

EIN BEITRAG ZUR DIRECTPHOTOMETRIE VON  
PAPIERCHROMATOGRAMMEN MIT HILFE EINES  
EINFACHEN EXTINKTIONENSCHREIBERS  
QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON AMINOSÄUREN

JEAN BARROLIER, JOHANNA HEILMANN UND EUGEN WATZKE  
*Hauptlaboratorium der Schering A.G., Berlin-West (Deutschland)*

Bei Papierchromatogrammen und -elektropherogrammen liegt der Gedanke nahe, auf die bisher vielfach geübte Elution der gefärbten Zonen und anschließende Colorimetrie der Eluate zu verzichten und statt dessen die Papierstreifen selbst photometrisch auszuwerten. Diese Auswertung läuft auf eine Colorimetrie auf dem intakten Streifen hinaus, den man sich in eine Vielzahl von schmalen Streifchen zerlegt denken kann, die den Küvetten eines Colorimeters entsprechen und nacheinander colorimetriert werden. Stellt man die farbigen Zonen eines Papierchromatogramms oder elektropherogramms als Extinktionskurven dar, so folgt nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz Proportionalität von Inhalt der Kurvenflächen und Substanzmenge in den betreffenden Zonen.

Neuerdings findet die Directphotometrie, besonders bei Elektropherogrammen, zunehmend Interesse und es sind bereits einige Geräte im Handel, welche Extinktionskurven schreiben. Als Beispiele seien genannt der Zeiss-Extinktionenschreiber und der Elphor-Integraph von Bender und Hobein. Beide arbeiten nach dem Kompensationsprinzip unter Verwendung eines logarithmischen Graukeils bzw. einer logarithmisch geschnittenen Blende. GRUBHOFER<sup>1</sup> erreicht das gleiche Ziel auf einem anderen Wege. Er misst den Photostrom mit einem Spiegelgalvanometer, wobei die Galvanometerlichtmarke mit Hilfe eines Kurvenspiegels derart abgelenkt wird, dass eine der Extinktion entsprechende Anzeige entsteht. Die schwierig zu berechnende Spiegelkurve hat er nach einem Näherungsverfahren ermittelt und danach einen Spiegel schleifen lassen. Die Extinktionskurve wird halbautomatisch geschrieben, indem man die Wanderung der Lichtmarke auf einem Transparenzpapier mit der Hand nachzeichnet.

Wir haben unabhängig davon und gleichzeitig denselben Weg beschritten, wobei wir den Kurvenspiegel durch Biegen eines verspiegelten Stahlbandes herstellen. Unter Verwendung im Handel befindlicher Bauelemente, wie Spiegelgalvanometer, Nachlaufschreiber und Chromatometer von B. Lange, haben wir ein vollautomatisches Gerät zum Schreiben von Extinktionskurven gebaut. Der einzige von uns selbst hergestellte Teil ist der Kurvenspiegel. Wir haben unseren Extinktionenschreiber so aufgebaut, dass keine feinmechanische Präzisionsarbeit nötig ist.

Von einer Berechnung der Spiegelkurve haben wir bewusst Abstand genommen

und den Kurvenspiegel an Hand empirischer Daten justiert. Wir verwendeten dabei einen Stufenkeil mit bekannten Absorptions- und Extinktionswerten. Die Spiegelkurve wurde rein zeichnerisch, ohne geometrische Konstruktion dargestellt, um den Verlauf der Spiegelkurve zu veranschaulichen. Diese Kurve dient dazu, die Ausgangslage für die eigentliche Justierung des Stahlbandes festzulegen.

In der Praxis ist der Extinktionsbereich von 0–1.0 von Interesse. Wir haben uns daher auf diesen Messbereich beschränkt, wie es auch beim Zeiss-Extinktionsschreiben und dem Gerät von GRUBHOFER geschehen ist. Prinzipiell kann der Bereich der Schreibung auch auf höhere Extinktionen ausgedehnt werden.

### Zeichnung der Spiegelkurve

Man kann sich die Spiegelkurve aus einer Vielzahl von kleinen, ebenen Spiegeln zusammengesetzt denken, die als Tangenten der exacten Spiegelkurve anliegen. Der jeweilige Berührungspunkt der Tangenten ist zugleich der Punkt, wo der Lichtstrahl des Galvanometerspiegels auf den Kurvenspiegel auftrifft. Da es sich bei den Spiegelkurven um schwach gekrümmte und stetige Kurven handelt, so sind für benachbarte Spiegelemente die Tangentenabschnitte vom Berührungspunkt bis zu ihrem Schnittpunkt angenähert gleich ( $AC = CB$ ). Diese Näherungsannahme, zusammen mit dem Spiegelgesetz, gestattet die Elementarspiegel in einem geschlossenen Kurvenzug (Spiegelkurve) aufzustellen.

Zunächst ist er noch insofern unbestimmt, als sich der Verlauf der Spiegelkurve als abhängig vom Kurvenbeginn, d.h. der Lage des ersten Elementarspiegels, erweist

