchromatographie von 1.8% TCE-hältigen Testgemischen (TG) (Leu, Phe, Val, Pro, Thr, Ser) teils keine, teils 0.1 N, bzw. 0.5 N HCl enthaltend, und dem entsprechenden TCE-freien Gemisch ( $TG_n$ ), sowie von TCE-entweisztem Serum (S) und Fruchtwasserkonzentraten (FW) teilweise superponiert von den Aminosäuren Leu, Phe, Val, Ala (AS). Zum Vergleich auch ein mit Alkohol entweisztes Serumkonzentrat (S ROH). Links und rechts — im nicht überschriebenen Teil — wurden verschiedene Testamino-säuren (ohne TCE) aufgetragen. (a) Fließmittel "8" ohne Vorbehandlung. (b) Fließmittel "8" nach Vorbehandlung (zweimal) in Äther gesättigt mit Wasser. (c) Fließmittel "8" nach Vorbehandlung (zweimal) in Äther gesättigt mit 10%iger Essigsäure. (d) Fließmittel "8" nach Vorbehandlung (zweimal) in Äther gesättigt mit 10%iger Ameisensäure.

TCE-störung als viel weniger ausgeprägt. Es zeigten sich hier zumeist nur verwaschene Fleck- und teilweise Schwanzbildung in der Wanderungsrichtung. Bei den wenig wandernden Aminosäuren merkt man fast nichts. Mitunter ändert sich die Form der Flecken etwas, sie werden langgestreckt und laufen oben spitz zu. Histidin und Histamin, die ja in diese Gruppe fallen, verhalten sich in Gegenwart der TCE (fast) normal. Auch BECKETT und Mitarbeiter hatten im Falle von Histamin normales Verhalten<sup>8</sup> gefunden, wohingegen die Arbeitsgruppe WEST<sup>3,4</sup>, die allerdings wesentlich grössere Mengen auftrugen, Doppelfleckbildung feststellten.

In den anderen Fließmitteln, die nicht in die Gruppe der Essigsäure und Butanol enthaltenden Gemische fallen, bewirkt TCE keine oder nahezu keine Veränderungen. Mitunter nur kommt es zu kleineren Verschiebungen, bzw. Formver-

änderungen einiger Flecken. Es handelt sich bei diesen Fliessmitteln ("34", "KHL", "13") ja durchwegs um basische. "ML" aber stellt ein neutrales (zudem noch Butanol, wenn auch *tert.*-Butanol enthaltendes) Lösungsmittel dar. Und in diesem zeigt sich der TCE-Effekt auch wieder in gleicher Weise wie bei den Gemischen der Butanol-Essigsäure-Reihe. Auch BECKETT UND CHOULIS<sup>8</sup> hatten bei Verwendung eines wasser-gesättigten Butanols ähnliche Ergebnisse erhalten wie im Fliessmittel "P".

Um die geschilderten Erscheinungen näher zu untersuchen, wurde ein 2% TCE-enthaltendes Testgemisch (Leucin, Phenylalanin, Valin, Prolin, Threonin, Serin) in verschiedener Weise einer zweidimensionalen Chromatographie unterworfen.

Zunächst einmal wurde in der ersten Dimension ein den Effekt zeigendes Fliessmittel ("P", "8", bzw. "Mk") und in der zweiten Dimension "34", das den Effekt nicht aufweist, angewandt. Die Ergebnisse waren wie erwartet: ein kleiner Teil von Phenylalanin und Valin kamen in der ersten Richtung auf die richtige Stelle, der Grossteil jedoch, sowie praktisch das ganze Leucin, wird hinauf verschleppt. Nach dem Laufe der zweiten Richtung erscheint sodann alles an den entsprechenden Stellen.

