

Zeitschrift: Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène
Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit
Band: 53 (1962)
Heft: 5

Artikel: Aminosäurebestimmung mit Ionenaustauschern
Autor: Loverne Duncan, E. / Mohler, H.
DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-982570>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

Download PDF: 08.02.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

Aminosäurebestimmung mit Ionenaustauschern

Von *E. Loverne Duncan* und *H. Mohler*

(KNORR Forschungs-Institut, Zürich)

Einleitung

Die quantitative Bestimmung der Aminosäuren in Eiweißhydrolysaten wurde durch Anwendung der Säulenchromatographie stark erleichtert. *Spackmann, Stein* und *Moore*¹ haben auf dieser Grundlage eine vollautomatische Apparatur entwickelt, die eine vollständige Proteinanalyse in 1 bis 2 Tagen gestattet.

In Verbindung mit der Fa. Bender & Hobein, München, modifizierte *Hannig*² die Apparatur. Sie steht seit einiger Zeit in unserem Laboratorium in Betrieb. Im folgenden teilen wir unsere Erfahrungen mit, wobei zuerst die Apparatur und das Prinzip der Arbeitsweise beschrieben werden.

Prinzip

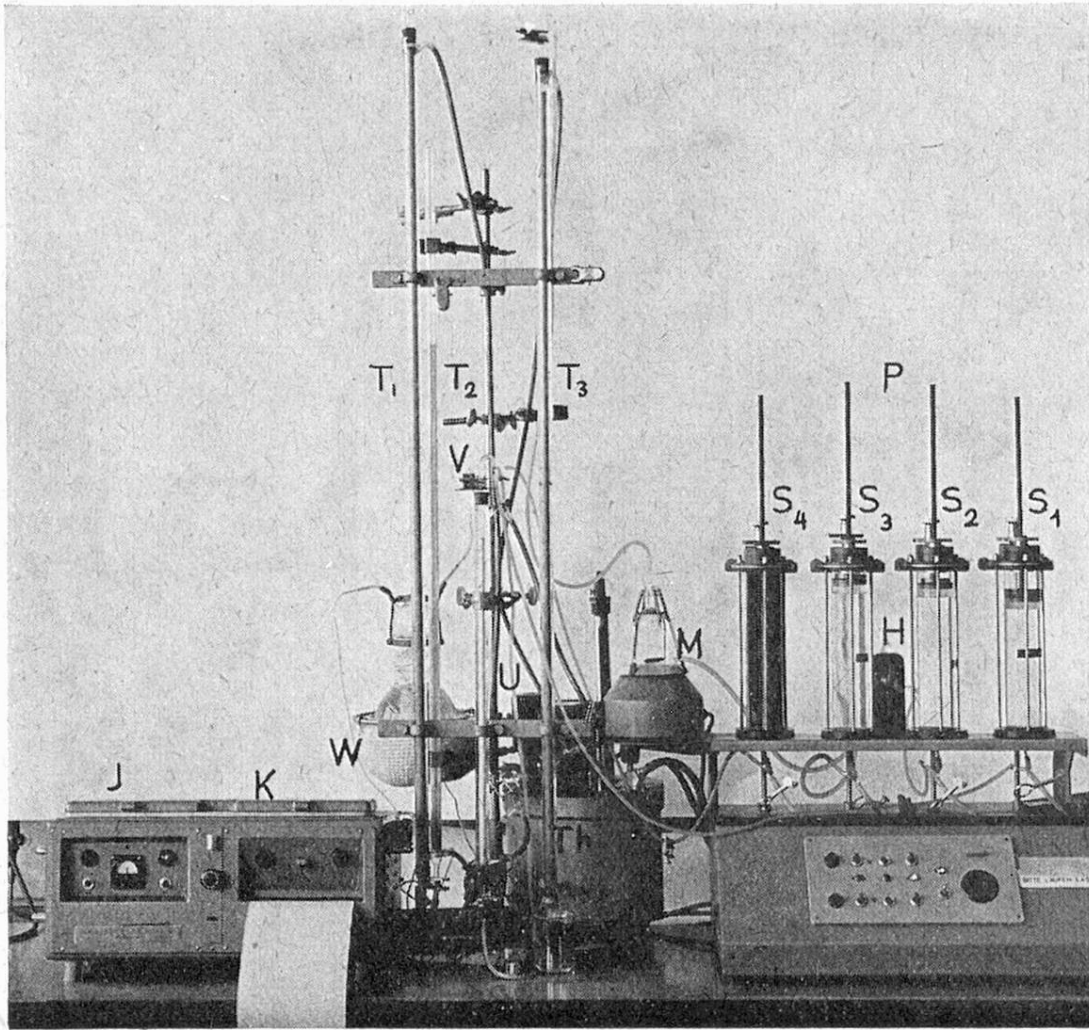
Dem aus der Ionenaustauschersäule austretenden Eluat wird innerhalb eines Kapillarrohres im konstanten Mischungsverhältnis und mit konstanter Geschwindigkeit durch eine Pumpe das Ninhydrinreagens zugeführt. Die Elutionsgeschwindigkeit durch die Säule beträgt 30 ml/h, die Geschwindigkeit der Ninhydrinzuführung 15 ml/h. Die Farbentwicklung erfolgt innerhalb von 20 Minuten in einem Teflonschlauch von 1 mm lichter Weite, der sich aufgerollt in einem siedenden Wasserbad befindet. Anschließend durchfließen die angefärbten Komponenten eine Meßküvette. Durch eine automatisch registrierende Photometereinrichtung können schließlich die einzelnen Extinktionen fortlaufend aufgezeichnet werden.

