

DNP-Aminosäuren

(Bearbeitet von A. NIEDERWIESER)

A) Säure- und wasserlösliche, mit Äther extrahierbare DNP-Aminosäuren

DNP-Arg, DNP-CySO₃H, Mono-DNP(Cys)₂, α-DNP-His²⁶, Di-DNP-His, ε-DNP-Lys und O-DNP-Tyr können durch Chromatographie im System n-Propanol/NH₃ 34% (7:3 v/v) einzeln oder, soweit dies praktisch in Frage kommt, nebeneinander identifiziert werden. Die Laufzeit beträgt ca. 2 h. Tabelle I orientiert über die Rf-Werte und die Unterscheidung der Flecken. Obwohl DNP-Arg und ε-DNP-Lys nicht völlig getrennt werden, gelingt es doch, die beiden auf Grund ihrer Unterschiede bei der Ninhydrin-Reaktion auch nebeneinander nachzuweisen. DNP-CySO₃H und Mono-DNP(Cys)₂ dürften praktisch nie nebeneinander vorkommen. – Die Probe (1 µg pro DNP-Aminosäure) wird in 1 µl Eisessig oder 0,5*n* HCl aufgetragen. Es ist wichtig, dass überschüssige Säure vor dem Chromatographieren wieder entfernt wird. Hierzu muss die Platte nach dem Auftragen der Lösung für etwa 10 min bei gutem Luftzug auf ca. 60° erwärmt werden.

B) Säureunlösliche, mit Äther extrahierbare DNP-Aminosäuren

Die sichere Identifizierung eines DNP-Derivates, das zu dieser relativ grossen Gruppe gehört, erfordert in der Regel ein zweidimensionales Chromatogramm. Wir verwenden hierzu in der ersten Dimension das «Toluol»-System von BISERTE und OSTEUX²⁷, und in der zweiten Dimension entweder: Chloroform/Benzylalkohol/Eisessig, oder: Chloroform/*t*-Amylalkohol/Eisessig, oder: Benzol/Pyridin/Eisessig, oder: Chloroform/Methanol/Eisessig in der unten angegebenen Zusammensetzung. Die Verwendung des zweiphasigen «Toluol»-Systems macht eine Vorbehandlung der Platten nötig und gibt Flecken mit sogenannten «Bärten»²⁸, zeigt aber im übrigen so gute Trenneigenschaften, dass wir es vorläufig für unentbehrlich halten.

Zur Charakterisierung der genannten Systeme wird zunächst ihre Trennwirkung in eindimensionalen Chromatogrammen beschrieben. Es sei aber gleich festgehalten, dass bei eindimensionalen Chromatogrammen von DNP-Aminosäuremischungen ein nicht unbedeutender Einfluss des Mengenverhältnisses auf die jeweiligen Rf-Werte festgestellt werden kann²⁹. In der zweiten Dimension von zweidimensionalen Chromatogrammen ist dies glücklicherweise nicht mehr der Fall. Hier werden die Rf-Werte weniger vom Mischungsverhältnis der Komponenten als von der «Vorgeschichte» der Schicht (Chromatographie in der ersten Dimension, Zwischentrocknung) beeinflusst. Der erwähnte Effekt geht soweit, dass man zwischen den Rf-Werten unterscheiden muss, welche die Systeme Nr. 2 bis 5 direkt bzw. indirekt (das heisst in zweidimensionalen Chromatogrammen nach Einwirkung des «Toluol»-Systems)

Tab. I. Identifizierung der säure- und wasserlöslichen DNP-Aminosäuren durch Dünnschicht-Chromatographie im System n-Propanol/Ammoniak 34% (7:3 v/v)

	Rf · 100	Farbe	Absorption im UV	Farbe mit Ninhydrin
Mono-DNP-(Cys) ₂	29	gelb	+	braun
DNP-CySO ₃ H	29	gelb	+	gelb
α-DNP-Arg	43	gelb	+	gelb
ε-DNP-Lys	44	gelb	+	braun
O-DNP-Tyr	49	farblos	+ ^a	violett
α-DNP-His	57	gelb	+	gelb
Di-DNP-His	65	gelb	+	gelb

^a siehe unter Sichtbarkeit der Flecken, Verwendung von UV-Licht, Dokumentation.

ergeben (vgl. Tab. II). Weil sich die «Vorgeschichte» weitgehend standardisieren lässt, sind die Rf-Werte der zweiten Dimension gut reproduzierbar. Mischungen geben deshalb beim zweidimensionalen Chromatographieren charakteristische Fleckenmuster, die durch Rf-Wert-Schwankungen kaum verfälscht werden. Man chromatographiert deshalb eine unbekannte Probe vorteilhaft nicht für sich allein, sondern zusammen mit einer Standardmischung, die von jeder in Frage kommenden DNP-Aminosäure gerade so viel enthält (0,2 µg), dass die einzelnen Komponenten nach der zweidimensionalen Trennung eben noch sichtbar werden³⁰ (Fig. 1). Die Verbindung in der Probelösung gibt sich dann in den meisten Fällen sofort und einwandfrei durch die Intensität des ihr zukommenden Fleckens zu erkennen.

Lösungsmittelsysteme und Rf-Werte

Qualität der Lösungsmittel. *Toluol*: Zweimal mit je 1/10 Volumteil konz. Schwefelsäure ausschütteln, mit Wasser, 2*n* Sodalösung und Wasser waschen, über Chlorcalcium trocknen und durch kurze Kolonne destillieren. *Pyridin*: 24 h über Bariumoxyd kochen und durch kurze Kolonne destillieren. *Äthylenchlorhydrin*: 2-Chloräthanol puriss. «Fluka»³¹. *Ammoniak*: 25% Ammoniak «Merck» mit destilliertem Wasser verdünnen. *Benzylalkohol*: Ausschütteln mit gesättigter Bisulfitlösung, waschen mit 2*n* Soda, trocknen über Natriumsulfat und unter N₂ durch kurze Kolonne im

²⁶ Das im-DNP-His gehört grundsätzlich auch zur Gruppe der säurelöslichen DNP-Derivate. Nach H. ZAHN und H. PFANNMÜLLER (Biochem. Z. 330, 97 (1958)) ist es aber seiner Unbeständigkeit wegen in Hydrolysaten von entsprechenden DNP-Peptiden nicht nachweisbar. Wir haben unsere Untersuchung deshalb auf das α-DNP- und das Di-DNP-His beschränkt.