Es wurde auch der umgekehrte Versuch unternommen, also "34" in erster, "P" bzw. "8" in zweiter Richtung. Hier zeigte sich, dass dann im zweiten Lauf durch das essigsäurehaltige Fliessmittel nur mehr ein kleinerer Teil hinauf verschleppt wird, es dürfte sich dabei fast ausschliesslich nur um Leucin handeln. Offenbar wurde im ersten Lauf doch ein Grossteil der TCE von den Aminosäuren getrennt.

Zuletzt wurde in beiden Dimensionen ein den Effekt zeigendes Fliessmittel ("P"), also die Diagonalchromatographie angewandt. Es lag das meiste tatsächlich etwa auf einer Diagonalen, lediglich Valin, etwas Phenylalanin und Spuren Leucin traten auch noch oberhalb der Diagonale wieder in Erscheinung. Das bedeutet, dass von den nach dem ersten Lauf auf den normalen Plätzen aufscheinenden kleinen Teil von Valin und Phenylalanin auch beim zweiten Lauf alles an die entsprechende Stelle rückt und nichts verschleppt wird. Von den im ersten Lauf aber hinaufgezogenen Aminosäuren wird ein Grossteil in der zweiten Richtung ebenfalls hinauf mitgerissen, ein kleinerer Teil aber gelangt an die richtige Stelle. Zu ganz demselben Ergebnis waren auch BECKETT und Mitarbeiter bei der zweidimensionalen Chromatographie von Isoprenalin und Phenyläthylamin (im Fliessmittel "P") gelangt<sup>7</sup>.

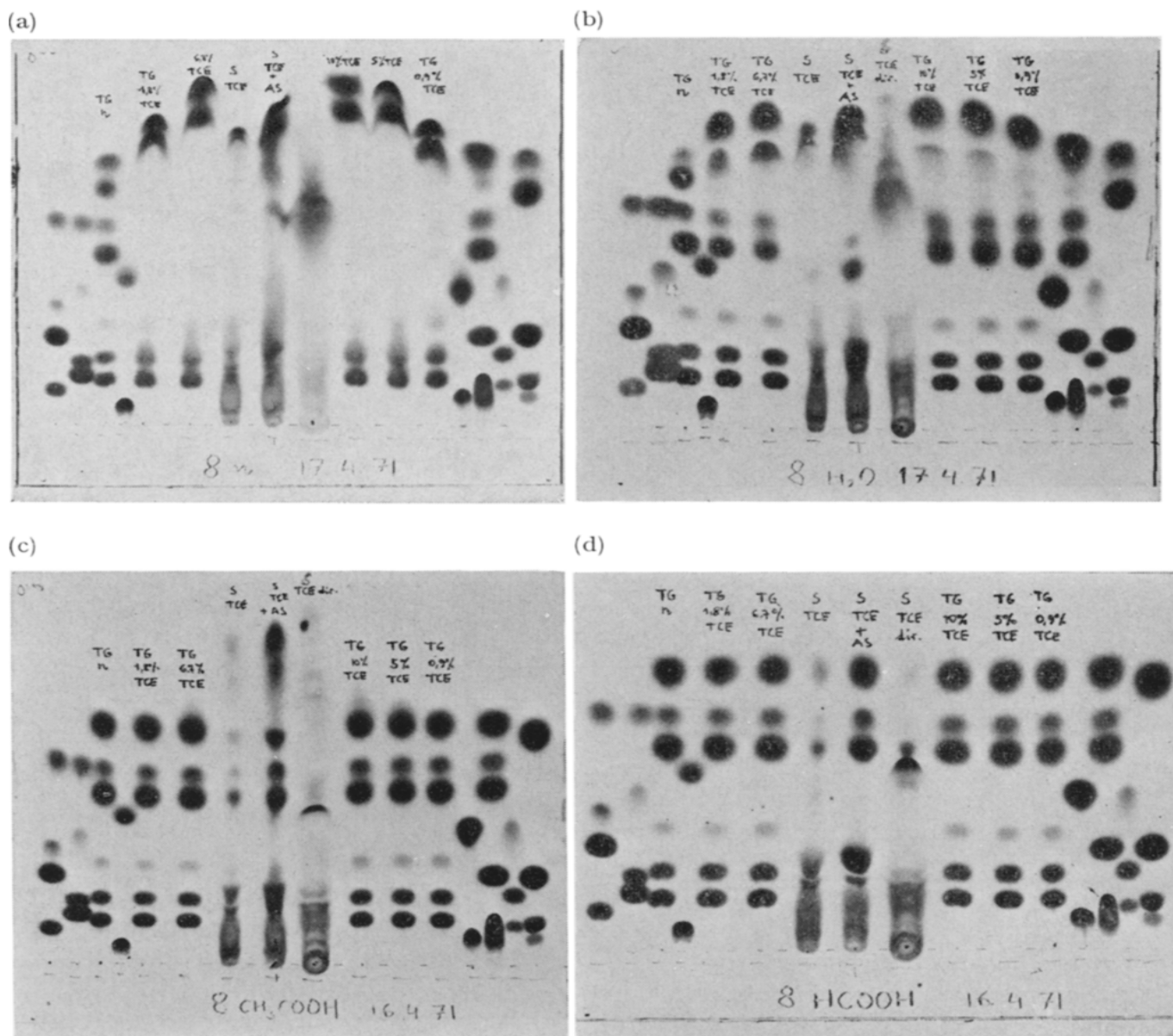
Um den Einfluss der Anwesenheit einer stärkeren Säure zu studieren, wurden auch — wie im experimentellen Teil geschildert — TCE-hältige Testgemische, die 0.1 N bzw. 0.5 N an HCl waren, untersucht. Interessanterweise zeigten sich dabei zumeist — wenn auch nicht immer klar erkennbar — gewisse Abstufungen des TCE-Effektes; mit steigendem HCl-Gehalt gelangt mehr an die richtige Stelle und wird weniger verschleppt (siehe z.B. Fig. 1a). Allerdings nimmt dafür auch eine gewisse Unschärfe und Verschwommenheit der Flecken zu. Fast keinen Unterschied ergab die Verwendung von 10%igem Isopropanol an Stelle des Pyridinacetatpuffers als Lösungsmittel (bei Abwesenheit von HCl).