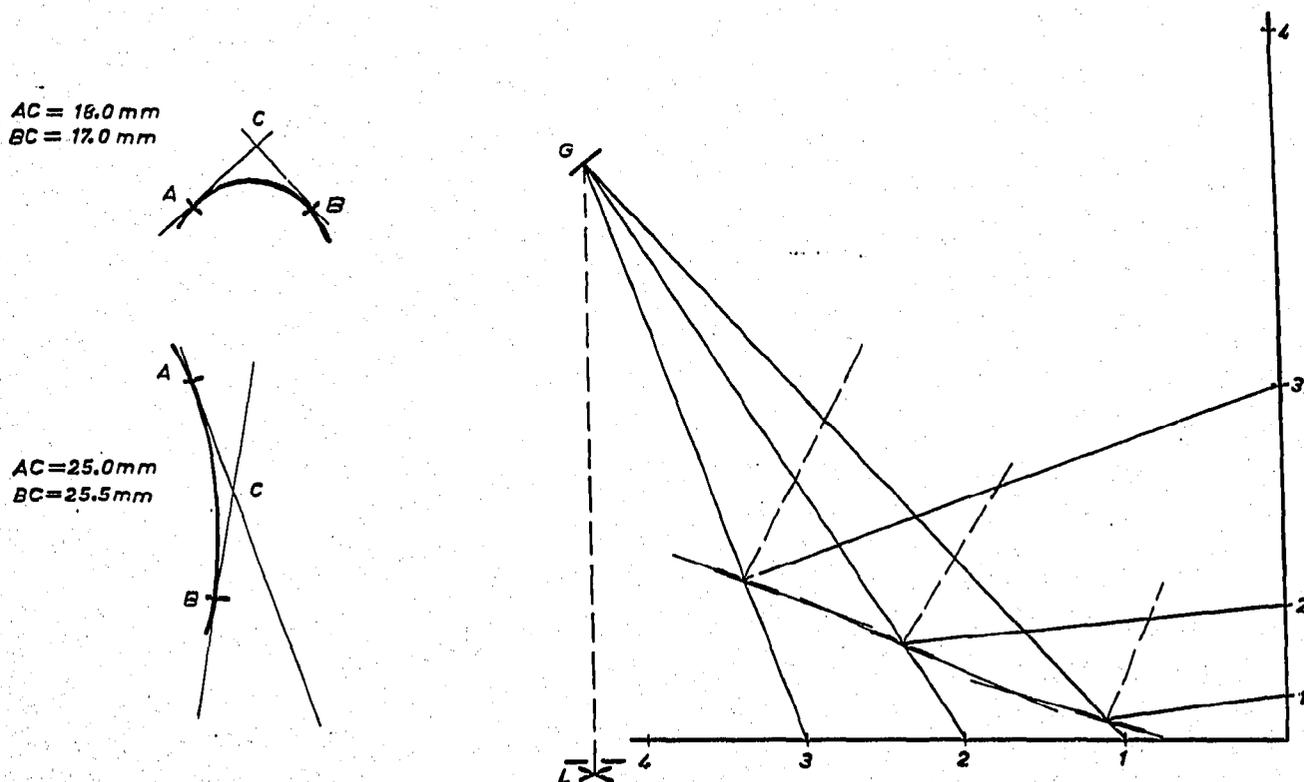


Fig. 1. Links: Die Tangentenabschnitte AC und BC sind annähernd gleich. Rechts: Zeichnerische Darstellung der Lage der Elementarspiegel der Spiegelkurve.

Die Unbestimmtheit dieser Lage wird auf einen engen Bereich eingeschränkt durch die Forderung, dass der reflektierte Lichtstrahl nur mit einer  $20^\circ$  nicht übersteigenden Parallaxe in die Photozelle des Nachlaufschreibers einfallen darf. Diese Einschränkung ergibt sich aus dem Bau der Photozelle.

Von einer Parallaxe von etwa  $5^\circ$ – $10^\circ$  für den Anfang der Spiegelkurve ausgehend, haben wir mit Hilfe eines durchsichtigen Lineals und Winkeltransporteurs auf den

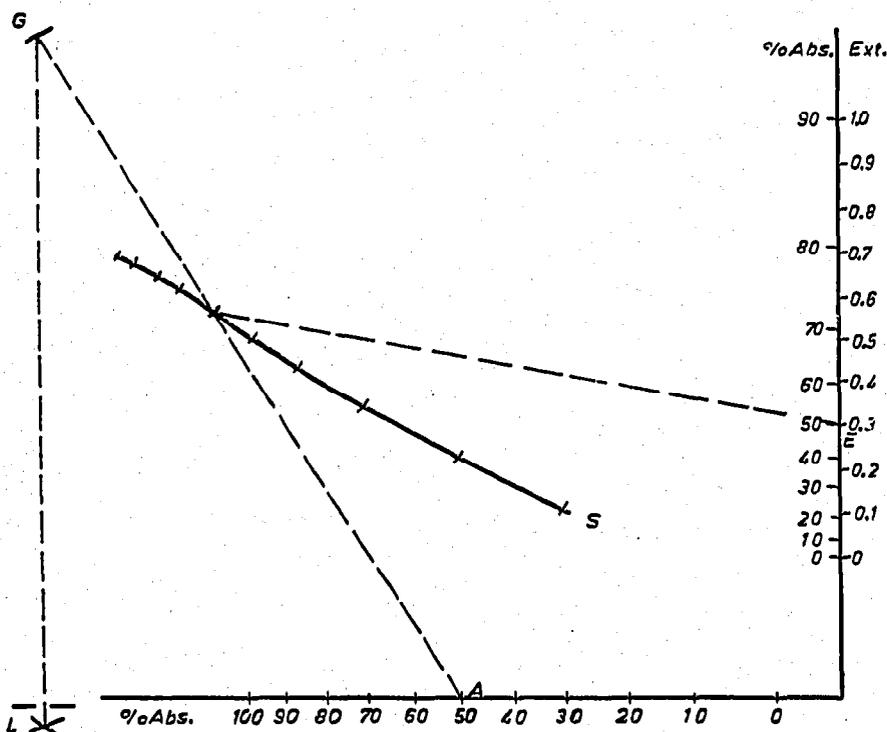


Fig. 2. Aufstellung von Galvanometer G, Spaltlampe L, Kurvenspiegel S, Absorptions- und Extinktionsskala. 1. Aufstellungsart.

Strahlen des Galvanometerspiegels die Lagen der Elementarspiegel so aufgezeichnet, dass obige Bedingungen, nämlich Erfüllung des Reflexionsgesetzes und Gleichheit der Tangentenabschnitte, erfüllt werden.

Die Aufstellung von 10 Elementarspiegeln im Bereich von 0–90% Absorption ( $E = 0$ – $1.0$ ) gibt bereits ausreichend Auskunft über den Verlauf der Spiegelkurve.

Obige Forderungen werden von den in Fig. 2 und 3 dargestellten Anordnungen von Galvanometer, Kurvenspiegel und Skalen erfüllt. Der vom Galvanometerspiegel zunächst nach A fallende Lichtstrahl wird vom Kurvenspiegel S der Extinktion entsprechend nach E reflektiert und fällt dabei stets mit einer unter  $20^\circ$  liegenden Parallaxe in die Photozelle des Nachlaufschreibers.

