

Analyse von Aminosäuren durch Säulenchromatographie an Anionenaustauschern

VON K. BORNER

Aus dem Institut für Angewandte Physiologische Chemie und Klinische Chemie der Freien Universität Berlin, Berlin-Dahlem
(Direktor: Prof. Dr. med. H.-J. Dulce)

(Eingegangen am 17. März 1966)

Die Methode der Säulenchromatographie von Aminosäuren mit anschließender automatischer Analyse wird durch zusätzliche Anwendung von Anionenaustauschern vom Typ Dowex 1 (im Gegensatz zu den üblichen Kationenaustauschern) in ihrer Leistungsfähigkeit gesteigert. Geeignete Arbeitsbedingungen zum Bestimmen von sauren Aminosäuren werden angegeben.

The application of the column chromatography of amino acids coupled with automatic analysis is extended by the use of the Dowex-1 type of anion exchanger instead of the usual cation exchangers. Appropriate operating conditions for the determination of acidic amino acids are given.

Die quantitative Analyse von Aminosäuren in biologischen Proben ist durch die industrielle Serienproduktion von Geräten zur automatischen Analyse nach dem Vorbild von D. SPACKMAN, H. W. STEIN und S. MOORE (1) wesentlich verbessert worden. Das zu untersuchende Aminosäuregemisch wird an einer Kationenaustauschersäule getrennt; das Eluat wird mittels der Ninhydrinreaktion automatisch analysiert. Die Kationenaustauschersäule trennt jedoch nicht alle Aminosäuren befriedigend (2, 3). Die vorliegende Arbeit möchte zeigen, daß sich die Leistungsfähigkeit der Methode durch zusätzliche Anwendung von Anionenaustauschern stark erhöhen läßt. Dafür werden geeignete Arbeitsvorschriften angegeben, die für automatische Apparaturen bisher fast völlig fehlten.

Methodik

Substanzen

Alle Reagenzien zur Aminosäure-Analyse waren von höchstem Reinheitsgrad.

L-Tyrosin-O-schwefelsäure wurde nach der Vorschrift von H. H. TALLAN und Mitarbeitern (4) hergestellt. D-Penicillamin · HCl wurde von der Fa. Heyl u. Co., Berlin bezogen. D-Penicillaminsäure wurde aus D-Penicillamin durch Oxydation mit Peroxoameisensäure (5) präpariert, auf dem gleichen Wege Homocysteinsäure aus Homocystin. Cystein, Homocystein, Penicillamin und Glutathion wurden bei pH 6,8 mit Jodessigsäure zu den S-Carboxymethylderivaten umgesetzt. Nach der Korngröße besonders fraktionierte Anionenaustauscher wurden von den Firmen Serva, Heidelberg (Dowex 1×8 und 1×10) und Technicon Ltd. Chertsey-Surrey (Dowex 1×4,1) bezogen.

Eine Apparatur zur Aminosäure-Analyse (Fa. „Technicon“, Frankfurt) wurde im chromatographischen System folgendermaßen modifiziert: Das Puffer-Gradienten-Gerät wurde durch eine einfache Vorratsflasche ersetzt. Die Stromversorgung der Milton-Roy-Pumpe wurde mit einem magnetischen Konstanthalter (Philips, PE 1033) stabilisiert. Pumpengeschwindigkeit: 39 ml/Std. bei Drucken von 7–14 ATM je nach Art und Länge der Austauschersäule. Die Zusammensetzung der Puffer gibt Tabelle 1 an. Abmessungen der Säule: 0,6×80 bis 108 cm. Temperatur 35°. Vom analytischen System wurde die zerbrechliche Glasschlange des Ölbadess durch Teflonschlauch ersetzt.

Innere und äußere Eichung

Die innere Eichung erfolgt durch Elution und Analyse von Eichsubstanzen von der Säule. Um Schwankungen in der Qualität des Ninhydrinreagenz auszugleichen, läßt man bei späteren Läufen vor

der Elution eine Testlösung bekannter Konzentration etwa 15 Min. lang nur in das analytische System laufen und berechnet die Farbausbeute aus der Höhe des Plateaus (äußere Eichung).