Einen günstigen Einfluss übte auch ein Nachbehandeln der aufgetragenen Proben mit HCl (5  $\mu$ l 2 N HCl) aus. Der Störeffekt der TCE wird dadurch wesentlich abgeschwächt; es wird nicht mehr soviel hinauf verschleppt und die Wanderungsstrecke des noch mitgerissenen Anteils (hauptsächlich Leucin) wird auch kürzer. In Serumkonzentraten, zum Unterschied von den Testgemischen, bewirkte die Salzsäure zumeist keine besondere Verbesserung.



Noch günstiger im Hinblick auf den TCE-Effekt war es, wenn die Platte nach dem Auftragen in eine Kammer mit der verdünnten HCl (dazu wurde 0.5 N HCl verwendet) gestellt und bis zu einer Steighöhe von etwa 3–4 cm entwickelt wurde. Nach dem Trocknen wurde dann in üblicher Weise chromatographiert. Die Ergebnisse waren hierbei nicht immer reproduzierbar, in einigen Fällen gab es nahezu kein Mitreissen durch die TCE mehr, zumeist waren zwar noch die Serumkonzentrate zum Teil davon betroffen, die Testgemische aber in der Regel nicht mehr oder nur mehr andeutungsweise. Freilich traten dafür — ebenso wie auch beim Übertüpfeln mit HCl — häufig andere Störungen in Erscheinung, Verzerrungen, bezw. ein Zusammendrücken einzelner Aminosäurezonen.

