

DIE VERWENDUNG VON 2,4,6-TRINITROBENZOLSULFONSÄURE ZUM AMINOSÄURENNACHWEIS IN AUTOMATISCHEN AMINOSÄUREN-ANALYSATOREN

J. HARMEYER, H.-P. SALLMANN UND L. AYOUB

Physiologisches Institut und Institut für Physiologische Chemie der Tierärztliche Hochschule, Hannover (Deutschland)

(Eingegangen den 16. August 1967)

EINLEITUNG

Bei der quantitativen Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung von Lösungen mittels automatisch arbeitender Aminosäureanalysatoren dient als Nachweismethode eine von MOORE UND STEIN^{1,2} entwickelte Vorschrift, die sich des Ninhydrins bedient. Dieses Reagenz hat jedoch bei Anwendung in Routineanalysen Nachteile, die bei quantitativen Messungen eine Reihe besonderer Vorsichtsmaßnahmen erfordern. Zu diesen Nachteilen gehören seine vielfach beschriebene ungenügende Stabilität bei längerer Aufbewahrung mit einer hohen Empfindlichkeit gegenüber Sauerstoff und geringgradigen chemischen Verunreinigungen, ferner seine Empfindlichkeit gegenüber Temperaturerhöhungen über Zimmertemperatur hinaus und seine Lichtempfindlichkeit. Diese Einflüsse können eine ungleichmässige Farbausbeute der Ninhydrin-Aminosäuren-Reaktion bewirken³ und die Genauigkeit der Methode stark beeinträchtigen. So sind die zahlreichen Versuche zu verstehen, die darauf abzielen, die Stabilität des Ninhydrinreagenzes zu erhöhen⁴⁻⁸. Durch die Verfügbarkeit von hoch gereinigtem Ninhydrin in den letzten Jahren wurde diese jedoch wohl am meisten verbessert.

OKUYAMA UND SATAKE⁹ berichten im Rahmen ihrer Arbeiten über Aktivierungsreaktionen für Proteine, dass Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS) mit primären Aminogruppen in Aminosäuren, Aminen und Peptiden reagiert unter Bildung eines Trinitrophenyl-Aminosäuren-Komplexes. Diese Verbindungen besitzen ein Absorptionsmaximum bei etwa 350 nm in alkalischer Lösung. Es wurden zahlreiche Trinitrophenyl-Aminosäuren synthetisiert und einige kinetische Eigenschaften dieser Reaktion untersucht¹⁰. TNBS wird seitdem in der Enzymologie¹¹ und Proteinchemie¹² verwendet. Ferner konnten AZEGAMI UND IWAI¹³ zeigen, dass TNBS auch mit Nukleinsäuren (Ribose und Guanin) reagiert. TNBS hat als Aminosäurenreagenz gegenüber Ninhydrin u. a. die Vorteile, dass es nicht sauerstoffempfindlich ist und die Reaktion bei Zimmertemperatur abläuft. Die Reaktion mit Aminosäuren ist ferner reversibel¹⁰. Das Aminosäurenmolekül bleibt bei der Reaktion unverändert.

TNBS wird inzwischen zur Bestimmung von α -Amino-N^{14,15}, freien Aminogruppen in Proteinen^{16,17} und von Aminosäuren nach Papierchromatographie und Elektrophorese^{18,19} verwendet, Auch als Aminosäurenreagenz bei säulenchromatographischer

Aminosäurentrennung ist TNBS verwendet worden^{20, 21}. Dazu ist jedoch eine Änderung des in automatischen Aminosäurenanalysatoren vorliegenden Analysenganges notwendig, und die Autoren betonen, dass es schwierig sei, quantitative Bestimmungen durchzuführen. Als Hauptnachteile der bisher beschriebenen Methoden müssen das Fehlen eines leistungsfähigen Reagenzpuffers angesehen werden, sowie die Tatsache, dass TNBS mit einer zusätzlichen Pumpe in das Analysensystem eingepumpt werden muss. Das Ziel dieser Arbeiten war es, diese Nachteile zu beseitigen und damit eine einfache und genaue Methode zum Nachweis von Aminosäuren nach säulenchromatographischer Trennung mit TNBS zu entwickeln. Diese Methode sollte neben der Ninhydrinmethode ohne Modifikationen des in handelsüblichen, automatischen Aminosäurenanalysatoren vorliegenden Analysenschemas anwendbar sein. Die Genauigkeit der Methode, ihre Empfindlichkeit und die Wirkung von verschiedenen Reaktionsbedingungen auf Intensität und Ablauf der Farbreaktion wurden geprüft.

AMINOSÄURENNACHWEIS MIT TNBS

Nach Prüfung der verschiedenen Einflussmöglichkeiten wurde die folgende Methode zum Nachweis von Aminosäuren in automatischen Aminosäurenanalysatoren mit Hilfe von TNBS entwickelt.

Säulenchromatographische Aminosäurenanalysen wurden nach dem von STEIN *et al.*²² angegebenen Verfahren durchgeführt. Es wurden Elutionspuffer pH 3.25, 4.25 und 5.28 verwendet. Die automatischen photometrischen Messungen wurden mit einem Photometer "Eppendorf" (Hamburg) mit Durchflussküvette, Schichtdicke 10 mm und Stufenfilter Hg 313–366 nm vorgenommen. Die Extinktion der entstandenen Trinitrophenyl-Aminosäuren wurde kontinuierlich mit einem Schreiber (Philips PR 3210 U/001) registriert.

