

Dem unter der Leitung von Hrn. Dozent Dr. E. Wiesenberger stehenden Mikrolaboratorium danke ich für die Ausführung der Mikroanalysen. Fräulein G. Schwegler sei für ihre fleißige und geschickte Mithilfe bei den Versuchen bestens gedankt.

### 75. Gerhard Schramm und Josef Primosigh: Die Adsorptionsanalyse der Aminosäuren, II. Mitteil.\*): Die Gruppentrennung des Gesamtgemisches.

[Aus d. Arbeitsstätte für Virusforschung d. Kaiser-Wilhelm-Institute für Biochemie u. Biologie, Berlin-Dahlem.]

(Eingegangen am 16. Mai 1944.)

Die genaue Kenntnis der Aminosäurezusammensetzung der Proteine ist für viele Fragen der Eiweißchemie von entscheidender Bedeutung. Die bisherigen chemischen Verfahren zur Trennung der Aminosäuren sind äußerst langwierig und ungenau und erfordern verhältnismäßig große Proteinmengen. Durch Anwendung der chromatographischen Adsorptionsanalyse gelang es nun, die Gesamtanalyse aller in Eiweißstoffen vorkommenden Aminosäuren auf eine neue Grundlage zu stellen, die eine sichere und bequeme Analyse kleiner Proteinmengen ermöglicht. Hierbei erfolgt eine Trennung der Aminosäuren in fünf Gruppen, von denen jede nur eine geringe Anzahl funktionell zusammengehöriger Aminosäuren umfaßt. Die einzelnen Trennungen erfolgen in theoretisch durchsichtiger Weise, so daß auch das Verhalten bisher nicht berücksichtigter Bausteine mit großer Sicherheit vorausgesagt werden kann. Nach unseren Versuchen hat sich der im folgenden Schema dargestellte Analysengang als der zweckmäßigste ergeben:

#### Reihenfolge der Adsorptionen.

Absorbens	Aktivkohle	Silicagel	Aluminiumoxyd anionotrop	Aluminiumoxyd u. Formaldehyd	Rest
Im Adsorbat enthalten	1. Gruppe (Aromatische Aminosäuren)	2. Gruppe (Basische Aminosäuren)	3. Gruppe (Saure Aminosäuren)	4. Gruppe	5. Gruppe
	Tryptophan Tyrosin Phenylalanin	Arginin Lysin Histidin	Asparaginsäure Oxyglutaminsäure Glutaminsäure	Serin Threonin Cystein Glykokoll	Alanin Valin Leucin Isoleucin Prolin Oxyprolin

Von der Aktivkohle werden nur die Aminosäuren adsorbiert, die einen aromatischen Ring enthalten, unabhängig davon, wie dieser substituiert ist\*). Das Silicagel adsorbiert als saures Adsorbens die Aminosäuren, die neben der  $\alpha$ -Amino-Gruppe eine zusätzliche basische Gruppe enthalten. Von dem anionotropen Aluminiumoxyd werden dagegen nur die Aminodicarbonsäuren zurückgehalten. Die vierte Gruppe enthält

\*) I. Mitteil. B. 76, 373 [1943].

Aminosäuren, die mit Formaldehyd eine beständige Verbindung eingehen\*). Neben Glykokoll sind dies die  $\alpha$ -Aminosäuren, die in  $\beta$ -Stellung eine Oxy- oder Sulphydrylgruppe enthalten. Der verbleibende Rest enthält die aliphatischen neutralen Aminosäuren, wobei der aliphatische Rest verzweigt oder unverzweigt oder mit der  $\alpha$ -Amino-Gruppe zum Ring geschlossen sein kann.

Bei der Ausarbeitung des Analysenganges waren folgende Gesichtspunkte maßgebend: 1) Zur Vermeidung größerer Mengen an Waschflüssigkeit wurde bei jeder Trennung möglichst wenig Adsorbens verwendet. 2) Die Analyse mußte so geleitet werden, daß keine Anhäufung von Salzen in der Analysenflüssigkeit stattfand, da einige der verwendeten Adsorbentien, insbesondere das Silicagel und das Aluminiumoxyd, gegen Neutralsalze empfindlich sind. Es wurde daher auch ein Verfahren ausgearbeitet, um u. U. in der Lösung vorhandenes Ammoniak ohne Alkaliüberschuß zu entfernen. 3) Besonders sorgfältig mußte das Verhalten des Cystins geprüft werden, da es in Wasser nur wenig löslich ist und außerdem leicht zu der entsprechenden Sulfonsäure oxydiert wird.