Wurden die Platten nach dem Auftragen der Substanzen längere Zeit (1 h oder länger) auf etwa 105° erhitzt, so zeigte sich dann bei der anschliessenden Chromatographie der TCE-Effekt wesentlich abgeschwächt, bezw. war mitunter überhaupt verschwunden. Es ist klar, dass die TCE durch das Erhitzen gespalten





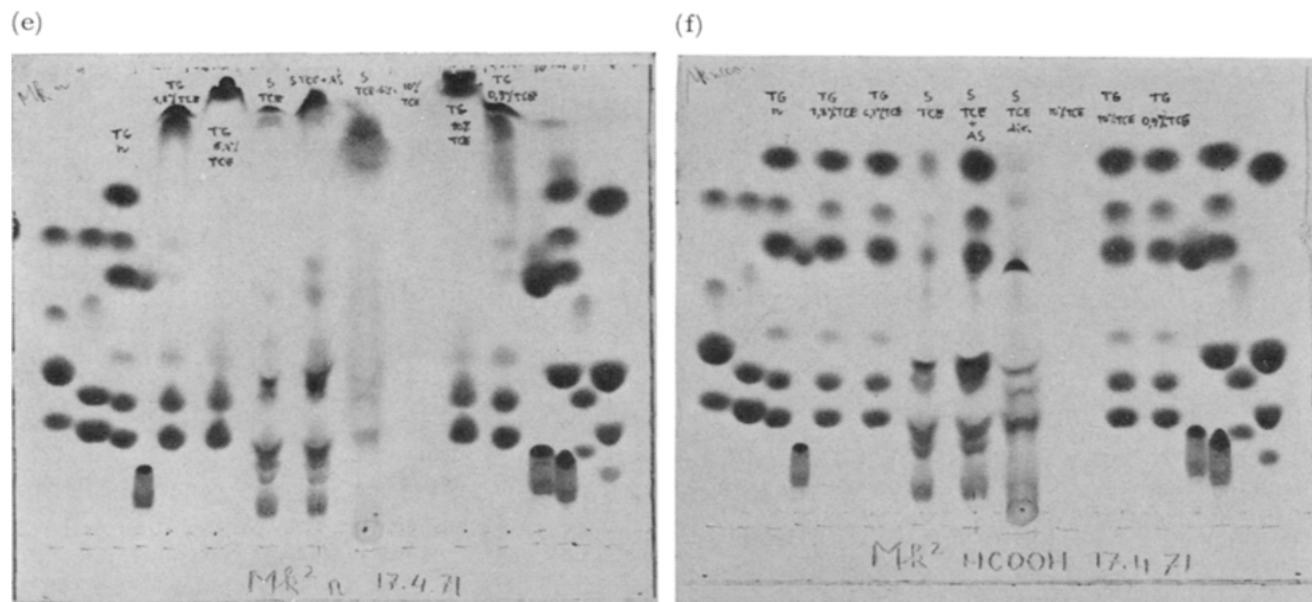


Fig. 2. Dünnschichtchromatographie der Testgemische (Leu, Phe, Val, Pro, Thr, Ser) mit verschiedenen Mengen (0.9%, 1.8%, 5%, 6.7%, 10%) TCE bzw. ohne TCE ( $TG_n$ ) sowie einmal von mit TCE gewöhnlich enteiweisstem (S TCE), teilweise auch von den Aminosäuren Leu, Phe, Val, Ala (AS) superponiert, und einmal von TCE enteiweisstem Serum ohne Ausätherung und Einengung (S TCE dir.). Links und rechts im unbeschrifteten Teil wieder andere Aminosäuregemische ohne TCE-Zusatz. (a) Fliessmittel "8" ohne Vorbehandlung. (b) Fliessmittel "8" nach Vorbehandlung (zweimal) in Äther gesättigt mit Wasser. (c) Fliessmittel "8" nach Vorbehandlung (zweimal) in Äther gesättigt mit 10%iger Essigsäure. (d) Fliessmittel "8" nach Vorbehandlung (zweimal) in Äther gesättigt mit 10%iger Ameisensäure. (e) Fliessmittel "Mk" (zweimal) ohne Vorbehandlung. (f) Fliessmittel "Mk" (zweimal) nach Vorbehandlung (zweimal) in Äther gesättigt mit 10%iger Ameisensäure.

wird und sich verflüchtigt. Allerdings muss natürlich auch unter den Aminosäuren und Peptiden mit partiellen Zersetzungs Vorgängen zu rechnen sein.