Beschreibung der Apparatur

Der Aufbau der Apparatur ergibt sich aus Fig. 1. Zur Trennung der Aminosäuren dienen die Säulen T₁, T₂, T₃. Diese Säulen sind mit Heizmänteln umgeben, durch die Wasser aus dem Thermostaten Th von 50° bzw. 40° mit Umlaufpumpe U zur Zirkulation gebracht wird. Die beiden großen Säulen T₁ und T₃ dienen der Trennung aller nichtbasischen Aminosäuren (neutrale und saure); die Füllung besteht aus dem sauren Kationenaustauscher Amberlite CG-120. Beide Säulen sind gleichwertig; während die eine in Betrieb ist, wird die andere regeneriert.

Die mittlere Säule T₂ dient zur Trennung der basischen Aminosäuren. Die Füllung besteht aus dem schwach sauren Kationenaustauscher Amberlite IRC-50.

Die Zuführung des Elutionsmittels (Pufferlösungen) auf die Säulen erfolgt durch eine Pumpvorrichtung P. Sie besteht im wesentlichen aus vier Glaspritzen von etwa 300 ml Inhalt, deren gut eingeschliffene Kolben mit Dich-



Figur 1
Aufbau der Trennapparatur

T ₁ , T ₂ , T ₃	= Trennsäulen mit Heizmänteln umgeben	M	= Mischgefäß
Th	= Thermostat	V	= Vermischung von Eluat- mit Ninhydrinlösung
U	= Umlaufpumpe	W	= Wasserbad mit Teflonschlauch
P	= Pumpvorrichtung mit vier Glasspritzen für Pufferlösung und Ninhydrinlösung	K	= (Meß-) Küvette
H	= Dreiweghahn	J	= Integraph

tungsringen über ein Getriebe von einem Synchronmotor gleichmäßig vorwärts bewegt werden.

Spritze S₁ wird gefüllt mit einem Puffer vom pH 7,0. Er dient zur Elution der kleinen Säule. S₂ ist gefüllt mit Na-Citrat-Puffer vom pH 3,12, der den großen Säulen bis zum Austritt des Prolingipfels zugeführt wird. Danach tritt die Spritze S₃ in Funktion, die mit einem Na-Citrat-Acetat-Puffer vom pH-Wert 5,12 gefüllt ist. Mit Hilfe dieses Puffers und eines Magnetrührers wird etwa nach der ersten Hälfte der Trennung aller nichtbasischen Aminosäuren – genauer nach Registrierung des Prolingipfels – ein pH-Gradient erzeugt. Dazu dient das Mischgefäß M mit Magnetrührer von etwa 100 ml Inhalt, durch das zunächst der Puffer pH 3,12 fließt und nach Umschalten des Dreiweg-

hahnes H der Puffer aus der Spritze S₃ zur Vermischung in das Mischgefäß einströmt. Dadurch wird ein allmähliches Ansteigen des pH-Wertes erzielt. Die Vorschubgeschwindigkeit der Spritzen S₁, S₂ und S₃ ist so bemessen, daß je 30 ml Puffer pro Stunde gefördert werden.

