

DIE SÄULENCHROMATOGRAPHISCHE AMINOSÄURE-ANALYSE IN GEGENWART VON SCHWERMETALL-KATIONEN*

A. RUDOLPH

Deutsche Akademie der Wissenschaften zu Berlin, Institut für Kulturpflanzenforschung, Gatersleben (D.D.R.)

(Eingegangen den 24. Juni 1967)

Wiederholt wurde in den letzten Jahren von verschiedener Seite¹⁻⁴ über stickstofffreie ninhydrinpositive Verbindungen berichtet, die bei der Trennung und Anfärbung von Aminosäuren zu falscher Interpretation von Analysenergebnissen in qualitativer und quantitativer Hinsicht führen können. Von besonderem Interesse erschien eine Notiz von GROSS⁴, der bei Anfärbung von Elektropherogrammen ninhydrinpositive Flecke beobachtete, die verschiedenen Elementen der 1. und 2. Haupt-Gruppe des Periodensystems zuzuordnen waren. Im Zusammenhang mit biochemischen Untersuchungen an Normalformen und Mutanten von *Lycopersicon esculentum* Mill. konnten wir nachweisen, dass bei säulenchromatographischer Aminosäure-Analyse der Cysteinsäure-Peak als Verunreinigung neben organischen Substanzen Eisen enthält (RUDOLPH, in Vorbereitung). Im folgenden sollen deshalb die säulenchromatographischen Eigenschaften bestimmter Schwermetall-Kationen unter den Bedingungen der Aminosäure-Analyse⁵ untersucht werden. Weiterhin wird der Einfluss dieser Kationen auf die quantitative Aminosäure-Bestimmung bei der Anfärbung mit Ninhydrin-Hydrindantin⁶ ermittelt.

EXPERIMENTELLES

Die Aminosäure-Analysen wurden nach MOORE, SPACKMAN UND STEIN⁵ durch Ionenaustauscherchromatographie an Amberlite CG 120 durchgeführt. Die Säulendimensionen betragen 20×0.9 cm (zur Analyse der basischen Aminosäuren) und 150×0.9 cm (für die sauren und neutralen Aminosäuren). Dem Aminosäure-Testgemisch war 1 mg Fe^{3+} , 1 mg Cu^{2+} oder 1 mg Ni^{2+} zugesetzt. Die Grösse der Fraktionen betrug 1.1 ml. Nach Verdünnen der Proben mit je 1 ml Citratpuffer vom pH-Wert 3.25, 4.25 oder 5.28 wurden die Schwermetall-Kationen bestimmt durch Vermessung ihrer Absorption bei den Wellenlängen 405 nm (für Fe^{3+} und Ni^{2+}) und 366 nm oder 578 nm (für Cu^{2+}). Daran anschliessend erfolgte die Anfärbung von 1 ml jeder Fraktion mit Ninhydrin-Hydrindantin nach MOORE UND STEIN⁶ zur Anfertigung des Elutionsdiagramms.

Um den Einfluss der Metall-Kationen auf die quantitative Bestimmung von Leucin, Cysteinsäure, Cystin, Valin, Methionin, Isoleucin und Histidin zu überprüfen, wurden Testlösungen hergestellt, die 0.1 μMol jeder Aminosäure pro ml sowie die Metall-Kationen Fe^{3+} , Cu^{2+} oder Ni^{2+} in den Konzentrationen 100 μg , 200 μg , 500 μg .

* Teil der in Vorbereitung befindlichen Dissertation.