Bei der Analyse des Säurehydrolysates eines Eiweißstoffes muß die Adsorption an Aktivkohle an erster Stelle erfolgen, da sonst die sauren Zersetzungsprodukte des Tryptophans, die von der Kohle vollständig zurückgehalten werden, eine Störung des weiteren Trennungsganges verursachen würden. Um eine Oxydation des Cystins durch die Kohle zu vermeiden, muß die Adsorption in schwefelwasserstoffhaltiger Lösung vorgenommen werden.

Die nun folgende Abtrennung der basischen Aminosäuren kann mit einer Reihe verschiedener saurer Adsorbentien vorgenommen werden, z. B. der Bleicherde Filtrol-Neutrol<sup>1)</sup>, kationotropem Aluminiumoxyd<sup>2)</sup>, saurem Wofatit<sup>3)</sup>, Permutit<sup>4)</sup> oder Silicagel<sup>5)</sup>. Mit Filtrol-Neutrol ist die Abtrennung der basischen Aminosäuren vollständig, jedoch scheint nach unseren Versuchen eine befriedigende Elution mit stickstofffreien Elutionsmitteln nicht möglich zu sein (Tafel 1). Wegen der guten Durchlässigkeit und der leichten Eluierbarkeit des Adsorbates verdient die Silicagelsäule nach unseren Erfahrungen bei weitem den Vorzug. Es ist allerdings zu beachten, daß an Silicagel in gleicher Weise wie die basischen Aminosäuren auch andere Kationen, wie z. B. Natrium-Ionen, adsorbiert werden und das Bindungsvermögen für die gesamten anwesenden Kationen nur beschränkt ist (Tafel 2). Durch Vorbehandlung des Adsorbens mit Essigsäure muß vor der Adsorption störendes Alkali entfernt werden, da in alkalischer Lösung das Histidin wegen der schwach basischen Eigenschaften des Imidazol-N nicht adsorbiert wird.

Die Abtrennung der sauren Aminosäuren kann mit verschiedenen basischen Adsorbentien erfolgen. Von diesen bewährt sich das nach dem Vorschlag von Th. Wieland<sup>6)</sup> durch Behandlung mit Salzsäure her-

1) F. Turba, B. 74, 1829 [1941].

2) Th. Wieland, Ztschr. physiol. Chem. 273, 24 [1942].

3) K. Freudenberg, Naturwiss. 30, 87 [1942].

4) J. C. Whitehorn, Journ. biol. Chem. 56, 751 [1923].

5) G. M. Schwab u. K. Jockers, Angew. Chem. 50, 546 [1937].

6) B. 75, 1001 [1942].

gestellte anionotrope Aluminiumoxyd am besten. Da die Glutaminsäure in neutraler oder schwach saurer Lösung leicht einen Ringschluß zur Pyrrolidoncarbonsäure erleidet, war zu prüfen, ob hierdurch die Analyse gestört wird. Dies ist nicht der Fall. Die Pyrrolidoncarbonsäure unterscheidet sich in ihrem Adsorptionsverhalten nicht merklich von der Glutaminsäure. Wieland fand, daß mit den Aminodicarbonsäuren auch das Cystin vom anionotropen Aluminiumoxyd zurückgehalten wird. Dies beruht wahrscheinlich darauf, daß das Cystin bei dem in der Säule herrschenden  $p_H$  unlöslich ist<sup>7)</sup>. Bei Anwesenheit von Schwefelwasserstoff wird das Cystin zu Cystein reduziert, das die Aluminiumoxydsäule ohne Hemmung passiert. Die Adsorption des Cysteins an das anionotrope Aluminiumoxyd gelingt jedoch mit Sicherheit in Formaldehydlösung. Dieses Verhalten entspricht dem des Serins und Threonins. Bei allen diesen Aminosäuren wird durch Formaldehyd die Dissoziationskonstante der  $\alpha$ -Amino-Gruppe stark herabgesetzt, so daß sie in neutraler Lösung vollständig als Anionen vorliegen und somit fest an das anionotrope Aluminiumoxyd gebunden werden. Die Stabilität der Formaldehydverbindung dieser  $\beta$ -substituierten Aminosäuren ist wohl darauf zurückzuführen, daß sich ein relativ beständiger Oxazolidin- bzw. Thiazolidinring<sup>8)</sup> ausbildet.

