

## STUDIORUM PROGRESSUS

Dünnschicht-Chromatographie  
von Aminosäuren

Von M. BRENNER und A. NIEDERWIESER\*

ISMAÏLOV und SHRAÏBER<sup>1</sup> haben wahrscheinlich als erste Stoffgemische auf dünnen Schichten von Adsorptionsmitteln chromatographiert. Sie arbeiteten mit losen Pulvern (CaO, MgO, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> usw.) auf Objektträgern und führten das jeweils verwendete Lösungsmittel tropfenweise zu. WILLIAMS<sup>2</sup> schützte die sehr empfindliche Schicht mit einer darüber gelegten zweiten Glasplatte und führte die mobile Phase durch ein Loch in der oberen Platte zu. MEINHARD und HALL<sup>3</sup> verwendeten als Adsorptionsmittel ein Gemisch von Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> und Celite und führten erstmals ein Bindemittel (Stärke) ein. Als Grundlage dienten Objektträger, auf welche das Adsorptionsgemisch als nasser Brei mit einem Spatel gestrichen wurde («Surface Chromatography»). KIRCHNER, MILLER und KELLER<sup>4-6</sup> gebrauchten statt dessen schmale Glasstreifen als Träger («Chromatostrips», 0,5 × 5,25 inches), die in Reagenzgläser gestellt wurden, welche die mobile Phase enthielten. Sie untersuchten zahlreiche Stoffe auf ihre Verwendbarkeit als Adsorptionsmittel für die Trennung von Terpenen, zum Beispiel MgO, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> mit SiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>, CaO, Stärke und MgCO<sub>3</sub>, fanden Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> und SiO<sub>2</sub> am günstigsten und kamen davon ab, Celite beizumischen. Zum Sichtbarmachen der Flecken benutzten sie unter anderem H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-HNO<sub>3</sub> und den Brom-Fluoreszein-Test. Es ist das Verdienst von STAHL<sup>7-11</sup>, der Methode die verdiente Beachtung verschafft zu haben. Er führte ein standardisiertes Adsorptionsmittel ein (Kieselgel G «Merck», mit etwas Gips als Bindemittel) und schuf ein brauchbares Streichgerät, mit dem gleichmässig dicke Adsorptionsschichten bereitete werden können. Damit war die Hauptschwierigkeit, die einer Verbreitung der Methode im Wege gestanden hatte, beseitigt.

Die ausserordentlichen Erfolge, die bei der Trennung lipophiler Stoffgemische mit der Dünnschicht-Chromatographie erzielt wurden<sup>5,12-17</sup>, haben uns veranlasst, diese Methode auch an so hydrophilen Stoffen wie den Aminosäuren zu erproben. Ein solcher Versuch lag um so näher, als sich in der älteren Literatur eine ganze Anzahl von Angaben über säulenchromatographische Aminosäuren-Trennungen an anorganischen Adsorbentien finden<sup>18</sup>. Diese Trennungsverfahren gerieten in Vergessenheit, weil sie infolge eines unverhältnismässig grossen Bedarfs an Adsorptionsmitteln umständlich waren und andere Methoden (Ionenaustauscher, Papierchromatographie) bequemer erschienen. Tatsächlich ist auch bei der Papierchromatographie das Verhältnis Adsorbens zu Adsorbat sehr gross: es beträgt zum Beispiel bei zweidimensionaler Chromatographie von 450 µg Aminosäuren-Mischung auf einem Bogen von 32 × 32 cm Whatman-Papier Nr. 1 (Gewicht 9 g) 20000:1! Dies wirkt nur deshalb nicht störend, weil die der Papierchromatographie eigene Technik kurze Laufzeiten gewährleistet und die Elution entweder auf einen kleinen Teil des Adsorbens beschränkt oder überhaupt überflüssig.

Genau dasselbe gilt nun für die Platten-Chromatographie. Beim Übergang von der Adsorptionssäule zur Adsorptionsschicht durfte man deshalb erwarten, dass die Nachteile der anorganischen Adsorbentien verschwinden würden. In der Tat berichten MUTSCHLER und ROCHELMAYER<sup>19</sup> über eine sehr erfolgreiche Trennung von 14 Aminosäuren an gepuffertem Kieselgel in 70% EtOH (1. Dimension) und EtOH/NH<sub>3</sub> (2. Dimension). Wir haben die Angaben dieser Autoren nachgearbeitet und können

ihre Resultate unter gewissen Vorbehalten bestätigen. Zunächst zeigte es sich nämlich, dass noch mehr als bei der Papierchromatographie eine gewisse Unsicherheit in bezug auf die Reproduzierbarkeit von R<sub>f</sub>-Werten besteht. Unter unseren Arbeitsbedingungen zum Beispiel laufen sämtliche Aminosäuren langsamer als bei MUTSCHLER und ROCHELMAYER. Dies kann mit dem Trocknungsgrad der Platte, der schwer zu definieren ist, und mit dem Sättigungsgrad der Gasatmosphäre in der Trennkammer zusammenhängen. Im übrigen ist die nach MUTSCHLER und ROCHELMAYER erforderliche Pufferung überflüssig und unter Umständen sogar nachteilig.

Wir beschreiben im folgenden unsere Arbeitsweise und fügen einige Resultate bei, welche die Leistungsfähigkeit der Methode illustrieren und die Angaben von MUTSCHLER und ROCHELMAYER ergänzen.

