

ÜBER EINE VEREINFACHUNG DER QUANTITATIVEN BESTIMMUNG  
VON AMINOSÄUREN AN AUSTAUSCHERSÄULEN  
MIT DER MÖGLICHKEIT  
GLEICHZEITIGER QUALITATIVER UNTERSUCHUNGEN\*

WERNER MATTHIAS

*Institut für Pflanzenzüchtung der Deutschen Akademie der  
Landwirtschaftswissenschaften, Quedlinburg (Deutschland)*

(Eingegangen den 10. Januar 1961)

Die verschiedenen Methoden der Säulenchromatographie und der Papierchromatographie sind die z. Zt. am meisten verwendeten und leistungsfähigsten Verfahren zur Bestimmung von Aminosäuren. Die Papierchromatographie ist für die qualitative Analyse von Aminosäuren vor allem durch die Einfachheit der Handhabung und den geringen apparativen Aufwand allen anderen Methoden gleich guter Trennwirkung überlegen. Sie wurde in vielen Fällen auch zur quantitativen Bestimmung von Aminosäuren herangezogen, doch ist die Leistungsfähigkeit dieser Methode hier noch sehr begrenzt und die Fehlerbreite noch zu gross, um eindeutig gesicherte und reproduzierbare Werte liefern zu können. Bei Untersuchungen, die eine exakte quantitative Bestimmung erfordern, ist es daher angebracht, der Säulenchromatographie als der z. Zt. leistungsfähigsten Methode auf diesem Gebiet den Vorzug zu geben und hier besonders der von MOORE, STEIN UND SPACKMAN entwickelten Chromatographie an Ionenaustauschern entweder mit Hilfe eines Fraktionssammlers<sup>2</sup> oder aber unter Verwendung der vollautomatischen Apparatur der gleichen Autoren<sup>3</sup> bzw. der vereinfachten Ausführung dieser Methode von HANNIG<sup>4</sup>.

Der Nachteil all dieser säulenchromatographischen Verfahren liegt darin, dass keine Möglichkeit besteht, neben der quantitativen Bestimmung der einzelnen Gipfel einer Elutionskurve auch eine qualitative Prüfung auf ihre Identität und Einheitlichkeit durchzuführen bzw. unbekannte Komponenten zu identifizieren, da die gesamte Menge jeder Fraktion für die quantitative Auswertung restlos verbraucht wird. Diese Methoden sind daher in erster Linie für die Bestimmung von Aminosäuren in Proteinhydrolysaten geeignet, jedoch für die Bestimmung unbekannter Naturprodukte, z.B. freier Aminosäuren in biologischem Material, bei denen Identitätsprüfungen unerlässlich sind, nicht ausreichend.

Wir entwickelten daher auf der Grundlage des Verfahrens von MOORE, SPACKMAN UND STEIN<sup>2</sup> eine chromatographische Apparatur, die die Möglichkeit bietet, in einem Trennvorgang ausser der quantitativen Bestimmung auch eine spezielle qualitative

\* Siehe auch Lit.<sup>1</sup>.

Untersuchung eines jeden Elutionsgipfels durchzuführen. Darüber hinaus wird durch eine weitgehende Vereinfachung der quantitativen Auswertung der Fraktionen eine so erhebliche Einsparung an Zeit und Reagenzien erzielt, dass mit dem sonst für eine Analyse notwendigen Aufwand mehrere Analysen nebeneinander durchgeführt werden können.

Das Prinzip der Methode besteht darin, dass jede 1-ml-Fraktion des Eluates einer Austauschersäule mit Hilfe eines elektronischen Programmreglers alternierend in eine Test- und eine Hauptfraktion zerlegt wird; die Testfraktionen werden halbquantitativ getestet und die Hauptfraktionen auf Grund dieser Testung im Bereich jedes einzelnen Gipfels zu jeweils einer Gesamtfraktion zusammengefasst. Die quantitative Bestimmung erfolgt in einem aliquoten Teil jeder Gipfelfraktion, so dass anschliessend ausreichende Mengen für weitere Untersuchungen zur Verfügung stehen. Die Anzahl der quantitativen Einzelbestimmungen verringert sich auf diese Weise von ca. 300–600 auf die Zahl der vorhandenen Gipfel, also auf etwa 20 Bestimmungen.