Die Gesamtanalyse läßt sich mit einer Genauigkeit von 2 bis 3% durchführen, wie aus folgendem Versuchsbeispiel hervorgeht.

Analyse eines Aminosäuregemisches.

Fraktion	Adsorptionsmittel	mg N theoret.	gef.	Fehler %
1. Gruppe (Phenylalanin, Tryptophan) . . . . .	Aktivkohle	0.962	0.990	+ 2.9
2. Gruppe (Arginin, Histidin, Lysin) . . . . .	Silicagel	3.336	3.378	+ 1.3
3. Gruppe (Glutaminsäure, Asparaginsäure) . . .	Aluminiumoxyd	0.956	0.944	- 1.3
4. Gruppe (Glykokoll, Serin, Cystein) . . . . .	Aluminiumoxyd und Formaldehyd	1.622	1.640	+ 1.3
5. Gruppe (Alanin, Isoleucin) .	—	1.212	1.182	- 2.5
	Summe	7.088	7.144	+ 0.8

<sup>7)</sup> Th. Wieland, *Chemie* 56, 213 [1943].

<sup>8)</sup> Für die Bildung dieses Ringes sprechen auch die Versuche von S. Ratner und H. T. Clarke, *Journ. Amer. chem. Soc.* 59, 200 [1937].

Die chromatographische Analyse der Aminosäuren ist sicherlich in vieler Hinsicht noch weiterer Entwicklung bedürftig. Wir glauben aber, daß die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Trennung in einzelne Gruppen als Grundlage der Analyse der Aminosäuren ihren Wert behalten wird und die weitere Aufgabe darin besteht, die abgetrennten Gruppen in ihre Bestandteile aufzulösen. Hier ergeben sich noch viele offene Fragen, die aber zur Zeit von verschiedenen Arbeitskreisen in erfolversprechender Weise bearbeitet werden. (F. Turba und Mitarb.<sup>9)</sup>, Th. Wieland<sup>7)</sup>, W. Koschara<sup>10)</sup>, A. Tiselius<sup>11)</sup>, H. Gordon, A. J. P. Martin u. R. L. M. Synge<sup>12)</sup>.) Es wird weiterhin notwendig sein, die durch Stickstoffanalysen bestimmten Aminosäuren durch geeignete chemische oder physikalische Verfahren zu identifizieren. Für manche Fragen wird aber die Gruppentrennung als solche schon von großem Wert sein, so z. B. für die Feststellung der unter den Bedingungen der sauren Eiweißhydrolyse auftretenden Veränderungen von Aminosäuregemischen. Untersuchungen hierüber befinden sich im Gange.

### Beschreibung der Versuche.

#### A) Durchführung der Analyse.

Die Voraussetzung zu einer erfolgreichen Durchführung der Analyse ist, daß alle benutzten Reagenzien und Adsorbentien stickstofffrei sind. Der käufliche 40-proz. Formaldehyd wird durch Destillation bei gewöhnl. Druck gereinigt. Der Eisessig wird über Phosphorsäure destilliert. Auch das Kaliumhydroxyd<sup>13)</sup> und die Salzsäure sind vorher auf Anwesenheit stickstoffhaltiger Verbindungen zu prüfen. Die Aktivkohle muß vor der Adsorption mit Essigsäure ausgekocht werden. Ebenso ist es notwendig, das Silicagel durch Behandlung mit 20-proz. Essigsäure zu reinigen. Das Aluminiumoxyd erweist sich in der Regel nach der üblichen Vorbehandlung als stickstofffrei.

Falls nicht anders bemerkt, benutzen wir bei den Trennungen Adsorptionsröhrchen mit einem Durchmesser von 12 mm und einer Länge von etwa 300 mm. Um das Aufwirbeln des Adsorbens und Substanzverluste durch Benetzung der Rohrwand zu vermeiden, lassen wir die Aminosäurelösung durch einen Tropftrichter einfließen, dessen untere, seitlich abgegebene Spitze unmittelbar über der Oberfläche des Adsorbens endete.