Die Spritze S₄ dient der Zuführung des Ninhydrinreagens zu dem unten aus den Säulen austretenden Eluat. Die Vermischung erfolgt in dem Misch-T-Stück V (Kapillar-T-Glasrohr) vor dem Wasserbad W. Die Geschwindigkeit der Ninhydrinspritze ist so bemessen, daß 15 ml/h Ninhydrinreagens dem Eluat zugeführt werden.

An das Misch-T-Stück schließt sich ein etwa 20 m langer Teflonschlauch an, der sich in einem siedenden Wasserbad W (gebildet aus einem Dreihalskolben mit Rückflußkühlerrohr und der Pilzheizhaube) befindet. Der Kolben ist mit destilliertem Wasser so weit zu füllen, daß die eingesetzte Schlauchspule voll bedeckt wird. Die aus dem Teflonschlauch austretenden, nunmehr gefärbten Fraktionen durchfließen eine schmale Meßküvette K über dem Lichtspalt des Auswertgerätes (modifizierter Elphor-Integraph J). Die Registrierung der Extinktionen geschieht selbsttätig bei zwei verschiedenen Wellenlängen. Die Messung erfolgt in Abständen von etwa einer Minute jeweils mit den Wellenlängen 578 und 436 m μ . Da zur Extinktionsmessung monochromatisches Licht verwendet wird, gehorchen beide Kurven streng dem Lambert-Beer'schen Gesetz. Dadurch ist jede der beiden Kurven gleichwertig auswertbar, so daß weitere Hilfskurven für höhere Extinktionen (über 1,2) nicht notwendig sind. Die mit Filter 578 m μ zu hoch gezeichneten Kurven werden jeweils mit der darunterliegenden Kurve (436 m μ) ausgewertet.

Durchführung des Versuches

Zunächst werden die basischen Aminosäuren getrennt. Zu diesem Zweck wird das Proteinhydrolysat (0,2 bis 1,0 ml, entsprechend 1 bis 2 mg Protein) aufgetragen. Man läßt diese Probe in die Säule einsickern und wäscht mit 0,3 ml Citratpuffer pH 7,0 nach, bis auch der Puffer eingesickert ist, und wiederholt das Nachwaschen mit 0,3 ml Citratpuffer pH 7,0 noch zweimal. Dann wird die Säule über der Austauscherausfüllung mit dem gleichen Puffer bis zum oberen Rand des Schalenschliffes gefüllt. Schließlich wird die gefüllte Pufferleitung von der Spritze S₁ mit dem Kugelschliff so aufgesetzt, daß keine Luftblasen entstehen. Die Schliffe werden mit den zugehörigen Schliffklemmen und Dichtungen gesichert. Die Schliffsicherung hält einen Ueberdruck von 1,5 bis 2,0 atü aus, was bei richtigem Betrieb und einwandfreier Arbeitsweise ausreicht.

Man läßt durch Einrasten des Zahnrades auf der Spritze S₁ mit Hilfe der entsprechenden Rändelschraube und Einschalten des Schalters «Pumpe» die Pufferlösung durch die Säule strömen. Das unten aus der Säule austretende Eluat wird durch die Kugelschliffverbindung mittels Kapillarschlauch an das Misch-T-Stück angeschlossen. Die Zuführung des Ninhydrin erfolgt zweck-

mäßigerweise erst 30 Minuten nach Einschalten des Pufferflusses. Die nicht-basischen Aminosäuren wandern in der Säule gemeinsam nahezu mit der Geschwindigkeit der Pufferfront und haben die Säule etwa nach 30 Minuten, d.h. bei der Zuführung des Ninhydrin, verlassen.