Ninhydrinreagenz wird durch einen 10%igen Natriumcarbonatpuffer + 1.4 ml 6 N NaOH/100 ml Puffer ersetzt. Der Reagenzpuffer wird dem Elutionspuffer im Verhältnis 1 + 2 kontinuierlich zugemischt. TNBS befindet sich in den Elutionspuffern bis zu einer Konzentration von 60 mg/100 ml. Die Reaktion erfolgt in etwa 15 Minuten bei Zimmertemperatur.

Empfindlichkeit und Genauigkeit der Methode

Die in der vorliegenden Messanordnung erzielte Genauigkeit und Empfindlichkeit der Methode sind in Tabelle I zusammengestellt.

Der Nachweis mit TNBS erwies sich als etwa halb so empfindlich wie mit Ninhydrin. Ähnliche Ergebnisse werden für den Aminosäurennachweis mit TNBS nach papierchromatographischer Trennung erhalten¹⁸. Die Reproduzierbarkeit war jedoch deutlich besser als bei Verwendung von Ninhydrin. Mit Ninhydrin lag in dieser Messanordnung die Streuung bei allen untersuchten Aminosäuren um 3–7 % höher.

Einfluss verschiedener Reaktionsbedingungen auf die Farbreaktion

Es wurde der Einfluss folgender Faktoren auf Intensität und Ablauf der Farbreaktion analysiert: Zusammensetzung des Reagenzpuffers, pH-Wert, Reaktionszeit, Aufbewahrungszeit der Lösungen, TNBS-Konzentration, Aminosäurenkonzentration.

TABELLE I

ERZIELTE GENAUIGKEIT DES AMINOSÄURENNACHWEISES MIT TNBS NACH AUTOMATISCHER SÄULEN-CHROMATOGRAPHISCHER ANALYSE VON SAUREN UND NEUTRALEN AMINOSÄUREN SOWIE EIN VERGLEICH DER EMPFINDLICHKEITEN BEIDER NACHWEISMETHODEN (5 BESTIMMUNGEN)

Aminosäure	Streuung in Prozent	Empfindlichkeit TNBS: Ninhydrin
Tau	± 4.8	0.6
Asp	± 5.2	0.4
Thre	± 3.1	0.6
Ser	± 4.6	0.4
Glu	± 5.3	0.4
Citr	± 3.4	0.4
Gly	± 4.7	0.5
Ala	± 1.0	0.4
Cys	± 3.1	0.6
Val	± 2.3	0.6
Met	± 5.3	0.5
Ileu	± 4.0	0.9
Leu	± 2.8	0.6
Tyr	± 4.1	0.6
Phe	± 3.3	0.5

BESTIMMUNG OPTIMALER REAKTIONSBEDINGUNGEN

Methodisches

Die photometrischen Messungen zur Analyse der einzelnen die Reaktion beeinflussenden Faktoren wurden mit einem Doppelstrahl-Spektralphotometer (Leitz-Unicam SP 800) mit automatischer Registrierung der Extinktion durchgeführt. Die Messungen erfolgten mit einer Küvettenwechselautomatik, mit der jeweils 4 Ansätze in definierten Zeitabständen von 50 sec–15 min gemessen werden konnten bei einer Wellenlänge von 350 nm. Die Schichtdicke der Küvetten betrug 10 mm. Die Farb-reaktion zwischen Aminosäuren und TNBS (Fa. Serva-Entwicklungslabor, Heidelberg) wurde in einem Lösungsgemisch aus Elutionspuffer und Reagenzpuffer untersucht. Als Elutionspuffer wurden Citratpuffer pH 3.25, 4.25 und 5.28 verwendet. Elutionspuffer und Reagenzpuffer wurden in einem bei automatischen Aminosäuren-analysatoren üblichen Mischungsverhältnis von 2 + 1 gemischt. Wenn nicht anders angegeben, wurde ein Aminosäurengemisch aus 18 Aminosäuren mit einer Gesamtkonzentration von 0.1 $\mu\text{Mol/ml}$ verwendet. Die einzelnen Aminosäuren lagen in diesem Gemisch in einer Konzentration von 0.0015–0.3 $\mu\text{Mol/ml}$ vor.

Die Aminosäurenfärbung mit TNBS und die TNBS-Eigenfärbung wurden durch die optische Differenz der Intensitäten von Messstrahl und Vergleichsstrahl bei 350 nm erhalten.

$$\text{Aminosäurenfärbung} = \text{Extinktion}_{\text{Probe}} - \text{Extinktion}_{\text{TNBS}}$$

$$\text{TNBS-Eigenfärbung} = \text{Extinktion}_{\text{TNBS}} - \text{Extinktion}_{\text{Leerwert}}$$

Die Zusammensetzung der einzelnen Ansätze zeigt Tabelle II.

TABELLE II

ZUSAMMENSETZUNG DER ANSÄTZE VON AMINOSÄUREN-TNBS-REAKTIONSGEMISCH, TNBS-EIGENFÄRBUNG UND LEERWERT

Ansatz	Elutions- + Reagenzpuffer	Aminosäuren	TNBS
Probe	2 + 1	+	+
TNBS-Eigenfarbe	2 + 1	—	+
Leerwert	2 + 1	—	—

Reagenzpuffer und pH-Wert

Als Reagenzlösungen wurden NaHCO_3 , Na_2CO_3 , Na_2HPO_4 , NaH_2PO_4 und NaOH verwendet. Die Geschwindigkeit der Farbentwicklung, wie bekannt¹⁰, nahm mit zunehmender Alkalinität des Reaktionsgemisches zu, die durch Verwendung der Reagenzlösungen in folgender Reihenfolge erzielt wurde: NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , NaHCO_3 , Na_2CO_3 , NaOH .