Wie bei GRUBHOFER, ergeben sich unsymmetrische, S-förmige Spiegelkurven. Wir haben bei unserem Gerät die Aufstellung nach Fig. 2 verwirklicht, weil uns hierbei in einfacher Weise, durch Teilung des Lichtstrahls, gleichzeitige Steuerung des Nachlaufschreibers und Beobachtung der Absorptionsskala ermöglicht wird. Dies erleichtert die durch Regulierung des Photostroms der Messzelle erfolgende Einstellung des Galvanometerausschlags auf die Skalenlänge (s.u.).

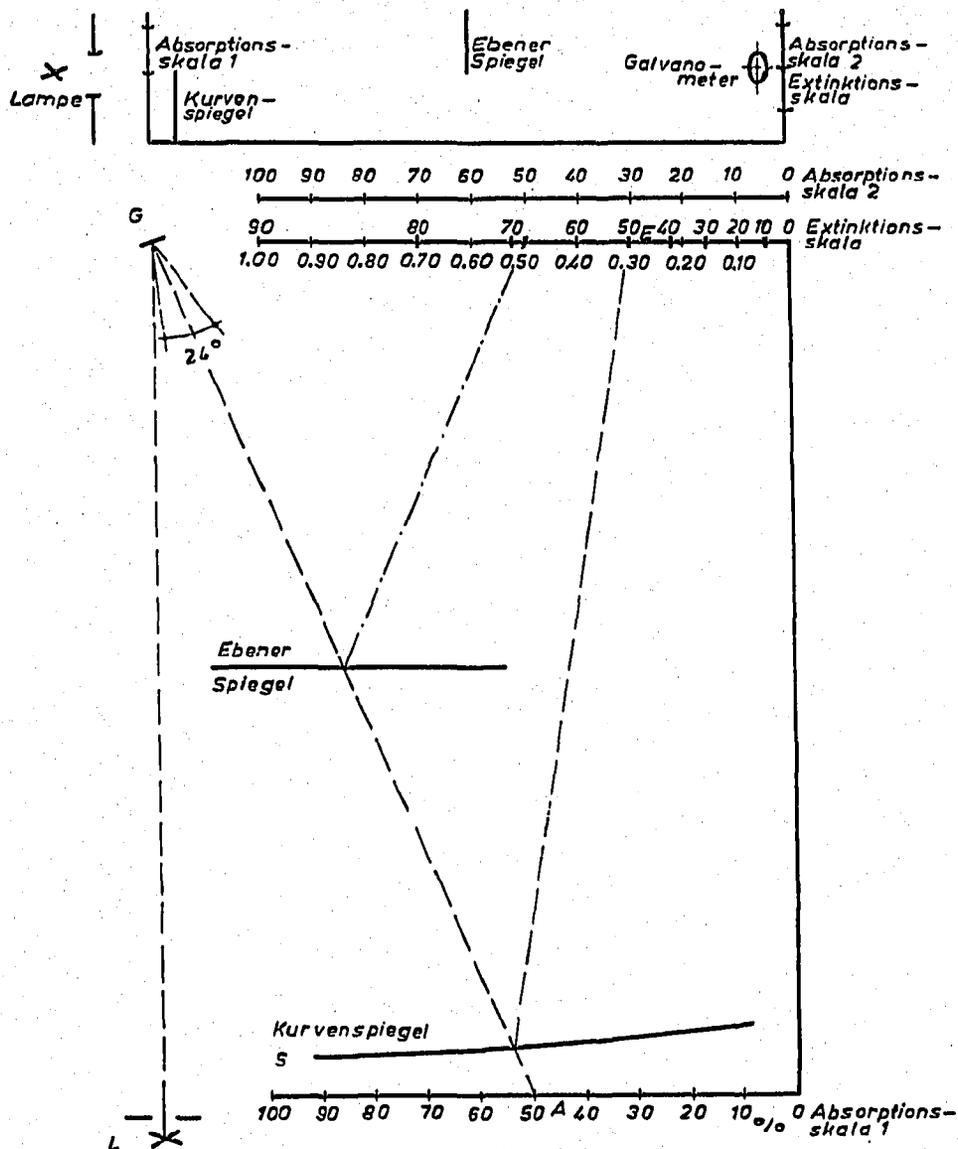


Fig. 3. Aufstellung von Galvanometer G, Spaltlampe L, Kurvenspiegel S, Absorptions- und Extinktionsskala. 2. Aufstellungsart.

*Stufenkeil*

Die Eichung und Justierung unseres Geräts erfolgte an Hand eines Stufenkeils. Wir haben uns denselben angefertigt, indem wir 10 Streifen aus 0.05 mm dicker Lupolenfolie treppenartig über einander legten und die Enden der einzelnen Folien mit einander verschweissten.

Absorption und Extinktion wurden für jede Stufe im Unicam bei 500 mμ gemessen.

Daten des Keils: Breite = 4.0 cm; Länge = 15 cm; Länge/Stufe = 1.5 cm; Länge bis zur Schweissstelle = 25 cm.

Stufe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Absorption	21	38	50.5	61.3	69.8	75.5	80.9	85.0	87.2	89.8
Extinktion	0.103	0.206	0.306	0.412	0.518	0.610	0.720	0.820	0.899	0.990

### Aufstellung des Geräts

Fig. 4 veranschaulicht die Vereinigung der Bauelemente (Photometerbank = I, Galvanometer und Kurvenspiegel = II, Nachlaufschreiber = III) zu einem vollautomatischen Extinktionenschreiber.

*I. Photometerbank.* Als Photometerbank haben wir das mit einer Selenzelle arbeitende Chromatometer 3b der Fa. Bruno Lange verwendet. Das Chromatogramm wird hier auf einem Schlitten, der von einem Synchronmotor bewegt wird, unter der