Wenn das Ninhydrin zufließt, wird der Schalter «Registrieren» am Schaltbrett des Pumpengehäuses eingeschaltet. Damit beginnt die Registrierung mit dem Integrator. Nach weiteren 20 Minuten wird die Einstellung des Blindwertes vorgenommen werden (siehe Gebrauchsanweisung der Firma Bender & Hobein).

Die getrennten basischen Aminosäuren müssen in folgender Reihenfolge auftreten: Histidin, Lysin und Arginin.

Nachdem die kleine Säule etwa eine Stunde eluiert wurde, kann bereits der zweite aliquote Teil des Proteinhydrolysats auf eine der beiden großen Trennsäulen aufgebracht werden. (Dies kann aber auch gleichzeitig mit dem Beschicken der kleinen Säule erfolgen.) Dazu werden 0,2 bis 1,0 ml der Aminosäurelösung bzw. des Hydrolysates (entsprechend 1 bis 2 mg Protein), deren pH nicht über 2,5 betragen darf, auf die Säule aufgetragen und wie vorher beschrieben nach dem Einsickern dreimal mit je 0,3 ml Citratpuffer pH 2,2 nachgewaschen. Dann füllt man die Säule wieder bis zum Rand des Schalenschiffes mit Citratpuffer pH 2,2 und schließt die Zuführleitung aus der Pufferspritze (S_2) auf den Kugelschliff der Säule (auch hierbei ist auf blasenfreie Verbindung zu achten).

Während die Elution der basischen Aminosäuren in der kleinen Säule noch läuft (die Trennung der basischen Aminosäuren beansprucht insgesamt etwa $3\frac{1}{2}$ Stunden), kann bereits mit der Elution der großen Säule, die noch auf 40° temperiert ist, begonnen werden. Dazu wird die Spritze (S_2) in Betrieb gesetzt, wobei darauf zu achten ist, daß der Dreiweghahn H so gestellt wird, daß die Pufferlösung der Spritze (S_2) durch das Mischgefäß der Trennsäule (T_1 bzw T_3) zugeführt wird. Das aus der Säule austretende Eluat wird zunächst in einem bereitstehenden Becherglas aufgefangen.

Wenn der Lysingipfel aus T_2 auf dem Registrierstreifen erscheint, muß die Temperatur am Kontaktthermometer des Thermostaten auf 50° eingestellt werden.

Nach etwa einer Stunde tritt Oxyprolin als erste nichtbasische Aminosäure, gefolgt von Asparaginsäure usw. auf. Nach dem Erscheinen des Prolingipfels wird die weitere Elution mit einem pH-Gradienten durchgeführt (pH 3,1 bis 5,1). Die Elution ist während sieben Stunden fortzusetzen.

Auswertung der Kurven

Da mit dem Elphor-Integrator Extinktionskurven geschrieben werden, beschränkt sich die Auswertung auf die Ermittlung der Flächenwerte der einzelnen Gaußkurven. Dies kann am besten und einfachsten durch Planimetrieren

mit Hilfe eines Planimeters, aber auch durch Auswägen der ausgeschnittenen Gaußkurven, durch Auszählen des Millimeterrasters oder rechnerisch durch Multiplikation von Höhe mal Halbwertsbreite der einzelnen Gaußkurven erfolgen.

Die vom Integrativen geschriebenen Flächenintegrale sind außer von der Menge der eluierten Aminosäure abhängig von mehreren apparativen Gegebenheiten wie: Dimensionen der Trennsäulen, Elutionsgeschwindigkeit, Dicke der Meßküvette, Länge des Papiervorschubs zwischen zwei Einstichen des Schreibers usw., die in die bei der Eichung mit Standardlösungen bestimmten Konstanten eingehen. Das bedeutet, daß bei jeder Änderung in der Apparatur (z.B. Neufüllung der Säuren) die Konstanten der einzelnen Aminosäuren sich u.U. verändern und neu ermittelt werden müssen. Der Wert der Konstanten bei der Eichung ergibt sich aus: Fläche dividiert durch aufgetragene μmole . Für die Analyse eines unbekanntes Aminosäuregemischs ergibt die Fläche, dividiert durch die Konstante, die gesuchte Aminosäurekonzentration in μmol .

