

Auftrennung der Eiweissaminosäuren durch eindimensionale Papierchromatographie

Alle Eiweissaminosäuren mit einem Chromatogramm zu trennen, ist bisher nur mit der zweidimensionalen Technik in befriedigender Masse gelungen¹. Dieses Verfahren ist jedoch für eine nachfolgende quantitative Auswertung aus mehreren Gründen ungeeignet²⁻⁴. Mit der eindimensionalen Technik werden bisher mehrere Chromatogramme für die mehr oder weniger vollständige Erfassung der Eiweissaminosäuren benötigt⁵⁻¹⁷, wobei für eine hinreichend gute quantitative Auswertung einige Aminosäuren oft nur durch Differenzbestimmung erfasst werden können¹⁰.

Im folgenden wird ein Verfahren zur vollständigen Auftrennung aller Eiweissaminosäuren auf einem einzelnen für die quantitative Auswertung geeigneten Chromatogramm beschrieben, das bei geringem Aufwand z.B. auch die Analyse sehr kleiner Untersuchungsproben ermöglicht.

Methodik

Die Aminosäurelösung wird strichförmig (2 mm breit und 4–6 cm lang) auf einen 55 cm langen unten ausgezackten Streifen oder Bogen (Schleicher u. Schüll 2043 b Mgl) aufgetragen. In einem zu Beginn jedes Laufes lösungsmittelfreien Chromatographiekasten (250 × 120 × 500 mm) wird absteigend dreimal — 18, 25 und 43 Std. — mit der organischen Phase des Laufmittels *n*-Butanol–Isobuttersäure–Eisessig–aqua dest. (5.0:0.5:0.7:5.0) chromatographiert. Nach jedem Lauf wird das Papier mit frisch destilliertem Diäthyläther oder Aceton 2–3mal gewaschen, bis Eisessig und Isobuttersäure am Geruch nicht mehr wahrzunehmen sind.

Ergebnisse

In der Tabelle I sind die R_{Leuctn} -Werte der Aminosäuren zusammengestellt. Die R_F -Werte sind nicht erfassbar, weil es sich um ein Durchlaufchromatogramm handelt. Bei mehrmaligen Läufen ist der Bezug auf die Aminosäuren mit der höchsten Laufgeschwindigkeit ohnehin exakter.

Cystin und Cystein lassen sich nicht trennen. Tryptophan wird als Racemat in die optischen Isomeren aufgetrennt.

TABELLE I

R_{Leuctn} -WERTE DER EIWEISSAMINOSÄUREN

Aminosäure	$R_{Leuctn} \times 100$	Aminosäure	$R_{Leuctn} \times 100$
Cystin	4.3	Threonin	35.2
Lysin	8.8	Alanin	43.8
Histidin	11.2	Prolin	49.8
Arginin	13.6	Tyrosin	55.8
Asparaginsäure	21.0	L-Tryptophan	62.7
Serin	23.4	Methionin	74.6
Glycin	26.5	Valin	77.0
Glutaminsäure	31.7	Phenylalanin	90.5
		Isoleucin	97.5

Diskussion

Nach den bisherigen Erfahrungen gehören die sauren alkoholischen Lösungsmittelgemische zu den wirkungsvollsten Laufmittelsystemen in der Papierchromatographie der Aminosäuren. Die Eiweissaminosäuren werden z.B. mit dem "PARTRIDGE-Gemisch"¹⁸ *n*-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5) über die gesamte Laufstrecke verteilt, und man kann durch entsprechende Verlängerung der Laufstrecke oder durch mehrfache Chromatographie die Wirksamkeit dieses Systems weiter erhöhen. Die Möglichkeiten sind allerdings begrenzt, weil mit Verlängerung des Chromatogramms die Aminosäureflecken immer grösser und auch etwas diffuser werden, so dass die quantitative Auswertung verschlechtert wird; ausserdem werden bei mehrmaligem Lauf wohl die langsam laufenden Aminosäuren zunehmend besser getrennt, die schnell laufenden Aminosäuren schieben sich jedoch vom 3. bis 4. Lauf ab wieder ineinander, sie werden von den nachfolgenden Läufen in immer geringerem Masse beeinflusst. Das lässt sich verbessern, wenn die Laufzeiten vom ersten zum letzten Lauf zunehmend verlängert werden. Eine besondere Rolle hinsichtlich einer guten Trennung der Aminosäuren spielt die Atmosphäre im Chromatographiegefäss. Im allgemeinen wird das "PARTRIDGE-Gemisch" bei gesättigter Atmosphäre verwendet. Wir fanden aber, dass bei bis zu Beginn des Laufs lösungsmittelfreier Atmosphäre die sonst schwierig zu trennenden Aminosäuren Methionin und Valin zwei deutlich abgesetzte Flecken ergeben. Ausserdem sind Tryptophan und Tyrosin in ihren R_F -Werten stark von der Art der Atmosphäre im Chromatographieraum abhängig. Sie können bei unterschiedlich starker Feuchtigkeitskonzentration im Chromatographiekasten bei gleichbleibender Lage zueinander in ihren R_F -Werten um ± 0.1 Einheiten schwanken. Die Trennung der Paare Glutaminsäure und Threonin sowie Serin und Asparaginsäure ist mit dem "PARTRIDGE-System" nicht zu erreichen. Wir konnten jedoch feststellen, dass die R_F -Werte der beiden sauren Aminosäuren durch Kombination des "PARTRIDGE-Systems" mit anderen organischen Säuren zu beeinflussen sind. Ameisensäure bewirkt z.B. eine Erhöhung der Laufgeschwindigkeit von Asparaginsäure und Glutaminsäure; dabei kommt jedoch die Asparaginsäure auf den Glycinfleck zu liegen. Von Vorteil erwies sich jedoch wie bei der Trennung der essentiellen Aminosäuren¹⁹ der Einsatz von Isobuttersäure, die die R_F -Werte der sauren Aminosäuren erniedrigt, bei zu hoher Konzentration aber auch die Laufgeschwindigkeit der basischen Aminosäuren herabsetzt. In der Kombination *n*-Butanol-Isobuttersäure-Eisessig-aqua dest. (5.0:0.5:0.7:5.0) ergab sich schliesslich ein Laufmittelsystem, das unter Berücksichtigung der o.a. Bedingungen für eine gute Trennung auch der schwierig voneinander abzugrenzenden Aminosäurepaare geeignet ist.