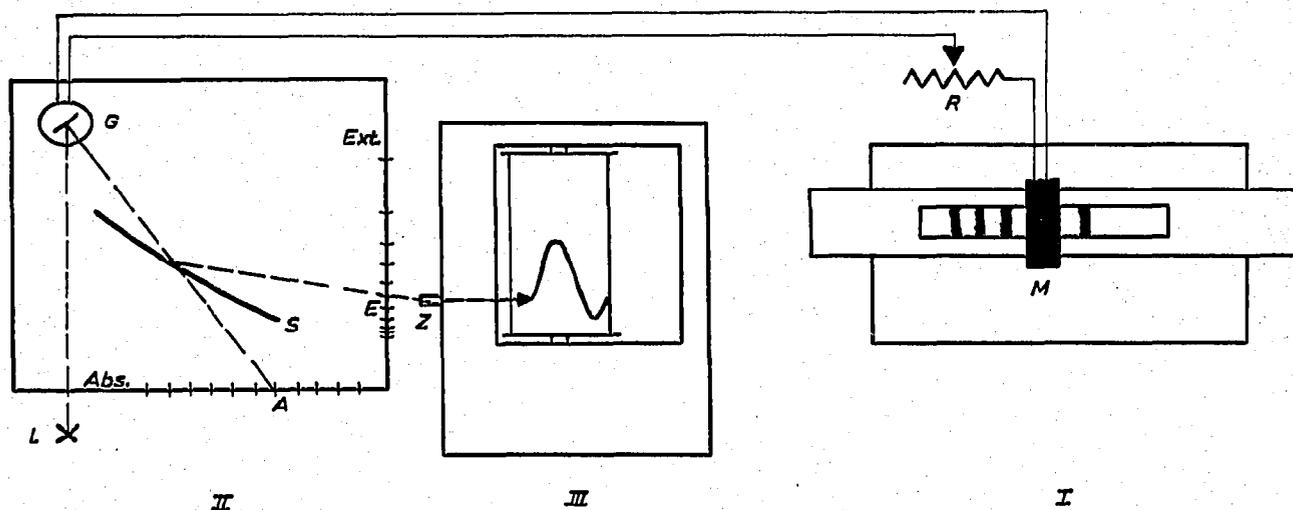


Fig. 4. Zusammenstellung der Bauelemente (schematisch). I = Photometerbank mit Photozelle M; II = Spiegelvorrichtung mit Galvanometer G, Spallampe L, Kurvenspiegel S; III = Nachlaufschreiber mit Photozelle Z zum Steuern der Schreibfeder.

Photozelle vorbeigeführt. Schlittenlänge = 40 cm, Spaltbreite = 1 mm, Spallänge (variabel) bis 40 mm. Der Vorschub ist in Stufen wählbar; 2.8 cm/min haben sich als günstig erwiesen.

Für unseren Zweck haben wir an dem Chromatometer einige Abänderungen vorgenommen:

(a) Um in monochromatischem Licht messen zu können, haben wir einen Halter für Interferenzfilter (50 × 50 mm) zwischen Lampe und Spalt eingebaut. Wir benutzen die Doppellinienfilter (DIL) von Schott u. Gen., Mainz.

(b) Wir ersetzen in dem Chromatometer die 4 Volt-Einfadenlampe (8 W) durch die kleine Osram-Soffittenlampe No. 6452 (6 V, 15 W), die über einen Netzstabilisator betrieben wird.

(c) Der Spalt wird mit einer matten Perlonfolie unterlegt, um das Licht leicht diffus zu machen.

(d) Die hochklappbare Photozelle M muss bei der Messung stets die gleiche Lage einnehmen. Wir sichern dies durch Anbringen eines Anschlags an der Photozelle M.

(e) Von der Photozelle muss sorgfältig alles Nebenlicht ferngehalten werden. Da die angebrachte Vorrichtung ("Vorspalt") dafür nicht ausreicht, decken wir die Photozelle noch zusätzlich mit einem schwarzen Tuch ab.

*II. Galvanometer und Kurvenspiegel.* Das Galvanometer G, der Kurvenspiegel S  
Literatur S. 445.

und die Lampe L für die Lichtmarke werden auf einer schweren, auf Weichgummipuffern ruhenden Aluminiumgrundplatte erschütterungsfrei aufgestellt.

(a) Das hoch stromempfindliche Galvanometer, Type SSG 11 von Ruhstrat, hat eine Stromkonstante  $c_i = 3.5-5.0 \cdot 10^{-9}$  mA/mm/m, einen inneren Widerstand  $R_g = 1000 \Omega$  und eine Schwingungsdauer von 0.6–0.88 sec.

(b) Die Lichtmarke liefert uns eine Quecksilberdampfampe (Osram HgQS 500, 120 W), die in einem gekühlten Gehäuse brennt. In dem Mantel dieses Gehäuses wurde ein 5 cm langer und 3 mm breiter Spalt ausgespart. Es entsteht eine kräftige Lichtmarke, welche den Nachlaufschreiber gut steuert. Es kann natürlich jede andere Lichtquelle verwendet werden, die eine genügend kräftige Lichtmarke gibt.

(c) Für den Kurvenspiegel wird ein 25–30 cm langes, 2 cm breites und 0.4–0.5 mm starkes Federstahlband verwendet, das auf Hochglanz poliert und anschliessend verchromt wird. Es wird auf einem Block in solcher Höhe montiert und justiert, dass die Lichtmarke des Galvanometers halbiert wird. Die obere Hälfte des Lichtstrahls fällt direct nach A auf die Absorptionsskala, die untere Hälfte wird der Extinktion entsprechend nach E reflektiert und steuert dort den Nachlaufschreiber.

Der biegsame Spiegel wird von kleinen Winkeln festgehalten. Durch Verschieben dieser Winkel auf der Unterlage wird beim Justieren das spiegelnde Band zu der Spiegelkurve gebogen und in dieser Lage fixiert.

(d) Die Absorptions- und Extinktionsskalen (s. Fig. 2 und 4) werden auf matten Plexiglasstreifen aufgezeichnet.

*III. Nachlaufschreiber.* Wir benutzen den Nachlaufschreiber nach Wilhelmi der Fa. Bruno Lange mit einer Schreibbreite von 20 cm. Nachdem der Messbereich auf Extinktionen von 0–1.0 beschränkt wurde, entspricht 1 cm Schreibhöhe einer Extinktion 0.05.

Die Wechsel-Radgetriebe sind in Chromatometer und Nachlaufschreiber derart auf einander abgestimmt, dass der Vorschub von Chromatogramm und Registrierpapier mit gleicher Geschwindigkeit oder in einem wählbaren Geschwindigkeitsverhältnis erfolgen kann. In den meisten Fällen werden gleiche Vorschubgeschwindigkeiten erwünscht sein.

*Regelwiderstand.* R ist ein im Galvanometerkreis liegender Regelwiderstand, der in Grob- und Feinregulierung ( $1.3 M\Omega + 10 k\Omega$ ) unterteilt ist. Er dient zur Abstimmung des von Spalllänge und Transparenz des Chromatogramms abhängigen Photostroms auf den der Absorption bzw. Extinktion o entsprechenden Galvanometerausschlag.