1. *Lösungsmittelsysteme.* Die bei papierchromatographischen Aminosäuren-Trennungen gebräuchlichen einphasigen Systeme, welche durch einfaches Mischen der Komponenten im angegebenen *Gewichtsverhältnis* bereitet werden, eignen sich auch hier. Wir haben im besonderen gute Erfahrungen gemacht mit:

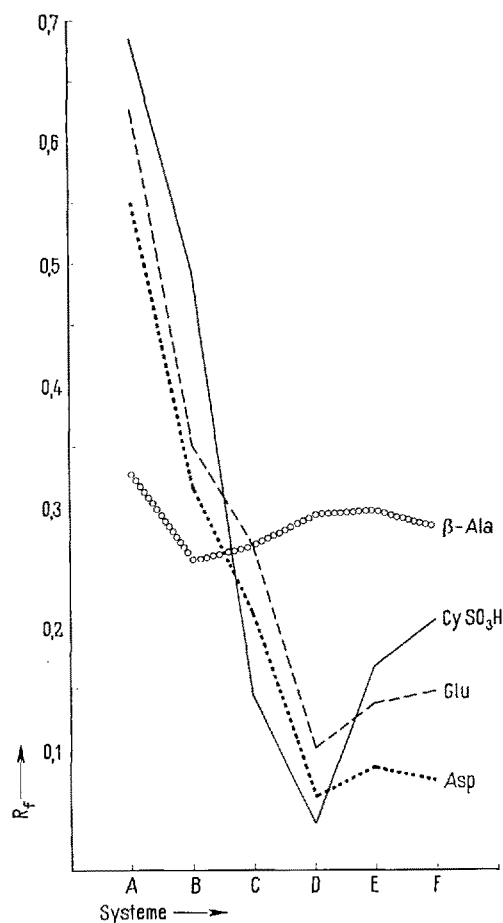
Alkohol 96%-Wasser (63:37), *n*-Propanol-Wasser (64:36), *n*-Butanol-Eisessig-Wasser (60:20:20), Phenol-Wasser (75:25)<sup>20</sup>, *n*-Propanol-Ammoniak 34% (67:33), Alkohol 96%-Ammoniak 34% (77:23).

In Systemen mit viel Methanol, Äthanol oder Azeton erzielt man oft gute Trenneffekte, erhält aber immer relativ verschwommene Flecken. Wie man aus den sehr aufschlussreichen Abbildungen 1a), b), c) ersieht, ist der allgemeine Trenneffekt von *n*-BuOH-AcOH-H<sub>2</sub>O und Phenol-Wasser weitaus am besten. Dementsprechend ist für zweidimensionale Chromatogramme die Kombination von *n*-BuOH-AcOH-H<sub>2</sub>O mit Phenol-Wasser besonders empfehlenswert.

2. *Herstellung der Platten*<sup>21</sup>. Das Kieselgel G<sup>22</sup> (25 g) wird mit Wasser (50 ml) in einem verschlossenen Erlenmeyer-Kolben (200 ml) 30 sec lang sehr kräftig geschüttelt, die Suspension sofort in das bereitgestellte Streichgerät gegossen und dieses vorsichtig über die entfetteten Glasplatten geführt. Es empfiehlt sich nicht, die entstandene

\* Organisch-chemische Anstalt der Universität Basel, 9. Juni 1960.

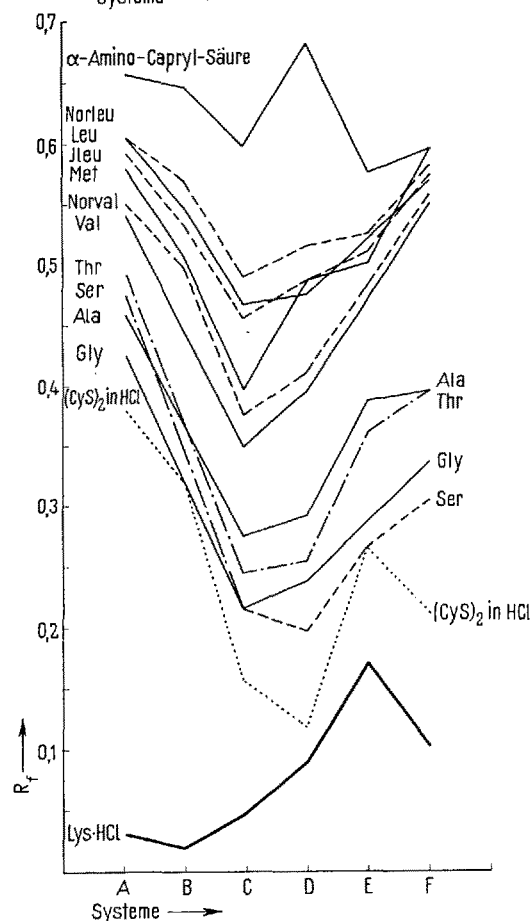
<sup>1</sup> N. A. ISMAÏLOV und M. S. SHRAÏBER, *Farmatsija* 1938, Nr. 3, 1.<sup>2</sup> T. I. WILLIAMS *Introduction to Chromatography* (Blackie and Son, Glasgow 1947), p. 36.<sup>3</sup> J. E. MEINHARD und N. F. HALL, *Anal. Chem.* 21, 185 (1948).<sup>4</sup> J. G. KIRCHNER, J. M. MILLER und G. J. KELLER, *Anal. Chem.* 23, 420 (1953).<sup>5</sup> J. M. MILLER und J. G. KIRCHNER, *Anal. Chem.* 25, 1107 (1953).<sup>6</sup> J. M. MILLER und J. G. KIRCHNER, *Anal. Chem.* 26, 2002 (1954).<sup>7</sup> E. STAHL, *Pharmazie* 11, 633 (1956).<sup>8</sup> E. STAHL, *Chemikerztg.* 82, 323 (1958).<sup>9</sup> E. STAHL, *Parfümerie und Kosmetik* 39, 564 (1958).<sup>10</sup> E. STAHL, *Arch. Pharm., Berlin* 292/64, 411 (1959).<sup>11</sup> E. STAHL, *Pharm. Rdsch.* 1959, Heft 2, 1.<sup>12</sup> R. H. REITSEMA, *Anal. Chem.* 26, 960 (1954).<sup>13</sup> L. II. BRYANT, *Nature* 175, 556 (1955).<sup>14</sup> R. A. BERNHARD, *Nature* 182, 1171 (1958).<sup>15</sup> H. ROCHELMAYER, *Pharm. Ztg.* 103, 1269 (1958).<sup>16</sup> M. BARBIER, H. JÄGER, H. TOBIAS und E. WYSS, *Helv. chim. Acta* 42, 2440 (1959).<sup>17</sup> A. SEHER, *Fette, Seifen, Anstrichmittel* 61, 345 (1959).<sup>18</sup> Vgl. die Zusammenstellung bei A. J. P. MARTIN und R. L. M. SYNGE, *Adv. Prot. Chem.* 2, 1 (1945).<sup>19</sup> E. MUTSCHLER und H. ROCHELMAYER, *Arch. Pharm., Berlin* 292/64, 449 (1959).<sup>20</sup> Zu 100 g Mischung gibt man etwa 20 mg NaCN.<sup>21</sup> Glasplatten und Geräte stammen von der Firma C. Desaga, Heidelberg.<sup>22</sup> Kieselgel G «Merck» für Dünnschichtchromatographie nach STAHL.



