

251. Dünnschicht-Chromatographie von Aminosäuren auf Kieselgel G

2. Mitteilung¹⁾

Eine Schnellmethode zur Trennung und zum qualitativen Nachweis von 22 Aminosäuren

von A. R. Fahmy, A. Niederwieser, G. Pataki und M. Brenner

(5. X. 61)

Zur zweidimensionalen Chromatographie von Aminosäuren auf Kieselgel-Schichten eignet sich nach früheren Befunden¹⁾ als Fließmittel $n\text{-BuOH-AcOH-H}_2\text{O}$ (60:20:20 g/g) kombiniert mit $\text{Phenol-H}_2\text{O}$ (75:25 g/g). Dabei können aber einerseits Phe, Leu und Ileu, und andererseits Gly, Hypro und Ser, falls sie zusammen vorliegen, nicht mit Sicherheit unterschieden werden.

Wir haben nun gefunden, dass ein wesentlich besseres Trennergebnis erzielt wird, wenn man zur Chromatographie in der ersten Dimension als Fließmittel $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH-17-proz. NH}_3$ (2:2:1 v/v) statt $n\text{-BuOH-AcOH-H}_2\text{O}$ (60:20:20 g/g) ver-

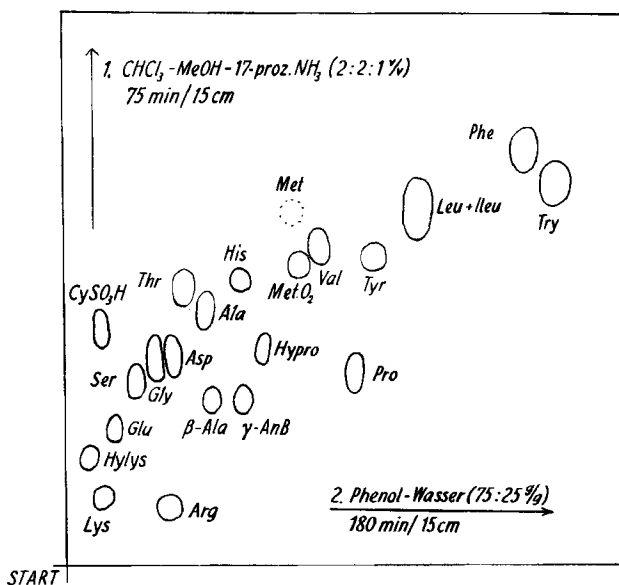


Fig. 1. Zweidimensionale Trennung eines Perameisensäure-oxidierten⁴⁾ Gemisches aus 20 Eiweißaminosäuren + β -Alanin + γ -Amino-n-buttersäure ($\gamma\text{-AnB}$)

Beladung pro Aminosäure $0,5 \mu\text{g}$ in total $0,5 \mu\text{l}$ $0,1\text{N HCl}$. Nach Chromatographieren in der ersten Dimension lüftet man 20 Min. im Abzug. Der Methionin-Fleck (punktirt) erscheint nur bei Verzicht auf die Perameisensäure-Oxydation. Revelation («Sichtbarmachung») mit Ninhydrin. Im übrigen vgl. ¹⁾.

¹⁾ 1. Mitteilung M. BRENNER & A. NIEDERWIESER, *Experientia* 16, 378 (1960).

wendet (Fig. 1). Ungetrennt bleiben bei der neuen Fließmittelkombination lediglich Leucin und Isoleucin. Diese sind indessen in einem Parallelversuch unter Anwendung des Durchlaufverfahrens²⁾ unterscheidbar³⁾, und zwar auch dann, wenn sie mit allen andern Eiweissaminosäuren + β -Alanin + γ -Amino-n-buttersäure vermischt sind (Fig. 2).