1000 μg und 2000 μg pro ml enthielten. Als Lösungsmittel dienten die Puffer, die zur Elution der Aminosäuren verwendet werden⁵. Zur Bestimmung der Aminosäure-Konzentrationen bei 578 nm und zur Messung der Farbintensitäten der Metall-Kationen wurde das lichtelektrische Photometer "Eppendorf" verwendet. Die Absorptionsspektren der Reaktionsprodukte von Aminosäure und Ninhydrin-Hydrindantoin wurden mit dem Perkin-Elmer-Spektrophotometer 137 UV aufgenommen.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Einen Überblick über das säulenchromatographische Verhalten von Fe^{3+} , Cu^{2+} und Ni^{2+} gewinnt man bei Analyse der basischen Aminosäuren (Fig. 1). An Stelle der Retentionsvolumina seien die Volumina angegeben, die erforderlich sind, um das Bandenmaximum zu eluieren (V_{max}): für Fe^{3+} (und Cysteinsäure) $V_{\text{max}} = 11$ ml, für Cu^{2+} $V_{\text{max}} = 15.4$ ml und für Ni^{2+} $V_{\text{max}} = 17.6$ ml. Der Fe^{3+} -Peak wird zusammen mit Cysteinsäure eluiert, während Cu^{2+} und Ni^{2+} mit unterschiedlichen V_{max} -Werten im Gebiet der Summenbande erscheinen, welche die übrigen sauren und neutralen Aminosäuren enthält. Die Banden für Cu^{2+} und Ni^{2+} zeigen deutliche Asymmetrie im Kurvenverlauf. Eine genauere Differenzierung der Positionen der Schwermetall-Peaks war unter Bedingungen zu erwarten, wie sie für die Auftrennung der sauren und neutralen Aminosäuren angewendet werden (Fig. 2). Hier resultiert im Gegensatz zur 20 cm langen Säule eine starke Überlappung der Banden von Fe^{3+} ($V_{\text{max}} = 37.4$ ml) und Cysteinsäure ($V_{\text{max}} = 38.5$ ml). Die Unterschiede im Elutionsverlauf von Fe^{3+} beim Vergleich der kurzen und der langen Säule stehen in Übereinstimmung mit Untersuchungen an Hydrolysaten pflanzlicher Extrakte. Für die Banden von

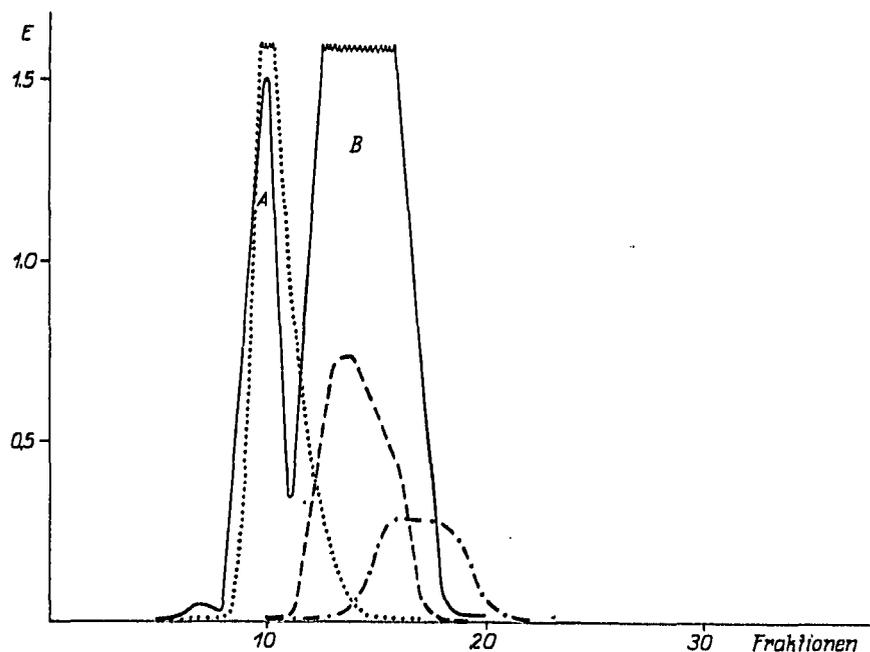


Fig. 1. Elution der Kationen Fe^{3+} (\cdots), Cu^{2+} ($---$) und Ni^{2+} ($-.-.-$) unter den Bedingungen der Analyse basischer Aminosäuren mit Citrat-Puffer (0.35 N, pH 5.28). Säulendimensionen: 20 \times 0.9 cm. Peak A stellt Cysteinsäure, Peak B die Summenbande der sauren und neutralen Aminosäuren dar (—).