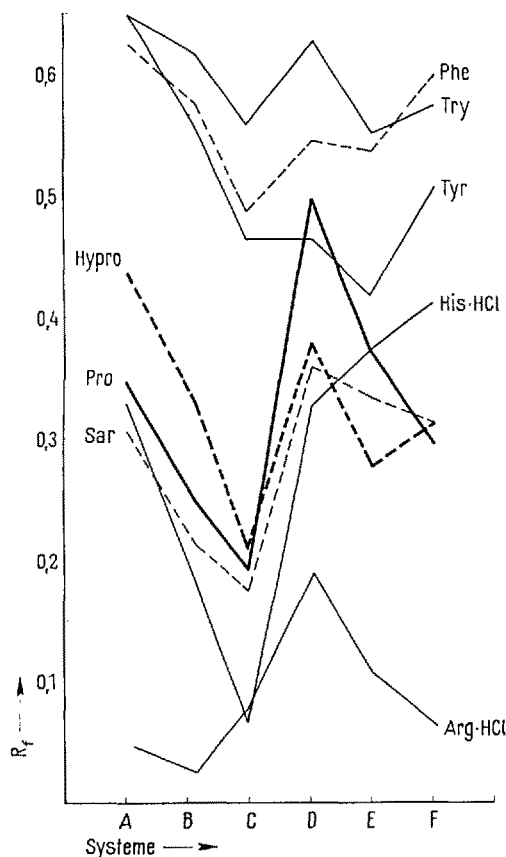
a

Schicht mit dem Föhn vorzutrocknen, da aus Unachtsamkeit durch den kräftigen Luftstrom leicht Unebenheiten in der anfangs noch leicht beweglichen Schicht entstehen können. Ratsam ist es, die Platten mindestens solange unberührt liegen zu lassen, bis ihre Oberfläche völlig matt geworden ist (etwa 10 min). Am besten lässt man sie einfach über Nacht an der Luft trocknen, wobei eine besonders fest haftende Schicht entsteht. Man kann sie auch etwa 15 min lang bei 110°C trocknen, muss sie dann aber nach dem Abkühlen noch mindestens  $\frac{1}{2}$  h frei an der Luft liegen lassen. Vor Gebrauch wird die Schicht an den Rändern zur Sicherstellung einer scharfen Begrenzung jeweils etwa 2 mm breit mit Daumen und Zeigefinger abgestreift.

3. *Auftragen der Substanz-Proben.* Die Startpunkte liegen 1,5 cm vom Plattenrand entfernt und werden durch sehr kleine Einstiche mit einem spitzen Bleistift markiert. Bei kleiner aufgetragener Menge sind gegenseitige Abstände von nur 0,8 cm zulässig. Auf einer 20 × 20-cm-Platte finden also in solchen Fällen über 20 Proben Platz. Pro Aminosäure sollen 0,1–10 µg, besser aber 1–5 µg aufgetragen werden, und zwar auf möglichst kleiner Fläche. Es darf höchstens 1 mm<sup>3</sup> Flüssigkeit auf einmal aufgetragen werden, besser nur  $\frac{1}{3}$  mm<sup>3</sup>. Man benötigt nach einiger Übung keine geeichten Spezialpipetten mehr, sondern kann selbst gezogene Kapillaren verwenden und das aufgetragene Volumen an der benetzten Fläche abschätzen.



b



c

Abb. 1. a), b), c) Graphische Darstellung der Trenneffekte einiger Lösungsmittelsysteme. A = EtOH 96%–H<sub>2</sub>O (63:37). B = *n*-PrOH–H<sub>2</sub>O (64:36). C = *n*-BuOH–AcOH–H<sub>2</sub>O (60:20:20). D = Phenol–H<sub>2</sub>O (75:25). E = *n*-PrOH–NH<sub>3</sub> 34% (67:33). F = EtOH 96%–NH<sub>3</sub> 34% (77:23).

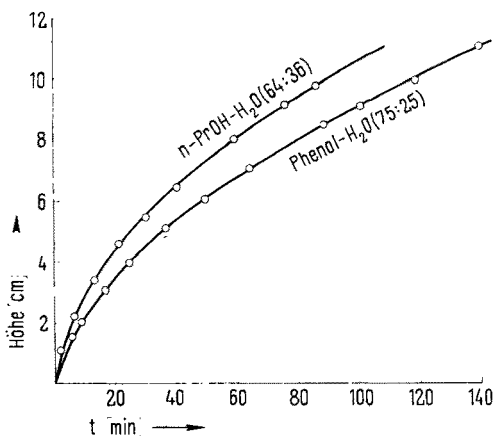


Abb. 2. Laufstrecke als Funktion der Versuchsdauer bei grosser und bei kleiner Viskosität der mobilen Phase.

