

Trennung ^{14}C -markierter Aminosäuren durch Dünnschichtchromatographie im Subnanogrammbereich

Von

E. Cremer* und E. Seidl

Aus dem Institut für Physikalische Chemie der Universität Innsbruck

Mit 1 Abbildung

(Eingegangen am 29. Juni 1970)

Die Dünnschichtchromatographie (*TFC*) ist eine mikroanalytische Methode¹⁻⁴, die sich besonders für die Anwendung im Subnanogrammbereich eignet. Als mobile Phase wird hier ein auf einer mikrorauen Oberfläche spreitender Flüssigkeitsfilm verwendet, der etwa 10mal dünner ist als die Fließmittelschicht bei der Dünnschichtchromatographie (*TLC*). Unter den für die *TFC* erprobten Adsorbentien hat sich Indiumoxid besonders bewährt.

Die Aminosäuren werfen wegen ihrer besonderen Eigenschaften in der *TFC* Probleme auf. Ihr stark polarer Charakter verlangt eine nicht sehr aktive stationäre Phase. In der *TLC* erreicht man dies durch Trocknen der Kieselschicht an der Luft statt bei 110° im Trockenschrank⁵. Die für die *TFC* verwendeten Oxidschichten weisen gegenüber den *TLC*-Schichten eine höhere Aktivität auf. Tempern bei niedrigerer Temperatur (150 statt 500°) vermindert auch hier die Aktivität, führt aber zu verwaschenen, diffusen Flecken im Chromatogramm.

Als mobile Phase kommen nur wäßrige und stark polare Fließmittel in Frage. Hoher Wassergehalt im Fließmittel erhöht aber in der *TFC* die Laufzeit sehr stark.

Die Versuche zur Trennung von Aminosäuren mit *TFC* wurden trotz dieser ungünstigen Voraussetzungen unternommen, da den Aminosäuren

* Herrn Prof. Dr. E. Broda mit den besten Wünschen zum 60. Geburtstag gewidmet.

¹ E. Cremer und H. Nau, Naturwissensch. **12**, 651 (1968).

² R. Kaiser, Tagungsbericht Chromatographia **1**, 504 (1969).

³ E. Cremer, Th. Kraus und H. Nau, Z. Anal. Chem. **245**, 37 (1969).

⁴ E. Cremer, F. Deutscher, P. Füll und H. Nau, J. Chromatogr. **48**, 132 (1970).

⁵ E. Stahl, Dünnschichtchromatographie, Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer-Verlag, Kapitel V (1967).

wegen ihrer Rolle als biologisch wichtige Substanzen große Bedeutung zukommt und oft auch die Notwendigkeit auftritt, sehr kleine Substanzmengen nachzuweisen.

*Nau*⁶ versuchte, Aminosäuren mit *TFC* zu trennen und mit Ninhydrin nachzuweisen. Die Nachweisgrenze dieser Farbreaktion liegt bei 10^{-7} bis 10^{-8} g. Die mit der Dünnschicht-Chromatographie noch erkennbaren Substanzmengen liegen aber um einige Zehnerpotenzen niedriger.

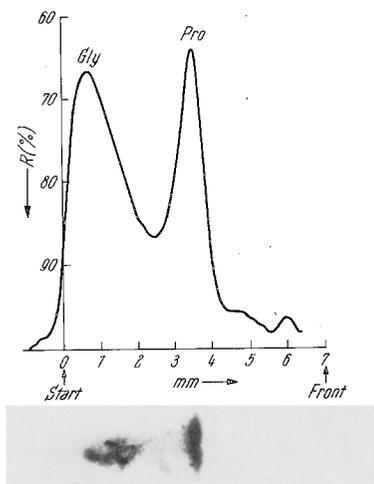


Abb. 1. Unten: Autoradiogramm einer dünnfilmchromatographischen Trennung von ^{14}C -markiertem Glycin und Prolin
Oben: Schwärzungskurven, aufgenommen mit dem Zeiss-Chromatogramm-Spektrophotometer durch Remission bei 550 nm

Da sich die Autoradiographie bei der Dünnschichtchromatographie kleinster Mengen anorganischer Ionen sehr bewährt hat⁷, wurde versucht, ^{14}C -markierte Aminosäuren zu trennen und autoradiographisch nachzuweisen.

Für die Versuche wurden verschiedene von *Stahl*⁵ angegebene Fließmittel (und deren Variationen) verwendet. Mit neutralen und sauren Fließmitteln konnte keine eindeutige Trennung erzielt werden. Mit einem alkalischen Fließmittel gelang jedoch die Trennung von Glycin und Prolin. Die Ergebnisse sind in Abb. 1 wiedergegeben.

Experimenteller Teil

Stationäre Phase: Indiumoxidplatte „Cavadura“ der Fa. Balzers AG, Balzers, Liechtenstein; Schichtdicke etwa $3\ \mu$.

⁶ *H. Nau*, Dissertat. Univ. Innsbruck (1969).

⁷ *E. Cremer* und *E. Seidl*, *Chromatographia* **3**, 17 (1970).

Probe: Wäßr. Lösungen von: Glycin- ^{14}C uniform markiert, 50 mCi/mMol, $3 \cdot 10^{-6}$ g/ml; Prolin- ^{14}C uniform markiert, 125 mCi/mMol, $2 \cdot 10^{-6}$ g/ml.

Probenmenge: Die Probe wurde mit einer Mikroliterspritze aufgegeben, und zwar 0,02 μl . Die Probenmenge betrug daher: Glycin: $3 \cdot 10^{-11}$ g; Prolin: $2 \cdot 10^{-11}$ g.

Fließmittel: Methanol + CHCl_3 + $18n\text{-NH}_3$ = 40 + 30 + 10. Trennzeit: 6 Min.

Auswertung: Autoradiographie: Film: Kodak Royal Blue; Belichtungszeit: 40 Stdn.