

Zum Nachweis von Aminosäuren im 10^{-10} -Mol-Maßstab. Trennung von 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonyl-aminoäuren auf Dünnschichtchromatogrammen

Von GRAY und HARTLEY wurde kürzlich die Verwendung von 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonylchlorid (DANS-Cl) als empfindliches Reagens zur Bestimmung der Amino-Endgruppen von Proteinen und Peptiden mitgeteilt¹. Wir beschäftigen uns mit der gleichen Substanz in der Absicht, eine empfindliche Methode zum Nachweis und zur Bestimmung von Aminosäuren und Aminen auszuarbeiten, ebenfalls schon längere Zeit. Durch eine Privatmitteilung wurden wir von Prof. HARTLEY über seine elektrophoretische Methode zur Trennung der DANS-Aminosäuren orientiert. Wir möchten nachfolgend einige Laufmittelsysteme angeben, die geeignet sind, die DANS-Aminosäuren auf Dünnschichtchromatogrammen zu trennen.

Die Umsetzung der Aminosäuren mit DANS-Cl erfolgte weitgehend analog den Angaben von HARTLEY². Glutamin und Asparagin werden in bicarbonat-alkalischer Lösung bei 30°C umgesetzt. Die Lösungen der DANS-Aminosäuren müssen vor Licht geschützt werden, da sie einem allmählichen photochemischen Zerfall unterliegen. Zur Chromatographie dienen Dünnschichtplatten, welche mit einer 250 μ dicken Kieselgel-G-Schicht versehen sind.

Auf Grund ihrer intensiv gelben Fluoreszenz können weniger als 10^{-10} Mol einer DANS-Aminosäure unter einer UV-Lampe (365 mμ Hg-Linie) erkannt werden. Die während der Darstellung der markierten Aminosäuren durch Hydrolyse aus dem Säurechlorid entstehende 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonsäure (DANS-OH) ist an ihrer grünen Fluoreszenz von den Aminosäuren leicht zu unterscheiden. Sie stört unter unseren chromatographischen Bedingungen nicht. Ebensowenig stört nicht umgesetztes DANS-Cl, da es in allen benutzten Laufmittelsystemen mit der Lösungsmittelfront läuft.

In der Tabelle sind die in unsere Untersuchungen einbezogenen DANS-Aminosäuren aufgeführt. Die Figuren 1 und 2 zeigen die eindimensionale Trennung dieser Aminosäuren in aufsteigender Entwicklung mit den Laufmitteln: A Methylacetat + Isopropanol + konz. Ammoniak = 45 + 35 + 20 (V/V); B Chloroform + Methanol + Eisessig = 75 + 25 + 5 (V/V).

Wegen der wesentlich schärferen Trennungen zogen wir in Anlehnung an Angaben von STAHL³ Abgrenzungslinien in die Kieselgel-G-Sorptionsschicht in der in den Figuren

angegebenen Weise. Die eindimensionale Entwicklung reicht in keinem Fall zur vollständigen Trennung der Aminosäuren aus, doch genügt sie für sehr viele Trennprobleme.

Eine fast vollständige Trennung der in der Tabelle aufgeführten DANS-Aminosäuren gelingt durch kombinierte Anwendung der Lösungsmittelgemische A und B, bzw. A und C (Chloroform + Äthylacetat + Methanol + Eisessig

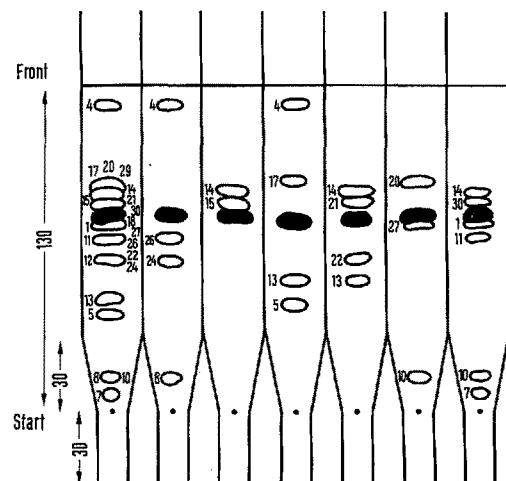


Fig. 1. Eindimensionale Dünnschichtchromatogramme von DANS-Aminosäuren-Gemischen auf Kieselgel G als Sorptionsschicht. Laufmittel A: Methylacetat + Isopropanol + konz. NH₃ = 45 + 35 + 20 (V/V). Der ausgefüllte Fleck ist DANS-OH. Die Zungendimensionen sind in der Figur in mm angegeben.