Da mehrfaches Ausschütteln mit Äther — also die einfachste Form eines Verteilungsvorganges — offenbar nicht in der Lage ist, TCE vollständig aus einer — nicht mit einer stärkeren Säure angesäuerten — Lösung zu entfernen, war es zweckmässig, zu versuchen, die Zahl der Verteilungsschritte extrem zu erhöhen. Und da die DC auf Celluloseschichten in der Hauptsache ja auf Verteilungsvorgängen beruht, sollte gleich dieses Verfahren herangezogen werden, eine Entfernung der störenden TCE zu erreichen.

Hierzu wurden die Platten nach dem Auftragen in mit Wasser gesättigtem Diäthyläther zunächst einmal — besser jedoch zweimal unter Zwischentrocknung — bis zum oberen Rand vorentwickelt, wonach dann nach einer weiteren Zwischentrocknung die Chromatographie in dem betreffenden Butanol-Eisessig-hältigen Fliessmittel angeschlossen wurde.

Die Ergebnisse waren, wenn auch nicht immer in gleicher Weise, zunächst durchaus ermutigend. Der Unterschied gegenüber einer nicht mit Äther vorbehandelten Platte war eindeutig. Nun ist in der Mehrzahl der Fälle hauptsächlich nur mehr Leucin mitgerissen, in den HCl-hältigen Proben jedoch meist nur wenig oder sogar überhaupt nichts mehr. Die Wanderungsstrecke der doch noch hinaufgezogenen Aminosäureanteile wurde ausserdem kürzer. Freilich, in Bezug auf die Serumkonzentrate zeitigte die Äthervorbehandlung nur sehr wenig Erfolg.

Als nächstes wurde statt des wassergesättigten ein mit 10 % Essigsäure gesättigter Äther für die Vorbehandlung verwendet. In diesem Fall verhielten sich die TCE-hältigen Testgemische fast durchwegs normal, es erschienen alle Aminosäuren auf den ihnen zukommenden Plätzen. Nur manchmal, insbesondere bei höheren TCE-konzentrationen (über 5 %) als sie sonst in der Mehrzahl unserer Versuche angewandt wurden (2 %), war eine Doppelfleckbildung bei Leucin zu bemerken, d.h. knapp über diesem, bzw. überlappend zeigte sich noch ein Fleck. Ein kleiner Teil von Leucin wird also von restlicher TCE noch verschleppt, aber nur mehr ein ganz kurzes Stück.

Bei den Serumkonzentraten (und anderen biologischen Substraten) war der Erfolg wieder geringer. In diesem Fall trat der TCE-Störeffekt noch auf, allerdings war auch hier nur mehr Leucin in erster Linie davon betroffen, dafür waren schon beträchtliche Teile der weitwandernden Aminosäuren (auch Leucin) an ihren Plätzen und — im oberen Teil des Chromatogramms — war bereits eine gute Aufschlüsselung erreicht.