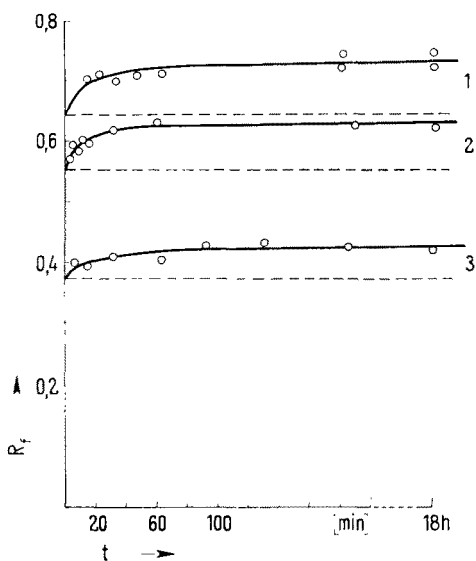


Abb. 3. Zeitliche Änderung von  $R_f$ -Werten bei erzwungenem Stillstand der Lösungsmittelfront.

Laufstrecke 10 cm, Stillstand der Front zur Zeit  $t = 0$ . 1:  $\alpha$ -Aminocaprylsäure in  $n$ -PrOH- $H_2O$  (64:36). 2: Try in  $n$ -BuOH-AcOH- $H_2O$  (60:20:20). 3: Hypro in Phenol- $H_2O$  (75:25).

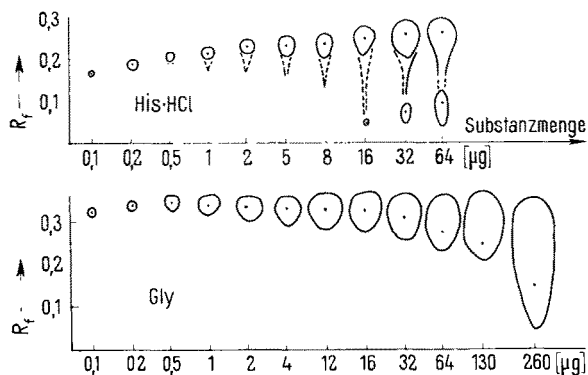


Abb. 4. Abhängigkeit der  $R_f$ -Werte von der Substanzmenge bei His-HCl und Gly.

Die Orte höchster Substanzkonzentration sind durch Punkte markiert. Die angegebenen Mengen (in  $\mu g$ ) wurden in je 1 mm<sup>3</sup> Lösung aufgetragen. System:  $n$ -PrOH- $H_2O$  (64:36).

Ist die Konzentration der verwendeten Lösung zu gering, so muss man natürlich wie bei der Papierchromatographie den beim ersten Tüpfeln entstandenen Fleck trocknen lassen, bevor man nochmals auf die gleiche Stelle aufträgt. Bei den geringen Flüssigkeitsmengen geht das so rasch, dass man keinen Föhn zu Hilfe nehmen muss.

4. *Trennung.* a) Als *Laufstrecke* genügen gewöhnlich 10 cm. Mit längeren Strecken lässt sich der Trenneffekt grundsätzlich verbessern. Dies lohnt sich aber kaum, denn die Versuchsdauer wird grösser (Abb. 2), der Diffusions-effekt deutlicher und die Empfindlichkeit kleiner. Eine der gewählten Laufstrecke entsprechende Grenzlinie kann im voraus mit dem Bleistift quer durch die Platte gezogen werden. Der dabei entstehende Staub muss weggeblasen werden. Obwohl die mobile Phase nur bis zu dieser Grenzlinie steigen kann, sollen die Platten unmittelbar nach Erreichen der Grenzlinie aus der Trennkammer herausgenommen werden<sup>23</sup>. Nur so erhält man sowohl reproduzierbare  $R_f$ -Werte (Schwankung  $\pm 0,05$ ) als auch minimalen Fleckendurchmesser. Wie man mit blossen Auge sieht, ist in der Kieselgel-Schicht die Konzentration der Flüssigkeit in der Nähe der Front sehr viel kleiner als weiter unten<sup>24</sup>. Der Flüssigkeitsstrom von unten nach oben hört deshalb nicht sofort auf, wenn die mobile Phase die obere Schichtgrenze erreicht hat. Das heisst, dass auch nach dem Stillstand der Front die Substanzen noch eine Weile weiter wandern (Abb. 3), wodurch die  $R_f$ -Werte um etwa 10% zunehmen ( $R_f$ -Endwert  $\sim 1,1 \cdot R_f$ ). Die Schwankungsbreite beim  $R_f$ -Endwert ist kleiner als beim  $R_f$ -Wert. Trotzdem ziehen wir für praktische Belange den  $R_f$ -Wert vor, weil man ihn ohne Zeitverlust ermitteln kann und weil die Fleckengrösse während der Zeit, die bis zur Erreichung des Endwertes verstreicht (15–60 min je nach System), infolge der Diffusion merklich zunehmen kann. Chromatographiert man mehrere Platten gleichzeitig, so empfiehlt es sich, nur die vorderste, am besten sichtbare Platte mit der 10-cm-Grenzlinie zu versehen. Das Lösungsmittel läuft nämlich nicht überall gleich schnell, so dass es, weil die Trennkammer erst nach Beendigung des Versuchs geöffnet werden darf, unmöglich wird, jede Platte im richtigen Moment herauszunehmen. Man richtet deshalb die Versuchsdauer nach der Steiggeschwindigkeit auf der vordersten Platte und markiert die Front auf den anderen Platten unmittelbar nach Öffnen der Kammer.

b) Die  $R_f$ -Werte sind, wie Abbildung 4 zeigt, von der Konzentration abhängig. Die Änderungen sind aber bei mittleren Konzentrationen zu vernachlässigen. Die Fleckengrösse ist natürlich auch konzentrationsabhängig, und zwar findet man in einem mittleren Konzentrationsbereich die aus der Papierchromatographie<sup>25,26</sup> bekannte Proportionalität zwischen der Fleckenfläche und dem log der Substanzmenge (Abb. 5). Im übrigen können sich die  $R_f$ -Werte bei Anwesenheit von Fremdstoffen geringfügig ändern. So nehmen zum Beispiel die  $R_f$ -Werte der sauren Aminosäuren im System 70%  $n$ -PrOH zu, wenn sie in Mischung mit anderen Aminosäuren vorliegen. Bemerkenswert ist die Höhe der  $R_f$ -Werte von  $CySO_3H$ , Asp und Glu in neutralen Systemen (vgl. Abb. 1a).

