

DIE REPRODUZIERBARKEIT UND DER AUSSAGEWERT PAPIERCHROMATOGRAPHISCHER AMINOSÄUREANALYSEN IM VERGLEICH ZU ENTSPRECHENDEN SÄULENCHROMATOGRAPHISCHEN ERGEBNISSEN

W. MATTHIAS

Institut für Pflanzenzüchtung, Quedlinburg (D.D.R.)

UND

J. WAGNER

Medizinische Klinik der Karl-Marx-Universität, Leipzig (D.D.R.)

SUMMARY

The reproducibility and value of paper chromatographic amino acid analyses in comparison to corresponding column chromatographic results

On the basis of five international surveys organized by the Quedlinburg Working Group for Protein Analysis, the following results were obtained: The separation and determination of amino acids with the aid of paper chromatography showed an error scatter of about 10% for artificial mixtures of amino acid; for biological material this value was substantially higher; the results obtained by column chromatography were reproducible in the range of about 3-5% within one research team; by comparing the results from different institutes a significantly greater scatter was observed. The sources of these errors are discussed in detail.

Die Weltliteratur über die Trennung und Bestimmung der Aminosäuren ist heute kaum noch übersehbar. Daraus sollte man die logische Schlussfolgerung ziehen, dass die Methoden zur Bestimmung der Eiweissbausteine exakte reproduzierbare Werte liefern. Beschäftigt man sich aber etwas eingehender mit der Aminosäureanalytik, wie es sich z.B. der Quedlinburger Arbeitskreis für Eiweissanalytik zur Aufgabe gestellt hat, dann muss man leider feststellen, dass die Fehlerbreite wesentlich grösser ist als allgemein in der Literatur angegeben. In den folgenden Ausführungen soll nur die Leistungsfähigkeit der Papier- und Säulenchromatographie für die Bestimmung der Aminosäuren erörtert werden.

Der Internationale Quedlinburger Arbeitskreis hat seit 1956 in fünf Enqueten und Symposien systematisch versucht, die Fehlermöglichkeiten der beiden chromatographischen Methoden festzustellen, indem Analysenproben mit unterschiedlichen Fragestellungen an zuständige Institute verschickt wurden, z.B. beteiligten sich 1964 27 Institute aus 8 Staaten. In diesem Zusammenhang wurde 1961 ein Eialbuminhydrolysat, 1962 2 Mischungen reiner Aminosäuren und ein Baktopeptonhydrolysat und 1964 ein Humanserumalbuminhydrolysat und reines Humanserumalbumin

verschickt. Die erhaltenen Werte wurden dann auf den Quedlinburger Symposien diskutiert. Als Ergebnis dieser internationalen Analysenvergleiche muss festgestellt werden:

Die quantitative Bestimmung der Aminosäuren mit Hilfe der Papierchromatographie besitzt trotz vieler Verbesserungen eine zu grosse Fehlerbreite. Die Enqueten haben gezeigt, dass die Analysenergebnisse der künstlichen Aminosäuremischungen Fehler von über $\pm 10\%$ hatten, die Ergebnisse bei den Hydrolysaten zeigten noch wesentlich grössere Streuungen, d.h. die Papierchromatographie eignet sich bei der Untersuchung von biologischen Materialien im allgemeinen nur für semiquantitative Aussagen.

Die an Ionenaustauschersäulen erhaltenen Werte besitzen innerhalb der einzelnen Institute eine Streuung von etwa 3–5%, jedoch beim Vergleich der Ergebnisse verschiedener Institute ergab sich eine wesentlich grössere Streubreite.

Welche Ursachen sind nun für diese Ungenauigkeiten verantwortlich zu machen?

Betrachten wir zunächst die Verhältnisse bei der Papierchromatographie: Eine Schwierigkeit für die quantitative Bestimmung ist, dass die Zellulosefasern die einzelnen Aminosäuren—je nach Laufmittelzusammensetzung—verschieden stark adsorbieren. Weitere störende Faktoren sind auf den Einfluss der qualitativ und quantitativ unterschiedlichen Begleitsubstanzen zurückzuführen. Diese Stoffe beeinflussen einmal die Gleichgewichtseinstellung und zum anderen auch bei der Auswertung den Ablauf der Ninhydrinreaktion, die im übrigen nach neuesten Untersuchungen—u.a. auch in unserem Laboratorium—wesentlich komplizierter abläuft als in der Literatur angegeben wird. Es ist daher nur bedingt möglich, mit Hilfe von Testmischungen Chromatogramme von biologischen Extrakten bzw. Hydrolysaten auszuwerten.

Ähnliche Gesichtspunkte gelten auch für die Dünnschicht-Chromatographie.

Für eine quantitative Trennung und Bestimmung der Aminosäuren mit Hilfe der Ionenaustauschersäulen ist von Bedeutung: Gleicher Vernetzungsgrad und gleiche Korngrösse des Ionenaustauschers, optimale Bedingungen im Hinblick auf die Puffersysteme, Temperatur, Elutionsgeschwindigkeit usw.

Die Auswertung der getrennten Aminosäuren mit Ninhydrin stellt auch hier eine Fehlerquelle dar. Dabei muss man differenzieren zwischen einer automatischen kontinuierlichen Anfärbung und einer Anfärbung in den mit einem Fraktionssammler getrennten Fraktionen des Eluates.

Aus den Ergebnissen der Enqueten, die im einzelnen publiziert sind^{1–3}, muss man die Schlussfolgerung ziehen, dass augenblicklich die Säulenchromatographie an Ionenaustauschern für die quantitative Bestimmung von Aminosäuren die Methode der Wahl ist, obwohl auch hier die zu erwartenden Fehler noch zu gross sind.

ZUSAMMENFASSUNG

Auf Grund der Ergebnisse von fünf internationalen Enqueten des Quedlinburger Arbeitskreises für Eiweissanalytik ergab sich für die Trennung und Bestimmung der Aminosäuren mit Hilfe der Papierchromatographie eine Fehlerbreite von $\pm 10\%$ für künstliche Aminosäuregemische, für biologische Materialien war dieser Wert erheblich grösser. Die säulenchromatographisch erhaltenen Resultate waren in einem Bereich von $\pm 3–5\%$ innerhalb einer Arbeitsgruppe reproduzierbar,

beim Vergleich der Ergebnisse verschiedener Institute ergab sich eine wesentlich grössere Streubreite. Die Gründe für diese Fehler werden im einzelnen diskutiert.

LITERATUR

- 1 W. MATTHIAS UND J. WAGNER, *Z. Chem.*, 2 (1962) 126.
- 2 W. MATTHIAS UND J. WAGNER, *Z. Chem.*, 5 (1965) 171.
- 3 W. MATTHIAS UND J. WAGNER, *J. Chromatog.*, 26 (1967) 41.

J. Chromatog., 33 (1968) 316-318