Ergebnisse

Die praktische Arbeit mit Anionenaustauschern vom Typ Dowex 1 weist gegenüber Kationenaustauschern einige Besonderheiten auf, die unbedingt beachtet werden sollten. Die zumeist in der Chloridform gelieferten Anionenaustauscher müssen rund 20 Stdn. lang mit dem gewünschten Puffer äquilibriert werden, damit die maximale Trennleistung erreicht wird. Danach bleiben die Retentionsvolumina über Monate hin konstant. Ein Regenerieren der Säule ist bei vollständiger Elution meist nicht nötig. Muß dennoch regeneriert werden, so wird es mit 1N Ameisensäure bzw. 1N Monochloroessigsäure und anschließend mit dem entsprechenden Puffer getan; Salzsäure ist auf jeden Fall zu vermeiden. Aus Analysenproben ist Salzsäure, so weit es geht, zu entfernen. Der pH-Wert von Analysenproben sollte gleich dem pH-Wert des Elutionspuffers sein oder etwas höher, jedoch nicht niedriger, da in diesem Falle die Aminosäuren vorzeitig eluiert werden.

Um optimale Trennungen zu erreichen, mußten 2 Parameter des chromatographischen Systems systematisch variiert werden: Die Elutionspuffer und der Vernetzungsgrad des Anionenaustauschers.

Puffer: Einwertige Puffer vom pH-Wert 3,4 bis 5,0 mit einer Konzentration des Anions von 0,25 Mol/l trennen am besten. Die Zusammensetzung dieser Puffer ist in Tabelle 1 angegeben. Bei längerer Erprobungszeit hat sich der Natrium-Formiat-Puffer pH = 4,2 als der nützlichste erwiesen. Etwas vereinfacht stellt ein Anionenaustauscher-Chromatogramm ein in der Reihenfolge umgekehrtes Kationenaustauscher-Chromatogramm dar (Abb. 1). Die basischen und neutralen Aminosäuren werden frontal eluiert, können also nicht bestimmt werden (Gipfel A, B und C in Abb. 1). Aminosäuren mit einer zusätzlichen sauren Gruppe werden mehr oder weniger retiniert und zwar um so stärker, je höher der pH-Wert des Puffers ist. Für die erwähnten drei Puffer wurden die Elutionsvolumina einer Anzahl von nin-

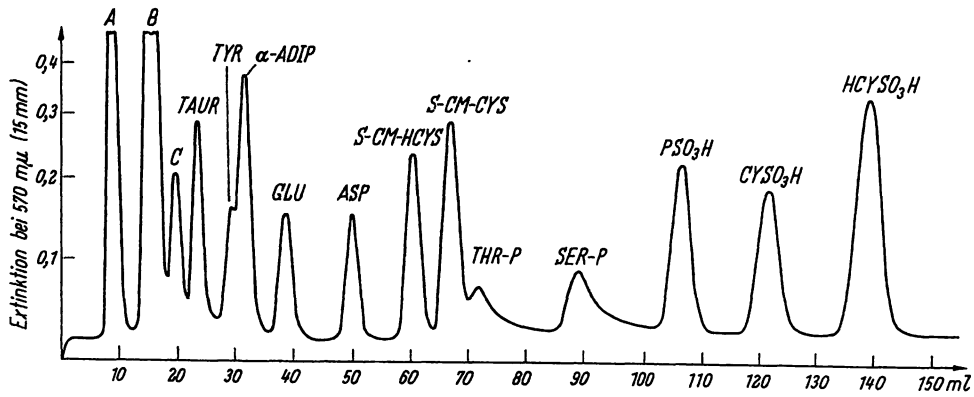


Abb. 1

Analyse von je 0,1 μ Mol Taurin, S-Carboxymethyl-Homocystein, S-Carboxymethyl-Cystein, O-Phosphoryl-Threonin, O-Phosphoryl-Serin, Cysteinsäure, je 0,2 μ Mol Penicillaminsäure und Homocysteinsäure, gemischt mit je 0,05 μ Mol 17 Standard-Aminosäuren (ASP, THR, SER, GLU, PRO, GLY, ALA, VAL, CYS, ILEU, LEU, TYR, PHE, $(NH_4)_2SO_4$, LYS, HIS, ARG, MET).

Säule: Dowex 1 \times 4, 0,6 \times 85,5 cm, 35°, Puffer pH 4,2. A, B, C = neutrale und basische Aminosäuren

Tab. 1
Zusammensetzung der Puffer

	Na-Chloracetat pH 3,4 (6)	Na-Formiat pH 4,2	Na-Acetat pH 5,0
Natriumhydroxyd	0,20 M	0,20 M ¹⁾	0,18 M (0,72 M)
Monochloressigsäure	0,25 M		
Ameisensäure		0,25 M)	
Essigsäure			0,25 M (1,0 M)
Phenol	1,0 g/l	1,0 g/l	1,0 g/l
„Brij 35“	5,0 g/l	5,0 g/l	5,0 g/l