Die Trennung der Aminosäuren wird am besten mit einer Menge durchgeführt, die etwa 10 mg Stickstoff enthält. Die zur Eiweißhydrolyse verwendete Salzsäure muß möglichst weitgehend entfernt werden. Die Lösung soll nach Möglichkeit nicht mehr als zwei Säureäquivalente/Mol. Stickstoff enthalten.

<sup>9)</sup> Naturwiss. 31, 508 [1943].

<sup>10)</sup> Ztschr. physiol. Chem. 280, 55 [1944].

<sup>11)</sup> Kolloid-Ztschr. 105, 101, 177 [1943].

<sup>12)</sup> Biochem. Journ. 37, 79, 86, 92 [1943].

<sup>13)</sup> Im Gegensatz zum Kaliumhydroxyd erwies sich das käufliche Natriumhydroxyd häufig als stickstoffhaltig.

Die Entfernung und quantitative Bestimmung des Ammoniaks wird durch Destillation der flüchtigen Base im Vak. durchgeführt, wobei das Ammoniak in der üblichen Weise durch vorgelegte Säure aufgefangen wird. Zur Vermeidung eines Alkaliüberschusses wird die Lösung mit einigen Tropfen Thymolphthalein versetzt und nur so viel Kalilauge zugegeben, daß die Lösung gerade blau gefärbt wird. In dem Maße, wie bei der Destillation Ammoniak entweicht und die Lösung sich entfärbt, läßt man durch die Siedecapillare weitere Mengen *n*-KOH zufließen. Nach diesem Verfahren ließ sich bei Kontrollbestimmungen mit Ammoniumchlorid die vorhandene Menge Ammoniak sehr genau bestimmen.

Die ammoniakfreie Lösung der Aminosäuren wird in einer Abdampfschale eingeengt und in 5, höchstens 10 ccm 5-proz. Essigsäure aufgenommen. Zur Reduktion des Cystins wird in diese Lösung bei 60° Schwefelwasserstoff eingeleitet. Bei Anwesenheit größerer Mengen Cystin trübt sich die Lösung unter Abscheidung von kolloidalem Schwefel.

Nach dem Abkühlen der Lösung erfolgt die Abtrennung der aromatischen Aminosäuren an der mit Schwefelwasserstoff vorbehandelten Aktivkohle. Die 4 cm lange Säule aus etwa 2 g pulverisiertem Carbo aktiv. granulat. (Schering) wird wie früher hergestellt\*). Nach dem Auskochen der Kohle mit 20-proz. Essigsäure wird jedoch die gereinigte Kohle in Wasser suspendiert und in die Suspension ein kräftiger H<sub>2</sub>S-Strom eingeleitet. Vor der Adsorption wird die Säule mit 50 ccm 5-proz. Essigsäure, die mit H<sub>2</sub>S gesättigt ist, unter schwachem Saugen durchgewaschen. Als Elutionsmittel wird ebenfalls eine mit H<sub>2</sub>S gesättigte 5-proz. Essigsäure verwendet. Die Aminosäuren der 2. bis 5. Gruppe sind in den ersten 50 ccm des Eluates enthalten. Die in der Säule verbliebenen aromatischen Aminosäuren werden auf dem früher angegebenen Wege\*) eluiert. Die Lösung der aliphatischen Aminosäuren wird nun auf dem Wasserbad in einer flachen Schale bis zu einem Vol. von etwa 2 ccm, jedoch nicht zur Trockne, eingeengt und dann im Vakuumexsiccator über Kaliumhydroxyd von den letzten Resten der Essigsäure befreit. Der Rückstand wird in 5 ccm Wasser gelöst. Bei Anwesenheit von viel Cystin muß etwas erwärmt werden, bis alles gelöst ist. Die schwach saure Lösung wird mit 0.1-*n*. KOH gegen Bromthymolblau auf Grün titriert; eine alkalische Reaktion ist unbedingt zu vermeiden, da hierdurch die Haftfestigkeit der basischen Aminosäuren in der Silicagelsäule herabgesetzt wird.