Verschiedentlich wurde auch eine Kombination von Säurebehandlung und Ätherchromatographie versucht, indem Platten, auf denen entweder die TCE-hältigen Substanzgemische mit 2 N HCl übertüpfelt wurden, oder die, wie oben geschildert, in 0.5 N HCl gestellt worden waren, darnach einer Chromatographie in wasser- bzw. essigsäuregesättigten Äther und dann der eigentlichen Chromatographie unterworfen wurden (natürlich jeweils unter Zwischentrocknung). Dadurch wurde etwa der wassergesättigte Äther einer alleinigen Anwendung des Essigsäuregesättigten gleichwertig, und bei Essigsäuregesättigten gelang es oftmals, den TCE-Effekt sogar bei Serumkonzentraten völlig zu beseitigen. Zumindest, wenn er bei diesen noch auftrat, dann nicht sehr ausgeprägt und oft nur in Form des Leucin-Doppelflecks. Ein nicht unerheblicher Nachteil des geschilderten Verfahrens liegt in der — wie schon erwähnt — durch die HCl-Behandlung oftmals bewirkten Verzerrung bzw. Stauchung einiger Aminosäurezonen.

Um eine noch weitergehende Entfernung der TCE zu erzielen, müsste man mit einem noch stärker sauren Äther arbeiten. Eine Erhöhung der Essigsäurekonzentration auf 25 % brachte nicht den gewünschten Erfolg und daher versuchten wir die Anwendung von Ameisensäure, die ja doch eine um etwa eine Zehnerpotenz grössere Dissoziationskonstante als Essigsäure aufweist.

Die vorbehandelnde Chromatographie fand also in Diäthyläther statt, der mit 10 %iger Ameisensäure gesättigt war. Dieses Verfahren führte praktisch zum vollen Erfolg. Weder in den Aminosäuretestgemischen, noch in den Serumkonzentraten zeigt sich mehr ein nennenswerter TCE-Störeffekt, höchstens die Leucinflecken im Serum bekommen eine etwas ovale Form und in seltenen Fällen — hiervon scheint das Fließmittel "P" eher als die anderen betroffen zu sein — zeigen sich ganz schwache Ansätze zu einer Doppelfleckbildung.

Schliesslich wurde versucht, ob die geschilderte Methode auch in der Lage ist, die zu erwartenden, ja wesentlich beträchtlicheren Störungen auszuschalten, wenn man ein TCE-entwässertes Serum verwendet, bei dem überhaupt kein Versuch gemacht wurde, die überschüssige TCE durch Ausäthern zu beseitigen. In diesem Fall — es wurde direkt das Zentrifugat nach der TCE-Fällung, ohne einzudampfen (60  $\mu$ l, d.h. 20  $\mu$ l Nativserum) aufgetragen — ergab sich bei normaler (ohne Äthervorbehandlung) Chromatographie in den meisten der butanolhaltigen Fließmitteln

(siehe z.B. Fig. 2a) ein völlig anderes Bild. In der Höhe, an der Stelle wo sonst die von der TCE verschleppten Aminosäuren zu liegen kommen, ist hier nichts zu sehen, dagegen erscheint etwa in der Zone der normalen Leucin- bzw. Phenylalaninlage ein grosser diffuser Fleck und überhaupt keinerlei Auftrennung. Da die Aminosäuretestgemische, auch wenn ihnen gleich viel (6.7%) oder sogar mehr (10%) TCE zugesetzt war, den Störeffekt in durchaus gewohnter Weise zeigten, ist wohl anzunehmen, dass im Falle des Serums wahrscheinlich die jetzt ja nicht entfernten Lipide, bzw. Lipoproteide diese merkwürdige Erscheinung mitverursachen.

Eine vorherige Entwicklung in Ameisensäuregesättigtem Äther vermag aber auch in diesem Falle ein weitgehend normales Chromatogramm zu liefern. Damit ergibt sich die Möglichkeit, die Aufarbeitung des Serums wesentlich zu verkürzen, indem das mehrfache Ausäthern und das Eindampfen entfallen könnte.