### *Säule*

### METHODISCHES

Die chromatographische Trennung wird an Ionenaustauschern durchgeführt und zwar an Amberlite IR 120 (CG 120) mit einer nach dem Flotationsverfahren von HAMILTON<sup>5</sup> ausfraktionierten einheitlichen Korngrösse von ca. 50  $\mu$ . Die Säulenlänge beträgt für die Bestimmung der sauren und neutralen Aminosäuren 160 cm, für die Bestimmung der basischen Aminosäuren 25 cm; der Durchmesser der Säule ist in beiden Fällen 0.9 cm. Die Rohrfüllung erfolgt nach den Angaben von MOORE, SPACKMAN UND STEIN<sup>2</sup>, ebenso die Elution mit den von den gleichen Autoren verwendeten Pufferlösungen. Die Untersuchungssubstanz wird in einer Menge von 0.2–0.3  $\mu$  Mol je Aminosäure oder 1–3 mg hydrolysierten Proteins in einer Lösung von 0.1–1 ml im pH-Bereich 2.0–2.5 auf die Säule gegeben. Die Trennung erfolgt bei einer Temperatur von 50°, die durch einen Umlaufthermostaten konstant gehalten wird. Die sauren und neutralen Aminosäuren werden mit 0.2 N Na-Citratpuffer eluiert und zwar zunächst mit Pufferlösung vom pH 3.25 bis zum Erscheinen von Prolin, dann mit Pufferlösung vom pH 4.25 bis zum Erscheinen der letzten Aminosäure. Die Elution der basischen Aminosäuren wird mit Pufferlösung vom pH 5.28 mit einer 0.35 N Na-Konzentration vorgenommen.

Um zu verhindern, dass sich innerhalb der Säule Luftblasen bilden, die die Säule unbrauchbar machen würden, werden die Pufferlösungen zur Entfernung gelöster Luft gekocht, heiss mit Paraffinöl überschichtet und bei 4° aufbewahrt.

Zur Einhaltung einer konstanten Elutionsgeschwindigkeit von ca. 15 ml/h wird auf die Pufferlösung, die sich in einem Vorratsgefäss befindet, ein Druck von etwa 30 cm Hg gegeben. Die Zuführung des Druckes erfolgt entweder direkt aus einer Stickstoffflasche mit Reduzierventil oder bei mehreren parallel laufenden Säulen zweckmässigerweise aus je einem kleinen, etwa 3 l fassenden und mit Stickstoff bis zum gewünschten Druck gefüllten Metallbehälter, aus dem dann der Druck über einen ausreichend langen Zeitraum gleichmässig abgegeben werden kann.

Um eine fortlaufende Untersuchungsfolge zu gewährleisten, werden bei uns die benutzten Säulen in einer besonderen Regenerationsanlage regeneriert. Hier können bis zu 12 der 160-cm-Säulen nebeneinander aufgehängt und durch Hindurchschicken von 100 ml 0.2 N NaOH und 100 ml Pufferlösung vom pH 3.25 zur weiteren Verwendung bereit gemacht werden. Die zur Trennung der basischen Aminosäuren verwendeten 25-cm-Säulen werden mit 20 ml 0.35 N NaOH und anschliessend 100 ml Pufferlösung vom pH 5.28 regeneriert.

### Fraktionierung

Die Fraktionierung des Säulenuates erfolgt durch Tropfenzählung mit Hilfe eines Streifkontaktes (Fig. 1). Die Tropfen fallen hierbei durch ein System frei nach unten hängender Platindrähte und stellen dadurch kurzzeitig einen Kontakt her. Die Impulse werden über ein elektronisches Relais einem Zählwerk zugeführt, das dann den Transportmechanismus des Fraktionssammlers auslöst.