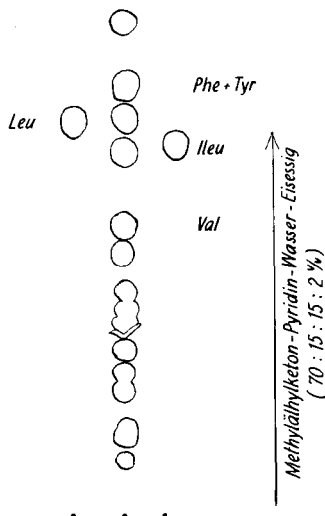


Fig. 2. Eindimensionale Trennung in der Durchlaufkammer²⁾ zum Nachweis von Leucin und Isoleucin neben 18 Eiweissaminosäuren + β -Alanin + γ -Amino-n-buttersäure

Beladung pro Aminosäure 0,5 μ g in total 0,5 μ l 0,1N HCl. Laufzeit 4 $\frac{1}{2}$ Std.; Revelation mit Ninhydrin. Perameisensäureoxydation⁴⁾ ist erforderlich. Zur sicheren Identifizierung von Leucin und Isoleucin chromatographiert man parallel je eine Probe dieser Aminosäuren als Vergleichssubstanzen. Im übrigen vgl. 1)²⁾.

Es ist empfehlenswert, vor dem Chromatographieren routinemässig mit Perameisensäure⁴⁾ zu oxydieren, um Cystein und Cystin in die beständigere Cysteinsäure überzuführen. Beim Verzicht auf die Oxydation geben Cystein und Cystin auf Dünnschicht-Chromatogrammen mehrere Nebenflecke. Es handelt sich bei diesen Artefakten vermutlich um Autoxydationsprodukte; eines davon konnten wir als Cysteinsäure identifizieren. – Aus Methionin entsteht unter den Bedingungen der Perameisensäureoxydation Methioninsulfon. Dieses stört weder im zweidimensionalen noch im eindimensionalen (Durchlauf-) Chromatogramm.

Nachweisgrenzen. In der ersten Mitteilung¹⁾ berichteten wir, dass die Ninhydrin-Reaktion auf Kieselgel G allgemein etwa 10mal empfindlicher sei als auf Papier. Tab. 1 zeigt den Sachverhalt etwas genauer. Direkt vergleichbar sind die Werte in Kolonne 2 und 3, indem jedesmal dasselbe Ninhydrin-Reagens verwendet und die Färbung in gleicher Weise entwickelt wurde. Ein Vergleich von Kolonne 3 und 4 vermittelt ein Bild über die Schwankungsbreite von Beobachtungen aus zwei La-

²⁾ M. BRENNER & A. NIEDERWIESER, *Experientia* 17, 237 (1961).

³⁾ M. BRENNER, A. NIEDERWIESER & G. PATAKI, *Experientia* 17, 145 (1961).

⁴⁾ C. H. W. HIRS, *J. biol. Chemistry* 219, 611 (1956).

boratorien. Kolonne 5 gibt für jede Aminosäure diejenige Menge an, welche sich im Gemisch mit allen anderen Aminosäuren aus Kolonne 1 auf einem zweidimensionalen Chromatogramm nach Fig. 1 eben noch deutlich erkennen liess. Zur Ermittlung dieser Mengen wurden die Aminosäuren (Kolonne 1) willkürlich in einem Gewichtsverhältnis gemischt, das dem Verhältnis der Empfindlichkeiten in Kolonne 2 entspricht, und die zur Chromatographie gebrachte Gesamtmenge in aufeinanderfolgenden Versuchen jedesmal um einen Faktor 2 verkleinert; die Reihe wurde abgebrochen, als die ninhydrinempfindlichsten Aminosäuren (Ala, Gly und Lys) eben noch sichtbar waren.

Tabelle 1. *Nachweisgrenzen (μg) von 19 Aminosäuren auf Papier- und Dünnschicht-Chromatogrammen*