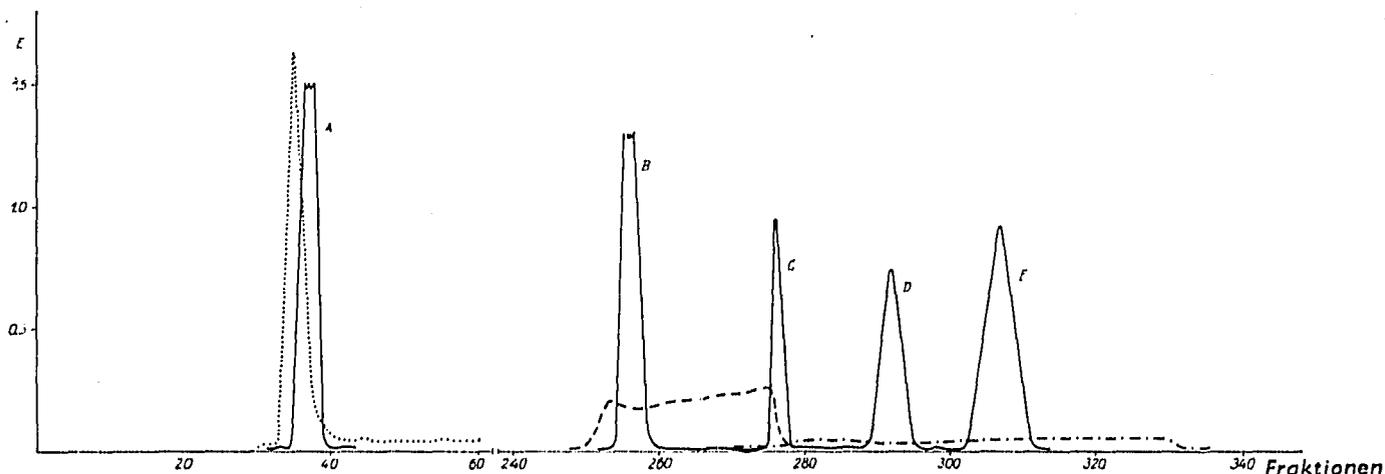


Fig. 2. Position von Fe^{3+} (\cdots), Cu^{2+} ($-\ - -$) und Ni^{2+} ($-\cdot-\cdot-$) bei der Analyse der sauren und neutralen Aminosäuren (—) mit Citrat-Puffer (0,2 N, pH 3,25 bzw. 4,25). A = Cysteinsäure; B = Valin; C = Methionin; D = Isoleucin; E = Leucin.

Cu^{2+} und Ni^{2+} ergeben sich unterschiedliche Positionen entsprechend ihrer V_{max} -Werte im Bereich der Summenbande der kleinen Säule. Die Vorderfront des Cu^{2+} -Peaks liegt kurz vor der Bande des Valins, die Rückfront endet im Methionin-Gebiet. Die Ni^{2+} -Bande erscheint an der Rückfront des Methionins, überlappt Isoleucin und Leucin und endet im Gebiet zwischen Leucin und Tyrosin. Die V_{max} -Werte von Cu^{2+} und Ni^{2+} sind nicht zu erfassen. Während der Fe^{3+} -Peak einen geradlinigen, symmetrischen Kurvenverlauf zeigt, sind die Cu^{2+} - und besonders die Ni^{2+} -Bande durch eine starke Peakverbreiterung ohne scharfe Vorder- und Rückfront charakterisiert. Diese Eigenschaften erlauben die Schlussfolgerung, dass während der Trennung der Schwermetall-Kationen am Ionenaustauscher unter den angegebenen Bedingungen neben dem eigentlichen Ionenaustauschvorgang, der Lösung und Knüpfung hauptvalenter Bindungen, sehr wahrscheinlich andere Vorgänge, wie z.B. Adsorptionseffekte, wirksam werden.

In der Literatur beschriebene Trennungen von Fe^{3+} , Cu^{2+} und Ni^{2+} an Kationenaustauschern⁷⁻⁹ sind mit den hier erzielten Ergebnissen nicht vergleichbar, da eine andere Methodik verwendet wurde, in den meisten Fällen HCl-Gradientenelutionstechnik. Eine Bestätigung für die rasche Elution von Fe^{3+} liefern Untersuchungen von ELOVICH UND MATORINA¹⁰, die Fe^{3+} am Kationenaustauscher SM-12 mit Citronensäure bereits bei einem pH-Wert von 2,50 eluieren konnten.