Institut für Ernährung, Bereich Mikrobiologie der Ernährung,
Potsdam-Rehbrücke, der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu
Berlin (Deutschland)

F.-K. GRÜTTE
B. KOHNKE

- 1 A. L. LEVY UND D. CHUNG, *Anal. Chem.*, 25 (1953) 396.
- 2 E. A. M. WADE, A. T. MATHESON UND C. S. HANES, *Can. J. Biochem. Physiol.*, 39 (1961) 141.
- 3 J. L. BAILEY, *Techniques in Protein Chemistry*, Elsevier, Amsterdam-London-New York, 1962, S. 9.
- 4 Z. DOBOSZYNSKI UND J. WIERZCHOWSKI, *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.*, 54 (1963) 3.
- 5 E. F. MCFARREN UND J. A. MILLS, *Anal. Chem.*, 24 (1952) 650.
- 6 F. G. FISCHER UND H. DÖRFEL, *Biochem. Z.*, 324 (1953) 544.
- 7 J. F. ROLAND UND A. M. GROSS, *Anal. Chem.*, 26 (1954) 502.

- 8 D. L. HARDY, D. O. HOLLAND UND J. H. C. NAYLOR, *Anal. Chem.*, 27 (1955) 971.
9 L. S. MARKOSYAN, *Izv. Akad. Nauk Arm. SSR, Ser. Biol. i Sel'shokhoz. Nauk*, 11, No. 12 (1958) 117.
10 H. G. KNAUF, P. DIETERLE UND H. ZICKGRAF, *Z. Physiol. Chem.*, 316 (1959) 186.
11 E. W. SCHERBAKOWA, *Arb. Odessaer Technol. Inst. Nahrungsm. -u. Kälte-Ind.*, 9 (1959) 65.
12 W. CIUSA UND A. BUCELLI, *Rass. Chim.*, 12 (1960) 17.
13 K. GRUHN, *Wiss. Z. Friedrich-Schiller-Univ. Jena*, 9 (1960) 593.
14 C. S. HANES, C. K. HARRIS, M. A. MOSCARELLO UND E. TIJANE, *Can. J. Biochem. Physiol.*, 39 (1961) 163.
15 B. S. HARTLEY, *Biochem. J.*, 80 (1961) 36P.
16 P. DE LA LHOSA, C. TERTRIN UND M. JUTISZ, *J. Chromatog.*, 14 (1964) 136.
17 N. BOUTSCHEFF, *Nahrung*, 9 (1965) 161.
18 S. M. PARTRIDGE, *Biochem. J.*, 42 (1948) 238.
19 F.-K. GRÜTTE UND B. KOHNKE, *Z. Lebensm.-Untersuch.-Forsch.*, im Druck.

Eingegangen den 10. Juni 1966

J. Chromatog., 26 (1967) 325-327

Some comparisons between column and paper ion-exchange chromatography

Ion-exchange paper chromatography usually yields results comparable to column ion-exchange chromatography when the same solutes, resin and wash liquid are included in the two systems. This has been demonstrated repeatedly by LEDERER and coworkers, for example with some thirty metal ions in anion-exchange systems employing HCl¹. It has been inferred by OSSICINI AND LEDERER² that differences between ion-exchange paper and column experiments are always due to differences in technique, for example frontal analysis of the solvent or other causes of nonequilibrium conditions, which can be detected and hopefully eliminated.

During our work with ion-exchange papers, we reported two discrepancies^{3,4} between paper and column results which we have now studied in detail and tried to explain.

Experimental

The standard procedures we employed for the downward development of paper chromatograms in commercial equipment have already been described⁵. Developed zones were located by spraying with yellow ammonium sulfide. Additional comments on procedure will be given in the discussion of the two systems below.

Vanadium-peroxide system

FRITZ AND ABBINK⁶ separated mercury (II) from vanadium (V) on a column of Dowex 50 (H form) by elution with a solution of 0.010 M sulfuric acid containing 1.0 % of hydrogen peroxide. Vanadium forms an anionic complex⁷ and is rapidly eluted while mercury is cationic⁷ and remains in a tight band on the top of the column.

We were originally unable to separate these ions on hydrogen-form SA-2 cation exchange paper by development with the same solution; vanadium migrated in a compact zone with R_F 0.36 but was contaminated by mercury which formed a long comet extending from the origin out to R_F 0.47⁴. After altering the procedure which