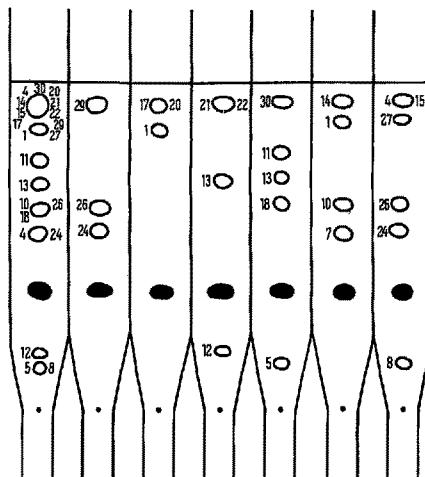


Fig. 2. Eindimensionale Dünnschichtchromatogramme von DANS-Aminosäuren-Gemischen. Laufmittel B: Chloroform + Methanol + Eisessig = 75 + 20 + 5 (V/V).

Nr.	DANS-Aminosäuren	Nr.	DANS-Aminosäuren
1	α-Alanin	16	Mono-ε-Lysin
2	β-Alanin	17	Di-Lysin
3	γ-Aminobuttersäure	18	Methioninsulfon
4	Ammoniak	19	Mono-δ-Ornithin
5	Arginin	20	Di-Ornithin
6	Asparagin	21	Phenylalanin
7	Asparaginsäure	22	Prolin
8	Cysteinsäure	23	Sarkosin
9	Glutamin	24	Serin
10	Glutaminsäure	25	Taurin
11	Glycin	26	Threonin
12	Di-Histidin	27	Tryptophan
13	Hydroxyprolin	28	Mono-O-Tyrosin
14	Isoleucin	29	Di-Tyrosin
15	Leucin	30	Valin

¹ W. R. GRAY und B. S. HARTLEY, Biochem. J. 89, 59P (1963).

² B. S. HARTLEY und V. MASSEY, Biochim. biophys. Acta 21, 58 (1956).

³ E. STAHL, Parfümerie und Kosmetik 39, 564 (1958).

$= 30 + 50 + 20 + 1$ (V/V)) in zweidimensionalen Dünn-schichtchromatogrammen.

Man entwickelt die Platten (20×20 cm) zunächst senk-recht zur Streichrichtung mit dem ammoniakalischen Laufmittelgemisch A und dann in der zweiten Richtung wahlweise mit dem Gemisch B (Figur 3) oder C (Figur 4). Die Kieselgel-G-Schicht muss nach dem ersten Lauf durch 10 min Erhitzen auf 100°C reaktiviert werden, da sich ansonsten die Flecke mit grösseren Rf-Werten als die Refe-renzsubstanzen am Rande der Platten bewegen und sich in der Nähe der Lösungsmittelfront zusammendrängen. Zersetzung der DANS-Aminosäuren haben wir unter dieser Behandlung nicht beobachtet. Die Fleckenkarten sind gut reproduzierbar, so dass die Aminosäuren auf Grund ihrer Lage auf dem Chromatogramm und zusätzlich durch mitgeführte Vergleichssubstanzen identifiziert wer-den können.