²⁷ G. BISERTE und R. OSTEUX, Bull. Soc. Chim. biol. 33, 50 (1951).

²⁸ vgl. I. M. HAYS in HAYS und MACEK, *Handbuch der Papierchromatographie* (VEB Gustav-Fischer-Verlag, Jena 1958), p. 147.

²⁹ Von der Papierchromatographie her ist bereits bekannt, dass insbesondere Dinitrophenol³¹ in dieser Weise störend wirkt²⁷.

³⁰ Eine Lösung von je 1 mg DNP-Aminosäure in total 5 ml Aceton hält sich im Kühlschrank mindestens 4 Wochen lang. Zum Versuch braucht man 1 µl.

³¹ Buchs, SG (Schweiz).

Tab. II. Rf-Werte* der ätherlöslichen DNP-Aminosäuren in den Lösungsmittelsystemen Nr. 1-5 bei eindimensionaler, aufsteigender bzw. horizontaler³³ Chromatographie

	1 ^b	2		3		4 ^c		5 ^c	
	aufsteigend	aufsteigend	indirekt ^a	aufsteigend	indirekt ^a	aufsteigend	horizontal	aufsteigend	horizontal
DNP-AAB ^e	46	72	44	73	42	52	55	79	85
DNP-AAC ^f	79	92	66	83	57	105	109	108	101
DNP-Ala	34	54	35	60	34	32	33	59	66
DNP-β-Ala	27	71	57	73	50	89	98	99	95
DNP-Asp	02	13	08	09	13	06	05	07	06
DNP-Glu	01	26	17	31	21	12	12	12	12
DNP-Gly	27	32	22	40	23	17	18	31	38
DNP-Ileu	64	83	63	81	57	107	107	100	101
DNP-Leu	66	82	62	80	54	100	100	100	100
DNP-Nleu	69	82	60	80	52	86	90	101	100
DNP-Met	55	70	39	69	38	43	43	72	81
DNP-Met. O ₂ ^g	17	—	—	—	04	03	03	10	10
DNP-Phe	67	75	46	74	41	44	46	81	86
DNP-Pro	29	65	41	67	38	58	59	78	84
DNP-Sar	23	56	35	57	32	34	35	59	65
DNP-Ser	15	11	10	11	10	09	10	07	08
DNP-Thr	20	17	13	15	12	12	14	09	11
DNP-Try	65	69	38	69	31	23	25	54	61
DNP-Val	53	79	56	77	51	76	81	91	98
DNP-Nval	56	77	52	76	48	65	70	86	95
Di-DNP-(Cys) ₂	—	03	02	01	01	00	00	02	02
Di-DNP-His	53	11	09	08	04	05	04	12	16
Di-DNP-Lys	74	56	35	60	30	12	13	66	73
Di-DNP-Orn	70	34	23	40	20	06	06	39	46
Di-DNP-Tyr	76	58	35	60	30	17	16	57	65
2,4-DNP-OH ³²	41	100	76	83	55	22	21	148	102
2,4-DNP-NH ₂ ³²	90	90	84	72	63	115	128	131	101

* angeführt ist Rf-100. ^b vgl. Text über Versuchstechnik. ^c Rf-Werte auf DNP-Leu bezogen. ^d nach «Vorbehandlung» der Schicht durch Chromatographie im «Toluol»-System (Nr. 1) und Zwischentrocknung (siehe Text). ^e AAB = α-Aminobuttersäure. ^f AAC = α-Aminocaprylsäure. ^g Met.O₂ = Methioninsulfon.

Vakuum destillieren. Beigemengter Benzaldehyd verändert die Rf-Werte ziemlich stark. *Methanol* und *Eisessig*: durch kurze Kolonne destillieren. *Chloroform*: zweimal durch kurze Kolonne destillieren. *t-Amylalkohol*: die Fraktion 100,5–102,0° durch kurze Kolonne aus t-Amylalkohol pract. «Fluka»³¹ herausdestillieren. *Benzol*: wie Toluol.

Die nachstehenden Angaben über die Mischungsverhältnisse der Systeme Nr. 1–5 beziehen sich auf Volumina bei ca. 20°C.

Lösungsmittelsysteme. Nr. 1: Toluol-Pyridin-Äthylenchlorhydrin-0,8n. Ammoniak (100:30:60:60). («Toluol»-System)²⁷. Die obere Phase dient zur Chromatographie, die untere zur Vorbehandlung der Dünnschicht (vgl. Versuchstechnik). Dieses System gibt Flecken mit langen «Bärten»²⁸. Damit ist natürlich ein gewisser Substanzverlust verbunden.

Nr. 2: Chloroform-Benzylalkohol-Eisessig (70:30:3). Dieses System gibt symmetrische Flecken. 2,4-Dinitrophenol³² und 2,4-Dinitranilin wandern an die Spitze.

Nr. 3: Chloroform-t-Amylalkohol-Eisessig (70:30:3). Dieses System trennt ähnlich wie System Nr. 2. 2,4-Dinitrophenol³² und DNP-Val rücken näher an DNP-Leu. Dafür ist der t-Amylalkohol stabiler und leichter flüchtig als Benzylalkohol.

Tab. III. Bemerkenswerte Trenneffekte und Laufzeiten bei eindimensionaler Chromatographie in den Lösungsmittelsystemen Nr. 1–5

System Nr.	Abtrennung der DNP-Aminosäuren von		Trennung der DNP-Derivate von		Trennung der Di-DNP-Derivate von Tyr, Lys	Laufzeit
	Dinitroanilin ³²	Dinitrophenol ³²	Leu, Ileu, Nleu	Val, Nval		
1	+	— ^a	—	—	—	1 h/15 cm
2	+	+	—	—	—	1½ h/10 cm
3	— ^e	— ^b	—	—	—	1 h/15 cm
4 ^f	+	— ^c	+	+	—	2–3 h
5 ^f	— ^d	— ^d	—	+	+	2–3 h

^a 2,4-Dinitrophenol liegt zwischen DNP-Val und DNP-Ala.

^b 2,4-Dinitrophenol liegt bei DNP-Leu.

^c 2,4-Dinitrophenol liegt zwischen DNP-Ala und DNP-Gly.

^d 2,4-Dinitrophenol und 2,4-Dinitranilin liegen knapp über DNP-Leu.

^e 2,4-Dinitranilin liegt zwischen DNP-Phe und DNP-Met.