Die Flächenwerte wurden in vorliegender Arbeit durch Multiplikation von Höhe mal Halbwertsbreite bestimmt, und zwar wurde nach dem Vorschlag von *Spackmann, Stein und Moore*¹ die Halbwertsbreite aus der Anzahl der Einstiche des Kurvenschreibers über der Halbwertshöhe erhalten. (Das Zeitintervall zwischen 2 Einstichen beträgt bei unserem Schreiber 22 Sekunden.) Die Methode der Auszählung der Einstiche gewährleistet gegenüber der einfachen Ausmessung der Halbwertsbreite auch bei nicht ganz regelmäßigem Papiervorschub hohe Genauigkeit, da das Registriergerät so eingerichtet ist, daß der Papiertransport zwischen zwei Einstichen konstant ist. Auf diese Weise wird der durch den Zeitfaktor bedingte Fehler eliminiert.

Für die praktische Berechnung geht man so vor, daß man von der Basislinie aus die Höhe H auf 0,05 cm genau abliest. Auf beiden Seiten der Kurve wird dann auf halber Höhe H die Halbwertsbreite B eingezeichnet. Die Halbwertsbreite B wird durch Auszählung der Punkte bestimmt, indem man beim ersten Punkt über der eingezeichneten Markierungslinie mit 0, 1, 2, ... zu zählen beginnt und die verbleibenden Distanzen zwischen Markierungslinie und erstem bzw. letztem Punkt auf 0,1 Einheiten abschätzt. Die Kurvenfläche berechnet sich sodann aus $F = H \text{ mal } B$. In Figur 2 zum Beispiel ergibt sich bei der rechten oberen Kurve ein $H \text{ mal } B$ von $12,0 \cdot 12,2 = 146,4$.

Reproduzierbarkeit

Aliquote Teile synthetischer Aminosäuremischungen aus Lysin, Threonin und Glutaminsäure wurden zur Prüfung der Reproduzierbarkeit verwendet. Der Versuch wurde von der gleichen Person dreimal durchgeführt. Die Standardlösung enthielt in 0,5 ml:

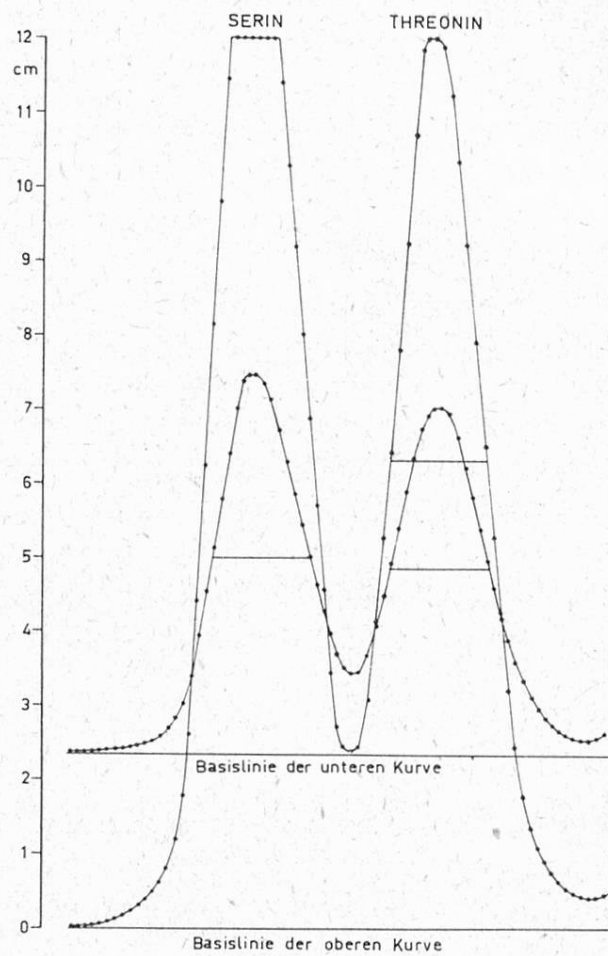
Lysin	0,997 μmol
Threonin	1,020 μmol
Glutaminsäure	1,000 μmol

Das Ergebnis ist in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Tabelle 1
Flächenwerte (Höhe · Halbwertsbreite)
 (3 Versuche ausgeführt von der gleichen Person)