1) Variante zu präparativen Zwecken: Pyridin an Stelle von NaOH, ohne „Brij 35“ und Phenol

Tab. 2
Elutionsvolumina von ninhydrin-positiven Substanzen (Werte in ml)

Säule	Dowex 1 \times 8, —400 mesh, 107 \times 0,6 cm			Dowex 1 \times 4, 20—40 μ 85 \times 0,6 cm		
	Puffer (s. Tab. 1)	Monochloracetat pH = 3,4	Formiat pH = 4,2	Acetat pH = 5,0 0,25 M	1,0 M	Formiat pH = 4,2
Neutr. u. bas. Aminosäuren		12,5	12,0	10,8	11,2	9,7
Phosphoäthanolamin						19,3
Taurin			21,5	24,5	22,8	23,6
2-Aminopimelinsäure				47,7	22,6	29,3
2-Aminoadipinsäure		13,5	29,8	54,0	23,6	31,9
Glutaminsäure		18,0	33,4	73,1	24,0	38,3
Asparaginsäure		21,0	48,0	88,4		49,9
Amino-Diessigsäure			51,3	91,1	32,7	57,0
O-Phosphoryl-Threonin		32,2	60,9	150,3	31,9	74,5
S-Carboxymethyl-Penicillamin			66,2		33,5	60,6
S-Carboxymethyl-Homocystein						60,9
S-Carboxymethyl-Cystein			69,1		36,4	69,2
O-Phosphoryl-Serin		41,4	85,7		42,6	91,9
Penicillaminsäure		75,0	131,0	247,6	70,4	106,0
Cysteinsäure		90,0	160,0	251,7	79,0	122,0
Homocysteinsäure		90,0	160,0		79,0	141,2
S-Carboxymethyl-glutathion		43,5	304			
Tyrosin-O-schwefelsäure		509 (851)				
Ausreichende Trennung		8 ml	8 ml	8 ml		4—6 ml

hydrin-positiven Substanzen an Säulen von Dowex 1 \times 8 und Dowex 1 \times 4 gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefaßt. Als Trennminimum ist der Unterschied in ml/Elutionsvolumen angegeben, der eine Flächenberechnung zweier aufeinander folgender Gipfel

von etwa 0,2 μ Mol noch erlaubt. Die bessere Trennleistung von Dowex 1 \times 4 (s. Tab. 2) ist durch die geringere Korngröße dieses speziell gesiebten Austauschers zu erklären. Für präparatives Arbeiten kann im Formiatpuffer pH = 4,2 Natriumhydroxyd durch Pyri-

din ersetzt werden, so daß sich der Puffer leicht im Vakuum abdampfen läßt.

Der optimale Anwendungsbereich der einzelnen Puffer ist folgender: Der von S. MOORE (6) beschriebene Monochloressigsäurepuffer pH = 3,4 trennt nur die Aminosulfonsäuren; der Formiat-Puffer pH = 4,2 trennt sehr viel mehr Substanzen, erfordert aber etwas längere Elutionszeiten. Der einzige Vorteil des Acetatpuffers pH = 5,0 ist, einige Monoamino-di-carbonsäuren bei noch längeren Elutionszeiten ausreichend zu trennen.

Austauscher mit höherem Vernetzungsgrad, z. B. Dowex 1×10, trennen bemerkenswerterweise schlechter als solche mit niederem Vernetzungsgrad, z. B. Dowex 1×8 und 1×4, ganz im Gegensatz zum Kationenaustauscher Dowex 50 W, für den das Gegenteil gilt (2). Leider zeigen auch Austauscher gleicher Typenbezeichnung von verschiedenen Bezugsquellen unterschiedliche Qualitäten. Die von uns als besonders geeignet befundenen Anionenaustauscher haben folgende Besonderheiten: Dowex 1×8, minus 400 mesh (Fa. „Serva“, Heidelberg) trennt Penicillaminsäure von Cysteinsäure und Homocysteinsäure, trennt nicht S-Carboxymethyl-penicillamin und S-Carboxymethyl-cystein. O-Phosphoryl-threonin und O-Phosphoryl-serin werden ohne Schwanzbildung getrennt eluiert. Der Austauscher Dowex 1×4, extrafein (Fa. „Technicon Ltd.“ England) erreicht unter vergleichbaren Bedingungen die schärfsten Trennungen. Die Gruppen Penicillaminsäure/Cysteinsäure/Homocysteinsäure, S-Carboxymethyl-cystein/S-Carboxymethyl-homocystein bzw. S-Carboxymethyl-penicillamin könnten wir aus einem Standardgemisch (s. Abb. 1) mit keinem anderen Anionen- oder Kationenaustauscher befriedigend trennen. Aus nicht geklärter Ursache ist der letztgenannte Austauscher zur Analyse von O-Phosphoryl-threonin und O-Phosphoryl-serin ungeeignet infolge Schwanzbildung („tailing“).