^f Horizontale Chromatographie (vgl. ³³). DNP-Leu läuft in 2½ h etwa 10 cm weit.

³² 2,4-Dinitrophenol und 2,4-Dinitranilin sind Nebenprodukte bei der Synthese und der sauren Hydrolyse von DNP-Peptiden.

³³ M. BRENNER und A. NIEDERWIESER, *Durchlaufende Dünnschicht-Chromatographie*, Exper. im Druck (1961).

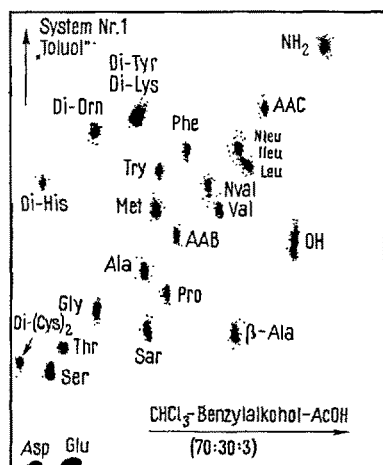


Fig. 1. Zweidimensionales Chromatogramm einer Standard-Mischung von je 0,2 µg DNP-Aminosäure in den Systemen Nr. 1 und 2. Symbole: OH = 2,4-Dinitrophenol³², NH₂ = 2,4-Dinitranilin³², Di = Di-DNP-Derivate, vgl. auch Tab. II. UV-Photokopie, Original 12 × 10 cm.

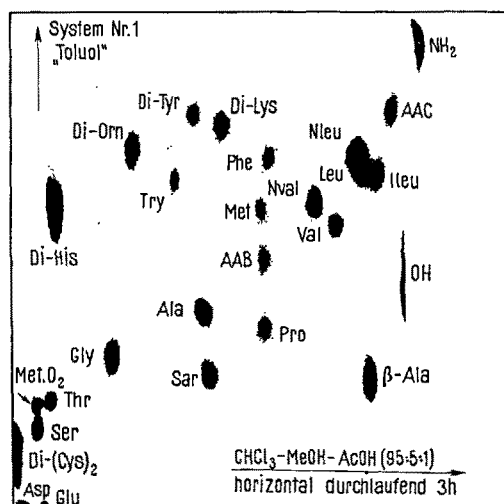


Fig. 2. Zweidimensionales Chromatogramm von je 1 µg DNP-Aminosäure in den Systemen Nr. 1 und 5. Symbole vgl. Fig. 1. UV-Photokopie, länger belichtet als bei Fig. 3, Original 13 × 13 cm.

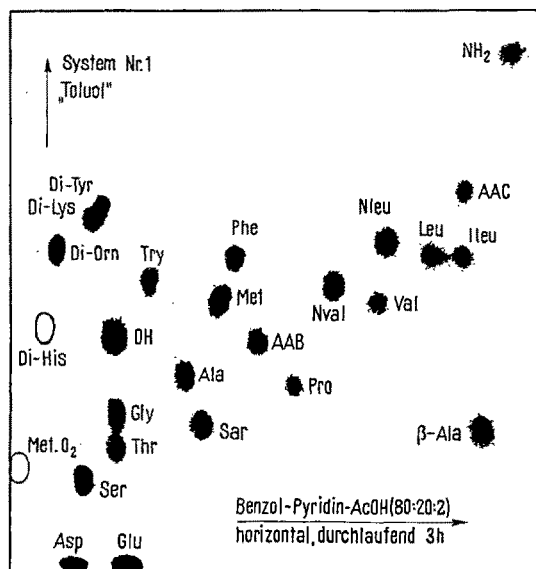


Fig. 3. Zweidimensionales Chromatogramm einer Mischung von je 1 µg DNP-Aminosäure in den Systemen Nr. 1 und 4. Symbole: vgl. Fig. 1; Di-His und Met.O₂ sind im abgebildeten Chromatogramm nicht mitgelaufen. UV-Photokopie, Original 15 × 14 cm.

Nr. 4: Benzol-Pyridin-Eisessig (80:20:2). Bei durchlaufender Chromatographie³³ eignet sich dieses System hervorragend zur Trennung der weniger polaren DNP-Aminosäuren. 2,4-Dinitranilin³² wandert an der Spitze: $R_{DNP-Leu} = 1,28$.

Nr. 5: Chloroform-Methanol-Eisessig (95:5:1). Di-DNP-Tyr und Di-DNP-Lys, welche in keinem der vorgehend beschriebenen Systeme getrennt werden, lassen sich hier bei durchlaufender Chromatographie³³ eindeutig unterscheiden.

Tabelle II orientiert über die Rf-Werte in den genannten Lösungsmittel-Systemen. In Tabelle III sind die Laufzeiten und einige Besonderheiten, welche eine spezielle Erwähnung rechtfertigen, zusammengestellt.

Trenneffekte im zweidimensionalen Verfahren. Figur 1 zeigt die Auftrennung einer Standardmischung von je 0,2 µg DNP-Aminosäure bei Kombination der Systeme Nr. 1 und Nr. 2. Keine Trennung erfolgt bei der Leucin-Gruppe, bei der Valin-Gruppe und bei Di-DNP-Lys/Di-DNP-Tyr.

Zur Auftrennung der letzteren verwendet man die Kombination von Nr. 1 mit Nr. 5 (Fig. 2), oder gegebenenfalls Nr. 5 allein. Die Kombination von Nr. 1 mit Nr. 4 (Fig. 3) ermöglicht die Unterscheidung der isomeren Leucin-Derivate und der isomeren Valin-Derivate.

C) Versuchstechnik

Allgemeines

Die allgemeine Versuchstechnik haben wir schon früher beschrieben²⁴. Die dortigen Angaben sind genau zu befolgen. Ergänzend sei noch folgendes bemerkt:

1. Die Schichtdicke ist bei gleichem Streichgerät und gleichem Verhältnis Kieselgel G zu Wasser natürlich von der Streichgeschwindigkeit abhängig.

2. Relativ harte Schichten erhält man, wenn die bestrichenen Platten an der Luft über Nacht bei 20°C trocknen können. Schon wenn wenig über 100°C getrocknet wird, kann der im Kieselgel G enthaltene Gips seine Funktion als Bindemittel nicht mehr richtig erfüllen. Man erkennt dies daran, dass die Schicht weich, fast pulverig wird. Platten, die man bei höherer Temperatur «aktiviert» (zum Beispiel 2 h bei 140° nach CHERBULIEZ et al.²⁵), müssen schliesslich gegen Luftfeuchtigkeit empfindlich werden³⁴, und es ist nicht verwunderlich, wenn bei ihrer Verwendung störende Rf-Wert-Schwankungen auftreten.