Aminosäure	I	II	III	Mittelwert	M.Q.A.*	M.Q.A. in %
Lysin	115,1	118,4	115,8	116,4	1,74	1,49
Threonin	78,4	84,9	79,1	80,8	3,57	4,41
Glutaminsäure	77,0	74,5	74,8	75,4	1,37	1,82

* M.Q.A. = Mittlere Quadratische Abweichung = $s = \frac{\sum(x-\bar{x})^2}{N-1}$



Figur 2
 Erklärung im Text

In einer anderen Versuchsreihe wurde eine Standardlösung mit 17 Aminosäuren (je 1,00 μmol pro 0,5 ml) hergestellt, die ebenfalls dreimal, jedoch von drei verschiedenen Personen gemessen wurde. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabelle 2
Flächenwerte (Höhe · Halbwertsbreite)
(3 Versuche ausgeführt von 3 verschiedenen Personen)

Aminosäure	I	II	III	Mittelwert	M.Q.A.*	M.Q.A. in %
Histidin	92,8	96,1	89,2	92,7	3,45	3,72
Lysin	117,0	116,9	108,8	114,2	4,71	4,12
Arginin	99,2	97,6	94,8	97,2	2,23	2,29
Oxyprolin	11,1	11,0	12,6	11,6	0,89	7,67
Asparaginsäure	78,8	75,4	72,8	75,6	3,01	3,98
Threonin	78,8	79,3	76,1	78,1	1,72	2,20
Serin	84,1	83,4	84,6	84,0	0,60	0,71
Glutaminsäure	83,4	76,7	77,8	79,3	3,59	4,53
Prolin	26,1	28,7	27,7	27,5	1,31	4,76
Glycin	68,5	72,8	69,2	70,2	2,31	3,29
Alanin	75,8	72,4	71,7	73,3	2,19	2,99
Valin	78,2	77,1	79,9	78,4	1,41	1,80
Methionin	59,2	59,9	59,9	59,7	0,41	0,69
Isoleucin	64,7	64,6	63,1	64,1	0,90	1,40
Leucin	82,3	80,4	78,4	80,4	1,95	2,43
Tyrosin	87,9	84,7	82,1	84,9	2,91	3,43
Phenylalanin	91,3	89,9	83,6	88,3	4,10	4,64

* M.Q.A. = Mittlere Quadratische Abweichung

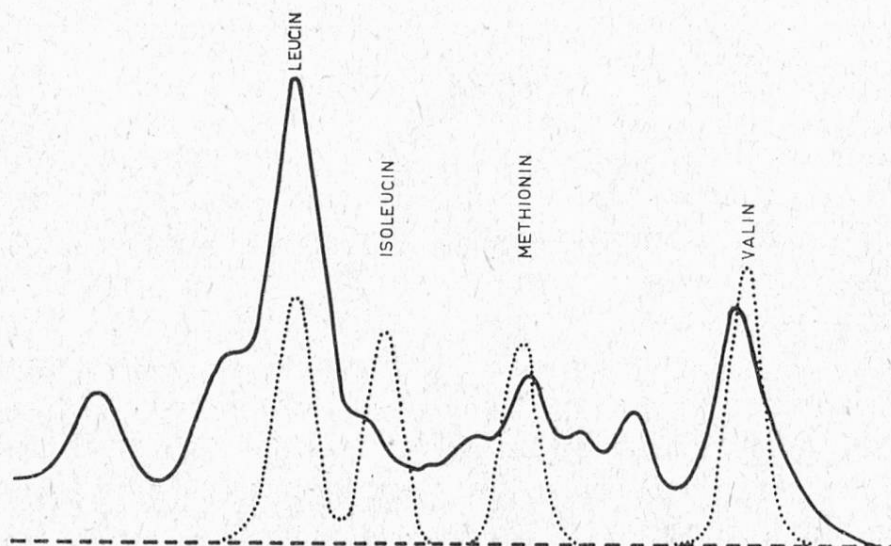
Um den Konzentrationseinfluß auf die Bestimmung der Aminosäuren festzustellen, wurden Konzentrationen von 0,5, 1,0 und 1,5 μmol jeder Aminosäure verwendet. Für die Berechnung wurde angenommen, daß die Ausbeute jeder Aminosäure, von der 1 μmol eingesetzt wird, 100 % beträgt. Diese Annahme stützt sich auf Versuche von *Spackmann, Stein* und *Moore*¹. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 zusammengestellt. Ist die Konzentration einer Aminosäure zu hoch (in einigen Fällen schon mit 2 μmol), so liegt der bei 578 $\text{m}\mu$ gemessene Gipfel außerhalb der Skala (siehe linker Gipfel in Fig. 2). In diesem Fall müssen die Werte der niedrigen Kurve, d.h. der 436 $\text{m}\mu$ -Kurve, für die Berechnung benutzt werden. Die Aminosäurekonzentrationen, die auf Grund der Zahlen der niedrigen Kurve errechnet wurden, sind weniger genau, da die Gipfel niedriger und breiter sind. Dies ist auch bei einer zu geringen Aminosäurekonzentration der Fall, bei der ebenfalls breite Gipfel entstehen.