Für die Steuerung des Wechsels zwischen Test- und Hauptfraktionen wurden zwei verschiedene Geräte zur elektronischen Programmregelung entwickelt. Das erste Gerät - Zählerform A - ähnelt im Prinzip der Anordnung einer Telefonwählanlage und ermöglicht Variationen der Tropfenzahl zwischen 0 und 9 Tropfen für die Testfraktion und zwischen 0 und 119 Tropfen für die Hauptfraktion. Das zweite Gerät -

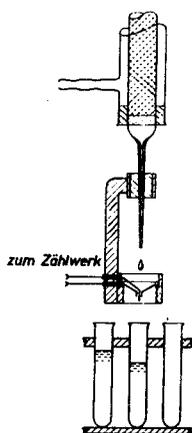


Fig. 1. Tropfenzählung durch Streifkontakt.

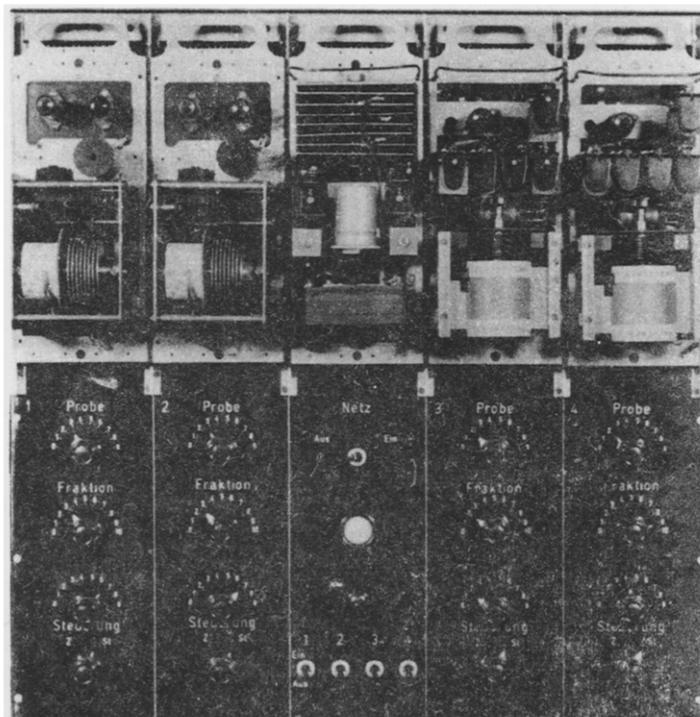


Fig. 2. Steuerungsgeräte für 4 Fraktionssammler. Links: 2 Geräte der Zählerform B. Rechts: 2 Geräte der Zählerform A. Mitte: Das Netzgerät.



*Vortestung*

Die Spitzröhrchen mit den Testfraktionen – im allgemeinen 3 Tropfen Eluat – werden entsprechend der Fraktionsfolge dem Sammler entnommen und in ein Gestell mit einem Aufnahmevermögen von 200 Gläsern eingesetzt. Nach Zugabe von 2 Tropfen Ninhydrinreagenz werden die Röhrchen in dem Gestell 20 Minuten in einem siedenden