3. Bei schmalen Platten (200 × 50 mm) erhält man trotz Streichgerät häufig ungleichmässige Schichten. Sie eignen sich deshalb zwar ausgezeichnet für orientierende, weniger aber für genauere Versuche.

4. Auf das Durchziehen eines Trennungsstriches zur Begrenzung der Laufstrecke (und der Laufzeit!) haben wir neuerdings ohne Schaden für das Experiment ver-

³⁴ R. E. KIRK und D. F. OTHMER, *Encyclopedia of Chemical Technology* (Interscience Publishers Inc. New York 1948), Vol. 2, p. 773.

zichtet. Man gewinnt sogar den Vorteil einer weniger starren Zeiteinteilung.

Einige spezielle Hinweise erfordert die Verwendung des «Toluol»-Systems.

Das «Toluol»-System

Vorbehandlung der Dünnschicht. Eine mit Filterpapier ausgeschlagene Trennkammer (Firma DESAGA) wird mit der unteren Phase des «Toluol»-Systems beschickt. Auf den Boden der Kammer legt man als Rost einen dicken gebogenen Glasstab. Zwei mit Kieselgel G präparierte Platten werden mit der Schichtseite nach aussen auf die Mitte des Rostes gestellt und jede wird mit der oberen Kante an eine Kammerwand gelehnt. Um zu vermeiden, dass Lösungsmittel vom Filterpapier auf die Schicht gelangt, trennt man diese durch einen kräftigen Strich mit einem Bleistift parallel zur Oberkante entzwei. Man lässt über Nacht stehen. Das Kieselgel nimmt dabei viel Feuchtigkeit auf, was man nicht am Aussehen, wohl aber zum Beispiel daran erkennt, dass auf die Platte gebrachte Substanzen während dieser Behandlung ganz erheblich diffundieren können.

Die Chromatographie auf einer derart vorbehandelten Platte beruht wahrscheinlich auf einer Verteilung zwischen zwei flüssigen Phasen. Jedenfalls geht die Wirkung der Vorbehandlung an Platten, die ungeschützt an der Luft verweilen, schon nach 45 min praktisch verloren. Dieser Effekt ist bei Benützung der Platten zu beachten.

Auftragen der Substanzproben. Lässt man eine Platte zwischen Vorbehandlung und Chromatographie während verschiedener Zeiten ungeschützt an der Luft liegen und trägt man dann die Logarithmen der R_f -Werte gegen die Logarithmen der zugehörigen Zeiten auf, so zeigt es sich, dass schon nach etwa 2 min ein linearer Abfall eintritt. Wir bedecken deshalb die vorbehandelte Schicht nach Entfernung aus der Kammer sofort mit einer Glasplatte, welche nur einen etwa 1,5 cm breiten Streifen an der unteren Kante freilässt. Hier können nun die Substanzproben in Ruhe aufgetragen werden. Benötigt man dazu nicht mehr als etwa 5 min, so ist die Störung unbedeutend. Das Auftragen lässt sich beschleunigen, wenn man relativ konzentrierte Lösungen verwendet. Das Volumen soll 1 μ l womöglich nicht übersteigen, weil die Verdampfungsgeschwindigkeit der aufgetragenen Lösungen auf vorbehandelten feuchten Schichten kleiner ist als auf trockenen. Nach beendetem Auftragen wird die Deckplatte vorsichtig entfernt und das Chromatogramm unverzüglich angesetzt.

Zwischentrocknung bei zweidimensionalen Chromatogrammen. Man lässt 10 min im Luftzug (gut ventilierte Kapelle) liegen, erwärmt im Trockenschrank 10 min auf 60° und lässt im Luftzug 10–15 min abkühlen. Hierauf kann sofort in der zweiten Dimension chromatographiert werden. Längeres Trocknen empfiehlt sich nicht, weil beim Liegenlassen an der Luft mit teilweiser

Zerstörung der DNP-Aminosäuren zu rechnen ist: die Oxydation von DNP-Met kann bei darauffolgender Chromatographie die Anwesenheit von Di-DNP-His vortäuschen. Ist nach der Zwischentrocknung ein längeres Aufbewahren nötig, so muss die Schicht mit einer Glasplatte bedeckt und im Dunkeln aufbewahrt werden.

Sichtbarkeit der Flecken, Verwendung von UV-Licht, Dokumentation

Mit Ausnahme von O-DNP-Tyr sind alle DNP-Derivate gelb. Mengen von 0,1 μ g (eindimensionale Chromatogramme) oder 0,5 μ g (zweidimensionale Chromatogramme) geben Flecken, die noch gut sichtbar sind, wenn man die Platte im durchfallenden Tageslicht betrachtet. Das Chromatogramm soll innerhalb einiger Stunden kopiert werden, da die Flecken im Lauf der Zeit merklich verblassen.

Gewöhnlich kopieren wir die Chromatogramme im Gegenlicht mit Tinte (weiche Feder) auf Pergaminpapier, das mit zwei Papierklammern auf die Schicht gespannt wird. Bei einiger Übung erkennt man auf der weissen Kieselgelschicht selbst schwächste hellgelbe Flecken. In vielen Fällen ist es trotzdem bequemer, die Platte im durchfallenden UV-Licht (Lichtquelle \rightarrow Schicht \rightarrow Glasplatte \rightarrow Brille \rightarrow Auge) zu betrachten. Hierbei sind die DNP-Aminosäuren als tiefdunkle Flecken erkennbar. Schwach absorbierende Substanzen in kleinen Konzentrationen sieht man schlecht, da die Kieselgel-Gipsschicht selber absorbiert und daher auch dunkel erscheint. Gibt man jedoch 0,5 g Zinksilikat³⁵ zu 25 g Kieselgel G, so wird die Schicht durch Fluoreszenz aufgehellt und O-DNP-Tyr selbst in kleinen Mengen erkennbar (ca. 0,06 μ g).