Die Überlappung bestimmter Aminosäure-Banden durch Schwermetall-Kationen erfordert Untersuchungen, ob die quantitative Bestimmung dieser Aminosäuren durch Schwermetall-Kationen gestört wird. Testlösungen mit konstanter Aminosäure- und steigender Metallionen-Konzentration wurden mit Ninhydrin-Hydrindantin 15 Min. bei 100° angefärbt und bei 578 nm vermessen. Bei Zusatz von Cu^{2+} und Ni^{2+} in dem für die Pflanzenanalyse interessierenden Konzentrationsbereich treten bei der Anfärbung von Valin, Methionin, Isoleucin und Leucin keine Störungen auf. Unter Aspekten der Aminosäure-Analyse dürfte jedoch Fe^{3+} als Störfaktor von Bedeutung sein. Hier zeigt sich eine signifikante Erhöhung der Extinktion mit steigender Fe^{3+} -Konzentration (Fig. 3). Den steilsten Kurvenanstieg weist Histidin auf, während die Anfärbung von Cysteinsäure und Cystin offensichtlich am schwächsten

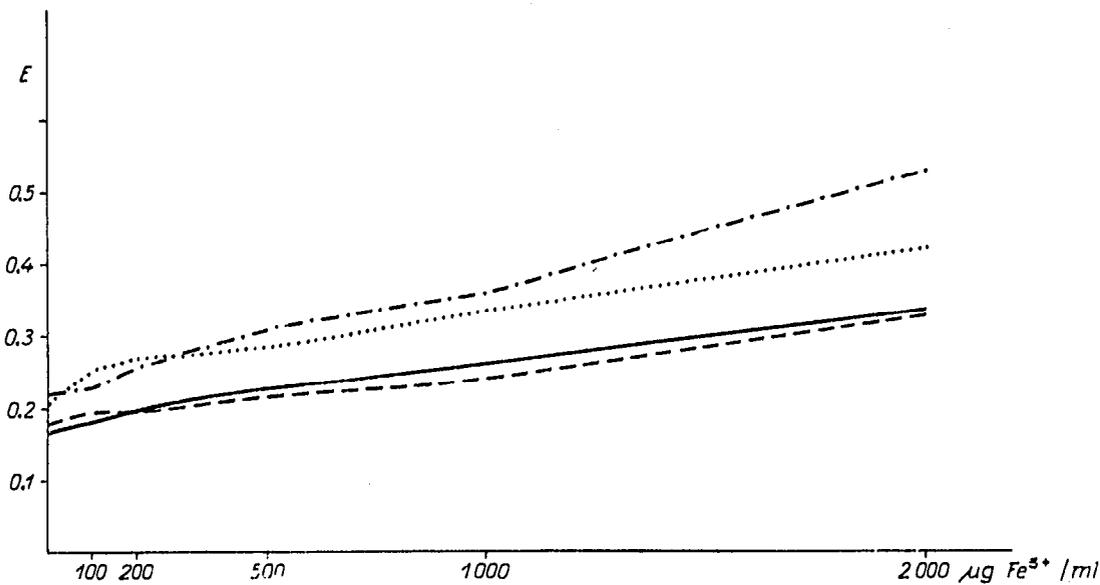


Fig. 3. Einfluss von Fe^{3+} auf die quantitative Bestimmung von $16.9 \mu\text{g}$ Cysteinsäure (---), $24 \mu\text{g}$ Cystin (—), $13.1 \mu\text{g}$ Leucin (···) und $15.5 \mu\text{g}$ Histidin (-.-.-).