### *Justierung des Kurvenspiegels*

Die Absorptions- und Extinktionswerte des für die Justierung benutzten Stufenkeils wurden bei 500 m $\mu$  gemessen. Dementsprechend muss das Interferenzfilter für die Wellenlänge 500 m $\mu$  in das Chromatometer eingesetzt werden.

Zunächst zeichnet man die Extinktionsskala (0–1.0) auf und legt die Endpunkte der Absorptionsskala, 0 und 100% Absorption, willkürlich fest. Wir haben beide Skalen 20 cm lang gemacht.

Man legt den Stufenkeil auf den Schlitten des Chromatometers und stellt die Länge des Spaltes der Messzelle M der Breite des Stufenkeils entsprechend ein. Zunächst lässt man die Messzelle unbeleuchtet und stellt die Lichtmarke des stromlosen Galvanometers auf der Absorptionsskala auf den Fixpunkt 100% ein. Ohne den Keil unter die Messzelle zu bringen, wird dann die Spaltbeleuchtung im Chromatometer ein-

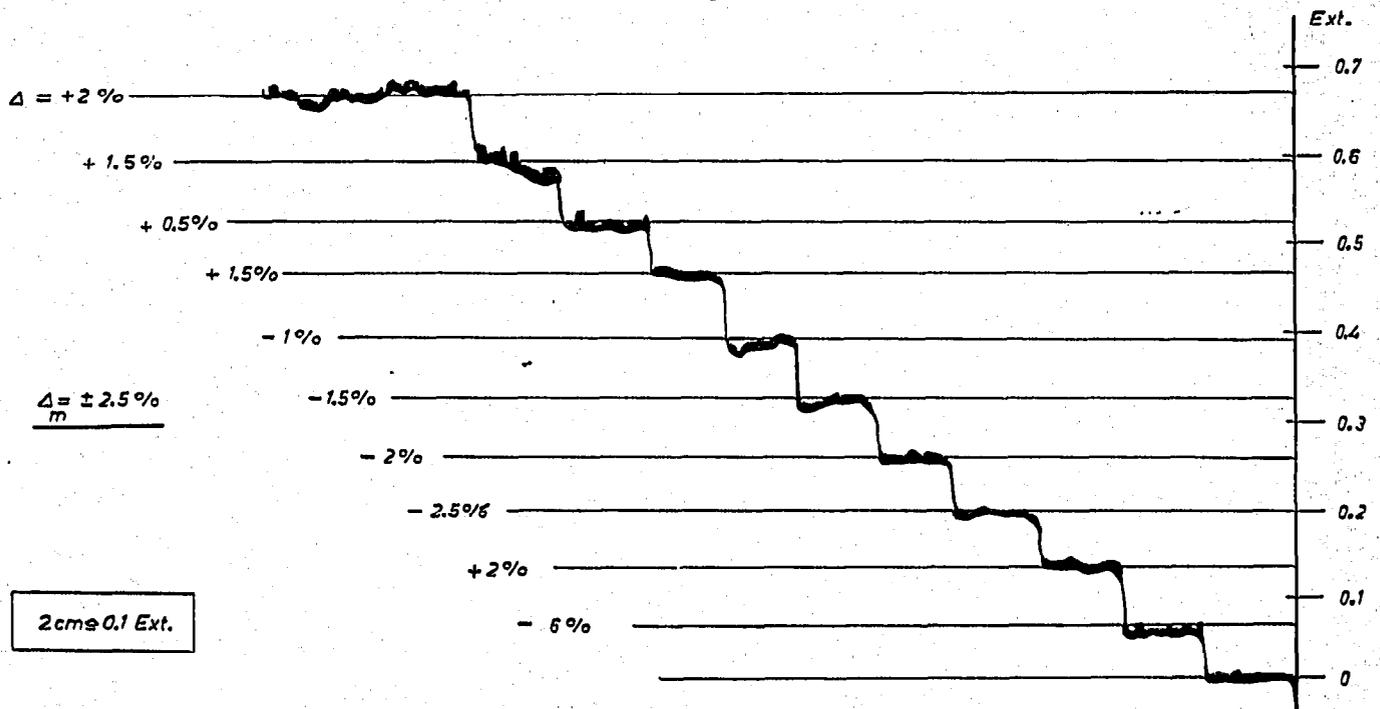


Fig. 5. Geschriebene Extinktionskurve des Stufenkeils. 500 m $\mu$ .

geschaltet und der Photostrom mit dem Widerstand R so reguliert, dass die Lichtmarke jetzt auf dem anderen Fixpunkt 0% steht. Anschliessend wird der Stufenkeil durchgezogen und für jede der bekannten Absorptionen die Lage der Lichtmarke angezeichnet. Die Absorptionsskala ist nicht linear, sondern folgt im Prinzip einer tg-Funktion. Da wir mit einem Galvanometerausgang bis zu 28° arbeiten, macht sich die Verdrillung des Spannbändchens zusätzlich bemerkbar. Es war daher vorzuziehen auch die Absorptionsskala auf Grund empirischer Daten zu eichen.

Das Spiegelband wird zunächst in der zeichnerisch ermittelten (s. Fig. 2), annähernd richtigen Lage aufgestellt. Die eigentliche Justierung erfolgt, indem man unter Regulierung des Photostroms mit dem Widerstand R die Absorptionsskala Punkt für Punkt abtastet. Dabei wird jeweils durch Verschieben der Haltewinkel die Lage des betreffenden Spiegelabschnitts derart corrigiert, dass der reflektierte Teil der Lichtmarke auf den Absorption entsprechenden Punkt der Extinktionsskala fällt. Es ist vorteilhaft bei der Justierung vom Wendepunkt der Spiegelkurve, der bei 60% Absorption liegt, auszugehen. Mit 15 Winkelpaaren lässt sich das spiegelnde Stahlband in der Spiegelkurve festlegen.

Zur Kontrolle der Justierung wurde mit dem Apparat anschliessend die Extinktionskurve des Stufenkeils geschrieben (Fig. 5). Bei unserem modellmässig aufgestellten Gerät beträgt die mittlere Abweichung von den Sollwerten  $\pm 2.5\%$ .