#### DISKUSSION

Über die Ursache dieses Mitreisens der schnellwandernden Aminosäuren durch die TCE kann noch nichts Eindeutiges ausgesagt werden. Der Gedanke, es könnte ein N-Trichloracetylderivat entstanden sein, dem dieser obere Fleck zukommt, war schon von ROBINSON UND SHEPHERD<sup>5</sup> widerlegt worden, indem sie N-Trichloracetylhistamin darstellten und das chromatographische Verhalten dieser Verbindung mit dem einer TCE-hältigen Histaminlösung verglichen. Auch könnte ja nicht nach Anwendung eines Ionenaustausches der Effekt ausbleiben, es sei denn man nimmt die Bildung des Acylderivates erst während der chromatographischen Entwicklung an. Die Autoren denken eher an eine Bildung von Komplexen, wobei die chromatographierten Verbindungen als Elektronendonatoren, die TCE als Elektronenacceptor fungieren. Die Basizität einer Verbindung dürfte dabei nur von geringem Einfluss sein — so verhielten sich bei unseren Versuchen Histidin und Histamin ganz ähnlich — ausschlaggebend ist vielmehr die Wanderungstrecke auf dem Chromatogramm. WEST und Mitarbeiter<sup>3,4</sup> fanden eine Mittlerrolle von basischen Aminosäuren bei Zustandekommen bzw. zunehmender Intensität des TCE-Effekts bei den von ihnen untersuchten Aminen. Sie nahmen auch eine Teilnahme der basischen Aminosäuren an den Amin-TCE-Komplexen an. Darauf, dass evtl. noch andere Verbindungen — seien es nun basische Aminosäuren oder irgendwelche sonstigen Substanzen — an der Bildung von losen Komplexen zwischen TCE und den weitwandernden Aminosäuren teilnehmen könnten, weist die Tatsache hin, dass sich der TCE-Störeffekt bei Serumkonzentraten stets wesentlich schwieriger beseitigen lässt, als bei den Test-Aminosäuregemischen.

Der Dissoziationsgrad der TCE — wie jeder nicht zu starken Säure — lässt sich durch Zusatz einer anderen Säure zurückdrängen, wodurch sich ja die Aufnahmefähigkeit des Äthers für diese Verbindung erhöht. Wenn auch Essigsäure und selbst noch Ameisensäure wesentlich schwächere Säuren als TCE sind, so bedeutet die Anwendung des säuregesättigten Äthers als Vorentwickler doch einen so grossen Überschuss, dass ein gewisser Erfolg durchaus zu erwarten ist. Und im Falle der Ameisensäure ist diese Wirkung sogar ausreichend, die TCE soweit zu entfernen, dass auch die weniger labilen Komplexverbindungen zerlegt werden können, die — sofern obige Annahme berechtigt ist — unter Mitwirkung irgendwelcher anderer Substanzen aus Serum oder anderen biologischen Substraten zustande kamen.

Die Anwendung der geschilderten Vorentwicklung mit Ameisensäuregesättigtem Äther kann also praktisch alle durch das Enteiweissungsmittel bewirkten Störungen beseitigen und macht die TCE-Deproteinisierung mit anderen, z.B. der Alkoholdeproteinisierung gleichwertig. Freilich, die durch die Gegenwart von Elektrolyten, Harnstoff, restlichen Lipoproteiden usw. verursachten Nachteile bleiben — ebenso wie bei den anderen Enteiweissungen — bestehen. Dagegen hilft nur z.B. die Anwendung von Ionenaustauschern, die ja auch die zurückgebliebene TCE vollständig zu entfernen vermag.

Nimmt man jedoch die Elektrolyt- und Lipoproteidstörungen in Kauf, so kann man mit vorliegender Methode bei Verzicht auf Ausätherung und Eindampfen bequem und rasch zu einer angenäherten Übersicht über die Aminosäure- und Peptidzusammensetzung von eiweisshaltigen Proben gelangen.