Besonders empfehlenswert ist die Anfertigung einer UV-Photokopie³⁶. Gevaert GEVACOPY Papier wird mit der empfindlichen Seite direkt auf die Schicht gelegt und mit einer Glasplatte angepresst. Man lässt dann für einige Sekunden UV-Licht durch die Schicht hindurch auf das Photopapier fallen und entwickelt in üblicher Weise ein Positiv. Die Figuren 1–3 sind auf diese Weise hergestellt worden. Die grösste Empfindlichkeit resultiert bei einer Belichtungszeit, welche den Hintergrund des Negativs noch nicht schwarz, sondern erst grau erscheinen lässt. Es entsteht dabei eine unverfälschte Kopie. Bei längerer Belichtungszeit wird der Hintergrund des Negativs zunehmend schwärzer; gleichzeitig vermindern die hellen Substanzflecken ihren Durchmesser, um bei Überbelichtung schliesslich ganz zu verschwinden. Hievon lässt sich Gebrauch machen, um grosse Flecken, die sich teilweise überdecken, in kleinere getrennte Flecken aufzulösen.

³⁵ Zinksilikat Leuchtstoff P 1, Type 118-2-7, General Electric, Cleveland/Ohio.

³⁶ vgl. dazu auch H. GRÜNEWALD, Photographie und Wissenschaft 8, 18 (1959).

PTH-Aminosäuren

(Bearbeitet von G. PATAKI)

Die Lösungsmittelsysteme, welche zur papierchromatographischen Trennung der PTH-Aminosäuren verwendet werden^{15–17, 20}, sind auf dem von uns benützten Kieselgel G unbrauchbar. Befriedigende Trenneffekte haben wir hingegen mit den in Tabelle IV angegebenen Mischungen erzielt; in geeigneter Kombination ermöglichen die Systeme Nr. 6–9 die direkte Identifizierung von 14 der insgesamt 19 angeführten PTH-Derivate der Tabelle IV.

PTH-Val, PTH-Phe, PTH-Met einerseits, sowie PTH-Leu und PTH-Ileu andererseits, wandern ausnahmslos gemeinsam. Sie müssen deshalb im allgemeinen Fall nach vorgängiger Hydrolyse in Form der freien Aminosäuren identifiziert werden; liegt PTH-Met allein vor, so ist es nach Behandlung mit H_2O_2 ohne Hydrolyse direkt erkennbar. Oft wird aber schon die Bestimmung der Bruttozusammensetzung eines Peptids (Totalhydrolyse) genügend Information liefern, um eine Abkürzung des Identifizierungsverfahrens von Val und Phe bzw. Leu und Ileu zu gestatten.

Lösungsmittelsysteme, Farbreaktionen der PTH-Aminosäuren und Rf-Werte

Qualität der Lösungsmittel. Chloroform: stabilisiert mit 1,5% Äthanol («Fluka»³¹), Ameisensäure: wasserfrei («Fluka»³¹), Eisessig, Methanol und Methyläthylketon: handelsübliche Qualitäten durch kurze Kolonne destillieren, Pyridin: 24 h über Bariumoxyd kochen und durch kurze Kolonne destillieren.

Die nachstehenden Angaben über die Mischungsverhältnisse der Systeme Nr. 6–10 beziehen sich auf Volumina bei ca. 20°C.

Lösungsmittelsysteme. Nr. 6: Chloroform. Nr. 7: Chloroform-Methanol (9:1). Nr. 8: Chloroform-Ameisensäure (100:5). Nr. 9: Chloroform-Methanol-Ameisensäure (70:30:2). Nr. 10: Methyläthylketon-Pyridin-Wasser-Eisessig (70:15:15:2).

Farbreaktionen. Das von EDMAN und SJÖQUIST²⁰ und neuerdings von CHERBULIEZ²⁵ zum Sichtbarmachen verwendete Jodazid ist nach unserer Erfahrung kein ideales Reagens für die PTH-Aminosäuren. Wir erhalten bei unseren Kieselgel G-Schichten weisse Flecken auf hellblauem Hintergrund, die man schlecht sieht und die schnell wieder verschwinden. Grote-Reagens¹⁸ wäre besser, ist aber in der Anwendung umständlich und zeitraubend. Sehr gute Dienste leistet der Chlor-Tolidin-Test. Man lässt nach dem Chlorieren³⁷, vor Luftzug geschützt, 3–5 min stehen. Bei sehr vorsichtigem Besprühen erhält man augenblicklich fast punktförmige Flecken; besprüht man weiter, so werden sie alsbald grösser und können sich dann unter Umständen mit benachbarten Flecken überdecken (vgl. zum Beispiel Flecken 10 und 11 in Fig. 4). PTH-

Tab. IV. Rf-Werte der PTH-Aminosäuren in den Lösungsmittelsystemen Nr. 6–9 bei eindimensionaler aufsteigender Chromatographie. Versuchstechnik vgl. ²⁴

PTH	Nr. 6 CHCl ₃	Nr. 7 CHCl ₃ – CH ₃ OH (9:1 v/v)	Nr. 8 CHCl ₃ – HCOOH (100:5 v/v)	Nr. 9 CHCl ₃ –CH ₃ OH– HCOOH (70:30:2 v/v)
Ala	0,16	0,68	0,39	~ 1
Arg	0	0,01	0	0,24
Asp	0	0,01	0,13	0,70
Asp(NH ₂)	0	0,23	0,07	~ 1
Glu	0,01	0,04	0,17	0,75
Glu(NH ₂)	0,01	0,28	0,08	~ 1
Gly	0,10	0,56	0,33	0,90
His	0,01	0,29	0	~ 1
Ileu	0,40	0,77	0,57	~ 1
Leu	0,40	0,77	0,60	~ 1
Lys	0,12	0,71	0,34	~ 1
Met	0,33	0,75	0,51	~ 1
Met-Sulfoxyd	0,01	0,40	0,12	~ 1
Phe	0,28	0,74	0,50	~ 1
Pro	0,60	0,82	0,65	~ 1
Thr	0,04	0,45	0,15	~ 1
Try	0,13	0,62	0,39	~ 1
Tyr	0,03	0,47	0,21	~ 1
Val	0,32	0,74	0,55	~ 1

Gly gibt als einzige PTH-Aminosäure eine charakteristische Fleckenform, an der man es sofort erkennen kann (Fig. 4).

Fleckengrösse und Rf-Werte. Bei PTH-Pro haben wir in System Nr. 7 die Abhängigkeit der Fleckengrösse von der Substanzmenge geprüft. Wenn die Verbindung jedesmal in 0,5 µl Methanol aufgetragen wird, so ist die Fleckenfläche bei Beladungen zwischen 0,05 und 72 µg ungefähr dem log der Substanzmenge proportional. Der Rf-Wert bleibt praktisch konstant.