Tabelle 3

Prozentuale Ausbeute der Aminosäuren bei verschiedenen Konzentrationen
(Bezogen auf ein μmol)

Aminosäure	0,5 μmol	1,5 μmol
Histidin	105,7	*
Lysin	103,4	*
Arginin	103,3	99,1
Oxyprolin	105,0	101,3
Asparaginsäure	107,7	99,7
Threonin	109,2	100,6
Serin	104,5	100,3
Glutaminsäure	107,1	101,6
Prolin	104,2	100,1
Glycin	108,7	99,6
Alanin	105,5	97,4
Valin	109,0	98,5
Methionin	111,9	98,9
Isoleucin	107,0	97,3
Leucin	104,5	96,3
Tyrosin	109,3	102,2
Phenylalanin	108,9	97,2
Mittelwert	106,7	99,3

* Zu hohe Konzentration, Gipfel außerhalb der Skala.



Figur 3

Ausgezogene Kurve = Aminosäuren-Peptid-Gemisch bei unvollständiger Hydrolyse
Punktierte Kurve = Aminosäuren bei vollständiger Hydrolyse

Wenn ein Eiweißhydrolysat unbekannter Zusammensetzung und unbekannter Konzentration vorliegt, wird die Konzentration des ursprünglichen Proteins über seinen N-Gehalt bestimmt. Pro Messung werden 1 bis 2 mg des hydrolysierten Proteins verwendet. Je nach dem Anteil der einzelnen Aminosäuren ist die Konzentration zu variieren.

Wird nur partiell und nicht vollständig hydrolysiert, so können die gebildeten Peptide stören, und zwar in quantitativer wie in qualitativer Hinsicht. Wie Figur 3 zeigt, ist bei Anwesenheit von Peptiden die Halbwertsbreite unter Umständen nicht mehr bestimmbar, andererseits können die Gipfel gewisser Aminosäuren nicht mehr erkennbar sein.

Um dieses Problem zu lösen, müßten Pufferzusammensetzung, Korngröße des Ionenaustauschers und Durchlaufgeschwindigkeit geändert werden.

Zusammenfassung

Zur Bestimmung von Aminosäuren mit Hilfe der *Hannig*-Apparatur und der Säulenchromatographie wurden eine Reihe von Experimenten durchgeführt, um die praktische Eignung einer solchen Apparatur für Routinearbeit mit Proteinhydrolysaten festzustellen.

Es war möglich, gut reproduzierbare Resultate mit einer Standardlösung zu erzielen, auch dann, wenn der Versuch von drei verschiedenen Personen durchgeführt wurde. Der verhältnismäßig enge Konzentrationsbereich, innerhalb welchem es möglich ist, mit der 578 m μ -Kurve zu arbeiten, stellt jedoch einen gewissen Nachteil dar. Um eine 100%ige Ausbeute zu erhalten, sollte ein Konzentrationsbereich zwischen 1,0 und 2,0 μ mol gewählt werden.

Ein anderes Problem stellt das Vorhandensein von Peptiden in Proteinen dar, die nur zum Teil hydrolysiert wurden. Diese Peptide erschweren die quantitative Analyse von Aminosäuregemischen. Ohne Änderungen in der Pufferlösung, der Teilchengröße des Austauscherkünstharzes oder der Säulengeschwindigkeit sind Variationen mit diesem Apparat zufolge der fixen Pumpgeschwindigkeit nicht möglich.

Trotz diesen Einschränkungen kann der Apparat jedoch sehr zufriedenstellend zur Analyse von gänzlich hydrolysiertem Eiweiß verwendet werden. Es sind damit Analysen in 1 bis 2 Tagen möglich, wozu man bisher 1 bis 2 Wochen brauchte.

Résumé

Une série d'expériences concernant le dosage des acides aminés à l'aide de l'appareil de *Hannig* et de la chromatographie sur colonne furent exécutées afin d'éprouver l'aptitude d'un tel dispositif pour des travaux de routine avec des hydrolysats de protéines. Il s'avéra possible d'obtenir, à l'aide d'une solution standard, des résultats bien reproductibles, même si les dosages étaient exécutés par trois personnes différentes. Cependant, l'étendue de concentration relativement restreinte dans laquelle il est possible de travailler en adoptant la courbe d'extinction de 578 m μ représente un certain désavantage. Pour atteindre un rendement de 100 % une étendue de concentration de 1,0 à 2,0 μ mol doit être choisie.

Un autre problème qui se présente résulte de la présence de peptides dans des protéines seulement partiellement hydrolysées. Ces dernières rendent difficile l'analyse quantitative de mélanges d'acides aminés. Vu la vitesse fixe de pompage, aucune variation n'est possible avec cet appareil, sans modifier la solution-tampon, la grandeur des particules de la résine synthétique de l'échangeur, ou la vitesse de la colonne.

Malgré ces limitations, l'appareil se prête d'une façon très satisfaisante à l'analyse de protéines entièrement hydrolysées. Il permet d'effectuer en 1 à 2 jours des analyses qui jadis nécessitaient 1 à 2 semaines.

Summary

Using the *Hannig* apparatus for the determination of amino acids by means of column chromatography, a series of experiments were performed in order to ascertain the practicability of such an apparatus for routine work with protein hydrolysates.

It was possible to obtain good duplicate results with a standard solution even when the determination was performed by three different people. However, the range of concentrations in which it is possible to work, using only the 578 m μ curve, presents a slight disadvantage. In order to obtain a 100% recovery one has to use the optimum concentration range of 1,0 to 2,0 μ mol.

A further problem is the presence of peptides in proteins which have been only partially hydrolyzed. These peptides make it difficult to obtain quantitative results for the amino acids which they contaminate. Without making changes in the buffer composition, particle size of the resin or the column velocity, variations are not possible with this apparatus due to the fixed pumping rate; this is not a problem readily solved.

However, in spite of these limitations, the apparatus is very satisfactory for routine analyses of completely hydrolyzed proteins. It makes possible the determination of amino acids in one or two days, which once took one or two weeks.

Literatur

- 1 Spackmann D.H., Stein W.H. und Moore St., Analytical Chemistry **30**, 1190 (1958).
- 2 Hannig K, Clinica Chimica Acta **4**, 51 (1959).

Recherche de l'anthranilate de méthyle dans les miels espagnols de fleur d'oranger par chromatographie sur couche mince

Par J. Deshusses et A. Gabbai

(Laboratoire cantonal de chimie, Genève)

En 1930, *Nelson*¹ a isolé et identifié l'anthranilate de méthyle dans certains miels américains. Il est bien connu que l'anthranilate de méthyle est l'un des constituants de l'essence de fleur d'oranger.

Pour isoler cet ester, *Nelson* distille le miel dans un courant de vapeur d'eau puis extrait l'ester contenu dans le distillat par de l'éther. Pour identifier l'anthranilate de méthyle, *Nelson* évapore l'éther, diazote le résidu et copule le dérivé diazo avec le β -naphthol.

Cette méthode n'est pas sans défaut, les pertes en anthranilate de méthyle, notamment, doivent être élevées d'où la nécessité de mettre en œuvre une quantité importante de miel pour que la réaction de l'anthranilate de méthyle devienne positive. C'est ainsi que *Lothrop*² qui a appliqué le principe de la méthode *Nelson*, distille 1 kg de miel.