In automatischen Aminosäurenanalysatoren beträgt die Reaktionszeit mit Ninhydrin etwa 10–25 Min. Diese Zeit wird durch die Länge des Teflonkapillarschlauches im Reaktionsbad bestimmt.

Ein Gemisch aus Elutionspuffer pH 3.25 und Aminosäuren wurde mit NaOH auf pH-Werte zwischen 6.0 und 11.5 eingestellt (8 Stufen). Dann wurde nach Zugabe von wässriger TNBS bis 20 mg/100 ml die Reaktion über 2.5 Std. untersucht (Fig. 1).

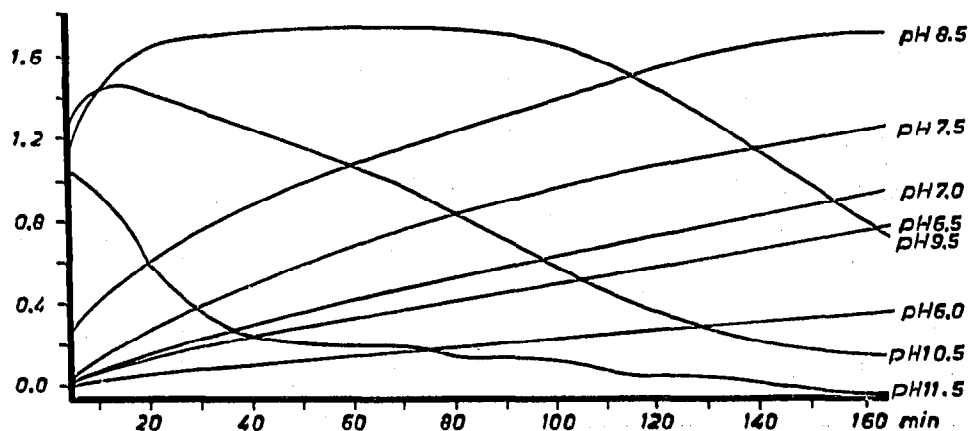
Extinktion

Fig. 1. Verlauf der Farbentwicklung zwischen Aminosäuren und TNBS bei unterschiedlichem pH-Wert der Lösung von pH 6.0 bis 11.5 über 2.5 Std.

Zwischen pH 6.5 und 8.0 nimmt die Extinktion mit steigendem pH-Wert in 2.5 Std. etwa kontinuierlich zu. Bei höheren pH-Werten ist die Extinktionszunahme am Anfang sehr stark und wird mit zunehmender Reaktionszeit geringer. Bei pH 9.5 ist das Extinktionsmaximum etwa nach 30 Min. erreicht. Es bleibt bei diesem pH-Wert fast 1 Std. konstant und fällt dann langsam ab. Bei pH 10.5 und 11.5 ist das Maximum der Extinktion schon nach 5–10 Min. erreicht. Durch die sich sehr rasch entwickelnde Eigenfarbe der Lösung bei diesen pH-Werten erreicht das Extinktionsmaximum nicht mehr die Höhe wie bei niedrigeren pH-Werten und fällt ausserdem sehr rasch ab.

Daraus ergibt sich, dass für die Verwendung in automatischen Aminosäure-analysatoren mit Reaktionszeiten zwischen 10 und 25 Min. das Reaktionsgemisch pH-Werte zwischen etwa 9.2 und 10.2 besitzen muss. Liegen lange Kapillarschläuche in den Geräten vor mit Reaktionszeiten zwischen 15 und 25 Min., empfehlen sich für das Reaktionsgemisch pH-Werte zwischen 9.2 und 9.7, bei kürzeren Reaktionszeiten (5–15 Min.) pH-Werte zwischen 9.7 und 10.2.

pH-Titrationen

Zur Erzielung von stabilen pH-Werten zwischen 9.2 und 10.2 nach Mischung mit Elutionspuffer im Verhältnis 2 + 1 kamen von den bisher geprüften Reagenzlösungen nur Natriumcarbonatpuffer infrage. Im folgenden wurde das pH-Verhalten verschieden konzentrierter Natriumcarbonatpuffer nach Mischung mit Elutionspuffer untersucht. Es wurden Titrations von Elutionspuffer pH 3.25 mit 6, 10 und 14 %igem Natriumcarbonatpuffer vorgenommen (Fig. 2, I).