Tabelle IV orientiert über die Rf-Werte, welche man beobachtet, wenn die angegebenen Substanzen einzeln aufgetragen (0,5 µg in 0,5 µl Methanol) und chromatographiert werden. Beim Vorliegen von Mischungen, die in einem Totalvolumen von ebenfalls 0,5 µl aufgetragen werden, können Abweichungen der Rf-Werte auftreten. Man verlässt sich deshalb bei Identifizierungen wie im Fall der DNP-Aminosäuren besser auf einen direkten Vergleich mit Kontrollsubstanzen oder auf das Fleckenmuster eines zweidimensionalen Chromatogramms (Beladung wie im eindimensionalen Chromatogramm).

Identifizierung von PTH-Aminosäuren

A) Einzelne PTH-Aminosäuren oder einfache Gemische. Die erwähnte Unsicherheit in bezug auf die Rf-Werte lässt es ratsam erscheinen, eine unbekannte PTH-Aminosäure zunächst zweidimensional in den Systemen Nr. 7 und 8 zu chromatographieren und auf

³⁷ F. REINDEL und W. HOPPE, Chem. Ber. 87, 1103 (1954). Modifizierung siehe M. BRENNER et al., Helv. chim. Acta 40, 1497 (1957). Die Chlorbehandlung ist hier auf 25 min auszudehnen!

Grund des Fleckenmusters in Figur 4 eine vorläufige Zuordnung zu treffen. Diese wird in einem zweiten Versuch, in welchem einige im Fleckenmuster benachbarte PTH-Aminosäuren mitchromatographiert werden, bestätigt³⁸. 11 Substanzen sind so direkt identifizierbar.

Spezialfälle. Asp, Glu: Das Auftreten eines Fleckens an der Stelle 2 (Fig. 4) kann auf PTH-Asp oder PTH-Glu oder beide zurückzuführen sein. Zur Unterscheidung chromatographiert man eindimensional im System Nr. 9; die Zuordnung bietet keine Schwierigkeiten, wenn man die beiden Substanzen als Kontrollen mitlaufen lässt (vgl. Fig. 5).

Pro: Liegt die Unbekannte rechts oben im Gebiet des grossen Fleckens 13, so chromatographiert man eindimensional im System Nr. 6 und lässt gleichzeitig als Vergleichssubstanzen die PTH-Derivate von Val, Met, Phe, Ileu, Leu und Pro mitlaufen (vgl. Fig. 6). Der Versuch gestattet innert $\frac{1}{2}$ h eine Entscheidung zwischen PTH-Pro oder [PTH-Ileu + PTH-Leu] oder [PTH-Val + PTH-Met + PTH-Phe].

Met: Handelt es sich um die letztere dieser drei Möglichkeiten, so kann die Anwesenheit von PTH-Met durch ein weiteres eindimensionales Chromatogramm im selben System festgestellt werden, wenn die Probe vorher mit H_2O_2 behandelt wird. Das Ausmass der Oxydation hängt vom Verhältnis H_2O_2 zu PTH-Aminosäure ab. Deshalb belädt man eine neue Platte viermal (A, B, C, D) mit der gleichen Menge der Unbekannten, lässt 60 sec trocknen (Lösungsmittel Methanol) und setzt dann jedesmal $0,5 \mu l H_2O_2$ zu: bei A 30/4-, bei B 30/8-, bei C 30/16-, bei D 30/32-proz. H_2O_2 . Schon nach 2 min kann man chromatographieren. Figur 7 zeigt die resultierende Substanzverteilung in Abhängigkeit von der Oxydationswirkung. Man wertet dort aus, wo die Oxydation am wenigsten Nebenprodukte liefert (zum Beispiel bei C in Fig. 7). Tritt nur ein Fleck am Startpunkt auf und höchstens ein undeutlicher Nebenfleck weiter oben, so ist die Anwesenheit von PTH-Met erwiesen. Falls auch oberhalb des Startpunktes deutliche Flecken auftreten, so liegt nicht nur PTH-Met, sondern auch PTH-Val oder PTH-Phe oder ein Gemisch der beiden vor. Kein Flecken am Startpunkt bedeutet Abwesenheit von PTH-Met; wie bei allen Beweisführungen auf negativer Basis ist indessen bei dieser Folgerung Vorsicht geboten.

Leu, Ileu, Phe, Val (und Met): Sind auf Grund der Chromatogramme nach Figur 4 und 6 eine oder mehrere Aminosäuren aus dieser Gruppe anwesend, so hydrolysiert man etwa $1 \mu g$ der Probe 12 h mit 6*N* HCl bei 120° im Rohr, verdampft zur Trockne, nimmt in Wasser auf und chromatographiert eindimensional in n-BuOH-AcOH- H_2O (60:20:20) bzw. Phenol- H_2O (75:25): Phe, Val und Met lassen sich sowohl unter sich als auch von den Leucinen unterscheiden²⁴. Zur Unterscheidung der Leucine dient bei Abwesenheit von Phe, Val und Met ein Durchlaufchromatogramm nach

Fig. 4. Zweidimensionales Chromatogramm einer Mischung von je $0,5 \mu g$ PTH-Aminosäure in den Systemen Nr. 7 und 8. (Met.O = Methioninsulfoxyd.) Original 10×10 cm.

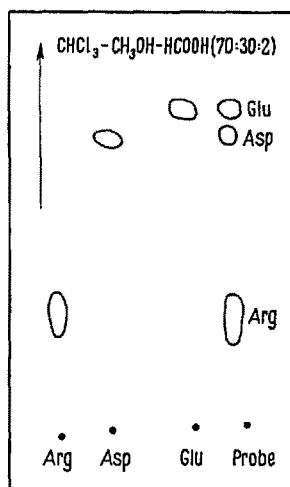
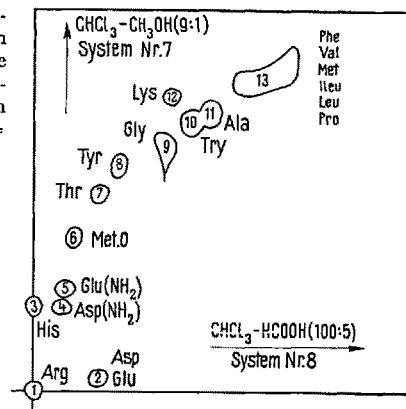
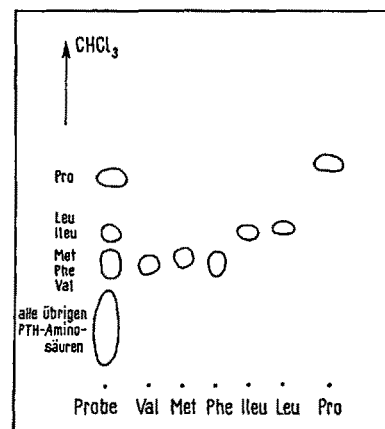


Fig. 5. Eindimensionales Chromatogramm im System Nr. 9 zum Nachweis von PTH-Asp und PTH-Glu. Kontrollen: je $0,5 \mu g$ PTH-Arg in der Probe tritt nur im Spezialfall komplexer Gemische auf (vgl. Text). Laufstrecke 11 cm.