1	2	3	4	5	6
Aminosäuren	Eindimensionales Chromatogramm der individuellen Aminosäuren in n-Propanol/Wasser (7:3 v/v)			Zweidim. Chromatogr. der Aminosäuren-Mischung auf Kieselgel G (vorliegende Arbeit) bzw. Papier (DENT ⁶⁾)	
	Kieselgel G	WHATMAN, Nr. 1		Kieselgel G	Papier
		vorliegende Arbeit	OPIENSKA-BLAUTH ⁵⁾		
Ala	0,009	0,05	0,065	0,05	2
β -Ala	0,01	0,1		0,06	5
Arg	0,01	0,1	0,13	0,06	15
Asp	0,1	0,5	0,26	0,4	5
CySO ₃ H	0,01	0,5		0,1	
Glu	0,04	0,3	0,03	0,2	5
Gly	0,001	0,01	0,02	0,006	1
His	0,05	0,1	0,13	0,5	20
Hypro	0,05	0,3		0,1	15
Leu	0,01	0,1	0,03	0,2	10
Lys	0,005	0,1	0,065	0,03	15
Met	0,01	0,1	0,03	0,4	10
Phe	0,05	0,3	0,065	0,2	10
Pro	0,1	0,5	0,52	0,5	8
Ser	0,008	0,1	0,03	0,1	2
Thr	0,05	0,3	0,065	0,1	10
Try	0,05	0,5	0,065	0,5	20
Tyr	0,03	0,3		0,1	15
Val	0,01	0,5	0,03	0,2	3

Anwendungen. Das beschriebene Verfahren eignet sich vorzüglich zur qualitativen Analyse von Peptid- und Eiweiss-Hydrolysaten (Fig. 3), und zwar unter geeigneten Versuchsbedingungen auch dann, wenn einzelne Aminosäuren in grossem Überschuss vorliegen (Fig. 4, Tab. 2). Weniger geeignet ist es im Falle von Urin und

⁵⁾ J. OPIENSKA-BLAUTH, M. SANECKA & M. CHAREZIŃSKI, *J. Chromatography* 3, 415 (1960).

⁶⁾ C. E. DENT, *Biochem. J.* 45, 169 (1948).

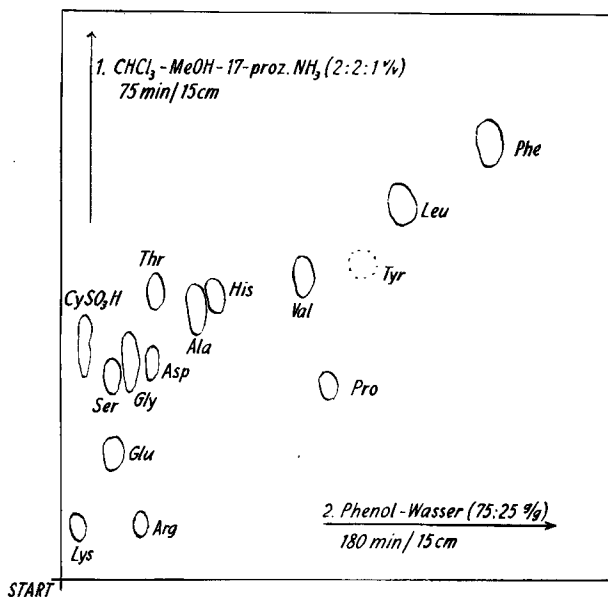


Fig. 3. *Hydrolysat* (6N HCl, 110°C, 14 Std., durch 5maliges Eindampfen unter Zusatz von Wasser vom HCl-Überschuss befreit) *der B-Kette von Insulin*⁷⁾
Beladung: 10 µg in 0,5 µl 0,1N HCl

Man erkennt alle erwarteten Aminosäuren. Die Undeutlichkeit des Tyrosinflecks beruht auf Zersetzung unter den genannten Hydrolysebedingungen! Hydrolyse derselben Substanzprobe unter kontrollierten Bedingungen (ca. 500fache Menge 6N HCl, 110° ± 1°, 24 Std., Sauerstoffausschluss) ergab den erwarteten deutlichen Tyrosinfleck (STEIN/MOORE-Analysen⁸⁾ beider Hydrolysate haben den dünn-schicht-chromatographischen Befund quantitativ bestätigt). Revelation mit Ninhydrin. Im übrigen vgl. ¹⁾.

Tabelle 2. *Elastin-Hydrolysat* (vgl. Fig. 4)

Vergleich von STEIN/MOORE-Analyse⁸⁾ und Dünnschicht-Chromatographie. Man beachte das Mengenverhältnis von rund 25:1 zwischen Glycin und Hydroxylysin.