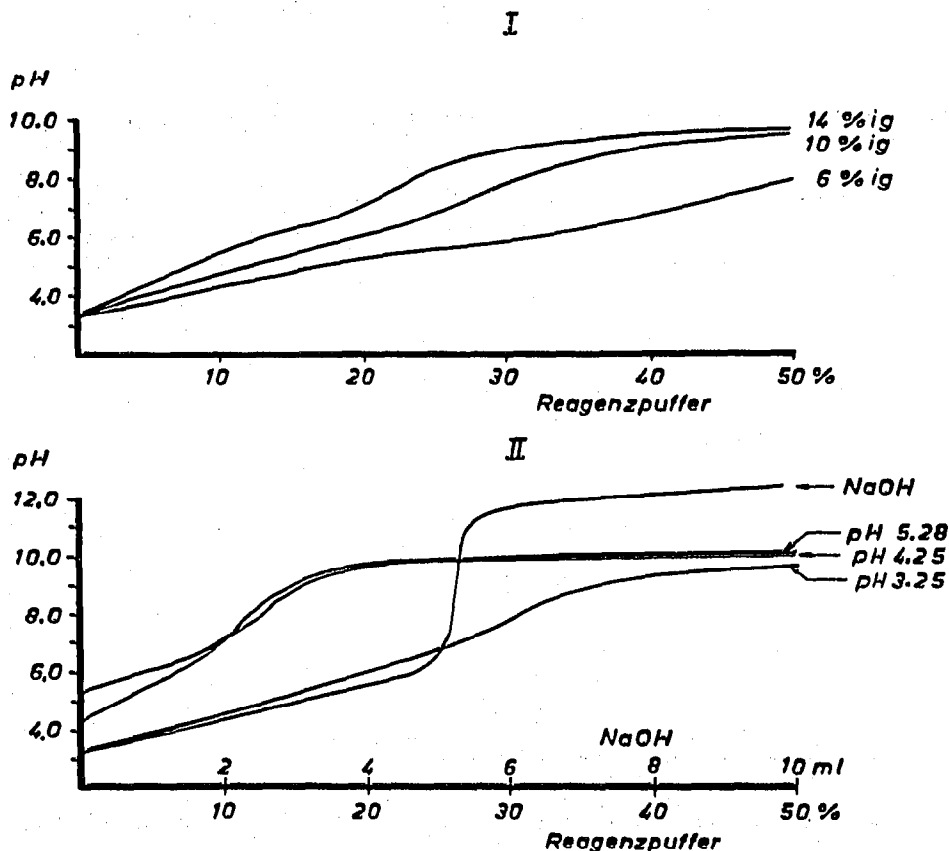


Fig. 2. (I) Titrationskurven von Elutionspuffer pH 3.25 mit Natriumcarbonatlösung (Reagenzpuffer) 6%ig, 10%ig und 14%ig. (II) Titrationskurven von drei bei säulenchromatographischen Aminosäureanalysen verwendeten Elutionspuffern mit 10%iger Na₂CO₃-Lösung + 1.4 ml 6 N NaOH/100 ml Puffer sowie die Titrationskurve des Elutionspuffers pH 3.25 mit 1.5 N NaOH.

Der nach Mischung im Verhältnis 2 + 1 erreichte pH-Wert steigt mit zunehmender Na₂CO₃-Konzentration von pH 8.0 auf etwa 9.4. Bei Verwendung höher konzentrierter Na₂CO₃-Lösungen stieg der pH-Wert nicht wesentlich weiter an. Um nach Mischung mit Elutionspuffer konstante pH-Werte von 9.5–10.2 zu erreichen, wurde dem Na₂CO₃-Puffer Natronlauge zugesetzt. Als günstigste Mischung erwies

sich 1.4 ml 6 N NaOH/100 ml 10%iger Na_2CO_3 -Lösung. Die pH-Werte lagen nach Mischung dieses Puffers mit 3 verschiedenen Elutionspuffern pH 3.25, 4.25 und 5.28 im Verhältnis 1 + 2 in einem pH-stabilen Bereich etwa zwischen 9.6 und 10.1 (Fig. 2, II). Diese Mischung ist für die Analyse geeignet. Eine Gasentwicklung in Form von CO_2 trat nach Mischung von Reagenzpuffer und Elutionspuffer bei dem sich einstellenden pH-Wert von 9.5–10.5 nicht auf. Mit diesem Reagenzpuffer können durch Änderung der Natronlaugezugabe die pH-Werte nach Mischung mit Elutionspuffer variiert und auf die in den einzelnen Geräten vorliegenden Reaktionszeiten abgestimmt werden.

Durch Mischung von NaOH mit Elutionspuffer pH 3.25 waren, wie erwartet werden durfte, keine stabilen pH-Werte zwischen pH 9.2 und 10.2 zu erzielen. Die Farbentwicklung zwischen TNBS und Aminosäuren war jedoch in Reaktionsgemischen, in denen die pH-Werte mit reiner NaOH eingestellt wurden, intensiver als bei Einstellung der gleichen pH-Werte nach Zugabe von Na_2CO_3 -Lösung.

Einfluss verschiedener organischer Lösungsmittel auf die Farbbildung

Durch Zugabe verschiedener organischer Lösungsmittel zum Reaktionsgemisch, wie Methyläthylketon, Picolin, Äthyl-, Propylalkohol, Diäthyläther, Chloroform, Pyridin, Xylol, und Tetrachlorkohlenstoff, konnte die Farbbildung nicht deutlich verstärkt werden. Acetonzugaben zum Reaktionsgemisch zeigten eine geringgradig positive Wirkung, die offenbar auf einer nach der Acetonzugabe nachweisbaren Erhöhung des pH-Wertes beruhte.

Zumischung von TNBS

Die Lösung von TNBS in 10%igem Natriumcarbonatpuffer + NaOH führte in wenigen Minuten zu einer raschen Zunahme der Eigenfarbe dieser Lösung. Die Zumischung von TNBS zum Reagenzpuffer analog der Zusammensetzung des Ninhydrinreagenzes schied daher für TNBS aus.

TNBS wurde deshalb dem Elutionspuffer zugemischt. TNBS wird von den für die Aminosäurenchromatographie verwendeten Kationenaustauschern praktisch nicht zurückgehalten und fließt zusammen mit dem Elutionspuffer kontinuierlich durch die Säule. Bei diesem Verfahren konnte das in den Aminosäureanalysatoren vorliegende Nachweisprinzip unverändert für den Nachweis mit TNBS verwendet werden. TNBS und Aminosäuren passieren gemeinsam die Säule. Die Farbreaktion zwischen TNBS und den Aminosäuren soll nach Elution durch Zumischen des basischen Reagenzpuffers ausgelöst werden. Von der Zumischung von TNBS zum Elutionspuffer muss gefordert werden:

(1) dass das TNBS-Elutionspuffer-Gemisch genügend lange Zeit haltbar ist. (Es sollte wie beim Nachweis mit Ninhydrin möglich sein, einen für mehrere Wochen reichenden Vorrat an Elutionspuffer herzustellen),

(2) dass es bei einer über 15–20 Std. dauernden säulenchromatographischen Analyse auf der Säule nicht zu einer nennenswerten Reaktion zwischen Aminosäuren und TNBS kommt.