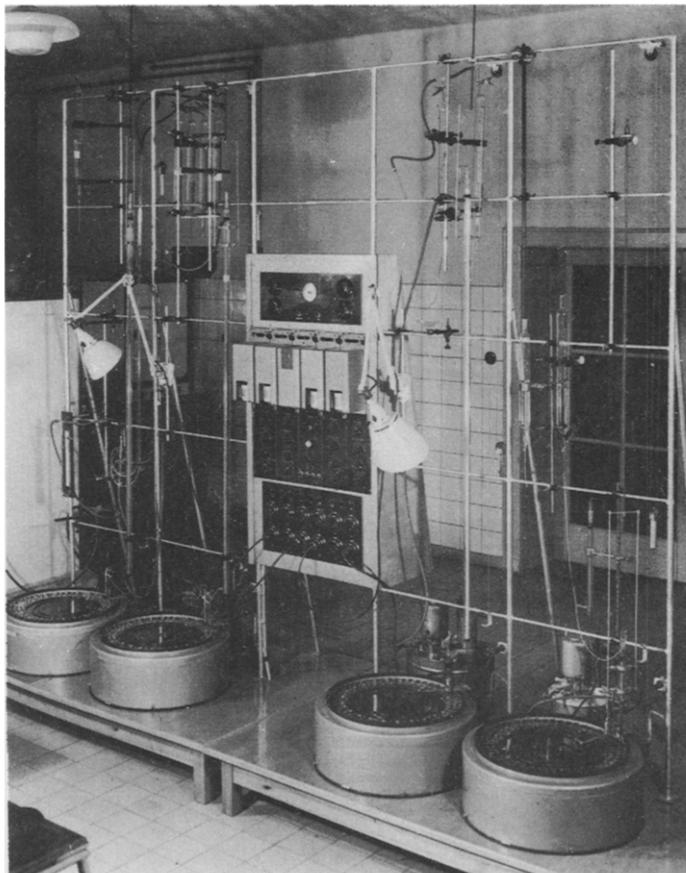


Fig. 4. Aggregat aus 4 programmgesteuerten Fraktionssammlern.

Wasserbad erhitzt. Durch visuelles Schätzen der entstandenen Farbintensität lässt sich eine halbquantitative Elutionskurve aufstellen, ähnlich der oberen Kurve in Fig. 6. Die tropfenweise Zugabe des Ninhydrinreagenz erfolgt aus einer braunen Tropfflasche, in der das Reagenz aus Ninhydrin und Hydrindantin<sup>6</sup> direkt hergestellt wird und zwar zur Vermeidung schädigender Luftwirkung mit Hilfe eines Magnetrührers unter einer Paraffinölschicht, unter der es dann ständig verbleibt. Eine U-förmige Kapillare und ein Glasrohr, das zum Schutz vor Verunreinigungen in einer kleinen Erweiterung mit Watte gefüllt ist, führen durch einen doppelt durchbohrten Stopfen, mit dem die Flasche verschlossen ist, bis auf den Boden der Flasche bzw. in

den Raum oberhalb der Paraffinölschicht. Durch kurzes Einblasen von Luft durch das Glasrohr wird Ninhydrinreagenz in die Kapillare gedrückt und tropft dann je nach Länge und Durchmesser der Kapillare in mehr oder minder grossen Zeitabständen gleichmässig ab. Durch kurzes Saugen am Glasrohr kann dieser Vorgang wieder unterbrochen werden.

### *Quantitative Auswertung*

Anhand der Vortestung werden innerhalb eines Gipfels die Gläser der den Testfraktionen entsprechenden Hauptfraktionen zusammengefasst. Durch eine einfache Saugvorrichtung (Fig. 5) wird der Inhalt der Gläser in ein 25-ml-Messkölbchen mit Normalschliff überführt und auf 25 ml aufgefüllt; die Gesamtfraktion eines jeden

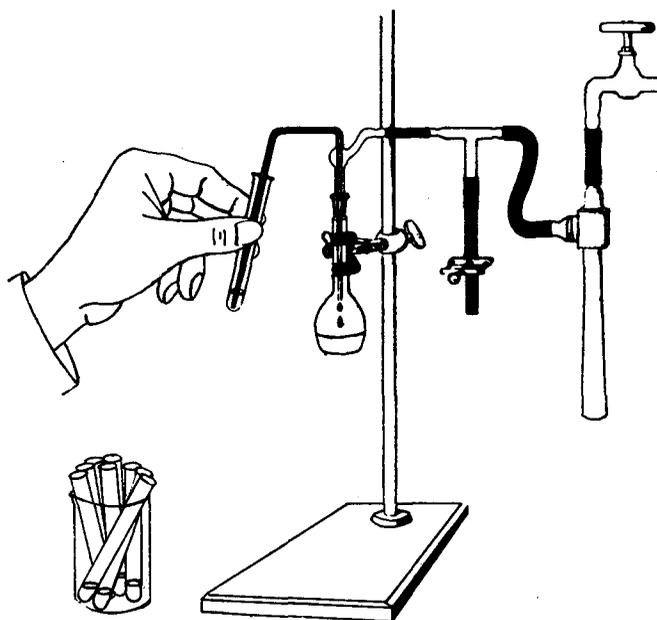


Fig. 5. Vorrichtung zum Zusammensaugen der Hauptfraktionen.