*Registrierung der Extinktionskurve*

Das Chromatogramm wird in bekannter Weise transparent gemacht und auf den Schlitten des Chromatometers gelegt. Die Länge des Spaltes der Messzelle wird auf die Breite der auszuwertenden Zonen eingestellt. GRASSMANN UND HANNIG<sup>2</sup> haben gezeigt, dass nur unter dieser Voraussetzung quantitativ auswertbare Extinktionskurven erhalten werden. Wenn die gefärbten Zonen die Länge des Spalts nicht ausfüllen, werden zu niedrige Extinktionen registriert. Dieser Fehler hängt von der Verteilung des Farbstoffs über die Spaltlänge sowie von der Grösse der Extinktion ab. Bei höheren Extinktionen wird der Fehler sehr erheblich.

Bevor die Spaltbeleuchtung der Messzelle eingeschaltet wird, kontrolliert man die Lage der Lichtmarke des Galvanometers. Sie soll auf 100% Absorption stehen; nötigenfalls wird die Stellung des Galvanometerspiegels korrigiert. Dann bringt man eine ungefärbte Stelle des Chromatogramms unter den Spalt der Photozelle, schaltet die Spaltbeleuchtung ein und stellt die Lichtmarke durch Regeln des Photostroms mit dem Widerstand R auf 0% Absorption ein.

Jetzt werden die Motore für die Registriertrommel des Nachlaufschreibers und den Vorschub des Chromatogramms in Gang gesetzt und die Extinktionskurve geschrieben.

*Quantitative Auswertung der Extinktionskurven*

Wir planimetrieren unsere Kurven durch Ausschneiden und Wägen der Papierstücke.

Die Proportionalität von Dosis und Extinktionskurvenfläche wurden an Modell-elektropherogrammen des Farbstoffs Neucoccin nachgeprüft.

Zunächst wurde der einer Kolorimetrie in Lösung entsprechende, optimale Fall untersucht, bei dem die farbigen Zonen auf völlig durchsichtigem Untergrund stehen. Die Testpherogramme wurden durch Elektropherieren des Farbstoffs in Agargel hergestellt. Als Träger für die Gelschicht diente Tesa- oder Cellophanfolie. Nach dem Trocknen erhält man die Pherogramme als klar durchsichtige Filme. Es wurden genau dosierte Mengen Farbstofflösung in bekannter Weise in Filterpapierstreifen aufgesaugt und diese auf das Gel gelegt. Durch Wahl von Streifenbreite und Farbstoffkonzentration wurde dabei die Gestalt der Extinktionskurven variiert, so dass nach Wunsch hohe und schmale neben niedrigen und breiten Kurven erhalten wurden.

Fig. 6 zeigt die lineare Beziehung zwischen Dosis und Extinktionskurvenfläche.

Nachfolgend sei auf einen Punkt hingewiesen, der unseres Wissens bei der direkten photometrischen Auswertung von Pherogrammen bisher noch nicht beachtet wurde.

Bei transparent gemachten Papieren beobachtet man einen Einfluss des Transparenzgrades auf die Höhe der Extinktionskurven. Diesen Effekt veranschaulicht Fig. 7. Sie zeigt die Extinktionskurven eines Testpherogramms auf Whatman No. 1, bei dem nacheinander durch Einbetten in Flüssigkeiten von verschiedenem Brechungs-exponenten unterschiedliche Grade der Lichtdurchlässigkeit hergestellt wurden.

I = eingebettet in  $\alpha$ -Bromnaphthalin,  $n_D^{20}$  1.6587; Durchlässigkeit bei 500 m $\mu$  = 2.1%.

II = eingebettet in Paraffinöl,  $n_D^{20}$  1.4812; Durchlässigkeit bei  $500\text{ m}\mu = 4.8\%$ .

III = eingebettet in Transparenzöl (200 ml  $\alpha$ -Bromnaphthalin + 250 ml Paraffinöl,  $n_D^{20}$  1.5599; Durchlässigkeit bei  $500\text{ m}\mu = 17.4\%$ .

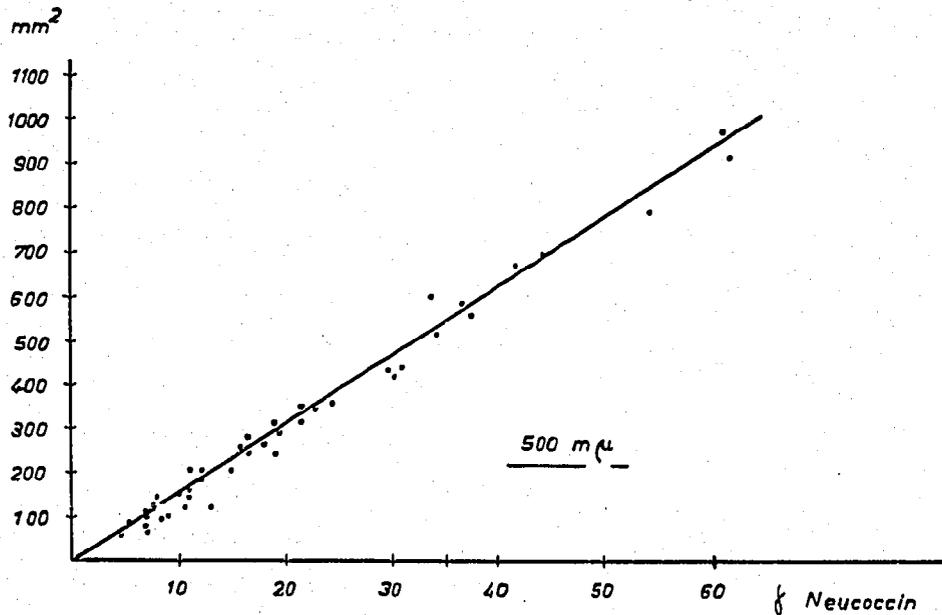


Fig. 6. Beziehung zwischen Substanzdosis und Fläche der Extinktionskurve. Tests substanz = Neucoccin.