Haltbarkeit des TNBS-Elutionspuffer-Gemisches

Die Elutionspuffer pH 3.25, 4.25 und 5.28 wurden jeweils mit TNBS in vier verschiedenen Konzentrationen gemischt (10, 30, 60 und 90 mg/100 ml) und 4 Wochen

aufbewahrt. Bei den Puffern mit 60 und 90 mg TNBS pro 100 ml Puffer trat im Laufe der Aufbewahrung eine zunehmende Gelbfärbung auf. Bei der Wellenlänge 350 nm war im Laufe der Aufbewahrung jedoch für diese TNBS-Konzentrationen nur eine schwache Zunahme der Extinktion festzustellen, die bei niedrigeren TNBS-Konzentrationen noch geringer war (Fig. 3, I).

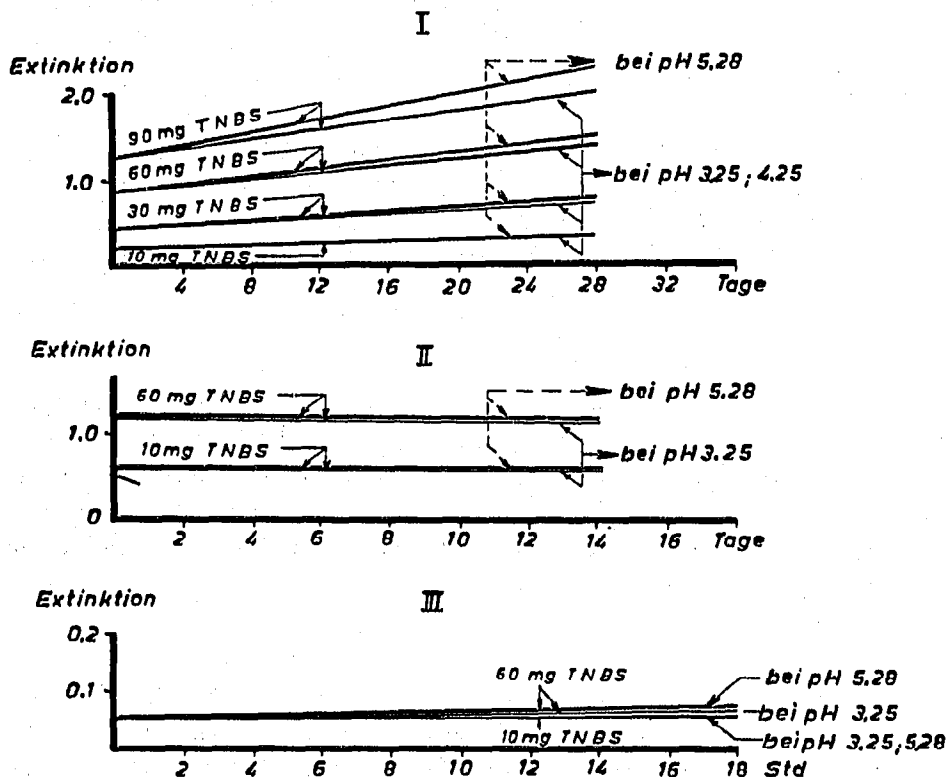


Fig. 3. (I) Zunahme der TNBS-Eigenfarbe bei 350 nm bei Aufbewahrung von drei Elutionspuffern pH 3.25, 4.25 und 5.28 mit je vier verschiedenen TNBS-Konzentrationen, 10, 30, 60 und 90 mg/100 ml Puffer über 4 Wochen. (II) Bildung des Trinitrophenyl-Aminosäuren-Komplexes mit TNBS-Elutionspuffer-Gemischen, die über 2 Wochen aufbewahrt wurden. Die Messung erfolgte 2 × täglich jeweils nach 25 Min. Reaktionszeit. (III) Farbentwicklung zwischen Aminosäuren und TNBS in Elutionspuffer pH 3.25 und 5.28 bei einer TNBS-Konzentration von 10 und 60 mg/100 ml über 18 Std. Gemessen wurde die Extinktion des Elutionspuffer-TNBS-Aminosäuren-Gemisches gegen Elutionspuffer-TNBS-Gemisch (Simulierung der Verhältnisse auf der Säule).

Eine zunehmende Alkalinität des Elutionspuffers bewirkt bei allen TNBS-Konzentrationen eine geringfügig erhöhte Eigenfärbung.

Es wurde daraufhin untersucht, ob die Aminosäuren-TNBS-Reaktion durch längere Aufbewahrung des TNBS-Elutionspuffer-Gemisches beeinflusst wird. Elutionspuffer pH 3.25 und 5.28 und TNBS-Konzentrationen von je 10 und 60 mg/100 ml wurden über 2 Wochen aufbewahrt und deren Extinktion nach Zugabe von Aminosäuren in täglichen Abständen gemessen. Fig. 3, II zeigt den Verlauf derjenigen Extinktionen über 2 Wochen, die täglich 25 Min. nach Zugabe von Aminosäuren gemessen werden konnten. Diese blieb über die Dauer von 14 Tagen nahezu gleich.