Gipfels befindet sich damit in je einem Kölbchen. Genau 2 ml werden daraus entnommen und in ein 10-ml-Messkölbchen überführt; nach Zusatz von 1 ml Ninhydrinreagenz werden die Kölbchen 20 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Auffüllen wird in üblicher Weise die Farbintensität im Photometer quantitativ bestimmt.

Fig. 6 zeigt eine säulenchromatographische Aminosäureanalyse, bei der jeder Strich der oberen Kurve eine quantitative colorimetrische Bestimmung bedeutet, wie sie nach der üblichen Fraktionssammlermethode erforderlich ist, während in der unteren Kurve jeder Strich die quantitative Bestimmung jeweils einer gesamten Gipelfraktion nach dem eben beschriebenen Verfahren bedeutet, d.h. die Zahl der

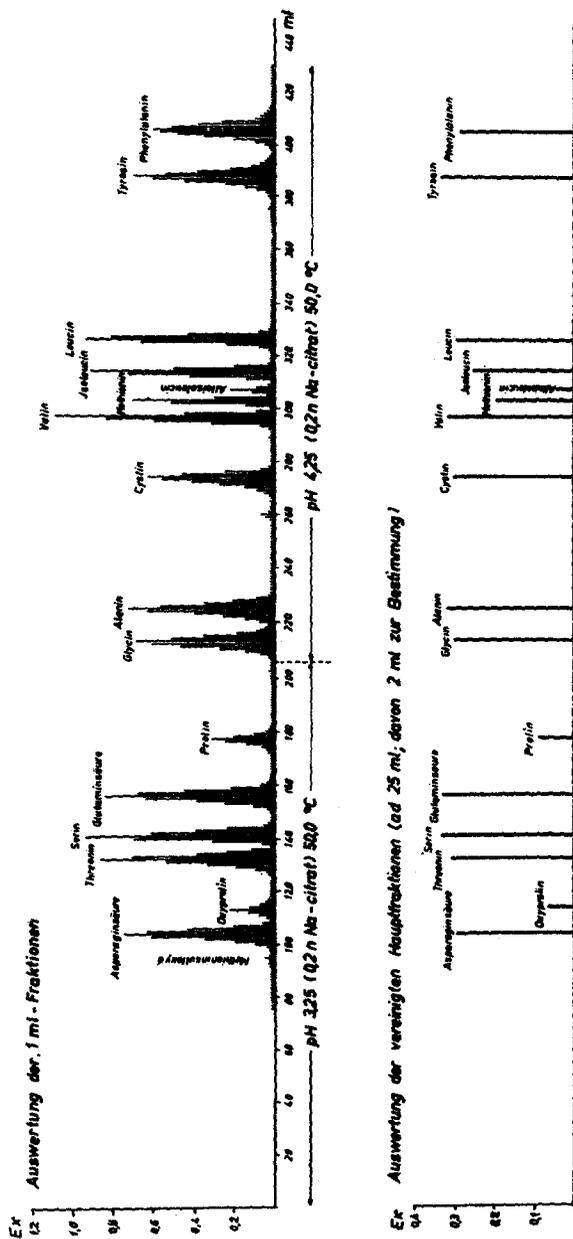


Fig. 6. Auftrennung eines Aminosäuregemisches an Amberlite CG 120, Type 3 (Partikel Durchmesser:  $58 \pm 7 \mu$ ). Säule:  $160 \times 0.9$  cm. Druck: 0.4 atü. Durchlaufgeschwindigkeit: 15 ml/h.

quantitativen Einzelbestimmungen verringert sich bei diesem Verfahren von 300–600 auf etwa 20 zuzüglich 3 Blindwertbestimmungen. Nach der quantitativen Bestimmung stehen etwa 90% jeder 25-ml-Fraktion für Wiederholungsbestimmungen und zur qualitativen Untersuchung zur Verfügung, so dass jede Fraktion durch Vergleich mit authentischen Aminosäuren papierchromatographisch auf Identität und Einheitlichkeit geprüft werden kann. Hierzu müssen die einzelnen Fraktionen jedoch zunächst von der Pufferlösung befreit und konzentriert werden.