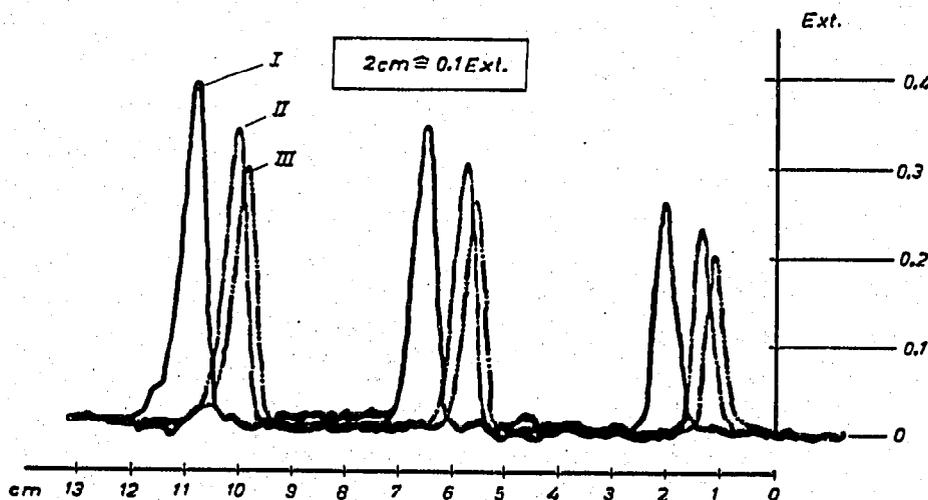


Fig. 7. Abhängigkeit der Höhe der Extinktionskurven vom Transparenzgrad des Papiers. Test-pherogramm bei verschiedenen Graden der Lichtdurchlässigkeit ausgemessen. Tests substanz = Neucoccin.  $500\text{ m}\mu$ . I = 2.1% Durchlässigkeit; II = 4.8% Durchlässigkeit; III = 17.4% Durchlässigkeit.

Zum Vergleich seien die Durchlässigkeiten von Glas, Cellophanfolie und nicht transparent gemachtem Whatmanpapier bei  $500\text{ m}\mu$  angeführt:

Whatman No. 1, 0.15 mm dick; Durchlässigkeit = ca. 0.1%  
 Glas, 2 mm dick; Durchlässigkeit = 84%  
 Cellophanfolie, 0.04 mm dick; Durchlässigkeit = 87.5%

Die Kurven der Fig. 7 zeigen deutlich, dass mit abnehmender Transparenz des  
 Literatur S. 445.

Papieruntergrundes höhere Extinktionen registriert werden. Dies erklärt sich durch die bei geringerer Transparenz stärker in Erscheinung tretenden Lichtbrechungen und -reflektionen an den Papierfasern; mit abnehmender Transparenz wird der Weg des durchfallenden Lichtstrahls im Papierfilz verlängert; die Elementarküvetten werden scheinbar dicker.

Bei gleichbleibendem Transparenzgrad des Papieruntergrundes gilt jedoch die Proportionalität von Dosis und Extinktionskurvenfläche (Tabelle I).

TABELLE I

<i>Neurococcindosis</i>	<i>Kurve I</i> <i>Transparenz = 2.1%</i>		<i>Kurve II</i> <i>Transparenz = 4.8%</i>		<i>Kurve III</i> <i>Transparenz = 17.4%</i>	
	<i>mm</i> <sup>2</sup>	<i>mm</i> <sup>2</sup> / <i>γ</i> <i>Neurococcin</i>	<i>mm</i> <sup>2</sup>	<i>mm</i> <sup>2</sup> / <i>γ</i> <i>Neurococcin</i>	<i>mm</i> <sup>2</sup>	<i>mm</i> <sup>2</sup> / <i>γ</i> <i>Neurococcin</i>
6.4 <i>γ</i>	262	41	192	30	176	27.6
9.55 <i>γ</i>	360	38	294	31	256	26.8
11.75 <i>γ</i>	478	40.7	382	32	335	28.5
i.M.		39.9		31.0		27.6

Zonenbreite = Spaltlänge = 38 mm; 500 m $\mu$ .

Die Kurvenflächen I sind 44% grösser als die Kurvenflächen III.

Da es schwierig ist die Lichtdurchlässigkeit der Papiere mit der notwendigen Genauigkeit zu reproduzieren, sind die Extinktionskurvenflächen verschiedener Chromatogramme oder Pherogramme für quantitative Bestimmungen nicht unmittelbar mit einander zu vergleichen.

Wir tragen daher auf den auszuwertenden Papierstreifen nachträglich eine genau dosierte Menge eines Farbstoffs, dessen Absorptionsmaximum mit der auszuwertenden Färbung überein stimmt, der Zonenbreite entsprechend als Strich auf und nehmen dessen Extinktionskurvenfläche als Bezugsgrösse für die quantitative Bestimmung. Es ergeben sich Umrechnungsfaktoren, welche das Verhältnis der Kurvenflächen für gleiche Dosen Bezugsfarbstoff und Substanz angeben; sie sind unabhängig von Unterschieden in der Transparenz des Papiers und den sich daraus ergebenden Unterschieden in der Höhe der registrierten Extinktionen.

Der Einfluss des Transparenzgrades des Papiers auf die Höhe der registrierten Extinktionen nimmt mit steigender Lichtdurchlässigkeit der geölten Papiere stark ab und macht sich bei hoher Lichtdurchlässigkeit nicht mehr störend bemerkbar. Ein solcher Fall liegt z.B. bei hochacetylierten Papieren vor, die in Paraffinöl 60% Lichtdurchlässigkeit erreichen. Bei diesen ist die Beziehung auf einen Farbstoff überflüssig; vielmehr kann die Substanzmenge direct in Beziehung zur registrierten Kurvenfläche gesetzt werden. Dem Extinktionskoeffizienten der Absolutkolorimetrie entspricht in diesem Falle eine bestimmte, konstante Fläche der Extinktionskurve bei Einheitsbedingungen, d.h. bei 1  $\gamma$  Substanz, verteilt auf 1 cm Spaltlänge. Der zahlenmässige Wert dieser Fläche, die man "spezifische Extinktionskurvenfläche" nennen könnte, hängt natürlich vom Massstab der Extinktionsschreibung ab.