Reaktionen zwischen Aminosäuren und TNBS auf der Säule während der Elution

Nach Zugabe von Aminosäuren und TNBS zum Elutionspuffer pH 3.25 und 5.28 bei einer TNBS-Konzentration von 10 und 60 mg/100 ml wurde über einen Zeit-

raum von 20 Std. die Extinktion gemessen (Fig. 3, III). Diese Messungen wurden täglich über 8 Tage und einmal wöchentlich für weitere 2 Wochen vorgenommen.

Bei einer TNBS-Konzentration von 10 mg/100 ml ist die Reaktion zwischen Aminosäuren in TNBS im Elutionspuffer pH 3.25 und 5.28 während 18 Std. kaum messbar. Bei 60 mg TNBS/100 ml ist in 18 Std. eine ganz schwache Zunahme der Extinktion zu erkennen, die im Puffer pH 5.28 stärker ist als bei pH 3.25. Die Extinktion lag bei 18 Std. Aufbewahrung jedoch unter 5 % der Extinktion, die 30 Min. nach Zugabe von Reagenzpuffer gemessen wurde. Bei Arbeiten an der automatischen Aminosäurenapparatur kommen die Aminosäuren auf der Säule jedoch nur 3–5 Std. mit dem Elutionspuffer pH 5.28 in Berührung. Die aus Fig. 3, III erkennbare äusserst geringe Reaktion zwischen Aminosäuren und TNBS auf der Säule ist bei vergleichenden säulenchromatographischen Analysen etwa gleich und kann vernachlässigt werden.

Nach den Ergebnissen der bisherigen Untersuchungen waren wichtige Voraussetzungen für die Durchführbarkeit dieser Methode gegeben. In den folgenden Experimenten wurde die für diese Methode günstigste TNBS-Konzentration ermittelt. Ferner interessierte die Frage, ob unter diesen Versuchsbedingungen die TNBS-Aminosäuren-Reaktion dem Lambert-Beerschen-Gesetz folgt und eine lineare Eichkurve bei verschiedenen Aminosäurenkonzentrationen aufgestellt werden kann.

Einfluss der TNBS-Konzentration auf die Farbentwicklung

Es wurde die Farbentwicklung in Elutionspuffer pH 3.25 bei TNBS-Konzentrationen von 10–160 mg/100 ml über 1.5 Std. bei pH 9.5 gemessen (Fig. 4).

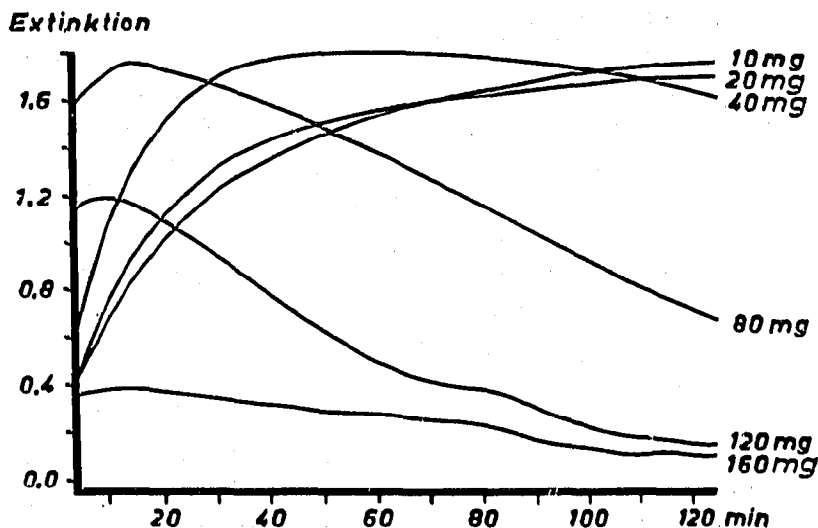


Fig. 4. Bildung des TNBS-Aminosäuren-Komplexes bei verschiedenen TNBS-Konzentrationen, von 10 bis 160 mg/100 ml.

Die Geschwindigkeit der Reaktion zwischen TNBS und Aminosäuren bei gleichem pH-Wert der Lösung nimmt in den ersten 30 Min. bei steigender TNBS-Konzentration zu. Die TNBS-Konzentration zeigt damit, wie zu erwarten, auf die Reaktionsgeschwindigkeit eine dem pH-Wert ähnliche Wirkung, da bei höheren TNBS-Konzentrationen die Aminosäuren eher Gelegenheit haben, mit dem Reaktionspartner zu-

sammennzutreffen. Bei TNBS-Konzentrationen unter 40 mg % steigt die Extinktion bis 1.5 Std. nach Beginn der Reaktion an. Bei 80 mg % ist das Extinktionsmaximum schon nach 15 Min. erreicht und fällt infolge der sich rasch entwickelnden Eigenfarbe danach wieder ab. Dieser Effekt ist bei TNBS-Konzentrationen von 120 und 160 mg/100 ml noch deutlicher, so dass das bei 40 und 80 mg nachweisbare Extinktionsmaximum nicht mehr erreicht wird. Die optimale TNBS-Konzentration dürfte für diese Methode zwischen 40 und etwa 70 mg/100 ml liegen. Im Hinblick auf die längere Aufbewahrungsmöglichkeit der TNBS-Elutionspuffer-Gemische bei niedrigeren TNBS-Konzentrationen und die geringe Reaktion zwischen TNBS und Aminosäuren während der Elution auf der Säule ist eine TNBS-Konzentration um 40 mg/100 ml Reaktionsgemisch zu empfehlen. Die TNBS-Konzentration im Elutionspuffer muss dann 60 mg/100 ml betragen, da dieser nach Elution 2 + 1 mit Reagenzpuffer gemischt wird.

