

Zum Nachweis von Aminen im 10^{-10} -Mol-Maßstab. Trennung von 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonsäure-amiden auf Dünnschichtchromatogrammen

Zum empfindlichen Nachweis von Aminosäuren hat sich 1-Dimethylamino-naphthalin-5-sulfonylchlorid (DANS-Cl) bereits bewährt¹⁻². Es lag daher nahe, dieses Reagens auch für den Nachweis von Aminen heranzuziehen. Wohl existieren, insbesondere für die wichtigsten biogenen Amine, denen unser Hauptinteresse galt, z.T. sehr empfindliche Nachweis- und Bestimmungsmethoden (vgl. z. B.⁴⁻⁷). Diese gestatten es jedoch nur, einzelne und nicht die gesamten, z. B. in einem Gewebe vorliegenden Amine zu erfassen. Die für primäre Amine allgemein anwendbare Ninhydrinfärbung ist in vielen Fällen zu unempfindlich.

Die in der Tabelle aufgeführten primären und sekundären Amine setzen sich in gesättigter Natriumhydrogen-carbonatlösung (Aceton + Wasser = 7 + 3) schon bei Raumtemperatur rasch mit DANS-Cl um. Unter der UV-Lampe ($365 \text{ m}\mu$ Hg-Linie) fluoreszieren die DANS-Amide gelbgrün, während Amine, die auch mit einer phenolischen OH-Gruppe reagiert haben (z. B. Adrenalin, Noradrenalin, Dopamin) eine intensiv gelbe oder eine gelb-orange Fluoreszenz zeigen. Man erkennt so etwa 10^{-10} Mol je DANS-Amid.

Zur Trennung der DANS-Amide benutzten wir, wie schon früher für DANS-Aminosäuren, die zweidimensionale Dünnschichtchromatographie².

In der ersten Laufrichtung wird mit Äthylacetat + Cyclohexan = 75 + 50, in der zweiten wahlweise mit Benzol + Methanol + Cyclohexan = 85 + 5 + 10 (Figur 1) oder mit Benzol + Triäthylamin = 100 + 20 (Figur 2) bei etwa 20° 45 min entwickelt (Laufstrecke 13 cm). Nach dem ersten Lauf reaktiviert man die mit einer 250μ Kieselgel G-Schicht bestrichenen 20×20 cm Platten durch 5 min Erhitzen auf 100° . Während dieser Behandlung erfolgt keine Zersetzung. Diese Beobachtung zeigt einen wesentlichen Vorteil der Methode, nämlich die Beständigkeit der Catechinarinderivate gegen Autoxydation. Diese fällt während der üblichen Aufarbeitung und Chromatographie der freien Amine störend ins Gewicht. Ein weiterer Vorteil der Methode ist es, dass die Substanzen nach der Chromatographie durch Elution mit Äthylacetat unverändert isoliert werden können und damit für weitere chromatographische, elektrophoretische

und spektroskopische Untersuchungen zur Verfügung stehen.

DANS-Aminosäuren wandern in den beschriebenen chromatographischen Systemen nicht, so dass sie die

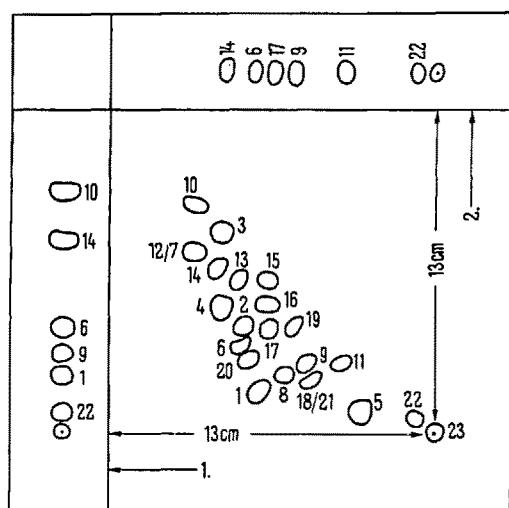


Fig. 1. Zweidimensionales Dünnschichtchromatogramm eines Gemisches aus 23 DANS-Amiden (vgl. Tabelle). 1. Laufrichtung: Äthylacetat + Cyclohexan = 75 + 50. 2. Laufrichtung: Benzol + Methanol + Cyclohexan = 85 + 5 + 10.