Damit werden folgende Substanzen von klinischem Interesse besser, z. T. erstmalig säulenchromatographisch bestimmbar: 2-Amino adipinsäure, O-Phosphoryl-serin, O-Phosphoryl-threonin, Penicillamin oder Homocystein in Gegenwart von Cystein, Gesamt-Penicillamin, Gesamt-Homocystin in Gegenwart von Cystin sowie Tyrosin-O-schwefelsäure.

Diskussion

Seit der Einführung von industriell gefertigten Apparaturen zur Aminosäure-Analyse werden fast ausschließlich Kationenaustauscher von immer besserer Qualität verwendet — die Ausnahme ist das Bestimmen von Cysteinsäure (6). Die meisten in einem Proteinhydrolysat vorkommenden sog. häufigen Aminosäuren können auf einer einzigen Kationensäule getrennt werden. Über 170 natürliche Aminosäuren (7) und dazu synthetische Aminosäuren von medizinischem Interesse können jedoch nicht über ein einziges chromatographisches System analytisch sauber getrennt werden. Andererseits ist die Kombination von Ionenaustauscherchromatographie und automatischer Analyse z. Z. die genaueste Bestimmungsmethode für Aminosäuren. Eine zusätzliche Anionenaustauschersäule in einer derartigen Apparatur bringt folgende Vorteile:

Es werden Aminosäuren getrennt, die die Kationenaustauschersäule nicht retiniert (Aminosulfonsäuren, O-Phosphoryl-hydroxyaminosäuren) oder die in stark besetzte Bereiche des Kationenaustauscherchromatogramms fallen (S-Carboxymethyl-derivate von Cystein, Homocystein und Penicillamin, Monoaminodicarbonsäuren (2, 3)). Damit ist auch eine sichere Identifizierung möglich (8).

Ein Verschwinden von Glutaminsäure, wie es für die Kationenaustauschersäule festgestellt wurde (9), konnten wir bei der Anionenaustauschersäule nicht beobachten. Thiolgruppen unterdrücken die Ninhydrinreaktion auch nach eigenen Erfahrungen in unvorhergesehener Weise (10). Die üblichen Veränderungen des Moleküls für analytische Zwecke führen zu Sulfonsäuren oder S-Carboxymethylderivaten mit gut reproduzierbaren Farbausbeuten. Beide Arten von Derivaten können nur auf der Anionenaustauschersäule befriedigend getrennt werden.

Als Nachteil des Anionenaustauschers muß erwähnt werden, daß er lange äquilibriert werden muß und gegen Salzsäure sehr empfindlich ist. Letztere läßt sich jedoch leicht aus Analysenproben entfernen.

Wir danken Herrn Dr. GRUBHOFFER, Heidelberg, und Herrn Dr. HOLY, Chertsey/Surrey, für das Überlassen von spezialgesiebten Ionenaustauschern. Fräulein R. WEBER und Fräulein B. HANISCH danken wir für gewissenhafte, praktische Mitarbeit.

Literatur

1. SPACKMAN, D. H., H. W. STEIN und S. MOORE, *Analytic. Chem.* 30, 1190 (1958). — 2. HAMILTON, P. B., *Analytic. Chem.* 35, 2055 (1963). — 3. ZACHARIUS, R. M. und E. A. TALLEY, *Analytic. Chem.* 34, 1551 (1962). — 4. TALLAN, H. H., S. T. BELLA, W. H. STEIN und S. MOORE, *J. biol. Chemistry* 217, 703 (1955). — 5. SCHRAM, E., S. MOORE und E. J. BIGWOOD, *Biochem. J.* 57, 33 (1954). — 6.

MOORE, S., *J. biol. Chemistry* 238, 235 (1963). — 7. MEISTER, A., *Biochemistry of the Amino Acids*, S. 2. Academic Press, New York-London (1965). — 8. STANTON KING, J. Jr., *Clin. chim. Acta* (Amsterdam) 9, 441 (1964). — 9. HACKET, N., A. P. MATHIAS und F. PENNINGTON, *Analyt. Biochem. (New York)* 12, 367 (1965). — 10. WHITAKER, J. R., *Nature (London)* 189, 662 (1961).

Dr. K. Borner

Institut f. Angew. Physiolog. Chemie u. Klin. Chemie
der Freien Universität Berlin
1 Berlin 33, Arnimallee 22