Einfluss der Aminosäurenkonzentration

Die Farbreaktion zwischen TNBS und Aminosäuren wurde mit Glutaminsäure verschiedener Konzentration bei einer TNBS-Konzentration von 40 mg/100 ml und pH-Wert von 9.6 gemessen. Bis 0.2 μ Mol Glutaminsäure pro ml war unter den hier gewählten Messbedingungen die gemessene Extinktion nach 25 Min. Reaktionszeit der Glutaminsäurekonzentration proportional.

Nach dieser beschriebenen Methode kann ohne Modifikationen des Analysenschemas in automatischen Aminosäureanalysatoren (2 Säulenverfahren) neben Ninhydrin TNBS als Nachweisreagenz verwendet werden. Es muss lediglich die Möglichkeit zur Absorptionsmessung des Trinitrophenyl-Aminosäuren-Komplexes bei 350 nm eingebaut werden, sofern diese nicht vorhanden ist. Beim Nachweis mit TNBS ist die Verwendung eines Stufenfilters, z.B. 313–366 nm, zur Erzielung einer hohen Nachweisempfindlichkeit zu empfehlen. Es ist bekannt, dass die Absorptionsmaxima der einzelnen Trinitrophenyl-Aminosäuren-Komplexe in alkalischer Lösung nicht alle genau bei 350 nm liegen⁹.

Ein Vergleich der beiden Methoden zeigt folgende Vorteile der TNBS-Methode gegenüber Ninhydrin:

- (1) grössere Stabilität gegenüber geringfügigen methodischen Abweichungen,
- (2) keine Sauerstoffempfindlichkeit des Reagenzes,
- (3) einfache Herstellungsvorschriften,
- (4) Reaktionsablauf bei Zimmertemperatur,
- (5) geringere Kosten,
- (6) bessere Reproduzierbarkeit,
- (7) höhere Nachweisempfindlichkeit von TNBS gegenüber Peptiden.

Die bessere Reproduzierbarkeit der Messungen gegenüber Ninhydrin wurde auch nach papierchromatographischer Trennung von SHINODA UND SATAKE hervorgehoben¹⁸.

Nachteile der Methode sind:

- (1) vor allem die Unempfindlichkeit von TNBS gegenüber Prolin und Oxyprolin,
- (2) bei der Analyse der basischen Aminosäuren eine zuweilen zu beobachtende geringfügige aufwärts gerichtete Drift der Basislinie. Dieses tritt jedoch auch mit Ninhydrin bei Verwendung stärker basischer Elutionspuffer im Einsäulen-Verfahren auf.

SCHLUSSFOLGERUNGEN

Bei vielen Fragestellungen, bei denen auf die Bestimmung von Prolin bzw. Oxyprolin z. B. in komplexen biologischen Gemischen nicht verzichtet werden kann, liefert eine zusätzliche Analyse und der Nachweis der Substanzen mit TNBS wertvolle Aufschlüsse über die Zusammensetzung des Materials. Als besonders vorteilhaft kann sich die wesentlich höhere Reaktionsempfindlichkeit von TNBS mit Peptiden im Vergleich zu Ninhydrin erweisen¹⁰. Die Peptidkonzentration besitzt bei der Untersuchung vieler biologischer Flüssigkeiten besonderes Interesse. Die Peptidbestimmung kann ferner bei der Beurteilung des erreichten Aufspaltungsgrades von Proteinhydrolysaten nach unterschiedlich langer Hydrolyse sehr aufschlussreich sein. Durch Verwendung von Ninhydrin und TNBS ist es möglich, stickstofffreie, aber Ninhydrin positive Substanzen zu erkennen, die im Chromatogramm von Proteinhydrolysaten und biologischen Flüssigkeiten auftreten können (z. B. Ketosäuren). Dazu muss das Reaktionsverhalten dieser Stoffe gegenüber Ninhydrin und TNBS jedoch weiter untersucht werden. Neben der bekannten Tatsache, dass TNBS mit Ammoniak nicht reagiert, wird in den Chromatogrammen keine Extinktion bei der Elution von Cysteinsäure und Harnstoff gemessen.

Bis zu einer Konzentration von $0.2 \mu\text{Mol/ml}$ Aminosäure folgt die TNBS-Aminosäuren-Reaktion unter diesen Versuchsbedingungen dem Lambert-Beerschen-Gesetz. Abhängig von der Empfindlichkeit der einzelnen Geräte für den Aminosäurenachweis mit TNBS werden für eine Analyse von den einzelnen Aminosäuren Mengen bis etwa $0.5 \mu\text{Mol}$ benötigt. Bei einer Flussrate (Elutionspuffer + Reagenzpuffer) von 60 ml pro Std. ist eine einzelne Aminosäure in etwa 10–20 Min. eluiert. Sie liegt nach der Elution damit in einer Flüssigkeitsmenge von 10–20 ml vor, und ihre Konzentration fällt in den linearen Bereich der Eichkurve.

Die TNBS-Aminosäuren-Derivate sind lichtempfindlich¹⁸. Es empfiehlt sich daher, das Reaktionsbad vor intensiver Beleuchtung zu schützen. Eine vollständige Abdunklung erscheint vorteilhaft, jedoch nicht notwendig. Ebenso sind die TNBS-haltigen Elutionspuffer genügend haltbar, wenn sie vor intensiver Dauerbelichtung geschützt werden. Eine vorübergehende Aufbewahrung bei Tageslicht zeigte keinen schädlichen Einfluss.