Wie bei der Papierchromatographie sind jedoch die  $R_f$ -Wertverhältnisse ziemlich konstant. Es ist also bei einem Aminosäuren-Gemisch weniger der einzelne  $R_f$ -Wert als das Fleckenmuster für die Identifizierung massgebend.

<sup>23</sup> J. DEMOLE, J. Chromatogr. 1, 30 (1958).

<sup>24</sup> Vgl. dazu die rechnerischen Betrachtungen über die Flüssigkeitsverteilung auf Papierchromatogrammen bei J. C. GIDDINGS, G. H. STEWART und A. L. RUOFF, J. Chromatogr. 3, 239 (1960).

<sup>25</sup> R. B. FISHER und R. HOLMES, Biochem. J. 44, liv (1949).

<sup>26</sup> R. B. FISHER, D. S. PARSON und G. A. MORRISON, Nature 161, 764 (1948).

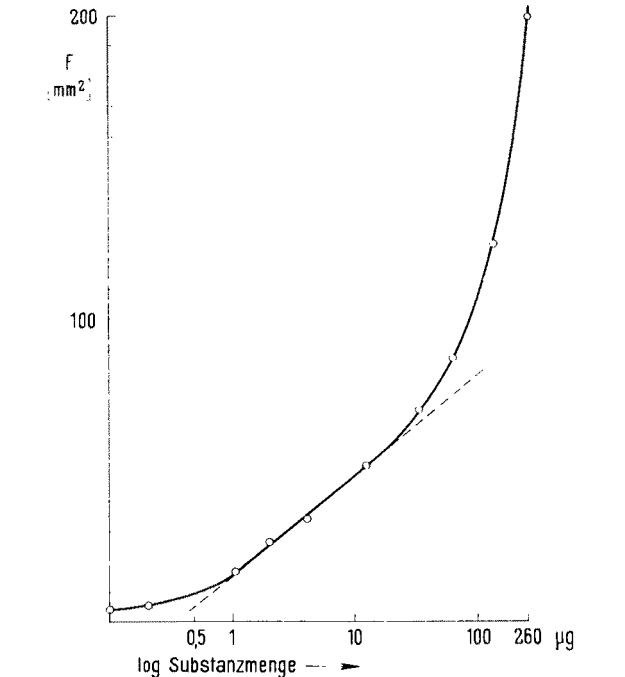


Abb. 5. Beziehung zwischen Substanzmenge und Fleckenfläche bei Glycin (vgl. Abb. 4).

Um die Reproduzierbarkeit der Muster zu prüfen, wurden zwei Aminosäuren-Mischungen A und B zunächst einzeln und dann gemeinsam zweidimensional chromatographiert. Kopiert man die beiden Chromatogramme von A und B aufeinander, so erhält man annähernd dasselbe Muster, wie wenn man A und B gemeinsam chromatographiert (Abb. 6).

Zur Orientierung geben wir nachstehend eine Zusammenstellung von  $R_f$ -Werten (Tab.). Angegeben ist das arithmetische Mittel aus jeweils mindestens drei Einzelbestimmungen, die auf Platten durchgeführt wurden, wie sie oben beschrieben sind. Verändert man vor dem Gebrauch die Qualität der Platten (Trocknen, Befeuchten, Lösungsmittel-Vorbehandlung<sup>27</sup>), so ergeben sich geringfügige  $R_f$ -Wertverschiebungen; dasselbe gilt natürlich für zweidimensionale Chromatogramme, wo das 1. Lösungsmittel das Verhalten der Platte gegenüber dem 2. Lösungsmittel beeinflussen kann. Da diese Änderungen geringfügig und von Fall zu Fall verschieden sind, lohnt es sich nicht, im einzelnen darauf einzugehen.

c) In die *Trennkammer* wird soviel mobile Phase gegeben, dass die Platten etwa 0,5 cm tief in die Flüssigkeit tauchen. Die Wände werden bis auf einen schmalen Spalt

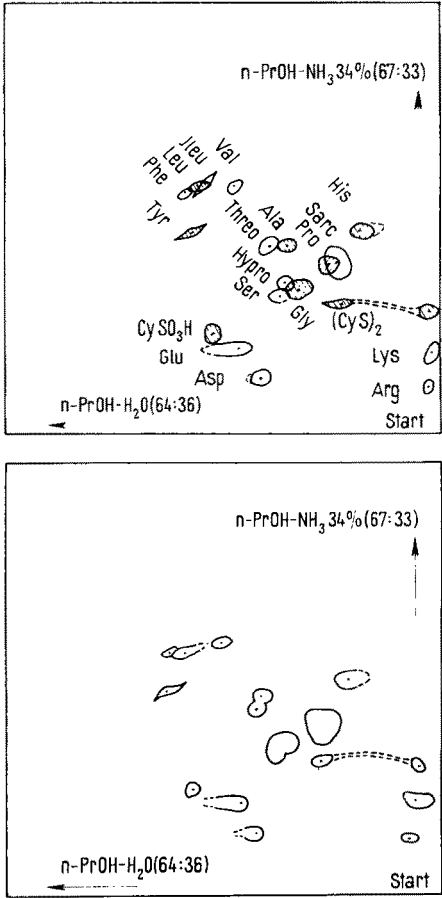


Abb. 6. Reproduzierbarkeit von Fleckenmustern.  
Oben. Chromatogramme A und B aufeinanderkopiert. A (schraffiert): zweidimensionales Chromatogramm von Leu, Tyr, Ala, Pro, Gly, CySO<sub>3</sub>H, His·HCl (CyS)<sub>2</sub>. B: zweidimensionales Chromatogramm von Phe, Ileu, Val, Thr, Hypo, Ser, Sar, Glu, Asp, Lys·HCl, Arg·HCl. Unten. Die Substanzen von A und B gemeinsam zweidimensional chromatographiert. Beladung oben und unten: je 1 µg pro Aminosäure.