Zur Abtrennung der basischen Aminosäuren wird Silicagel (Merck) benutzt. Das Material wird in gleicher Weise wie die Aktivkohle\*) pulverisiert, gesiebt und durch wiederholtes Schlämmen mit Wasser von feineren Anteilen befreit. Um stickstoffhaltige Verunreinigungen und das störende Alkali zu entfernen, läßt man das Pulver vor Gebrauch einige Tage in 20-proz. Essigsäure stehen. Nach dem Abgießen der Essigsäure wird wiederholt mit Wasser dekantiert, bis das p<sub>H</sub> der überstehenden Lösung etwa 6.0 beträgt. Aus dem stickstoff- und alkali-freien Silicagel wird eine 10 cm hohe Adsorptionssäule hergestellt, wozu etwa 6 g trocknes Silicagel benötigt werden. Die optimale Durchfließgeschwindigkeit beträgt bei Atmosphärendruck etwa 4 Tropfen je Minute. Nachdem die Lösung der Aminosäuren in die Silicagelsäule eingedrungen ist, wird mit Wasser nachgespült. Die Aminosäuren der 3.

bis 5. Gruppe sind quantitativ in den ersten 50 ccm des Eluates enthalten. Die in der Säule verbliebenen basischen Aminosäuren werden am zweckmäßigsten mit verd. Säure herausgelöst. Hierzu sind 100 ccm 0.1—0.5-*n*.HCl oder 100 ccm 20-proz. Essigsäure erforderlich. Die Lösung der Aminosäuren der Gruppen 3—5 wird auf dem Wasserbad bis zu einem Vol. von 5—10 ccm eingeeengt. Wenn nötig, wird neutralisiert und dann zur Reduktion des Cystins bei 60° Schwefelwasserstoff bis zur Sättigung eingeleitet.

Aus dieser Lösung werden die sauren Aminosäuren mit anionotropem Aluminiumoxyd abgetrennt. Dieses wird nach der Vorschrift von Wieland aus Aluminiumoxyd reinst, wasserfrei (Merck) durch Behandlung mit HCl hergestellt. Die 10 cm lange Säule aus etwa 10 g Aluminiumoxyd wird vor der Adsorption mit 50 ccm Schwefelwasserstoffwasser gespült. Die gleiche Lösung wird auch zur Elution benutzt, nachdem die Lösung der Aminosäuren zugegeben ist. Zum Auswaschen der neutralen Aminosäuren der 4. und 5. Gruppe genügen 50 ccm Schwefelwasserstoffwasser, bei Anwesenheit von Cystin müssen 100 ccm angewendet werden. Die in der Säule verbliebenen sauren Aminosäuren können mit Salzsäure oder mit 25 ccm 0.5-*n*.KOH eluiert werden. Die Lösung der neutralen Aminosäuren wird auf dem Wasserbad auf etwa 5 ccm eingeeengt und dann mit so viel 30—40-proz. Formaldehyd versetzt, daß eine 10-proz. Formaldehydlösung entsteht. Zur Reduktion des während des Abdampfens gebildeten Cystins wird die Lösung wiederum mit Schwefelwasserstoff bei 60° gesättigt und dann nach Zusatz von Bromthymolblau mit *n*-KOH auf Blaugrün titriert. Die Abtrennung des Glykokolls, Serins, Cysteins u. Threonins erfolgt an einer Säule aus 20 g anionotropem Aluminiumoxyd in einem Chromatographierohr von 17 mm Durchmesser. Vor der Adsorption wird die Säule mit 50 ccm neutraler 10-proz. Formaldehydlösung, die mit Schwefelwasserstoff gesättigt ist, gespült. Die gleiche Lösung wird auch nach Zugabe der Aminosäuren zur Elution benutzt. Der Durchlauf enthält in 100 ccm die neutralen Aminosäuren der 5. Gruppe. Die in der Säule verbliebenen Aminosäuren der 4. Gruppe können mit 50 ccm 0.5-*n*.KOH eluiert werden.

### B) Einzelversuche zum Analysengang.

Im folgenden Abschnitt sind die wichtigsten Versuche angeführt, auf denen sich der angegebene Analysengang aufbaut.

#### 1) Abtrennung der aromatischen Aminosäuren durch Adsorption an Aktivkohle.

Die Vollständigkeit der Abtrennung des Tryptophans, Tyrosins und Phenylalanins von Glykokoll, Alanin, Serin, Prolin, Methionin, Valin, Leucin und Isoleucin haben wir bereits beschrieben\*). Es wurde noch das Verhalten von Arginin, Lysin, Histidin, Glutaminsäure, Asparaginsäure und Cystein geprüft, indem ein Gemisch dieser Aminosäuren (1.79 mg N) unter den oben angegebenen Bedingungen an Aktivkohle adsorbiert und mit 5-proz. Essigsäure eluiert wurde. Es enthielten das 1. Eluat (25 ccm) 1.820 mg N, das 2. Eluat (25 ccm) 0.008 mg N. Gesamt-N eluiert: 1.828 mg (Fehler + 2%).