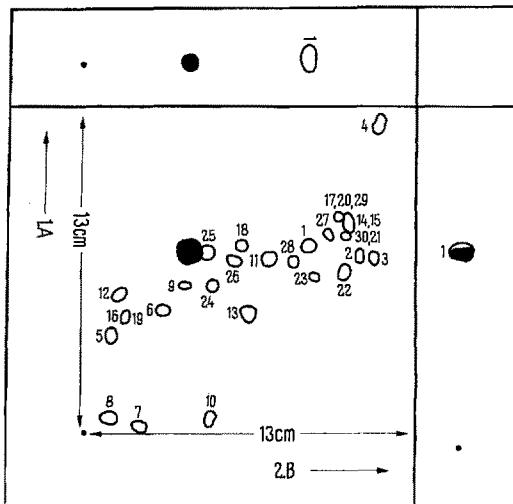


Fig. 3. Zweidimensionales Dünnenschichtchromatogramm eines Gemisches aus 30 DANS-Aminosäuren (vgl. Tabelle). 1. Laufrichtung: Lösungsmittelgemisch A (Methylacetat + Isopropanol + konz. $\text{NH}_3 = 45 + 35 + 20$ (V/V)). 2. Laufrichtung: Lösungsmittelgemisch B (Chloroform + Methanol + Eisessig = $75 + 20 + 5$ (V/V)).

Die Platten betrachtet man am besten in noch feuch-tem Zustand unter der UV-Lampe, da die Fluoreszenz-intensität der Flecke nach dem Trocknen stark abnimmt.

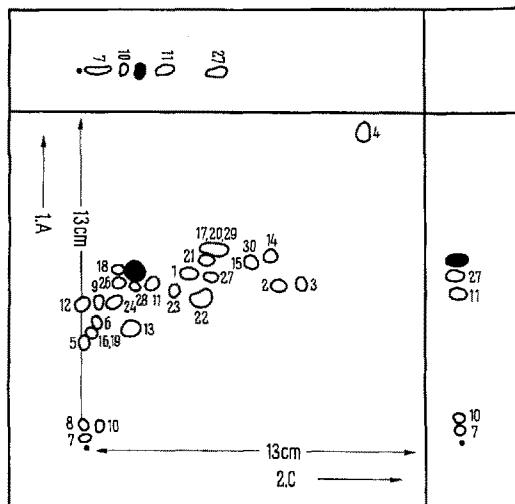


Fig. 4. Zweidimensionales Dünnenschichtchromatogramm eines Ge-misches aus 30 DANS-Aminosäuren (vgl. Tabelle). 1. Laufrichtung: Lösungsmittelgemisch A (Methylacetat + Isopropanol + konz. $\text{NH}_3 = 45 + 35 + 20$ (V/V)). 2. Laufrichtung: Lösungsmittelgemisch C (Chloroform + Äthylacetat + Methanol + Eisessig = $30 + 50 + 20 + 1$ (V/V)).

Summary. Some solvent systems are described for the separation of 1-dimethyl-amino-naphthalene-5-sulphonyl-amino acids on thin layer chromatograms. 10^{-10} mole per amino acid can be detected on a two-dimensional chromatogram, when the yellow fluorescence of these com-pounds is excited by a UV-lamp.

N. SEILER und JUTTA WIECHMANN

Max-Planck-Institut für Hirnforschung, Arbeitsgruppe Neurochemie, Frankfurt(Main)-Niederrad (Deutschland), 8. Mai 1964.

Morphological Modifications in the Adrenal Medulla after Decortications of Different Extent in the Left Cerebral Hemisphere

The influence of the vegetative nervous system on the adrenomedullary secretion has been known for some time. STEWART and ROGOFF¹ proved that the adrenal denerva-tion produces a suspension of the adrenaline secretion. KAHN² observed that, upon sectioning the left major splanchnic nerve, the adrenal medulla of that side did not show the same changes due to insulin shock as on the op-

posite side. Similar results were obtained by CIMINATA³, CROWDEN and PEARSON⁴, GEIGER⁵, HILLARP⁶, etc. The hypothalamus, which is the vegetative centre par excel-

¹ G. N. STEWART and J. M. ROGOFF, Am. J. Physiol. 69, 605 (1924).

² R. H. KAHN, Arch. ges. Physiol. 212, 54 (1926).

³ A. CIMINATA, Abh. neur. Inst. Univ. Wien 28, 95 (1926).

⁴ G. P. CROWDEN and M. G. PEARSON, J. Physiol. 65, 25 (1928).

⁵ E. GEIGER, Klin. Wschr. 2, 1313 (1933).

⁶ N. HILLARP, Acta Anat. (Basel) 3, 153 (1947).