Fig. 6. Eindimensionales Chromatogramm im System Nr. 6 zum Nachweis von PTH-Pro, PTH-Leu + PTH-Ileu und PTH-Met + PTH-Phe + PTH-Val. Kontrollen: je $0,5 \mu g$. Laufstrecke 10 cm.



³⁸ Der direkte Vergleich mit einer Standard-Mischung (vgl. DNP-Aminosäuren) ist wegen der beschränkten Haltbarkeit (72 h) von methanolischen PTH-Aminosäure-Lösungen kostspielig.

Figur 8 im System Nr. 10³³. – Dieses Verfahren zur Trennung der Leucine ist auch anwendbar, wenn das PTH-Leucin-Gemisch erst durch eindimensionale Chromatographie nach Figur 6 von anderen PTH-Aminosäuren abgetrennt werden muss (vgl. B: Komplexe Gemische). Man eluiert in diesem Fall den Leucin-Fleck vom eindimensionalen Chromatogramm mit Methanol²⁴, hydrolysiert und chromatographiert nach der Durchlauf-Methode³³. Zur sicheren Identifizierung ist es erforderlich, dass die auf das eindimensionale Chromatogramm gebrachte Probe mindestens 1 μg PTH-Leu und/oder 1 μg PTH-Ileu enthält.

Bemerkung. Wenn man nicht hydrolysieren muss, erfordern alle oben beschriebenen Experimente insgesamt höchstens 1 μg Material pro PTH-Aminosäure. Man wird es deshalb oft vorziehen, auf Kosten von etwas Substanz Zeit zu sparen und die verschiedenen Chromatogramme nicht hintereinander, sondern nebeneinander laufen zu lassen. Der Zeitbedarf der einzelnen Operationen beträgt: Auftragen: 5 min; Laufzeit/10 cm: 30 min; Trocknen: 5 min; Chlorieren: 25 min; Tolidin: 2 min; H_2O_2 : 12 min.

B) Komplexe Gemische. Weist das zweidimensionale Chromatogramm (Fig. 4) zahlreiche Flecken auf, so wird eventuell eine Elution notwendig. Man bereitet ein neues Chromatogramm, verzichtet auf die Chlor-Tolidin-Behandlung und streift das Gebiet der Flecken 1 und 2 einerseits und 13 andererseits von der Platte ab. Zum Eluieren wird das Kieselgel G in etwa 1 ml Methanol suspendiert. Man hält 2 min auf 40–50°, filtriert, wäscht dreimal mit heissem Methanol nach und verdampft zur Trockne.

Das vereinigte Material aus Flecken 1 und 2 wird nach Figur 5 eindimensional im System Nr. 9 mit PTH-Arg, PTH-Asp und PTH-Glu als Kontrolle chromatographiert.

Mit dem Eluat aus Flecken 13 verfährt man nach den Angaben über Pro; Met; Leu, Ileu, Phe, Val (und Met) im voranstehenden Abschnitt A.

Schlussfolgerung

DNP-Aminosäuren. Ausser DNP-Hypro, das nicht untersucht wurde, lassen sich die DNP-Derivate aller Eiweiss-Aminosäuren (Tab. I und II) durch drei gleichzeitige Chromatogramme in verschiedenen Systemen (Tab. I, Fig. 2 und 3) auf einfachste Weise voneinander trennen. Der Zeitbedarf pro Dimension beträgt nur 1–3 h. Zum sicheren Nachweis einer DNP-Aminosäure mittels UV-Photokopie genügen noch $2 \cdot 10^{-3} \mu\text{M}$, bei eindimensionaler Chromatographie sogar $10^{-4} \mu\text{M}$, das heisst zum Beispiel 0,02 μg DNP-Ser. Bei hohen Beladungen (ca. 100 μg) gelingt es deshalb häufig, noch 0,05% (!) einer beigemengten fremden DNP-Aminosäure einwandfrei zu erfassen.

PTH-Aminosäuren. Ein zweidimensionales (Fig. 4) und zwei eindimensionale (Fig. 5 und 6) Chromatogramme, die man ohne langwierige Äquilibrierung und

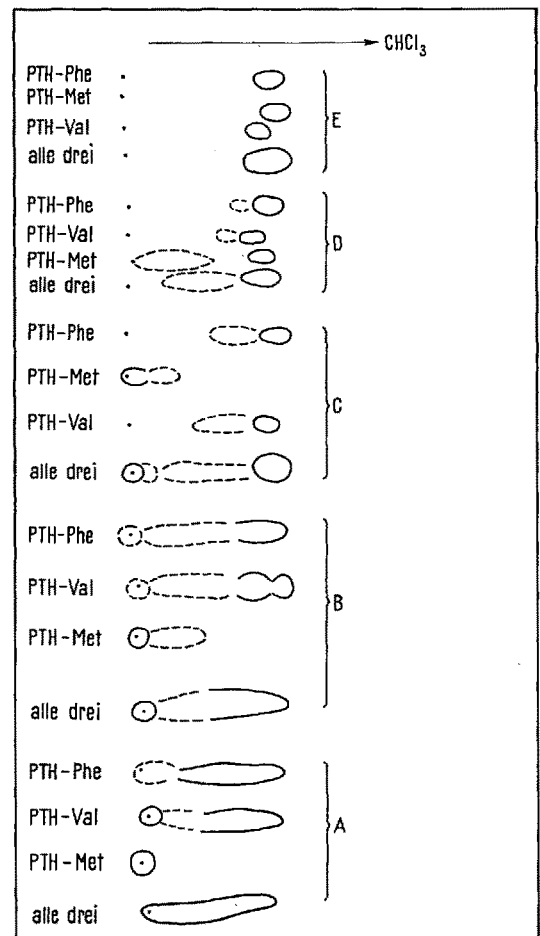


Fig. 7. Oxydation der PTH-Aminosäuren (je 1 μg) der «Methionin-gruppe» durch zunehmende Mengen H_2O_2 für sich allein und in Mischungen (vgl. Text). E = Vergleich ohne H_2O_2 . Laufstrecke 10 cm.