$R_f$ -Werte<sup>a</sup> einiger Aminosäuren

	A	B	C	D	E	F
$\alpha$ -Aminocaprylsäure	66	65	60	69	58	60
Try . . . . .	65	62	56	63	55	58
Phe . . . . .	63	58	49	55	54	60
Norleu . . . . .	61	57	49	52	53	59
Leu . . . . .	61	55	47	48	53	58
Ileu . . . . .	60	53	46	49	52	58
Tyr . . . . .	65	57	47	47	42	51
Dioxyphenylalanin .	—	—	45	34	—	—
Met . . . . .	59	51	40	49	51	60
Norval . . . . .	56	50	38	42	49	57
Val. . . . .	55	45	35	40	48	56
Ala. . . . .	47	37	27	29	39	40
$\beta$ -Ala . . . . .	33	26	27	30	30	29
Thr . . . . .	50	37	25	26	37	40
Ser . . . . .	48	35	22	20	27	31
Gly . . . . .	43	32	22	24	29	34
Hypso . . . . .	44	34	20	38	28	31
Pro . . . . .	35	26	19	50	37	30
Sar . . . . .	31	22	17	37	34	31
CySO <sub>3</sub> H . . . . .	69	50	14	04	17	21
Glu . . . . .	63	35	27	10	14	15
Asp . . . . .	55	33	21	06	09	07
His · HCl . . . . .	33	20	06	32	38	42
Lys · HCl . . . . .	03	02	05	09	18	11
Arg · HCl . . . . .	04	02	08	19	10	06
(CyS) <sub>2</sub> <sup>b</sup> . . . . .	39	32	16	12	27	22

<sup>a</sup> Angegeben ist  $R_f \cdot 100$ . <sup>b</sup> Gelöst in 0,5 N HCl.  
A = EtOH 96%·H<sub>2</sub>O (63:37). B = n-PrOH·H<sub>2</sub>O (64:36).  
C = n-BuOH·AcOH·H<sub>2</sub>O (60:20:20). D = Phenol·H<sub>2</sub>O (75:25). E = n-PrOH·NH<sub>3</sub> 34% (67:33). F = EtOH 96%·NH<sub>3</sub> 34% (77:23). Angegeben sind *Gewichtsverhältnisse*.

<sup>27</sup> STAHL berichtet, dass Platten, die sich in der Trennkammer wie beim Chromatographieren mit Benzol vollgesogen haben, nach Verdunsten des Benzols bei der nachfolgenden Verwendung zur Chromatographie sich etwas anders verhalten als Platten, die nicht in der angegebenen Weise vorbehandelt wurden. STAHL führt dies auf unterschiedlichen Wassergehalt der Schichten zurück.

mit Filterpapier ausgeschlagen, welches ebenfalls in die mobile Phase taucht<sup>10</sup>. Es ist gut, einige Male kräftig zu schütteln und dann noch 10 min zu warten, worauf die Platten rasch hineingestellt werden, und zwar möglichst ohne Luftzug. Man kann in eine Trennkammer mehrere Platten hineinstellen, muss aber darauf achten, dass sie sich namentlich unten nicht zu nahe kommen, weil sonst zwischen den Platten infolge der Kapillarität mobile Phase hochsteigen kann. Ferner ist es bei kleinen Plattenabständen (0,5–1 cm) sehr wichtig, ein Stück Filterpapier mit der mobilen Phase zu tränken und so auf die Rückseite der Platte zu kleben, dass es unten in die Flüssigkeit taucht. Diese Anordnung garantiert einen korrekten Frontverlauf auf der benachbarten Platte (Sättigung der Gasphase). Zur gegenseitigen Fixierung der Platten verwenden wir einen Halter, den man sich leicht selber aus einem dünnen Glasstab herstellen kann (Abb. 7). Als Trennkammern für schmale Platten (zum Beispiel 5 × 20 cm) können Sterilisiergläser geeigneter Grösse (zum Beispiel 2 l) benutzt werden.

5. *Entwickeln der Chromatogramme.* Die Platten werden zunächst etwa 10 min bei 110°C getrocknet und dann verteilt mit dem von MOFFAT und LYTLE<sup>28</sup> modifizierten Ninhydrin-Reagens vorsichtig besprüht.

*Reagens.* Lösung I: 50 ml 0,2% Ninhydrin-Lösung in EtOH abs, 10 ml AcOH, 2 ml 2,4,6-Kollidin. Lösung II: 1% Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> · 3 H<sub>2</sub>O-Lösung in EtOH abs. Erst kurz vor Gebrauch wird Lösung I mit II im Verhältnis 50:3 gemischt.

Man hält die besprühte Platte über eine heisse Kochplatte, bis die Farbentwicklung eben einsetzt. Im durchscheinenden Licht erkennt man, wie sich auf der warmen Platte die Farbflecke allmählich vertiefen. Einige Aminosäuren kommen so fast punktförmig zum Vorschein und werden rasch durch Einstiche mit einem spitzen Bleistift markiert. Auf diese Art wird es oft möglich, in Flecken, die nachher zusammenfliessen, die einzelnen Komponenten zu erkennen. Die Aminosäuren unterscheiden sich auch in der Geschwindigkeit, mit welcher sie Farbstoffe bilden (zum Beispiel erscheint Sarcosin erst spät und gibt dann rasch einen relativ grossen Flecken). Trotz dieser günstigen Verhältnisse gibt es Mischungen (zum Beispiel Phe, Leu, Ileu, Ser, Hypro, Gly), bei denen sich nicht alle Komponenten mit Sicherheit unterscheiden lassen.

6. *Zusammenstellung der Ergebnisse.* In Abbildungen und Tabellen werden dargestellt:

Tabelle:  $R_f$ -Werte.