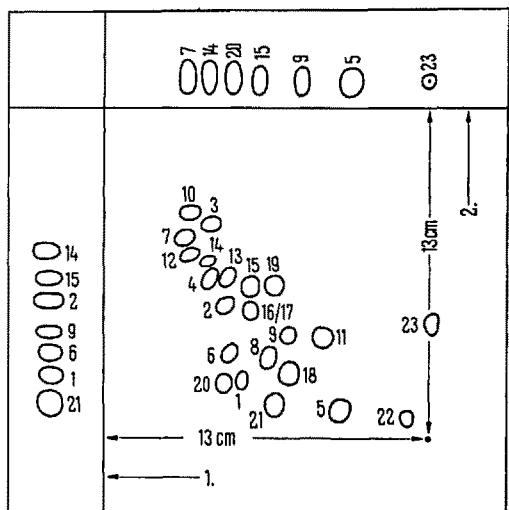


Fig. 2. Zweidimensionales Dünnschichtchromatogramm eines Gemisches aus 23 DANS-Amiden (vgl. Tabelle). 1. Laufrichtung: Äthylacetat + Cyclohexan = 75 + 50. 2. Laufrichtung: Benzol + Triäthylamin = 100 + 20.

Nr.	Aminkomponente des DANS-Amides	Nr.	Aminkomponente des DANS-Amides
1	Ammoniak	14	4-Methoxy- β -phenäthylamin
2	Methylamin	15	3,4-Dihydroxy- β -phenäthylamin (Dopamin)
3	Dimethylamin	16	3-Methoxy-4-hydroxy- β -phenäthylamin
4	Äthylamin	17	3,4-Dimethoxy- β -phenäthylamin
5	Athanolamin	18	Noradrenalin
6	Cysteamin (2-Mercapto-äthylamin)	19	Adrenalin
7	Isoamylamin	20	Tryptamin
8	Spermidin	21	5-Hydroxy-tryptamin (Serotonin)
9	Spermin	22	Pyridoxamin
10	Piperidin	23	Hordenin
11	Histamin		
12	β -Phenäthylamin		
13	4-Hydroxy- β -phenäthylamin		

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

² N. SEILER und J. WIECHMANN, Exper. 20, 559 (1964).

³ A. A. BOULTON und I. E. BUSH, Biochem. J. 92, 11 P (1964).

⁴ E. STAHL, *Dünnschichtchromatographie* (Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg 1962).

⁵ S. UDENFRIEND, *Fluorescence Assay in Biology and Medicine* (Academic Press, New York and London 1962).

⁶ H. G. LEEMANN, K. STICH und M. THOMAS, in E. JUCKER, *Fortschritte der Arzneimittelforschung*, Bd. 6 (Birkhäuser Verlag, Basel und Stuttgart 1963).

⁷ R. SEGURA-CARDONA und K. SOEHRING, Med. exp., Basel 10, 251 (1964).

Amin-Chromatographie nicht stören. Umgekehrt wandern die DANS-Amide in den früher zur Trennung der Aminosäuren beschriebenen Laufmitteln² nahezu mit der Front.

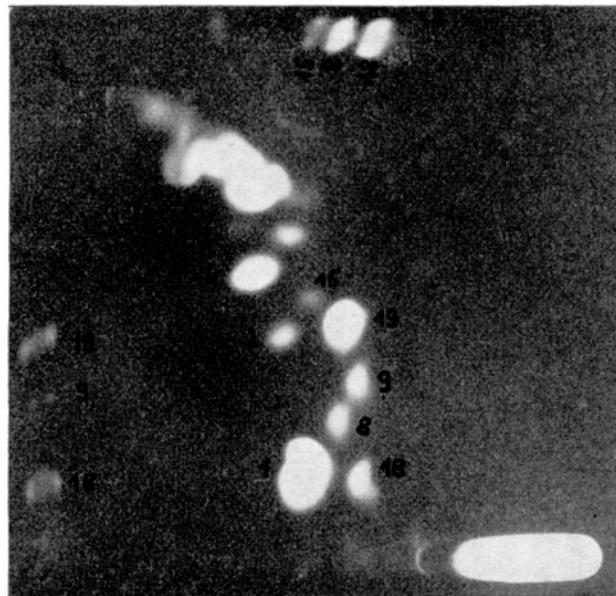


Fig. 3. Zweidimensionales Dünnschichtchromatogramm der Umsetzungsprodukte des HClO_4 -Extraktes einer Nebenniere der Maus mit DANS-Cl. 1. Laufrichtung: Äthylacetat + Cyclohexan = 75 + 50. 2. Laufrichtung: Benzol + Triäthylamin = 100 + 20. 1 = Ammoniak; 2 = Methylamin; 4 = Äthylamin; 15 = Dopamin; 18 = Noradrenalin; 19 = Adrenalin; 8 = Spermidin; 9 = Spermin.