beeinflusst wird. Bei Leucin liegt die Abweichung vom Standardwert zwischen beiden Extremen. Diese charakteristischen Unterschiede können nicht auf die Art des verwendeten Puffers zurückgeführt werden. Die Anfärbung der drei Puffer bei Zusatz von Fe^{3+} erbrachte gleichzeitig den Beweis, dass Wechselwirkungen zwischen Fe^{3+} und Reagens als Ursache für die signifikante Erhöhung der Extinktionswerte im Falle von Leucin und Histidin keinesfalls ausreichend sind. Für eine Reaktion zwischen Leucin und Fe^{3+} sprechen Untersuchungen an Testlösungen mit konstantem Fe^{3+} -Zusatz ($1000 \mu\text{g}/\text{ml}$), aber unterschiedlicher Aminosäurekonzentration ($0.1 \mu\text{Mol}$ – $0.4 \mu\text{Mol}$ Leucin/ml). In diesem Bereich ist die Gültigkeit des Lambert-Beer'schen Gesetzes für die Anfärbung der Aminosäuren gewährleistet. Die grössten Abweichungen von der Standard-Kurve ohne Fe^{3+} -Zusatz liegen im mittleren Konzentrationsbereich bei $26.2 \mu\text{g}$ Leucin/ml, während der durch Fe^{3+} verursachte Fehler bei geringeren und höheren Aminosäurekonzentrationen kleiner ist. Über die Tendenz der Aminosäuren, mit Fe(III) ^{11,12}, Cu(II) ¹³ und Ni(II) ¹⁴ Komplexe zu bilden, wurde von verschiedenen Autoren berichtet. Histidin ist mit der Fe-Komplex-Stabilitätskonstante von 9.1 als ausgezeichneter Komplexbildner für Fe bekannt¹⁵. Es wäre denkbar, dass die besonders starke Störung der quantitativen Histidin- und Leucin-Bestimmung durch Fe^{3+} mit der hohen Komplexbildungs-Tendenz in Zusammenhang zu bringen ist. Absorptionsspektren von Leucin bei Zusatz von Fe^{3+} (Fig. 4) und Methionin in Gegenwart von Cu^{2+} (Fig. 5) nach Anfärbung mit Ninhydrin-Hydrindantin lassen keine qualitativen Veränderungen als Hinweis auf eine Komplexbildung erkennen. Für die auf Papierchromatogrammen hergestellten roten Cu-Komplexe wird ein Absorptionsmaximum bei 510 nm angegeben¹³. Eine endgültige Klärung der Wirkungsweise dieser Schwermetall-Kationen auf die Anfärbung von Aminosäuren in wässriger Lösung bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.

Von praktischer Bedeutung ist der störende Einfluss von Fe^{3+} auf die säulenchromatographische Bestimmung von Cysteinsäure. Bei einem Eisengehalt von 1 g Eisen pro kg pflanzlicher Trockensubstanz können bei der Analyse der sauren und