Aminosäuren	µg/1 µl	Sichtbarkeit im Dünnschicht-Chromatogr.	Aminosäuren	µg/1 µl	Sichtbarkeit im Dünnschicht-Chromatogr.
Ala	0,7	+	Leu	0,4	+
Arg	0,1	+	Lys	0,1	+
Asp	0,1	–	Met	0,02	–
Glu	0,2	+	Phe	0,2	+
Gly	1,1	+	Pro	0,6	+
His	0,03	–	Ser	0,1	+
Hylys	0,04	+	Thr	0,1	+
Hypro	0,4	+	Tyr	0,1	+
Ileu	0,1	+	Val	0,6	+

⁷⁾ F. SANGER, *Biochem. J.* 44, 126 (1949). Oxydation vgl. ⁴⁾.

⁸⁾ S. MOORE, D. H. SPACKMAN & W. H. STEIN, *Analyt. Chemistry* 30, 1185 (1958); 30, 1190 (1958). – Die Analysen wurden von Fr. L. GUIARD unter der Leitung von Dr. R. WEBER durchgeführt.

anderen Lösungen, welche im Verhältnis zur Aminosäuremenge viel Salze enthalten. Die Salztoleranz ist immerhin beträchtlich, indem z. B. das Elastinhydrolysat (Fig. 4, Tab. 2) in Gegenwart von rund 4 Äquivalenten Na^{\oplus} pro Äquivalent Aminosäure chromatographiert werden konnte.

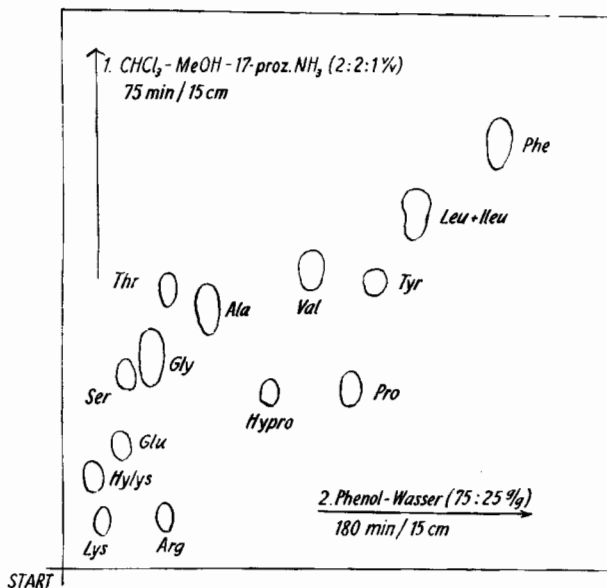


Fig. 4. Hydrolysat (kontrollierte Bedingungen, vgl. Legende Fig. 3) von 14,6 mg präpariertem getrocknetem Elastin (*ligumentum nuchae*, Kalb, Alter 3 Monate), gelöst in 2 ml 0,2N NaCl-HCl (pH \sim 2). Die optimale Beladung (1 μ l) wurde durch einen Reihenversuch ermittelt. Die Zusammensetzung dieser Lösung (STEIN/MOORE-Analyse⁸) ist aus Tabelle 2 ersichtlich. Revelation mit Ninhydrin. Im übrigen vgl. ¹).

Die Mittel zur Durchführung dieser Arbeit verdanken wir einem Stipendium der Medizinischen Fakultät der Universität Kairo (A. R. F.), Herrn Prof. Dr. M. GEIGER-HUBER und der Ungarnhilfe der Doktoranden des Botanischen Instituts der Universität Basel, der Kommission für ungarische Flüchtlingsstudenten an der Universität Basel (G. P.) sowie Arbeitsbeschaffungskredit des Bundes (M. B.).

SUMMARY

A thin-layer chromatographic method for rapid separation and detection of 22 commonly occurring amino-acids is described. Special reference is made to the analysis of protein hydrolysates and to the sensitivity of the ninhydrin reaction.

Institut für Organische Chemie der Universität Basel