So gestatten die beschriebenen Methoden sowohl die Erfassung der Amine als auch der Aminosäuren z. B. aus einem Gewebeextrakt. Im übrigen können die DANS-Amide aus saurer wie aus alkalischer Lösung mit Äthylacetat extrahiert werden.

Die Figur 3 stellt ein Chromatogramm der Amine aus der Nebenniere einer Maus dar. Eine frisch präparierte Nebenniere homogenisierte man in 2 cm^3 0,4 N HClO_4 , die etwa 50 mg Natriumsulfit enthielt. Den Überstand schüttelte man zur Entfernung von Säuren und Lipoiden mit Benzol aus, dann wurde mit etwa 10 mg DANS-Cl in 3 cm^3 Aceton und bis zur Sättigung mit NaHCO_3 versetzt. Nach 3 h verdampfte man das Aceton weitgehend im Vakuum und extrahierte mit einigen cm^3 Äthylacetat. Der Rückstand dieses Extraktes wurde auf das Chromatogramm aufgetragen. Neben Adrenalin und Noradrenalin erkennt man auf dem Bild u. a. Spermin, Spermidin, Dopamin, Methylamin und Äthylamin. Einige Flecken haben wir noch nicht identifiziert.

Summary. For the sensitive determination of amines their 1-dimethyl-amino-naphthalene-5-sulphonyl derivatives were separated in two-dimensional thin-layer chromatograms. 10^{-10} – 10^{-11} mole per amine can be detected, when the fluorescence of the DANSyl-compounds is excited by the $365 \text{ m}\mu \text{ Hg}$ line.

N. SEILER und M. WIECHMANN

Max-Planck-Institut für Hirnforschung, Arbeitsgruppe Neurochemie, Frankfurt/Main-Niederrad (Deutschland), 26. November 1964.

Papierchromatographischer Nachweis freier Aminosäuren im Knochenmark einiger Tiere während verschiedenen Jahreszeiten

Die Papierchromatographie wurde in den letzten Jahren weitgehend zur Bestimmung des qualitativen und quantitativen «Aminosäurespektrums» verschiedener Gewebe verwendet.

Das Vorkommen freier Aminosäuren im tierischen Knochenmark zu verschiedenen Jahreszeiten, das ein Ausdruck des Eiweissmetabolismus sein kann, wurde bis jetzt nicht untersucht.

Die papierchromatographische Bestimmung der freien Aminosäuren im Knochenmark von Kalb, Rind und Schwein ergab eine qualitative Gleichheit im Aminosäuregehalt des Knochenmarks dieser Tierarten, unabhängig von den einzelnen Jahreszeiten.

Das Knochenmark wurde aus frischer Tibia gewonnen. Aus dem homogenisierten Gewebe (50 g) wurden die freien Aminosäuren mit 80% Äthanol extrahiert, gleichzeitig die Proteine und Lipide nach AWAPARA¹ beseitigt. Die Chromatographie wurde auf Papier WHATMAN 3 MM und SCHLEICHER & SCHÜLL 2043 b (mgl) nach der ein- und zweidimensionalen Methode² bei 20°C durchgeführt. Als Fliessmittel wurden $n\text{-BuOH-AcOH-H}_2\text{O}$ (4:1:1), $n\text{-ProOH-H}_2\text{O}$ (8:2) u. a. verwendet. Entwickelt wurde

nach Trocknen bei Zimmertemperatur durch Eintauchen in 0,3% Azetonlösung von Ninhidrin und 10 min. Erhitzen auf 105°C.

Mit Hilfe von Vergleichschromatogrammen wurden folgende Aminosäuren nachgewiesen: Cys, Lys, Arg, His, Gly, Asp, Glu, Thr, Ala, Val, Met, Leu und Ileu.

Die qualitative Gleichheit der Aminosäure bei den untersuchten Tierarten bestätigt die Literaturangabe³ über die «Aminosäurespektren» gleichartiger Gewebe. Die Unabhängigkeit der Resultate von der Jahreszeit spricht dafür, dass auch der Eiweissmetabolismus im Knochenmark von der Jahreszeit nicht beeinflusst wird.

Summary. The qualitative identity of the free amino acids in some animal species was proved by means of paper chromatography.

D. KOLEFF

Chemisch-Pharmazeutisches Forschungsinstitut, Sofia (Bulgarien), 13. November 1964.

¹ J. AWAPARA, Arch. Biochem. 19, 172 (1948).

² M. HAIS und K. MACEK, *Handbuch der Papierchromatographie*, Bd. 1: *Grundlagen und Technik* (VEB Gustav Fischer, Jena 1958).

³ A. MEISTER, *Biochemistry of the Amino Acid* (Academic Press Inc., New York 1957).