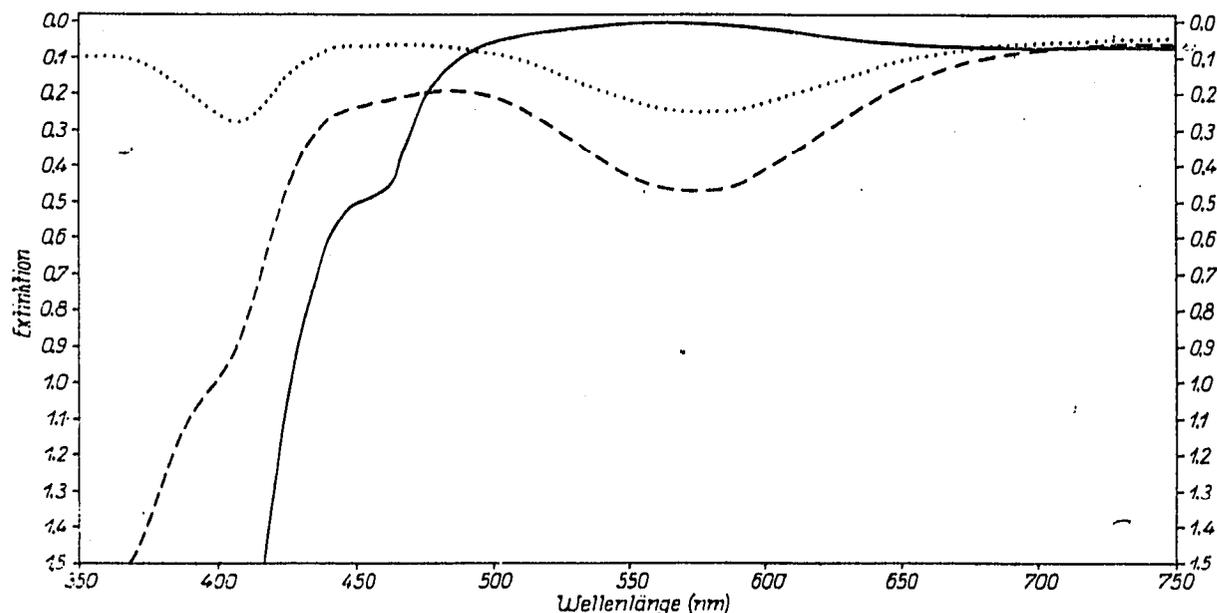


Fig. 4. Absorptionsspektren von 1 mg Fe^{3+} /10 ml Citratpuffer, pH 4.25 (—), von 13.1 μg Leucin, mit Ninhydrin-Hydrindantin angefärbt (···) und von 13.1 μg Leucin + 1 mg Fe^{3+} , umgesetzt mit Ninhydrin-Hydrindantin (- - -). Leucin-Lösungen nach Anfärbung mit Alkohol- H_2O (1:1) auf 10 ml aufgefüllt.

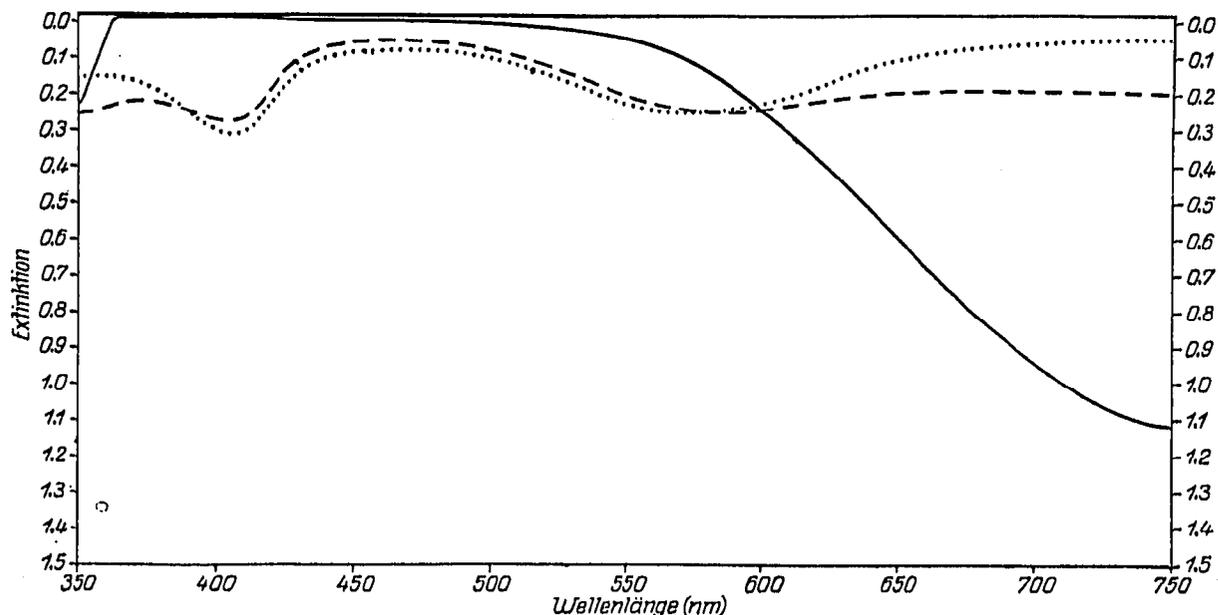


Fig. 5. Absorptionsspektren von 2 mg Cu^{2+} /10 ml Citratpuffer, pH 4.25 (—), von Methionin (14.9 μg), umgesetzt mit Ninhydrin-Hydrindantin (···) und von Methionin (14.9 μg) bei Zusatz von 2 mg Cu^{2+} nach Reaktion mit Ninhydrin-Hydrindantin (- - -). Methionin-Lösungen nach Anfärbung mit Alkohol- H_2O (1:1) auf 10 ml aufgefüllt.

neutralen Aminosäuren etwa 0.5 mg Eisen auf die Säule eingeschleppt werden. In der Annahme, dass der überwiegende Teil des Eisens bei der Cysteinsäure-Bestimmung nach dem alternierenden Fraktionssammler-Prinzip¹⁶ erfasst wird, beträgt der Fehler bei der Anfärbung von 16.9 μg Cysteinsäure/ml ca. 25–30 %.