#### DANK

Die Fruchtwasserkonzentrate wurden liebenswürdigerweise zur Verfügung gestellt von Hr. Dr. P. WEISS (Universitäts-Frauenklinik Graz), wofür ihm auch an dieser Stelle, gedankt sei.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Bei der Dünnschichtchromatographie auf Celluloseplatten zeigen in Gegenwart von Trichloressigsäure vor allem die weitwandernden Aminosäuren in einigen der untersuchten Fließmitteln ein abweichendes Verhalten. Sie erscheinen nicht oder nur zum geringen Teil an den ihnen zukommenden Plätzen, sondern werden zum Grossteil in ein Gebiet hinaufgezogen, in dem sonst keine (herkömmlichen) Aminosäuren zu finden sind. Diesen Effekt wiesen mehrere saure, Butanol und Essigsäure enthaltende, ein neutrales mit *tert.*-Butanol und Aceton, nicht aber alkalische Fließmittel auf. Gegenwart von HCl schwächt diese durch Trichloressigsäure bewirkte Störung ab.

Es werden Versuche beschrieben, durch eine (zweimalige) chromatographische Vorentwicklung in Diäthyläther, gesättigt mit Wasser, mit 10%iger Essigsäure bzw. mit 10%iger Ameisensäure, die Trichloressigsäure aus den aufgetragenen Lösungen zu entfernen, sodass dann die anschliessende normale Chromatographie das gewohnte Bild ergibt. Die beste Wirkung zeigt Ameisensäuregesättigter Äther: die geschilderte Störung durch Trichloressigsäure wird praktisch vollkommen beseitigt.

Trichloressigsäureenteiweiste Serumproben können solcherart rasch dünn-schichtchromatographisch untersucht werden ohne die Notwendigkeit einer zeit-raubenden Entfernung des überschüssigen Deproteinisierungsmittels durch Ionenaustauscher oder elektrolytische Entsalzung.

#### LITERATUR

- 1 R. CLOTTEN UND A. CLOTTEN, *Hochspannungselektrophorese*, G. Thieme, Stuttgart, 1962.
- 2 D. M. SHEPHERD UND G. B. WEST, *Nature*, 169 (1952) 797.
- 3 G. B. WEST UND J. F. RILEY, *Nature* 174 (1954) 882.
- 4 G. B. WEST, *J. Pharm. Pharmacol.*, 11 (1959) 595.
- 5 B. ROBINSON UND D. M. SHEPHERD, *J. Pharm. Pharmacol.*, 13 (1961) 374.
- 6 A. H. BECKETT, M. A. BEAVEN UND A. E. ROBINSON, *Nature*, 186 (1960) 775.

- 7 A. H. BECKETT, M. A. BEAVEN UND A. E. ROBINSON, *J. Pharm. Pharmacol.*, 12, Suppl. (1960) 203T.
- 8 A. H. BECKETT UND N. H. CHOULIS, *J. Pharm. Pharmacol.*, 15, Suppl. (1963) 236 T.
- 9 G. PATAKI, *Dünnschichtchromatographic in der Aminosäure- und Peptid-Chemie*, De Gruyter und Co., Berlin, 1966.
- 10 H. KRAUT UND H. ZIMMERMANN-TELSCHOW, *Nutr. Dieta*, 4 (1962) 22.
- 11 S. M. PARTRIDGE, *Biochem. J.*, 42 (1948) 238.
- 12 W. J. CULLEY, *Clin. Chem.*, 15 (1969) 902.
- 13 Zitiert nach: *Merckotest DC: Aminosäuren im Plasma*, Art. 3345 der Fa. Merck A.G., Darmstadt
- 14 H. J. BREMER, W. NÜTZENADEL UND H. BICKEL, *Monatsschr. Kinderheilkd.*, 117 (1969) 32.
- 15 Zitiert nach: *Merckotest DC: Phenylalanin und Leucine*, Art. 3357 der Fa. Merck A.G., Darmstadt.
- 16 F. KRAFFCZYK, R. HELGER UND H. LANG, *Clin. Chem.*, 16 (1970) 662.
- 17 H. STÜBCHEN-KIRCHNER, *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 349 (1968) 1049.

*J. Chromatogr.*, 64 (1972) 103-111