#### *Auswertung von Aminosäurechromatogrammen*

Die Chromatogramme werden in bekannter Weise hergestellt, wobei sich nach

*Literatur S. 445.*

unseren Erfahrungen besonders harte Papiere, wie z.B. Schleicher u. Schüll 2045 aM und agl gut bewähren. Als Laufmittel bevorzugen wir Propanol–Ameisensäure–Wasser (75:13:12) und ähnliche Lösungsmittelsysteme. Die Auftrennung der langsam wandernden Aminosäuren ( $R_F < 0.5$ ) wird durch mehrmaliges Laufenlassen des Chromatogramms sehr verbessert.

Gut auswertbare Färbungen erzielen wir mit dem von uns angegebenen Ninhydrin–Cd-Reagens<sup>3,4</sup>; die Farbe entwickelt sich in 24 Stunden bei Zimmertemperatur vollständig und beginnt erst nach weiteren 24 Stunden merklich abzublassen. Das Chromatogramm ist sorgfältig vor allen Ammoniakspuren aus der Raumluft zu schützen, sonst entstehen störende Rotfärbungen des Papieruntergrundes.

Als günstigen Dosierungsbereich fanden wir 0.3–1.2  $\gamma$  an einzelner Aminosäure/cm Startlinie.

Da bei der Chromatographie von Aminosäuren normale Cellulosepapiere angewendet werden, die in Transparenzöl nur mässige Lichtdurchlässigkeit, etwa 17%, erreichen, ist es notwendig, bei der photometrischen Auswertung die Extinktionskurven auf einen Standardfarbstoff zu beziehen. Bei der Ninhydrin–Cd-Färbung der Aminosäuren ist Neucoccin dafür geeignet. Die genau dosierte Farbstoffmenge wird nach der Ausfärbung der Aminosäurezonen als Strich aufgetragen; Dosis 8–10  $\gamma$ /cm.

Zum Transparentmachen verwenden wir  $\alpha$ -Bromnaphthalin–Paraffinöl (200:250). Das Chromatogramm muss luftblasenfrei und völlig in Transparenzöl eingebettet zwischen die Glasplatten des Chromatometerschlittens gebracht werden. Es ist falsch, das getränkte Chromatogramm vor Auflegen auf den Chromatometerschlitten zwischen Filterpapier abzulöschen, weil dabei die Lichtdurchlässigkeit auf 2.5–3% herabsinkt und zudem die Gefahr einer ungleichmässigen Transparenz längs des Papierstreifens besteht.

Mit genau dosierten Modellchromatogrammen wurde für die einzelnen Aminosäuren der "Neucoccinfaktor" ermittelt, d.h. der Faktor für die Umrechnung von Neucoccin auf die betreffende Aminosäure. Er ist das Verhältnis der Dosen von Aminosäure und Neucoccin, welche gleiche Extinktionskurvenflächen geben.

$$x = \frac{A \times y}{N} \times F_N$$

$x$  = gesuchte Aminosäuremenge  
 $A$  = Fläche der Aminosäurekurve  
 $N$  = Fläche der Neucoccinkurve  
 $y$  = Neucoccindosis  
 $F_N$  = Neucoccinfaktor

Wir haben die Neucoccinfaktoren für 15 Aminosäuren ermittelt und gefunden, dass sie sich in Gruppen aufteilen. Ein Zusammenhang mit der chemischen Konstitution der Aminosäuren ist dabei nicht zu erkennen.

Ähnliche Unterschiede zeigen sich auch in den Extinktionskoeffizienten, wenn der Farbstoff aus dem Papier mit Methanol eluiert und kolorimetriert wird. Der Fehler liegt bei der directen photometrischen Auswertung der Chromatogramme bei  $\pm 6\%$ ; bei der Kolorimetrie des Farbstoffs im methanolischen Eluat fanden wir einen durchschnittlichen Fehler von  $\pm 5\%$ .

$F_N \approx 0.06$	$F_N \approx 0.1$	$F_N \approx 0.14 - 0.16$	$F_N = 0.19$
Ala Ser Val	Glu Leu Ileu Lys Met Orn Thre	Asp Gly Phe Tyr	His

Schwierigkeiten macht sowohl bei der Directphotometrie als auch bei der Kolorimetrie des eluierten Farbstoffs die Bestimmung von Gly. Bei der Auswertung der Extinktionskurven liegt die Fehlerbreite für Gly bei  $\pm 10\%$ . Die Elution des von Gly mit dem Ninhydrin-Cd-Reagens gebildeten Farbstoffs mit Methanol gelingt nur sehr unvollständig, so dass der Fehler bei der Kolorimetrie dieses methanolischen Extrakts eher noch grösser ist.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Es wird eine einfache Apparatur zum Schreiben der Extinktionskurven von Chromatogrammen und Pherogrammen beschrieben, die zum grössten Teil aus bekannten, käuflichen Geräten aufgebaut ist. Der einzige zusätzliche Teil ist ein elastisches, verspiegeltes Stahlband, das derartig zu einer Kurve gebogen wird, dass die von diesem Kurvenspiegel reflektierte Lichtmarke des Galvanometers die Extinktion anzeigt. Die Wanderung der Lichtmarke wird von einem Nachlaufschreiber als Extinktionskurve registriert.

Mit diesem Gerät wird an der quantitativen Bestimmung von Aminosäuren die Directphotometrie von Chromatogrammen demonstriert, wobei zugleich die experimentellen Bedingungen für derartige quantitative Bestimmungen angegeben werden.

#### SUMMARY

A simple apparatus is described with which the extinction curves of chromatograms and pherograms can be traced. It is constructed for the greater part from well-known commercial instruments, the only additional part consisting of a mirror made from a flexible steel band, which is bent into such a curve that a galvanometer light-spot reflected from this curved mirror indicates the extinction. The movement of the light-spot is registered as an extinction curve by means of a recorder.

The quantitative determination of amino acids is given as an example of direct photometry of chromatograms with this apparatus. The experimental conditions for such quantitative determinations are also discussed.

#### LITERATUR

- <sup>1</sup> N. GRUBHOFER, *Z. Naturforsch.*, 11b (1956) 44.
- <sup>2</sup> W. GRASSMANN UND K. HANNIG, *Z. physiol. Chem.*, 290 (1952) 1.
- <sup>3</sup> J. BARROLIER, *Naturwiss.*, 42 (1955) 416.
- <sup>4</sup> J. HEILMANN, J. BARROLIER UND E. WATZKE, *Z. physiol. Chem.*, 309 (1957) 219.

Eingegangen den 2. April 1958