### Entsalzung

Die Entsalzung wird an Austauschersäulen von  $15 \times 0.9$  cm aus Dowex 50 X 4 (Na-Form), etwa 200 mesh, vorgenommen; die Glasrohre haben am oberen Ende einen Trichteransatz von etwa 7 cm Länge zur Aufnahme der Elutionsflüssigkeit.

5 ml jeder Aminosäure-Fraktion werden auf die Säule gegeben und mit 5 ml 0.01 N HCl nachgewaschen; anschliessend wird mit 10%igem Pyridin eluiert. Der Elutionsbereich von 4 einzeln entsalzten Aminosäuren ist aus der Zusammenstellung in Fig. 7 ersichtlich. Während die ersten 5 ml des Eluates zu verwerfen sind,

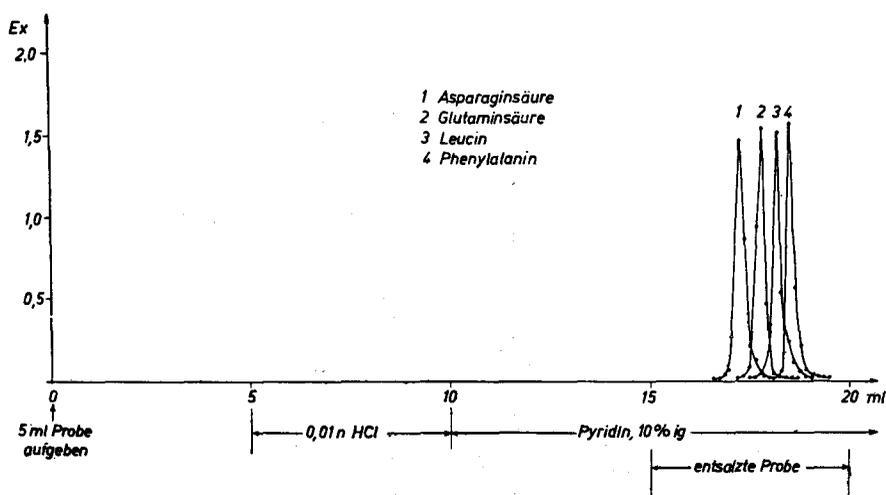


Fig. 7. Entsalzung der Aminosäurefraktion zur Identifizierung. Austauscher: Dowex 50 X 4 (Na-Form). Säule:  $15 \times 0.9$  cm.

werden die nächsten 20 ml in 50 ml-Bechergläsern aufgefangen und auf dem Wasserbad eingedampft; der Rückstand wird in etwa 1 ml Wasser gelöst und erneut eingedampft. Zur restlosen Entfernung von Pyridin muss dieser Vorgang  $3 \times$  wiederholt werden. Der Rückstand wird in 4 Tropfen 0.01 N HCl gelöst und kann dann zur papierchromatographischen Prüfung benutzt werden; die aufzutragende Menge richtet sich nach der jeweiligen Aminosäurekonzentration. Nach der Benutzung können die Säulen durch Hindurchschicken von 25 ml 0.2 N NaOH und anschliessend 15 ml Puffer vom pH 2.2 (0.2 N Na-Konzentration) regeneriert werden.