Abb. 1a), b), c): Graphische Darstellung der Trenneffekte einiger gebräuchlicher Lösungsmittel-Systeme.

Abb. 2: Laufstrecke als Funktion der Versuchsdauer bei grosser und bei kleiner Viskosität der mobilen Phase.

Abb. 3: Zeitliche Änderung von  $R_f$ -Werten bei erzwungenem Stillstand der Lösungsmittelfront (Laufstrecke 10 cm, Stillstand der Front zur Zeit  $t = 0$ ).

Abb. 4: Abhängigkeit der  $R_f$ -Werte von der Substanzmenge bei His·HCl und Gly ( $n$ -PrOH-H<sub>2</sub>O).

Abb. 5: Beziehung zwischen Substanzmenge und Fleckenfläche bei Glycin ( $n$ -PrOH-H<sub>2</sub>O).

Abb. 6: Reproduzierbarkeit von Fleckenmustern.

Abb. 7: Trennkammer mit eingestellten Platten und selbstverfertigtem Plattenhalter (Glasstab).

Abb. 8: Vergleich von Papierchromatographie mit Dünnschicht-Chromatographie (zweidimensionale Chromatogramme in Originalgrösse × 0,57).

7. *Schlussfolgerung.* Bei der Trennung von Aminosäurengemischen ist die Dünnschicht-Chromatographie der Papier-Chromatographie ebenbürtig oder sogar überlegen. Ihr Hauptvorteil gegenüber der Papier-Chromatographie beruht auf einer Verminderung der Diffusions-Erscheinungen. Dies bedeutet:

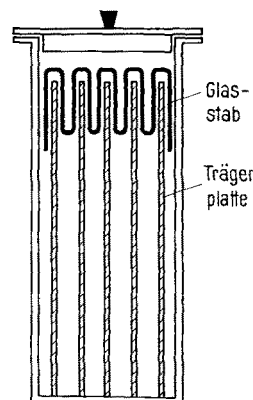


Abb. 7. Trennkammer mit eingestellten Platten und selbstverfertigtem Plattenhalter (Glasstab).

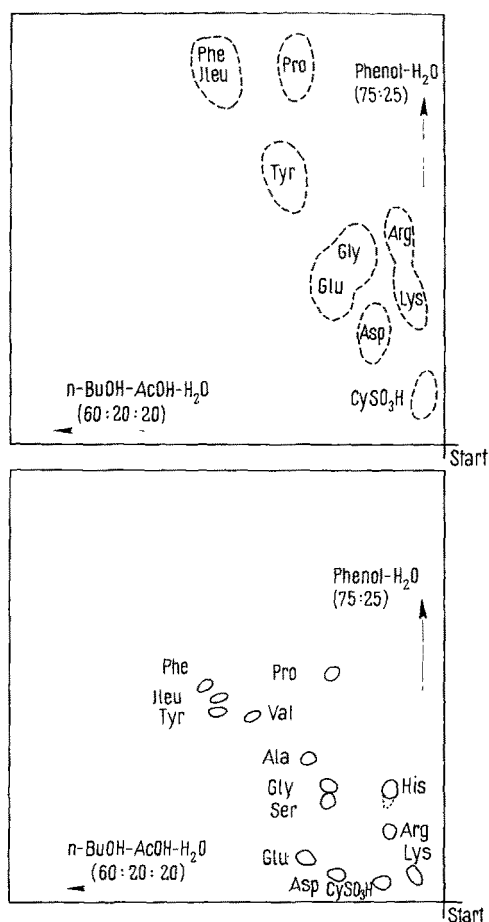


Abb. 8. Vergleich von Papierchromatographie mit Dünnschicht-Chromatographie. Zweidimensionale Chromatogramme in Originalgrösse × 0,57.

Oben: 10 Aminosäuren auf Whatman-Papier Nr. 1. Laufzeit etwa 2 und 2½ h. Unten: 14 Aminosäuren auf Kieselgel G. Laufzeit etwa 1½ und 2 h. Beladung: 1 mm<sup>2</sup> wässrige Lösung, enthaltend 1 µg von jeder Aminosäure.

<sup>28</sup> E. D. MOFFAT und R. I. LYTLE, *Analyt. Chem.* 31, 926 (1959).

Anmerkung bei der Korrektur. Leider wurden die beiden folgenden Arbeiten übersehen: E. NERNBERG, *Arch. d. Pharm.* 292/64 610 (1959). M. MOTTIER, *Mitt. a. d. Gebiet d. Lebensmittelunters. u. Hygiene* 49, 454 (1958).

a) eine Erhöhung der Empfindlichkeit um etwa einen Faktor 10, weil die Fleckenausdehnung während der Wanderung auch bei vergleichbaren Laufzeiten geringer ist als bei der Papier-Chromatographie (Abb. 8);

b) eine Verkürzung der benötigten Trennstrecke und damit einen Zeitgewinn. Weil die Steiggeschwindigkeit der mobilen Phase zu Beginn am grössten ist, ist dieser Zeitgewinn grösser als es die Streckenverkürzung allein erwarten liesse (Dauer für zweidimensionale Chromatogramme 4–5 h statt 2–3 Tage bei Papier-Chromatogrammen).

Bewährt hat sich das von MOFFA T und LITTLE<sup>28</sup> modifizierte Ninhydrin-Reagens, mit welchem die einzelnen Aminosäuren in charakteristischen Farben erscheinen.

### Summary

Amino acid separation with 6 different solvents on chromatoplates prepared from Kieselgel G ('Merck') is described. As demonstrated in Figur 8 and discussed in the text, this technique is equal or superior to paper chromatography.