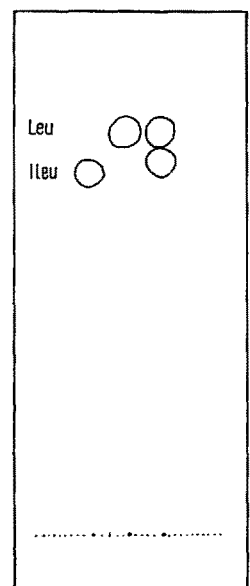


Fig. 8. Durchlauf-Chromatogramm im System Nr. 10 zur Trennung von Leu und Ileu (5 h, je 1 μg Leu und Ileu). Laufstrecke von Leu 10 cm.

gleichzeitig laufen lassen kann, trennen 14 von den 19 PTH-Aminosäuren der Tabelle IV. Mit Hilfe einer einfachen Oxydationstechnik (Fig. 7) und durch saure Hydrolyse mit anschließender dünn-schichtchromatographischer Identifizierung der freigesetzten Aminosäure, die hier in jedem Fall hydrolysebeständig ist, werden die noch fehlenden 5 Substanzen mit wenig zusätzlichem Aufwand ebenfalls nachweisbar (Fig. 8 und ²⁴). Zum Sichtbarmachen der PTH-Aminosäuren be-

währt sich ein modifizierter Chlor-Tolidin-Test; die Erfassungsgrenze liegt bei etwa $3 \cdot 10^{-4} \mu M$, das heisst zum Beispiel bei 0,05 μg PTH-Pro (!).

Summary. Methods for the identification of DNP- and PTH-amino acids are improved by application of thin-layer chromatography using Kieselgel G. The advantages over paperchromatography are better resolution, increased sensitivity and time-saving.

Cell Metabolism and Virus¹

By E. Kovács²

Viral infection is a cellular phenomenon. The virus, as a particle of macromolecular organization – or one part of it, the nucleic acid moiety – adsorbed on the external barrier of the cell, penetrates into it, takes over command of various physiological functions and determines or provokes its own reproduction by the host-cell. Thus, one might assume *a priori* a profound alteration, almost a metamorphosis of the cellular metabolism as the consequence of infection *with* and biosynthesis *of* the virus. As a matter of fact, experimental data accumulated up-to-date support the rightness of such ideas^{3,4}, in spite of many difficulties for the technical approach. For instance, up to about the last one and half decades, living experimental animals were almost exclusively used, which fact means a heterogeneous cell population regarding morphology and function, or viral sensitivity. With the use of chorio-allantoic membranes (CAM) of embryonated eggs⁵, and later the tissue cultures of mammalian cells, for virus research⁶, it became possible to study the sequence of events at the cellular level, also in viral diseases of animals. By this way, our actual concept of Virology was born: a biochemical and molecular one, quite different from the orthodox, bacteriological, and microbiological ideology. Thus the virus disease is a novel chapter of the Cell Physiology and Cell Pathology; 'a chemical infection' caused by invading *macromolecules*.

After this preamble, we want to limit this broad subject almost exclusively to the discussion of data regarding the metabolism of mammalian cells. Especially findings obtained in cultivated cells will be reviewed for the characteristic alterations caused by various viruses. Two great categories will be excluded from the beginning, namely that of the bacteriophage and plant viruses. These limitations allow us to list in this relation pertinent findings with the animal viruses, including human ones. However, this domain

is so extremely rich, that only the most important experimental facts can be presented and discussed.

Cell respiration and virus. From the historical angle, we quote experiments intended to demonstrate, without success, changes in O_2 consumption of brain slices derived from animals infected with poliomyelitis virus⁷. On the other hand, a slight increase of respiration was described in western equine encephalitis virus infected tissue cultures⁸. However, brain homogenates of mice paralyzed with human or murine poliomyelitis did not differ from the normal controls regarding respiration^{9,10}. Later PARODI¹¹ and others¹²⁻¹⁴ observed, with more refined special techniques, an increase, respectively the decrease of oxygen consump-

¹ On the basis of a relation presented at the Symposium. *The Effect of Corticosteroides on Viral Infection*. Symp. Soc. ital. Stud. Malatt. infett. parasit., Sta. Margherita Ligure, June 11/12, 1960. G. Malatt. infett. parasit. (in italian), in press.

² Deutsche Forschungsanstalt für Psychiatrie (Max-Planck-Institut), Abteilung für Serologie und Mikrobiologie, München (Germany).

³ C. HANNOUN, in J. A. THOMAS, *Exposés actuels de biologie cellulaire: Mécanismes d'autoreproduction* (Masson & Cie, Edit., Paris 1957), p. 363.

⁴ R. KOPPELMANN and E. A. EVANS, JR., *Progr. Med. Virol.* 2, 73 (1959).

⁵ G. J. BUDDINGH, in T. M. RIVERS and F. L. HORSFALL, *Viral and Rickettsial Infections of Man*, 3rd Edition (Lippincott Co., Philadelphia 1959), p. 199.

⁶ J. D. ROSS and J. T. SYVERTON, *Ann. Rev. Microbiol.* 11, 439 (1957).

⁷ M. BRODIE and S. B. WORTIS, *Arch. Neurol. Psychiat.* 32, 1159 (1934).

⁸ H. ZINSSER and E. B. SCHOENBACH, *J. exp. Med.* 66, 207 (1937).

⁹ E. RACKER and H. KABAT, *J. exp. Med.* 76, 579 (1942).

¹⁰ A. E. PEARSON and R. J. WINZLER, *J. biol. Chem.* 181, 577 (1949).

¹¹ A. S. PARODI, *J. Immunol.* 58, 109 (1948).

¹² W. F. MACLIMANS, R. A. SIEM, B. C. MARK, and E. PINSKA, *J. Immunol.* 64, 475 (1950).

¹³ R. A. SIEM, B. C. SMITH, and W. F. MACLIMANS, *Science* 112, 505 (1950).

¹⁴ E. KUN and M. H. D. SMITH, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, N. Y. 73, 628 (1950).