*Papierchromatographische Untersuchung*

Zur Papierchromatographie verwenden wir 6 in einem Bogen zusammenhängende Keilstreifen<sup>7</sup> (Schleicher & Schüll 2045b Gl mit Ausstanzungen), von denen abwechselnd je ein Streifen als Vergleichs- und ein Streifen als Testchromatogramm

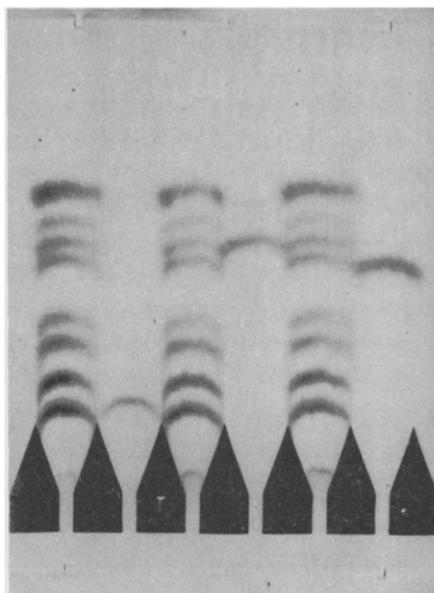


Fig. 8. Identifikationschromatogramm auf Keilstreifenbogen. Vergleichschromatogramm: 1, 3, 5. Testchromatogramm: 2 Serin, 4 Valin, 6 Methionin.

dient. Fig. 8 zeigt ein derartiges Chromatogramm, bei dem der Serin-, Valin- und Methioningipfel auf Identität und Einheitlichkeit geprüft werden. Auch Leucin/Isoleucin lassen sich auf diese Weise eindeutig nebeneinander nachweisen.

## DANK

Allen, die an der Entwicklung und an dem Aufbau des Gerätes Anteil hatten, vor allem Herrn F. PANNING, der den mechanischen Teil des Gerätes ausführte, und Herrn R. GÜNTHER, der die elektrische Schaltanlage mit besonderer Sorgfalt aufbaute, sei an dieser Stelle herzlich gedankt.

## ZUSAMMENFASSUNG

Es wird eine vereinfachte Technik beschrieben für die Bestimmung von Aminosäuren an Ionenaustauschersäulen mit Hilfe von Fraktionssammlern, die durch einen elektronischen Programmregler gesteuert werden. Die 1-ml-Fractionen werden alternierend in Test- und Hauptfraktionen zerlegt. Die Testfraktionen werden halbquantitativ

tativ ausgewertet; die Hauptfraktionen werden auf Grund dieser Testung im Bereich jedes Gipfels zusammengefasst, und in einem aliquoten Teil hiervon wird die quantitative Analyse durchgeführt. Die vollständige quantitative Analyse eines Proteinhydrolysates erfordert auf diese Weise nur etwa 20 quantitative Bestimmungen anstelle von 300–600. Darüber hinaus ermöglicht diese Methode Untersuchungen über die Identität und Einheitlichkeit der einzelnen Gipfel.

#### SUMMARY

A simplified technique is described for the determination of amino acids on ion exchange columns by using fraction collectors which are directed by an electronic program controller. The 1-ml fractions are alternatively divided into test and main fractions. The test fractions are tested semi-quantitatively; the main fractions are collected in the range of each peak, according to these results. In an aliquot part the quantitative analysis is carried out. A complete quantitative analysis of a protein hydrolysate requires only about 20 quantitative determinations instead of 300–600. Moreover, this method permits verification of the identity and homogeneity of the separated peaks.

#### LITERATUR

- <sup>1</sup> W. MATTHIAS, *Protides of the Biological Fluids, Proc. 8th Colloquium, Bruges, 1960*, Elsevier Publ. Co., Amsterdam, 1961, S. 74.
- <sup>2</sup> S. MOORE, D. H. SPACKMAN UND W. H. STEIN, *Anal. Chem.*, 30 (1958) 1185.
- <sup>3</sup> D. H. SPACKMAN, W. H. STEIN UND S. MOORE, *Anal. Chem.*, 30 (1958) 1190.
- <sup>4</sup> K. HANNIG, *Clin. Chim. Acta*, 4 (1959) 51.
- <sup>5</sup> F. B. HAMILTON, *Anal. Chem.*, 30 (1958) 914.
- <sup>6</sup> S. MOORE UND W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.*, 211 (1954) 907.
- <sup>7</sup> W. MATTHIAS, *Naturwissenschaften*, 41 (1954) 17; *Der Züchter*, 24 (1954) 313.

*J. Chromatog.*, 6 (1961) 333–342