DANK

Herrn Prof. Dr. habil. K. SCHREIBER danke ich für wohlwollende Unterstützung und Förderung dieser Arbeit. Für wertvolle Diskussionen sei Herrn Dr. G. SCHOLZ gedankt.

ZUSAMMENFASSUNG

Die säulenchromatographische Aminosäure-Analyse wurde in Gegenwart von Schwermetall-Kationen durchgeführt. Im Elutionsdiagramm der Aminosäuren wurden die Positionen der Banden von Fe^{3+} , Cu^{2+} und Ni^{2+} festgelegt. Der Fe^{3+} -Peak überlappt Cysteinsäure. Im Gegensatz zu Fe^{3+} werden Cu^{2+} und Ni^{2+} in Form stark verbreiteter Banden eluiert, die unter Valin und Methionin, bzw. Methionin, Isoleucin und Leucin liegen. Bei der Anfärbung der Aminosäuren Cysteinsäure, Cystin, Leucin und Histidin mit Ninhydrin-Hydrindantin bewirkt Fe^{3+} -Zusatz eine signifikante Erhöhung der Extinktionswerte. Auf den durch Fe^{3+} verursachten Fehler bei der säulenchromatographischen Cysteinsäure-Bestimmung wird hingewiesen.

SUMMARY

Amino acids were analyzed by ion-exchange chromatography in the presence of heavy metal cations. The positions of Fe^{3+} , Cu^{2+} and Ni^{2+} were determined under conditions used for the separation of amino acids on Amberlite CG 120. The Fe^{3+} -peak is eluted together with cysteic acid. Valine and methionine overlap with Cu^{2+} , while the position of Ni^{2+} coincides with that of methionine, isoleucine, and leucine. Iron significantly increases the extinction values of the reaction products of the amino acids cysteic acid, cystine, leucine and histidine with ninhydrin-hydrindantin. It has been shown that iron may cause erroneous results in the column chromatographic determination of cysteic acid.

LITERATUR

- 1 R. M. ZACHARIUS UND E. A. TALLEY, *J. Chromatog.*, 7 (1962) 51.
- 2 E. D. SCHILLING, P. I. BURCHILL UND R. A. CLAYTON, *Anal. Biochem.*, 5 (1963) 1.
- 3 W. KLINGER, *Naturwiss.*, 42 (1955) 645.
- 4 D. GROSS, *J. Chromatog.*, 10 (1963) 233.
- 5 S. MOORE, D. H. SPACKMAN UND W. H. STEIN, *Anal. Chem.*, 30 (1958) 1185.
- 6 S. MOORE UND W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.*, 211 (1954) 907.
- 7 R. N. GOLOVATYI, *Ukr. Khim. Zh.*, 24 (1958) 379.
- 8 A.K.M.A. HUQ, S. K. DEB UND M. H. KHUNDKAR, *J. Indian Chem. Soc., Ind. News Ed.*, 20 (1958) 127.
- 9 E. A. BREAVLT, *J. Assoc. Offic. Anal. Chemists*, 49 (1966) 298.
- 10 S. Y. ELOVICH UND N. N. MATORINA, in K. DORFNER, *Ionenaustausch-Chromatographie*, Akademie-Verlag, Berlin, 1. Aufl., 1963, S. 133.
- 11 H. J. BIELIG UND E. BAYER, *Chem. Ber.*, 88 (1955) 1158.
- 12 E. BAUMANN, *Z. Physiol. Chem.*, 8 (1883) 299.
- 13 F. BODE, H. J. HÜBENER, H. BRÜCKNER UND K. HOERES, *Naturwiss.*, 39 (1952) 524.
- 14 P. PFEIFFER UND W. CHRISTELEIT, *Stiasny-Festschrift*, S. 332; zitiert in: HOUBEN-WEYL, *Methoden der organischen Chemie*, Georg Thieme, Stuttgart, 4. Aufl., 1958, Band XI/2, S. 381.
- 15 H. M. RAUEN, *Biochemisches Taschenbuch*, Springer, Berlin, Göttingen, Heidelberg, New York, 2. Aufl., 1964, 2. Teil, S. 152.
- 16 W. MATTHIAS, *J. Chromatog.*, 6 (1961) 333.