## ARS EXCERPENDI

### « Codeless Scanning », ein neues Verfahren der automatischen Dokumentation

ROCHE gibt seit 1920, anfänglich allein und seit etwa 2 Jahren in Arbeitsgemeinschaft mit SANDOZ, eine betriebsinterne Literaturübersicht heraus, in der gegenwärtig ungefähr 400 der wichtigsten chemischen, medizinischen, pharmakologischen und pharmazeutischen Zeitschriften referiert werden. Diese Literaturübersicht ermöglicht, gleichzeitig die Aufgabe der Information und der Dokumentation zu lösen. Sie enthält Auszüge aus der publizierten Literatur in Form von Referaten, wobei jedes Referat neben einer kurzen Wiedergabe des wesentlichen Inhalts einer Publikation die Namen der Autoren, den Titel in der Originalsprache, das Literaturzitat und als Hauptmerkmal die wichtigsten Aussagen in Stichwörtern umfasst. Die für eine Arbeit zutreffenden Stichwörter werden einer verbindlichen Liste entnommen und schliessen damit die Schwierigkeiten aus, die durch Synonyma entstehen können. Sämtliche Stichwörter werden in Form einer Kartothek laufend nachgeführt und bilden ein Register mit Kreuzverweisen. Obschon sich diese konventionelle Arbeitsweise durchaus bewährt hat, führt der grosse Anfall von Referaten (mehr als 20 000 pro Jahr) zu zunehmenden Schwierigkeiten in der Bewältigung der Arbeitslast, was sich als Verzögerung der Berichterstattung störend auswirken kann. Dieses starke Anwachsen der Literatur veranlasste uns, ein neuartiges mechanisches Dokumentationsverfahren, das von uns als «Codeless Scanning» bezeichnet wird, auszuarbeiten. Die für unser Verfahren charakteristischen Merkmale sind nachstehend kurz beschrieben:

1. Es wurde eine verbindliche Stichwörterliste aufgestellt, die alle Belange der zu bearbeitenden Sachgebiete genügend umfasst. Nicht nur die Naturwissenschaften und die Medizin, sondern alle Wissensgebiete können durch ein geeignetes Stichwörterrepertoire unserer Methode zu-

gänglich gemacht werden. Das Stichwörterssystem hat zudem den Vorteil, dass jederzeit neue, durch die Fortschritte der Wissenschaft notwendig gewordenen Ausdrücke zugefügt werden können, ohne dass Änderungen des Systems notwendig werden.

2. Die Literaturreferate werden auf Friden-Flexowriter-Maschinen geschrieben, die gleichzeitig eine für die mechanische Vervielfältigung geeignete Vorlage in Klarschrift und einen Lochstreifen für die mechanische und automatische Rückinterpretation des gleichen Textes liefern.

3. Der Lochstreifen dient einmal zur automatischen Niederschrift der Stichwörterkartothek, wobei sich eine Reduktion der Arbeit um etwa 70% erzielen lässt und gleichzeitig ein Hineinbringen von Tippfehlern vermieden wird. Diese Stichwörterkartothek bleibt nach wie vor ein wesentlicher Bestandteil unseres Dokumentationssystems, da sie ein billiges und rationelles Hilfsmittel für einfachere Literaturrecherchen darstellt.

4. Zum andern dient der gleiche Lochstreifen zur automatischen Herstellung von Lochkarten im «Tape-to-card»-Converter, wobei der Lochstreifen für die verschiedenen Maschinenlochkartentypen, zum Beispiel IBM, Remington, Samas usw., verwendet werden kann und einen Austausch des Dokumentationsmaterials zwischen verschiedenen Firmen ermöglicht. Ausserdem können bei entsprechend ausgerüsteten Computern die Lochstreifen direkt ohne Umwandlung eingelesen werden.

5. Die maschinelle Durchführung von umfassenden Literaturrecherchen nach dem «Codeless Scanning»-Verfahren erfolgt auf elektronischen Rechengern wie Remington UCT, IBM 1401 und andern, die eine Recherche gleichzeitig nach mehreren gemeinsam vorkommenden Stichwörtern erlauben. Falls die Ansprüche an die Geschwindigkeit nicht allzuhoch sind, können auch wesentlich billigere Kleincomputer wie Bendix G-15, Zuse Z22R und andere eingesetzt werden. Die Maschinen vergleichen das in Form von Lochstreifen, Lochkarten oder Magnetbändern vorliegende Material Wort für Wort mit den auf Suchkarten gelochten zu selektionierenden Begriffen. Sobald ein Suchwort mit dem Stichwort eines Referates übereinstimmt, wird der ganze Text nach dem zweiten, dritten usw. Begriff abgesucht. Treffen die geforderten Bedingungen zu, so werden die gesamten, gespeicherten Angaben des betreffenden Referates auf dem angeschlossenen Schnelldrucker herausgeschrieben. Auf diese Weise erhält man als Ergebnis der Recherche direkt und ohne weiteren Aufwand eine gedruckte Liste, die die Gesamtheit der Stichwörter, Autoren, Titel und bibliographischen Daten enthält. Der ganze Vorgang läuft ab, ohne dass die ursprüngliche Reihenfolge der Lochkarten verändert wird. Damit wird das zeitraubende Rücksortieren der Karten hinfällig.

6. Schliesslich bietet die beschriebene «Codeless Scanning»-Methode eine gute Grundlage für eine Zusammenarbeit, wie sie bereits zwischen den Firmen ROCHE und SANDOZ besteht. Referate, Stichwörter-Kartei und Flexowriter-Lochstreifen werden zwischen den Firmen ausgetauscht, jede Firma wandelt die Lochstreifen gemäss ihrer maschinellen Anlage in Lochkarten oder Magnetbänder um. Ausserdem können die Lochstreifen auch zur Herstellung von Lochkarten für andere Dokumentationsverfahren wie das «L'Unité»-System verwendet werden. Eine Zusammenarbeit ist auch zwischen Firmen möglich, die keine geeignete Maschinenanlage besitzen. Die Recherchen können in bestehenden neutralen Rechenzentren oder mit Hilfe der Stichwörterkartothek durchgeführt werden.

Schematisch vollzieht sich der Ablauf der gesamten Dokumentationsarbeit nach dem «Codeless-Scanning»-Verfahren wie folgt: