

gelingen kann. Unter diesen Umständen ist die beobachtete Wirkungskonstante natürlich recht klein und beträgt der Größenordnung nach:

$$G_m/[VOSO_4] = 3 \times 10^3.$$

Bei Zunahme der Katalysatorkonzentration wird auch in diesem Falle zunächst eine Zunahme und dann eine rasche Abnahme der maximalen Helligkeit der Luminescenz beobachtet, also ist auch dieser Einfluß qualitativ genau so wie bei der Verwendung der anderen Katalysatoren.

Die hier benutzte Versuchsmethode wurde schon in den früheren Mitteilungen beschrieben. Die Luminolkonzentration betrug bei allen Versuchen dieser Arbeit 8×10^{-4} Mol/l. Die Versuche über die Inhibitorwirkung wurden immer bei den optimalen Ammoniak- und Katalysatorkonzentrationen vorgenommen. Als maximale Helligkeit der Luminescenz — in relativen Einheiten — bezeichnen wir den größten beobachteten Ausschlag des Galvanometers beim betreffenden Versuch; dieser konnte gewöhnlich unmittelbar nach dem Zusammengießen der Reaktionsgemische abgelesen werden. Als Anfangshelligkeit, die zum Vergleich mit den früheren Versuchen diente, wurde die Helligkeit nach 20 Sek. Reaktionszeit — wieder relativ in Galvanometerausschlägen — genommen. — Die benutzten Katalysatoren waren einfache Kahlbaum-Präparate. Die Lösungen des $RuCl_3$ mußten öfter frisch bereitet werden, da gealterte Lösungen, die hydrolytischen Veränderungen unterliegen, eine wesentlich geringere katalytische Wirkung zeigten.

Hrn. Prof. Dr. J. Plotnikow danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit mit Mitteln des Instituts.

58. Gerhard Schramm und Josef Primosigh: Über die quantitative Trennung neutraler Aminosäuren durch Chromatographie.

[Aus d. Arbeitsstätte für Virusforschung d. Kaiser-Wilhelm-Institut für Biochemie u. Biologie, Berlin-Dahlem.]
(Eingegangen am 9. März 1943.)

Im Rahmen von Untersuchungen über Virusproteine haben wir uns schon früher mit der Analyse der Eiweißbausteine befaßt¹⁾. Wir beschränkten uns hierbei auf die präparative Darstellung einiger leichter zu reinigenden Aminosäuren, um ihre Konfiguration kennenzulernen, da der damalige Stand der Trennungsverfahren es aussichtslos machte, die Aminosäuren in kleinen Proteinmengen quantitativ zu bestimmen. Inzwischen sind durch die Anwendung der Chromatographie wesentliche Fortschritte in der Analyse der Eiweißhydrolysenprodukte erzielt worden, so daß sich hierdurch neue Möglichkeiten für einen exakten Analysengang eröffnen. Wir haben daher Versuche unternommen, die Chromatographie auch auf einige Aminosäuren anzuwenden, die bisher nach dieser Methode nicht getrennt werden konnten.

F. Turba²⁾ gelang es, die basischen Aminosäuren (Arginin, Lysin und Histidin) quantitativ an Piltrol-Neutrol zu adsorbieren und so einwandfrei von den sauren und neutralen abzutrennen. Durch weitere Chromatographie an Floridin XXF und Piltrol-Neutrol gelang es ihm, das Gemisch der basischen Aminosäuren weiter in die Einzelbestandteile aufzutrennen. Th. Wieland³⁾ fand, daß Arginin und Lysin auch durch Adsorption an Aluminiumoxyd vom Histidin und den anderen Aminosäuren getrennt werden können. Er zeigte weiterhin, daß Aluminiumoxyd nach Vorbehandlung mit

1) G. Schramm u. H. Müller, Naturwiss., **28**, 223 [1940].

2) B. **74**, 1829 [1941].

3) Ztschr. physiol. Chem., **273**, 24 [1942]; Naturwiss., **30**, 374 [1942].

Salzsäure die Fähigkeit erlangt, selektiv die sauren Aminosäuren (Glutaminsäure, Oxyglutaminsäure und Asparaginsäure) sowie das Cystin zu adsorbieren. Aus diesem Gemisch der adsorbierten Aminosäuren kann das Cystin mit schwefelwasserstoffhaltigem Wasser für sich eluiert werden⁴⁾. F. Turba und M. Richter⁵⁾ fanden dann, daß auch eine weitere chromatographische Trennung von Glutaminsäure und Asparaginsäure in der Aluminiumoxydsäule möglich ist. Eine Abtrennung der basischen Aminosäuren ist nach K. Freudenberg⁶⁾ auch durch Adsorption an saure Austauschere auf Kunstharzbasis (Wofatit K, KS und A) möglich. Diese organischen Adsorbentien halten zunächst sämtliche Aminosäuren zurück. Durch Elution mit Pyridin gelingt es aber, alle Aminosäuren außer den basischen zu eluieren. Von dem basischen Austauscher Wofatit M werden hingegen nur die sauren Aminosäuren festgehalten. Einen neuartigen Weg der Adsorptionsanalyse beschriftet A. Tiselius⁷⁾. Er ließ das Gemisch verschiedener Aminosäuren von unten nach oben durch eine kurze Säule von Aktivkohle strömen. Der Durchtritt der einzelnen Aminosäuren wird hierbei entsprechend ihrer Adsorbierbarkeit verzögert, so daß in der Flüssigkeitssäule oberhalb der Aktivkohle eine den vorhandenen Aminosäuren entsprechende Zahl von Grenzzonen auftritt, die mit Hilfe der Töpplerschen Schlierenmethode sichtbar gemacht werden können. Aus der Analyse des Konzentrationsgradienten in diesen Grenzzonen kann nach bekannten refraktometrischen Verfahren unter gewissen Umständen auch die Konzentration der einzelnen Aminosäuren bestimmt werden.

Es gelingt somit, auf verschiedene Weise die sauren bzw. basischen Aminosäuren von den elektrisch neutralen zu trennen.

Wir haben nun versucht, auch die neutralen Aminosäuren voneinander chromatographisch zu trennen. Unserer Arbeitsrichtung entsprechend ist uns an einer sicheren mikroanalytischen Methode gelegen, die gestattet, die einzelnen Aminosäuren in Mengen von einigen Milligrammen sicher zu bestimmen. Wenn es auch kaum gelingen wird, jede Aminosäure durch Chromatographie einzeln zu isolieren, so bedeutet doch bereits eine sichere Trennung in bestimmte Gruppen einen großen Vorteil. Die Bestimmung der Aminosäuren innerhalb dieser Gruppen gewinnt wesentlich an Sicherheit gegenüber der Bestimmung im Gesamthydrolysat, da die Zahl der begleitenden Aminosäuren beschränkt ist und diese ihrer Art nach bekannt sind. Außerdem stehen für die Einzelbestimmungsmethoden wesentlich größere Substanzmengen zur Verfügung als wenn die Bestimmung in aliquoten Teilen des Gesamthydrolysates erfolgen muß. Bei unserer Untersuchung ließen wir uns weiterhin von dem Grundsatz leiten, den Aminosäurestickstoff möglichst nach der Mikro-Kjeldahl-Methode zu bestimmen, da dies die exakteste Methode zur schnellen Bestimmung kleiner N-Mengen ist. Die Genauigkeit dieses Verfahrens macht allerdings eine sorgfältige Prüfung aller benutzten Reagenzien notwendig.

Die chromatographische Trennung der neutralen Aminosäuren gelang uns durch 2 Verfahren, 1) die Adsorption an Aktivkohle und 2) die Adsorption an Aluminiumoxyd in Gegenwart von Formaldehyd.

1) Die Adsorption an Aktivkohle.

Es ist bekannt, daß die Adsorbierbarkeit der einzelnen Aminosäuren an Aktivkohle sehr verschieden ist (E. Abderhalden und A. Fodor⁸⁾,

⁴⁾ Th. Wieland, B. **75**, 1001 [1942].

⁵⁾ B. **75**, 349 [1942].

⁶⁾ Naturwiss. **30**, 87 [1942].

⁷⁾ Ark. Kemi, Mineral. Geol. **14** B, Nr. 32; **15** B, Nr. 6.

⁸⁾ Fermentforsch. **2**, 74, 151 [1919].

T. Ito⁹⁾ und E. Negelein¹⁰⁾). Hiernach geht die Adsorption etwa mit der Länge der Kohlenstoffkette der Aminosäuren parallel. Aber auch strukturelle Unterschiede zwischen Isomeren bewirken deutliche Differenzen in der Haftfestigkeit. Von Tiselius⁷⁾ wurde die Adsorbierbarkeit der Aminosäuren quantitativ durch die Verzögerung bestimmt, die diese beim Durchtritt durch eine Kohleschicht erleiden. Das Flüssigkeitsvolumen, das zwischen dem Meniscus des Lösungsmittels und der Grenzzone der Aminosäure liegt, wird von ihm als „Verzögerungsvolumen“ bezeichnet. Dieses ist also um so größer, je höher der Adsorptionskoeffizient der Substanz ist. Den Messungen von Tiselius sind die folgenden Werte der spezifischen Verzögerungsvolumina für die nach Abtrennung der sauren und basischen Aminosäuren verbliebenen neutralen Aminosäuren entnommen:

Tafel 1.

Spezifische Verzögerungsvolumina in cem je g Aktivkohle (Kahlbaum) für 0,5-proz. Lösungen verschiedener Aminosäuren.

Aminosäure	Medium	Spezif. Verzögerungsvolumen
Glykokoll.	0,1- <i>m.</i> NaCl	0
Alanin	0,1- <i>m.</i> NaCl	0,3
Oxyprolin	0,1- <i>m.</i> NaCl	1,9
Prolin	0,1- <i>m.</i> NaCl	2,5
Valin	0,1- <i>m.</i> NaCl	3,2
Leucin	0,1- <i>m.</i> NaCl	7,7
Isoleucin	0,1- <i>m.</i> NaCl	9,2
Phenylalanin	0,1- <i>m.</i> NaCl	62,5
Tryptophan	0,1- <i>m.</i> NaCl	76,5

Hiernach sind also die Unterschiede im Adsorptionsverhalten der einzelnen aliphatischen Aminosäuren verhältnismäßig gering, jedoch besteht zwischen diesen und den aromatischen Aminosäuren eine sehr erhebliche Differenz. Es erschien daher aussichtsreich, eine quantitative chromatographische Trennung der aromatischen Aminosäuren von den aliphatischen zu versuchen. Es zeigte sich, daß dies in der Tat auf einfache Weise und mit großer Genauigkeit möglich ist.

Wir benutzten für unsere Versuche Adsorptionsröhrchen der üblichen Form. Die abtropfende Lösung wurde in einzelnen Fraktionen aufgefangen und in diesen der Aminosäuregehalt nach der Mikro-Kjeldahl-Methode bestimmt. Bei der gewöhnlichen, feinpulvrigen Aktivkohle, z. B. Carbo aktiv. (Schering) oder Carbo animalis (Merck) ist die Durchflußgeschwindigkeit sehr gering, so daß die Analyse sehr langwierig wird. Wir verwandten daher statt dessen die granulierten Aktivkohle (Schering), die wir durch Pulverisieren und Sieben auf eine geeignete Korngröße brachten. Trotz des größeren Kornes sind hiervon nur verhältnismäßig geringe Mengen (2 g) für die Durchführung der Adsorptionsanalyse notwendig. Bei einer hieraus sich ergebenden Schichthöhe von 4 cm fließen ohne Saugen 50 ccm Flüssigkeit in etwa 2–3 Stdn. durch die Säule. Vor der Durchführung der Analyse

⁹⁾ C. 1931 II, 3090; C. 1932 II, 2833; C. 1936 II, 64.

¹⁰⁾ Biochem. Ztschr. 142, 493 [1923].

wurde die Kohle mit Essigsäure ausgekocht, um geringe Mengen stickstoffhaltiger Substanzen zu entfernen. Weiterhin ist es notwendig, die Kohle nach dem Vorschlag von Tiselius⁷⁾ mit Cyanid zu vergiften, da sonst merkliche Störungen durch Oxydation der Aminosäuren auftreten. Nach dem Einfüllen in das Adsorptionsröhrchen wird die Kohlesäule mit 5-proz. Essigsäure durchgespült, um die Adsorptionsfähigkeit der Kohle auf ein brauchbares Maß herabzusetzen. Ohne diese Vorbehandlung ist eine quantitative Trennung der Aminosäuren nicht möglich, da sonst stets ein gewisser Teil der Aminosäuren hartnäckig festgehalten wird, und die Elution sich so lange hinzieht, daß die Grenzen zwischen den aliphatischen und den aromatischen Aminosäuren sich verwischen. Diese Verhältnisse werden besonders deutlich durch die in Tafel 2 zusammengefaßten Versuche wiedergegeben.

Tafel 2.

Einfluß der Vorbehandlung mit Essigsäure auf die Adsorption an Aktivkohle. Versuchsbedingungen: 2 g Kohle mit KCN vergiftet. Die Aminosäuren kamen in den Versuchen 1—3 in wäbr. Lösung, in Versuch 4 in 5-proz. Essigsäure zur Adsorption.

Vorbehandl. mit	Elut.-mittel	Aminosäuren	mg N in aufeinander folgenden Eluaten					Ges.-N i. d. Eluaten	Ges.-N theo- ret. *)	Fehler %
			1. 25 ccm	2. 25 ccm	3. 25 ccm	4. 25 ccm	5. 100 ccm			
H ₂ O	H ₂ O	Glykokoll + Alanin + Serin + Valin + Leucin	0.990	0.044	0.0	0.014	0.082	1.130	1.274	---11
H ₂ O	5% Essigsäure	..	2.428	0.030	0.012	0.026	0.0	2.496	2.548	--- 2
H ₂ O	5% Essigsäure	Leucin + Isoleucin + Methionin	1.882	0.134	0.008	0.0	---	2.024	2.052	--- 1.5
50 cm 5% Essigsäure	5% Essigsäure	Isoleucin	2.248		0.00		---	2.248	2.236	+ 0.5

*) Im Hinblick auf den späteren Verwendungszweck wird bei diesen und allen nachfolgenden Versuchen die Menge der Aminosäuren stets in mg N angegeben, da bei Eiweißanalysen wegen der Unbestimmtheit des Trockengewichtes das Verhältnis Aminosäure-N / Gesamtprotein-N besser definiert ist als das Verhältnis g Aminosäure / g Eiweiß.

Hiernach können aus der nicht mit Essigsäure vorbehandelten Aktivkohle mit 200 ccm Wasser nur 90% der aliphatischen Aminosäuren ausgewaschen werden. Auch mit 5-proz. Essigsäure ist die Elution nicht quantitativ und zieht sich sehr lange hin. Nach Vorbehandlung mit Essigsäure wird dagegen auch die am stärksten adsorbierte aliphatische Aminosäure, das Isoleucin, mit 50 ccm 5-proz. Essigsäure quantitativ eluiert.

Nachdem sich die Essigsäure als geeignetes Elutionsmittel für die aliphatischen Aminosäuren erwiesen hatte, wurde das Verhalten der einzelnen Aminosäuren unter diesen Elutionsbedingungen geprüft (Tafel 3).

Tafel 3.

Verhalten der einzelnen Aminosäuren bei der Adsorption an Aktivkohle. Versuchsbedingungen: 2 g Kohle mit 20-proz. Essigsäure ausgekocht, mit KCN vergiftet und mit 50 ccm 5-proz. Essigsäure vor der Adsorption gespült. Die Aminosäuren kamen in 2—5 ccm 5-proz. Essigsäurelösung zur Adsorption.

Art der Aminosäure	Menge in mg N	mg N mit 5% Essigsäure eluiert		Gesamteluat in % der angew. Menge
		1. Eluat (50 ccm)	2. Eluat (50 ccm)	
Glykokoll	1.724	1.740	0.00*)	101
Alanin	1.558	1.568	0.00	100.5
Serin	1.296	1.288	0.00	99.4
Prolin	1.672	1.654	0.00	98.9
Methionin	0.960	0.962	0.00	100
Valin	1.110	1.120	0.00	100.9
Leucin	0.856	0.846	0.00	98.8
Isoleucin	1.118	1.122	0.00	100.3
Phenylalanin	0.694	0.00	0.058	0.0
Tyrosin	0.390	0.00	0.018	0.0
Tryptophan	1.156	0.00	0.00	0.0

*) Die noch sicher nachweisbare N-Menge beträgt bei unserer Versuchsanordnung 0.005 mg N.

Es zeigte sich, daß sämtliche aliphatischen Aminosäuren mit 50 ccm Essigsäure vollständig eluiert werden, während die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan auch nicht spurenweise ausgewaschen werden. Diese werden so fest adsorbiert, daß sie auch bei weiterer Elution mit Essigsäure gar nicht bzw. nur in geringer Menge eluiert werden. Damit ist unter diesen Versuchsbedingungen eine sichere Trennung dieser beiden Gruppen von Aminosäuren gewährleistet. Die Höchstmenge der unter den Versuchsbedingungen noch sicher adsorbierten aromatischen Aminosäuren beträgt etwa 2 mg Aminosäure-N (s. Versuchsteil). Falls also in einer unbekanntem Lösung dieser Wert erreicht wird, ist es zweckmäßig, das Eluat nochmals auf einer neuen Kohlesäule zu trennen.

Die Elution der adsorbierten aromatischen Aminosäuren bereitete zunächst große Schwierigkeiten. Es wurden u. a. folgende stickstofffreie Elutionsmittel geprüft: 0.5-n. Kalilauge, verd. Butylalkohol und Äthylalkohol, alkohol. Salzsäure und alkohol. Natronlauge, alkalische und saure Phenollösungen, Essigsäure in verschiedenen Konzentrationen teils in der Wärme, teils in der Kälte. Die Ergebnisse einiger dieser Versuche sind in Tafel 4 zusammengefaßt.

Von den 3 aromatischen Aminosäuren ist Phenylalanin, wie nach Tafel I zu erwarten ist, am leichtesten zu eluieren. So kann dieses z. B. mit heißer, 20-proz. Essigsäure mit befriedigender Ausbeute ausgewaschen werden, während Tyrosin und Tryptophan hierbei teilweise haften bleiben. Eine

Tafel 4.

Versuche zur Elution der aromatischen Aminosäuren.
Vollständigkeit der Elution in Prozent der adsorbierten Menge.

Elutions-Lösung	5-proz. Essig-säure	10-proz. Essig-säure	20-proz. Essig-säure	3 % Phenol	10 % Phenol in 0.5-n. KOH	5 % Phenol in 20-proz. Essig-säure
Menge in cem	100	100	200	200	200	100
Elutions-Temp.	70°	70°	70°	70°	70°	20°
Phenylalanin	90 %	95 %	97 %	—	—	100 %
Tyrosin	—	—	91 %	80 %	70 %	} 100 %
Tryptophan	—	—	50 %	—	—	

100-proz. Elution der aromatischen Aminosäuren gelingt mit essigsaurer Phenollösung bei Zimmertemperatur. Welches der Elutionsmittel den Vorzug verdient, richtet sich nach der weiteren Bestimmung der aromatischen Aminosäuren. Da bei der sauren Hydrolyse der Eiweißstoffe das Tryptophan vollständig und das Tyrosin teilweise zerstört wird, können diese Aminosäuren in dem sauren Hydrolysat nicht bestimmt werden. Es genügt daher, in diesem Falle allein das Phenylalanin quantitativ mit 20-proz. Essigsäure in der Wärme zu eluieren und dieses dann colorimetrisch nach der zuverlässigen Methode von Kapeller-Adler¹¹⁾ zu bestimmen. Die Essigsäure ist leicht zu entfernen und stört daher diese Farbreaktionen nicht. Falls der Gesamtstickstoff der aromatischen Aminosäuren bestimmt werden soll, wird man die Elution zweckmäßig mit 5 % Phenol in 20-proz. Essigsäure bei Zimmertemperatur durchführen. Diese Stoffe stören bei der Mikro-Kjeldahl-Bestimmung nicht, da sie beim Eindampfen der Lösung im Aufschlußkolben ohne Schäumen und ohne nennenswerte Zersetzung verdampfen. Als Beleg für die Brauchbarkeit des Trennungsverfahrens ist in Tafel 5 ein Trennungsversuch mit einem Gemisch aliphatischer und aromatischer Aminosäuren wiedergegeben.

Vorläufige Versuche ergaben, daß auch die in dem vorliegenden Zusammenhang nicht berücksichtigten sauren und basischen Aminosäuren sowie das Cystin unter den gleichen Bedingungen von den aromatischen Aminosäuren quantitativ abgetrennt werden.

Bei der Kohleadsorption handelt es sich nach der Systematik der Adsorptionserscheinungen von Michaelis und Rona¹²⁾ um eine apolare Adsorption, da die Adsorbierbarkeit von dem Vorliegen elektrischer Ladungen in den adsorbierten Stoffen unabhängig ist. Sie wird jedoch durch konstitutionelle Eigenschaften stark beeinflusst. Die Elutionsversuche zeigen, daß Tyrosin viel fester adsorbiert wird als Phenylalanin; durch den Eintritt der phenolischen Hydroxylgruppe wird also die an sich schon große Haftfestigkeit der aromatischen Aminosäuren weiter verstärkt. Für die verstärkte Bindung an die Kohle ist die undissoziierte Hydroxylgruppe verantwortlich zu machen, denn es zeigte sich, daß Tyrosin in alkalischer Lösung

¹¹⁾ Biochem. Ztschr. **252**, 186 (1932).

¹²⁾ Biochem. Ztschr. **102**, 268 (1920).

Tafel 5.

Trennung der aromatischen von den aliphatischen Aminosäuren. Adsorbens wie bei Tafel 3. Zusammensetzung der Aminosäurenmischung: Aliphatische: Isoleucin (0.447 mg N), Leucin (0.357 mg N), Methionin (0.386 mg N), Valin (0.44 mg N), Serin (0.55 mg N); Gesamt-N_{aliphat.} = 2.192 mg. Aromatische: Phenylalanin (0.386 mg N), Tyrosin (0.390 mg N), Tryptophan (0.578 mg N). Gesamt-N_{aromat.} = 1.354 mg.

	Aliphat. Aminosäuren, eluiert mit 5-proz. Essigsäure		Aromat. Aminosäuren, eluiert mit 5% Phenol in 20-proz. Essigsäure		
	1. Eluat (25 ccm)	2. Eluat (25 ccm)	1. Eluat (100 ccm)	2. Eluat (100 ccm)	3. Eluat (100 ccm)
mg N	2.182	0.016	1.248	0.078	0.036
Summe	2.198 mg N _{aliphat.}		1.362 mg N _{aromat.}		
% d. Theorie ..	100.3%		100.8%		

nur mangelhaft adsorbiert wird. In Übereinstimmung mit den allgemeinen Erfahrungen, daß eine Adsorptionsverdrängung am besten mit einem Stoff ähnlicher Konstitution gelingt, wird das Tyrosin aus der Adsorptionsverbindung mit Kohle nur durch undissoziiertes Phenol (saure Phenol-Lösung) vollständig verdrängt. Mit alkalischer oder neutraler Phenol-Lösung ist die Elution selbst bei hohen Phenolkonzentrationen unvollständig (Tafel 4). Werden hingegen die spezifischen Haftstellen in der Kohle vorher mit geringen Phenolmengen abgesättigt, so läßt sich das Tyrosin ohne Verluste mit neutralen Phenol-Lösungen in der Kälte eluieren. Hierfür ist in Tafel 6 ein Versuchsbeispiel gegeben.

Tafel 6.

Einfluß der Vorbehandlung mit Phenol auf die Adsorptionsfähigkeit der Kohle.

Bei Versuch 1 gleiche Bedingungen wie in Tafel 3 angegeben. Bei Versuch 2 wurde die Säule zunächst mit 50 ccm 5-proz. Essigsäure gespült, danach mit 20 ccm 3-proz. Phenol-Lösung und schließlich mit Wasser so lange gewaschen, bis die Ferrichloridreaktion auf Phenol negativ war.

Ver-such Nr.	Vorbehandlung mit	Elutionsmittel			Tyrosin-N adsorbiert mg	Eluiert mg	% der adsorb. Menge
		Art	Temp.	Menge ccm			
1	5-proz. Essigsäure	3% Phenol	20°	200	0.576	0.514	89.2
2	5-proz. Essigsäure u. Phenol	3% Phenol	20°	100	0.740	0.742	100

Es liegen hier dieselben Verhältnisse vor wie bei den in Tafel 2 wiedergegebenen Versuchen mit den aliphatischen Aminosäuren, bei denen eine irreversible Adsorption durch eine Vorbehandlung mit einer aliphatischen Säure verhindert werden kann.

Die Frage, wieweit durch Chromatographie an Aktivkohle die aliphatischen Aminosäuren untereinander getrennt werden können, muß noch offenbleiben. Unsere bisherigen Versuche in dieser Richtung erbrachten

keine völlig befriedigenden Ergebnisse, wenn auch eine weitgehende Trennung z. B. von Valin und den Aminosäuren mit noch kleinerem Verzögerungsvolumen von den Leucinen unter bestimmten Bedingungen möglich ist. Die weitere Trennung der aliphatischen Aminosäuren wird daher am besten nach der im folgenden Abschnitt beschriebenen Formaldehydmethode an der Aluminiumoxydsäule vorgenommen.

2) Die Adsorption der neutralen Aminosäuren an Aluminiumoxyd (Formaldehydmethode).

Von Th. Wieland³⁾ wurde gezeigt, daß Aluminiumoxyd nach Behandlung mit Säure anionotrop wird, d. h. die sauren Aminosäuren zu adsorbieren vermag, jedoch nicht die basischen und die neutralen. Es war daher bisher nicht möglich, die neutralen Aminosäuren untereinander durch Adsorption an Aluminiumoxyd zu trennen. Es ist nun bekannt, daß durch Zusatz von Formaldehyd das p_k (= p_R , bei dem 50% Dissoziation vorliegt) der α -Amino-Gruppe der Eiweißbausteine weitgehend in das saure Gebiet verschoben wird. Diese Verschiebung geht so weit, daß die Aminogruppen sich mit Phenolphthalein als Indicator (Umschlagsgebiet p_H 8–10) unter Abgabe von H^+ -Ionen wie eine Säure titrieren lassen (Formoltitration nach Sörensen). Dies brachte uns auf den Gedanken, ob nicht die neutralen Aminosäuren in Gegenwart von Formaldehyd sich auch bei der Adsorption wie Säuren verhielten und auf diese Weise ihre Trennung in der anionotropen Aluminiumoxydsäule möglich wäre. Die Verschiebung des p_k -Wertes durch Formaldehyd ist bei den einzelnen Aminosäuren verschieden stark ausgeprägt. Die aus der Literatur¹³⁾ bekannten Werte sind in Tafel 7 zusammengestellt.

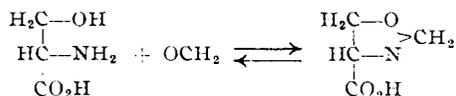
Tafel 7.
Verschiebung des p_k der α -Amino-Gruppe.

Aminosäure	p_k in Wasser	p_k in 9-proz. Formaldehyd-Lsg.
Glykokoll	9.60	5.92
Serin	9.15	5.63
Alanin	9.68	6.96
Valin	9.64	7.47
Leucin	9.60	7.10
Prolin	10.60	7.73*)

*) Gemessen in 10-proz. Formaldehyd-Lsg.

Man sieht, daß die p_k -Verschiebung bei Glykokoll und Serin viel weitergeht als bei den anderen Aminosäuren. Dies mag darauf beruhen, daß Glykokoll die einzige Verbindung dieser Gruppe ist, bei der die Aminogruppe an ein primäres C-Atom gebunden ist, so daß hier die Reaktion mit Formaldehyd gegenüber der anderen Aminosäure sterisch begünstigt ist. Die Sonderstellung des Serins beruht wahrscheinlich darauf, daß die Formaldehyd-Verbindung durch Bildung eines Fünfringes mit der β -ständigen Hydroxylgruppe stabilisiert wird.

¹³⁾ C. L. A. Schmidt, The Chemistry of the Amino Acids and Proteins. Springfield Baltimore 1938.



Die Bildung solcher Oxazolidine wurde von L. Knorr und H. Matthes¹⁴⁾ bei der Einwirkung von Aldehyden auf 1-Amino-2-oxy-Verbindungen beobachtet. Es handelt sich um leicht spaltbare Verbindungen, die in ihrem Verhalten den Aldehyd-Ammoniakten entsprechen.

Die Adsorptionsversuche zeigten nun, daß die einzelnen aliphatischen Aminosäuren sich tatsächlich so verhielten, wie es nach ihren p_K -Werten zu erwarten war: Glykokoll und Serin werden in 10-proz. oder höherer Formaldehyd-Lösung sehr fest an das anionotrope Aluminiumoxyd adsorbiert, die anderen Aminosäuren hingegen nicht, so daß eine quantitative Trennung möglich wurde.

In einer Reihe von Versuchen wurden nun die Voraussetzungen ermittelt für die sichere Abtrennung des Glykokolls und Serins von den übrigen nach der Kohleadsorption noch vorhandenen Aminosäuren. Zunächst wurden die optimalen Bedingungen für die Adsorption des Glykokolls festgestellt und dann das Verhalten der anderen Aminosäuren unter denselben Bedingungen einzeln geprüft. Wir arbeiteten mit den gleichen Adsorptionsröhrchen wie bei den Versuchen mit Kohle. Als Adsorbens bewährte sich das Aluminiumoxyd von Merck, das nach der Vorschrift von Th. Wieland mit Salzsäure behandelt wurde und frei von stickstoffhaltigen Stoffen war. Als Standard-Methode benutzten wir 10 g dieses Aluminiumoxyds, das in der üblichen Weise in die Röhrchen eingefüllt wurde. Die Schichthöhe betrug dann 10 cm. Die nicht adsorbierten Aminosäuren bestimmten wir wieder nach der Mikro-Kjeldahl-Methode; sie können auch direkt in der Formol-Lösung mit Natronlauge nach Sörensen titriert werden, jedoch ist dieses Verfahren weniger sicher, da das Aluminiumoxyd stets kleine Säuremengen abgibt, die aus der Vorbehandlung mit Salzsäure stammen. Die adsorbierten Anteile ergeben sich als Differenz der eingesetzten und der durchgelaufenen Menge. Zur Sicherheit wurden die adsorbierten Aminosäuren stets direkt bestimmt, indem wir das Adsorbat mit 0.5-n. Kalilauge auswuschen und die Kjeldahl-Bestimmung in dem Eluat durchführten.

Tafel 8.

Einfluß der Formaldehyd-Konzentration auf die Adsorption des Glykokolls.

Adsorbens: 10 g Aluminiumoxyd Merck mit HCl vorbehandelt. Vor der Adsorption wurde die Säule mit 50 cem der entsprechenden Formaldehyd-Lösung gewaschen; pH 7—8.

Formaldehyd-Konzentration der Lösung	Glykokoll-N angewandt mg	mg Glykokoll-N im Eluat		Adsorbiertes Glykokoll eluiert mit Kalilauge	
		1. Eluat (25 cem)	2. Eluat (25 cem)	mg N	% d. angew. Menge
10-proz.	0.427	0.0	0.0	0.420	98.4
5-proz.	0.658	0.019	0.130	0.514	62.2

¹⁴⁾ B. 34, 3488 [1901].

Die in Tafel 8 dargestellten Versuche zeigen, daß in 10-proz. Formaldehyd-Lösung das Glykokoll so fest adsorbiert wird, daß es mit 50 ccm Formaldehyd-Lösung vom p_{H} 7–8 auch nicht spurenweise ausgewaschen wird. Die weitere Erhöhung der Formalkonzentration brachte keine Vorteile. In 5-proz. Formaldehyd-Lösung ist die Haftfestigkeit des Glykokolls bereits deutlich vermindert.

Für die sichere Adsorption muß weiterhin ein bestimmter p_{H} -Bereich für die Lösung eingehalten werden. Aus den Versuchen (Tafel 9) geht hervor, daß bei p_{H} 5 oder im alkalischen Gebiet oberhalb p_{H} 9 das Glykokoll kaum noch festgehalten wird.

Tafel 9.

Einfluß des p_{H} auf die Adsorption des Glykokolls.

10 g Aluminiumoxyd vor der Adsorption mit 50 ccm der zu prüfenden Spülflüssigkeit gewaschen.

Zusammensetzung der Spülflüssigkeit			Angewandtes Glykokoll	Adsorbiertes Glykokoll nach Spülung mit 50 ccm	
CH ₂ O Konz.	Puffermischung	p_{H}	mg N	mg N	% der angew. Menge
10 %	<i>m</i> ' ₁₀ -Acetat	5.0	1.072	0.049	4.6
10 %	verd. NaOH (Phenolphthalein schwach rosa)	~8.5	0.427	0.420	98.4
10 %	verd. NaOH (Thymolphthalein dunkelblau)	9.0	1.090	0.638	58.5
10 %	<i>m</i> ' ₁₀ -Borat	9.5	1.072	0.022	2.1

Für die Adsorption erwies sich demnach ein p_{H} 7–8 am günstigsten, das daher bei allen weiteren Versuchen eingehalten wurde. Die Prüfung der einzelnen Aminosäuren ergab, daß Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin und Prolin beim Durchwaschen der 10-g-Säule mit 50 ccm Formaldehyd-Lösung vollständig eluiert werden. In Tafel 10 sind die mit 20-proz. Formaldehyd-Lösung durchgeführten Versuche wiedergegeben, aus denen hervorgeht, daß

Tafel 10.

Verhalten der aliphatischen Aminosäuren bei der Adsorption in Formaldehyd-Lösung.

Versuchsbedingungen wie bei Tafel 8 angegeben.

Aminosäure	Menge mg N	Spülflüssigkeit	Eluiert 1. Eluat 25 ccm	mg N 2. Eluat 25 ccm	Gesamt-eluat. % der angew. Menge	Adsorbierte Menge mg N*)
Alanin	0.674	20-proz. CH ₂ O	0.590	0.078	99.1	0.0
Prolin	0.588		0.586	0.0	99.7	0.0
Valin	0.362		0.342	0.018	99.4	0.0
Leucin	0.910		0.830	0.058	97.6	0.006
Isoleucin	1.734	10-proz. CH ₂ O	1.692	0.038	99.8	0.010
Glykokoll	0.427		0.0	0.0	0.0	0.420
Serin	0.448		0.0	0.0	0.0	0.440

*) Bestimmt nach der Elution mit 0.5-n. KOH.

selbst bei dieser hohen Aldehyd-Konzentration keine Adsorption stattfindet. Glykokoll und Serin werden unter den gleichen Bedingungen nicht eluiert.

Die Höchstgrenze an Glykokoll und Serin, die noch sicher abgetrennt werden kann, beträgt 0.78 mg Glykokoll-N bzw. 1.63 mg Serin-N. Wird dieser Wert erreicht, sollte die Trennung mit dem Eluat nochmals wiederholt werden. Die Trennung eines Aminosäuregemisches lieferte folgendes Ergebnis:

Tafel 11.

Trennung eines Gemisches der aliphatischen Aminosäuren.

Adsorbens: 10 g Aluminiumoxyd. Aminosäuren: 1. Gruppe Glycin + Serin = 0.788 mg N.
2. Gruppe Alanin + Leucin + Valin + Isoleucin = 1.098 mg N.

	mg N eluiert mit 50 ccm 10-proz. CH ₃ O, pH 7-8		mg N adsorbiert (nach Elution mit Kalilauge bestimmt)
	1. Eluat (E ₁) (25 ccm)	2. Eluat (E ₂) (25 ccm)	
	1.056	0.050	0.796
Summe E ₁ + E ₂	1.106 mg N		· · ·
% d. Theorie	100.7		101%

Eine quantitative Trennung ist also mit verhältnismäßig wenig Aluminiumoxyd möglich. Durch Verdopplung der Aluminiumoxydmenge und des Elutionsvolumens läßt sich die Trennung noch sicherer gestalten. Der in Tafel 12 wiedergegebene Versuch zeigt besonders deutlich den großen Unterschied in der Adsorbierbarkeit zwischen Glykokoll + Serin einerseits und den übrigen Aminosäuren andererseits, da das dritte Eluat vollkommen stickstofffrei ist.

Tafel 12.

Trennung eines Gemisches der aliphatischen Aminosäuren.

Menge des Adsorbens: 20 g Aluminiumoxyd. Verwendete Aminosäuremengen wie in Tafel 11.

	mg N eluiert mit 100 ccm 10-proz. CH ₃ O-Lösung			mg N adsorbiert, bestimmt wie Tafel 11
	1. Eluat (50 ccm)	2. Eluat (25 ccm)	3. Eluat (25 ccm)	
	1.074	0.032	0.00	0.804
Summe d. Eluate 1-3	1.106 mg N			· · ·
% d. Theorie	100.7%			102%

Da es sich bei den Formaldehydverbindungen der Aminosäuren um eine sehr lockere Addition handelt, kann der Aldehyd aus den Lösungen der Aminosäuren leicht durch Destillation oder auf anderem Wege entfernt werden, so daß die weitere Analyse ohne Störungen durchführbar ist. In der Glykokoll-Serin-Fraktion könnte das Glykokoll colorimetrisch nach Klein und Linser¹⁵⁾, das Serin nach Rapoport¹⁶⁾ bestimmt werden. In

¹⁵⁾ Ztschr. physiol. Chem. **205**, 251 [1932].

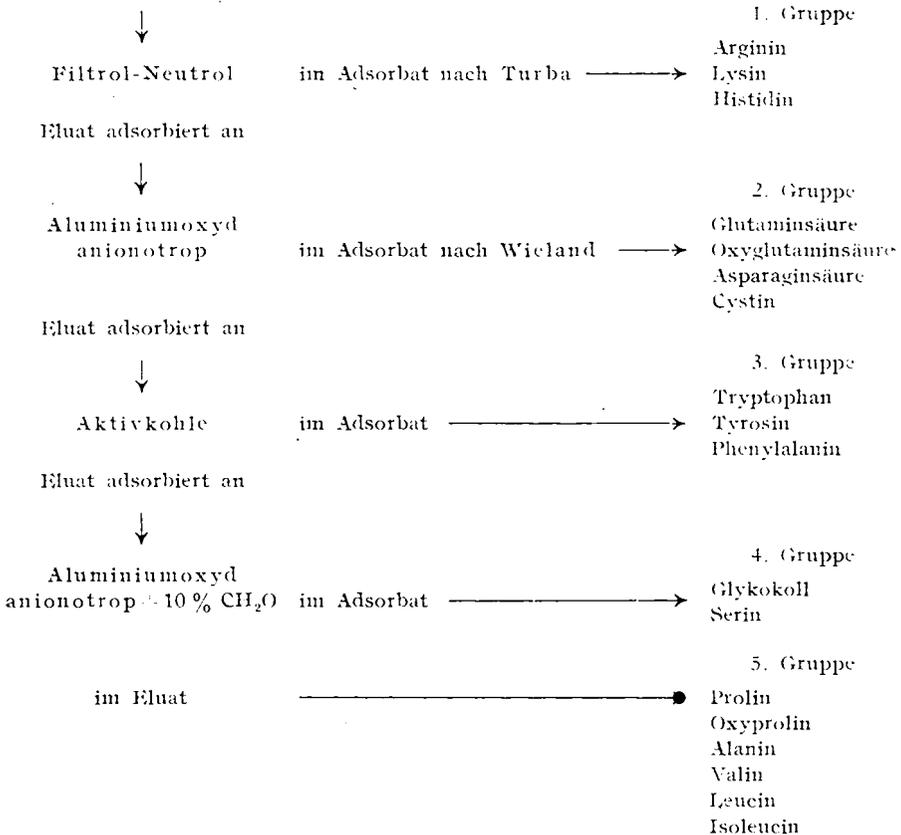
¹⁶⁾ Biochem. Ztschr. **289**, 406 [1937].

dieser Fraktion sollten u. U. außer dem Serin auch andere seltenere β -Oxyaminosäuren auftreten, wenn die anfangs (S. 380) geäußerte Ansicht über die Reaktionsweise des Formaldehyds mit α -Amino- β -oxy-Verbindungen zutreffend ist. Für die Aminosäuren der zweiten, nicht adsorbierten Gruppe bestehen z. Tl. ebenfalls gute Bestimmungsmethoden. So können Prolin und Oxyprolin, die nicht mit Salpetriger Säure reagieren, aus der Differenz des Gesamt-N und des Amino-N nach van Slyke bestimmt werden. Wenn die Zahl der Aminosäuren in dieser Fraktion beschränkt ist, könnte ihre Konzentration nach der optischen Methode von Tiselius gemessen werden.

Nach diesen bisher nur an künstlichen Mischungen der verschiedenen reinen Aminosäuren durchgeführten Versuchen ergibt sich etwa folgendes vorläufiges Schema für die Trennung eines Eiweißhydrolysats:

Schema der Aminosäuren-Trennung.

Hydrolysegemisch adsorbiert an



Es sind Versuche im Gange, die bisherigen Erfahrungen auf die Aufarbeitung eines natürlichen Hydrolysegemisches zu übertragen, da ein Analysengang auf chromatographischer Grundlage allen älteren Verfahren z. B. von E. Fischer oder Dakin an Einfachheit der Durchführung und an Genauigkeit weit überlegen ist.

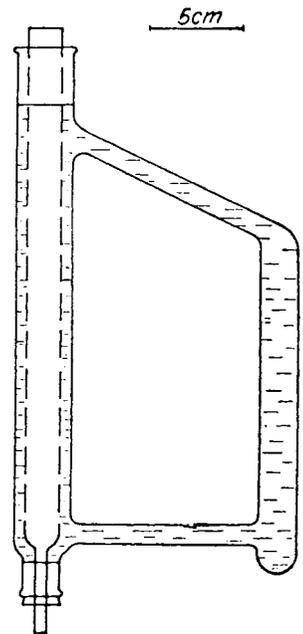
Beschreibung der Versuche.

Die Aminosäuren kamen mit Ausnahme von synthetischem Leucin und Methionin als natürliche *l*-Formen zur Anwendung. Sie wurden durch Umkrystallisieren oder durch Chromatographie gereinigt. Sämtliche anderen Reagenzien erwiesen sich nach entsprechender Reinigung als stickstofffrei.

a) Trennung des Tryptophans, Tyrosins und Phenylalanins von den aliphatischen Aminosäuren.

Herstellung der Adsorptionskohle: Carbo aktiv. granulatus (Schering) wird in einer Reibschale gepulvert und durch ein Sieb mit der Maschenzahl 28/qcm von den größeren Anteilen befreit. Aus dem erhaltenen Kohlepulver werden durch Sieben mit einem groben Tuch die feinsten Anteile entfernt. Man erhält dann ein Pulver von mittlerer Korngröße, welches bei einer Säulenhöhe von 4 cm eine Durchflußgeschwindigkeit von 4—5 Tropfen je Min. zeigen soll. Zur Entfernung der in der Kohle enthaltenen Stickstoffverbindungen wird diese mit der 5- bis 10-fachen Menge 20-proz. Essigsäure einige Min. zum Sieden erhitzt, heiß abgenutscht und mit heißem Wasser gewaschen, bis in der Spülflüssigkeit nach dem Veraschen kein Stickstoff nachweisbar ist. In der Regel ist dies schon nach 2- bis 3-maligem Waschen der Fall. Die gereinigte Kohle wird in Wasser suspendiert und mit 50 mg Kaliumcyanid je 100 g Kohle einige Min. auf 60° erwärmt. Hierauf wird abgesaugt und mit heißem Wasser wiederholt gespült.

Durchführung der Trennung: Die Chromatographieröhrchen haben einen Durchmesser von 12 mm und eine Länge von etwa 250 mm. Nach dem Verschließen der unteren Öffnung durch einen Wattepfropf werden 2 g Kohle in wäbr. Suspension in die Röhrchen eingefüllt und die über der Säule stehende Flüssigkeit unter schwachem Saugen entfernt. Nach dem Absetzen der Kohle erhält man durch leichtes Klopfen an der Glaswand eine gut ausgebildete Säule von 4 cm Länge. Die feinen Anteile der Kohle, welche an der Wand des Glasrohrs haften bleiben, werden durch Spülen mit Wasser und Absaugen der Spülflüssigkeit mit einer Pipette entfernt. Vor der Adsorption wird die Säule mit 50 ccm 5-proz. Essigsäure unter schwachem Saugen durchgewaschen. Wenn die Spülflüssigkeit so weit abgelaufen ist, daß sie gerade noch die Säule bedeckt, wird das zu trennende Aminosäuregemisch, das in einem Volumen von 2—5 ccm enthalten ist, aufgetragen. Nachdem die Lösung in die Säule eingedrungen ist, spült man 2-mal mit je 3 ccm 5-proz. Essigsäure sorgfältig die Glaswand ab und eluiert dann mit insgesamt 50 ccm 5-proz. Essigsäure die aliphatischen Aminosäuren. Die nach Auftragen der Aminosäurelösung ablaufende Flüssigkeit wird in einem 50-ccm-Meßkölbchen aufgefangen und in einem aliquoten Anteil der Stickstoff nach der Mikro-Kjeldahl-Methode bestimmt. Zur Elution der aromatischen Aminosäuren werden 300 ccm 5-proz. Phenollösung in 20-proz. Essigsäure verwendet. Die über der Säule stehenden Reste der 5-proz. Essigsäure können vorher durch Abpipettieren entfernt werden. In dem Eluat wird wiederum in einem aliquoten Teil der Gesamtstickstoff der aromatischen Aminosäuren bestimmt. Wenn das Phenylalanin bestimmt werden soll, wird die Elution mit 100 ccm 20-proz. Essigsäure bei 70° vorgenommen. Hierzu wird das Chromatographieröhr in einen wassergefüllten Wärmemantel aus Jenaer Glas eingesetzt, dessen seitlicher Ansatz durch einen Bunsenbrenner erwärmt wird (s. Abbild.). Höhere Temperaturen empfehlen sich nicht, da die Säule durch die sich entwickelnden Gasblasen zerrissen wird.



Abbild. Wärmemantel für Chromatographieröhr.

Die Menge der aromatischen Aminosäuren, die von 2 g Kohle unter den beschriebenen Bedingungen festgehalten wird, beträgt etwa 2.6 mg N. Zur Ermittlung dieser Höchstgrenze wurde die Säule mit einem Überschuß eines Gemisches der drei aromatischen Aminosäuren versetzt und der nach Elution mit 50 ccm 5-proz. Essigsäure in der Säule verbliebene Rest bestimmt.

Angewandte Menge: 1.155 mg Tryptophan-N + 0.778 mg Tyrosin-N + 0.797 mg Phenylalanin-N = 2.730 mg Gesamt-N. Hiervon adsorbiert 2.628 mg N.

b) Trennung des Glykokolls und Serins von Alanin, Valin, Leucin, Iso-leucin und Prolin.

Die 10-proz. Formaldehyd-Lösung wird aus dem käuflichen 40-proz. Formalin (Schering) hergestellt, nachdem dieses vorher durch Destillation bei gewöhnlichem Druck gereinigt ist. Die Konzentration des stickstofffreien Destillats beträgt etwa 30 Gew.-%. 100 ccm der 10-proz. Formaldehyd-Lösung dürfen nach der Veraschung keine nachweisbare Stickstoffmenge enthalten. Die 10-proz. Formaldehyd-Lösung wird mit einigen Tropfen Phenolphthaleinlösung versetzt und mit 1-n. KOH auf blaßrosa titriert. Das pH dieser Lösung beträgt mit der Glaselektrode gemessen etwa 8.5. Aluminiumoxyd reinst wasserfrei (Merek) wird nach der Vorschrift von Th. Wieland³⁾ mit HCl vorbehandelt.

Ausführung der Trennung: Die Trennung wird zweckmäßig mit 20 g des vorbehandelten Aluminiumoxyds durchgeführt, die in ein Chromatographierohr von 17 mm Durchmesser und 300 mm Länge eingefüllt werden. Man spült die Säule vor der Adsorption mit 100 ccm der neutralisierten 10-proz. Formaldehyd-Lösung. Das Gemisch der Aminosäuren wird in höchstens 5 ccm 10-proz. Formaldehyd-Lösung, die ebenfalls mit 1-n. KOH neutralisiert ist, zur Adsorption gebracht. Nachdem die Lösung in die Säule eingedrungen ist, spült man das Röhrchen 2-mal mit je 3 ccm Formaldehyd-Lösung und eluiert dann mit weiteren 94 ccm (insgesamt 100 ccm) der neutralisierten Formaldehyd-Lösung, die in einem 100-ccm-Meßkolben aufgefangen wird. Nach dem Wechsel der Vorlage werden das Serin und Glykokoll mit 50 ccm 0.5-n. Kalilauge eluiert.

Um zu prüfen, welche Mengen an Glykokoll und Serin unter den angegebenen Bedingungen noch sicher festgehalten werden, wurde eine Säule aus 10 g Aluminiumoxyd mit einem Überschuß an Glykokoll und Serin versetzt und mit 50 ccm 10-proz. Formaldehyd-Lösung ausgewaschen. Bei einem Versuch mit Glykokoll verblieben in der Säule 0.78 mg N, was einer Menge von 4.18 mg Glykokoll entspricht. Bei einem Versuch mit Serin verblieben in der Säule 1.63 mg N (= 12.3 mg Serin).

59. Géza Zemplén, Rezső Bognár und Iván Székely: Synthese des Salipurposids und des Isosalipurposids.

[Aus d. Organ.-chem. Institut d. Techn. Universität Budapest.]

(Eingegangen am 9. Februar 1943.)

Bei den chemischen Untersuchungen über Salix-Arten fanden Charaux und Rabaté¹⁾ in der Rinde der *Salix purpurea* L. außer dem längst bekannten Salicin zwei neue Glykoside, die sie mit den Namen Salipurposid bzw. Isosalipurposid²⁾ belegten. Das letztgenannte Glykosid begleitet nur in den älteren Rinden der Bäume das Salipurposid.

Beide Verbindungen gaben bei der Hydrolyse mit 2-proz. Schwefelsäure als Zuckerkomponente *d*-Glucose und als Aglykon das sogenannte Salipurpol, das bei den späteren Untersuchungen der Autoren als Naringenin

¹⁾ Compt. rend. Acad. Sciences **192**, 1478 [1931].

²⁾ Compt. rend. Acad. Sciences **196**, 816 [1933].