DANK

Wir danken der Stiftung Volkswagenwerk für die finanzielle Unterstützung.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird eine Methode beschrieben zum Nachweis von Aminosäuren mit 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS). Unter Beibehaltung des im Analysator für den Ninhydrinnachweis vorliegenden Analysenschemas kann dieses Nachweisreagenz statt Ninhydrin wahlweise in automatisch arbeitenden Aminosäureanalysatoren verwendet werden. Es muss lediglich die Möglichkeit zur Messung der Extinktion bei 350 nm bestehen. TNBS wird den Elutionspuffern bis zu einer Konzentration von 60 mg/100 ml zugesetzt. Statt Ninhydrinreagenz wird dem Eluat als Reagenzpuffer 10%ige Na_2CO_3 -Lösung (wasserfrei) + 1.4 ml 6 N NaOH/100 ml

Lösung im Verhältnis 1 + 2 zugemischt. Die Reaktion zwischen Aminosäuren und TNBS läuft bei Zimmertemperatur und pH 9,2–9,3 in etwa 10–20 Min. ab. Der Aminosäurenachweis mit TNBS erwies sich als halb so empfindlich wie mit Ninhydrin. Die Streuung der Analysenwerte lag um 3–7 % niedriger als beim Nachweis mit Ninhydrin. Zur Bestimmung optimaler Reaktionsbedingungen im Rahmen dieser Methode wurde der Einfluss verschiedener Puffer, des pH-Wertes organischer Lösungsmittel, der TNBS- und Aminosäurenkonzentration getestet. Die für diese Methode erforderlichen Reagentien sind über 2–4 Wochen haltbar.

SUMMARY

2,4,6-Trinitrobenzenesulphonic acid (TNBS) can be used for the quantitative determination of amino acids in automatic amino acid analyzers. If light absorption can be measured at 350 nm, TNBS can be used without further technical modifications instead of ninhydrin. TNBS is added to the elution buffers (60 mg/100 ml buffer). The ninhydrin reagent is replaced by a 10 % Na₂CO₃ (anhydrous) solution + 1.4 ml of 6 N NaOH per 100 ml of solution which is continuously added to the elution buffer in a ratio of 1:2. The reaction between amino acids and TNBS takes place in the teflon coil at room temperature at pH 9.2–9.3 within 10–20 min. The sensitivity of the method was about 50 % of that of ninhydrin. The reproducibility of the measurement was significantly better. For optimum conditions the influence of various buffers, of pH values, of various added organic solvents, and of the TNBS and amino acid concentrations was tested. The reagents used for the measurements are stable for about 2–4 weeks.

LITERATUR

- 1 S. MOORE UND W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.*, 211 (1954) 907.
- 2 S. MOORE UND W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.*, 176 (1948) 367.
- 3 T. A. MAHOWALD, E. A. NOLTMANN UND S. A. KUBY, *J. Biol. Chem.*, 237 (1962) 1138.
- 4 H. STEGMANN, *Z. Physiol. Chem.*, 319 (1960) 102.
- 5 D. R. GIANT, *Anal. Biochem.*, 6 (1963) 109.
- 6 H. ROSEN, C. W. BERARD UND S. M. LEVENSEN, *Anal. Biochem.*, 4 (1962) 213.
- 7 J. STANLEY, *Microchem. J.*, 9 (1965) 387.
- 8 E. YEMM UND E. C. COCKING, *Analyst*, 80 (1954) 209.
- 9 T. OKUYAMA UND K. SATAKE, *J. Biochem. (Tokyo)*, 47 (1960) 454.
- 10 K. SATAKE, T. OKUYAMA, M. OHASHI UND T. SHINODA, *J. Biochem. (Tokyo)*, 47 (1960) 654.
- 11 H. TERAYAMA UND M. TAKEUCHI, *Gann*, 53 (1962) 293.
- 12 Y. TONOMURA, J. YOSHIMURA UND T. OHNISHI, *Biochim. Biophys. Acta*, 78 (1963) 698.
- 13 M. AZEGAMI UND K. IWAI, *J. Biochem. (Tokyo)*, 55 (1964) 346.
- 14 J. HARMEYER UND H. PLONAIT, *Helv. Paediat. Acta*, 22 (1967) 216.
- 15 D. W. PALMER UND T. PETERS JR., *Ber. Fa. Technicon Corp.*, Ardsley, N.Y., Nr. 65, p. 25.
- 16 A. F. S. A. HABEED, *Anal. Biochem.*, 14 (1966) 328.
- 17 T. SHINODA, *Biochim. Biophys. Acta*, 97 (1965) 382.
- 18 T. SHINODA UND K. SATAKE, *J. Biochem. (Tokyo)*, 50 (1961) 293.
- 19 C. F. BAXTER UND J. SENOMER, *Anal. Biochem.*, 7 (1964) 55.
- 20 *Ergebnisse der Aminosäuren-Säulenchromatographie*, *Kolloquium*, Febr. 1965, Schloss Reinhartshausen, Erbach, Fa. Technicon GmbH, Frankfurt.
- 21 H. HOCHTRASSER, Dept. Med. Surg. Veterans Adm. Hosp., Cleveland, Ohio, U.S.A., pers. Mitteilung.
- 22 S. MOORE, D. H. SPACKMANN UND W. H. STEIN, *Anal. Chem.*, 30 (1958) 1185.