## 2) Abtrennung der basischen Aminosäuren durch saure Adsorbentien.

a) Versuche mit Filtrol-Neutrol: Die Abtrennung des Arginins, Lysins und Histidins von den übrigen Aminosäuren mit Filtrol-Neutrol nach Turba gelingt einwandfrei. Es ist jedoch schwierig, sie ohne Anwendung stickstoffhaltiger Lösungsmittel wieder herauszulösen<sup>14)</sup>. Nach Tafel 1 ist eine vollständige Elution mit stark alkalischer Phosphatlösung möglich. Diese ist aber äußerst langwierig, da die Bleicherden in alkalischer Lösung aufquellen und fast undurchlässig werden, so daß die Elution sich tagelang hinzieht.

Tafel 1.

Versuche zur Elution der an Filtrol-Neutrol adsorbierten basischen Aminosäuren.

Versuchsbedingungen: 3 g Filtrol-Neutrol wurden auf eine Glasfritte 11 G 4 aufgebracht, Arginin, Lysin und Histidin (Gesamt-N 6.04 mg) adsorbiert und mit 100 ccm des entsprechenden Elutionsmittels gespült.

Elutionsmittel 100 ccm	Vollständigkeit der Elution in % der angewandten Menge
1-n.Essigsäure . . . . .	1
20-proz. Formaldehydlösung . . .	1
1-n.HCl . . . . .	30
0.5-n.KOH . . . . .	85
1-n.KOH u. $\frac{1}{15}$ m $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (1:1)	100

b) Versuche mit Silicagel: Die Silicagelsäule wurde wie oben hergestellt und mit Essigsäure vorbehandelt. Es kam zur Adsorption ein Gemisch von Arginin, Lysin und Histidin (4.126 mg N) mit Alanin und Isoleucin (1.398 mg N). Es fanden sich im ersten Eluat (50 ccm  $\text{H}_2\text{O}$ ) 1.408 mg N (100.1% der neutralen Aminosäuren), im 2. Eluat (25 ccm  $\text{H}_2\text{O}$ ) 0.0 mg N. Die in der Säule verbliebenen basischen Aminosäuren wurden mit 100 ccm 0.5-n.HCl eluiert. Es wurde gefunden 3.940 mg N (98% der basischen Aminosäuren).

Entsprechende Versuche wurden mit Gemischen der basischen Aminosäuren mit Glutaminsäure, Serin und Cystin ausgeführt. Übereinstimmend ergab sich, daß mit 50 ccm Wasser die nicht basischen Aminosäuren quantitativ ausgewaschen werden. Es folgt dann ein mehr oder weniger großes „leeres“ Volumen, ehe die basischen Aminosäuren im Eluat erscheinen. Die Elution der basischen Aminosäuren gelingt vollständig mit 100 ccm 0.1-n.HCl. Die Salzsäure ist durch Eindampfen der Lösung leicht zu entfernen, so daß hierdurch eine störungsfreie weitere Trennung des Gemisches der basischen Aminosäuren möglich wird.

Tafel 2 zeigt, daß durch Anwesenheit von Kochsalz die Haftfestigkeit des Histidins am Silicagel stark vermindert wird.

<sup>14)</sup> Eine u. U. im Adsorbens vorhandene stickstoffhaltige Verunreinigung kann ohne Beeinträchtigung der Adsorptionsfähigkeit durch Erhitzen der Bleicherde in einer Porzellanschale auf 250° entfernt werden.

Tafel 2.

Einfluß der Salzkonzentration auf die Adsorption  
des Histidins an Silicagel.

Versuchsbedingungen: Normale Silicagelsäule.

Menge der Kationen			mit 50 ccm $\overline{\text{H}_2\text{O}}$ eluiert mg Histidin
NaCl in mg	Arginin mg	Histidin mg	
100	5.92	5.269	1.18
200	5.923	10.538	8.635

### 3) Abtrennung der sauren Aminosäuren durch anionotropes Aluminiumoxyd.

Die wichtigsten Versuche sind in Tafel 3 zusammengefaßt.

Tafel 3.

Adsorptionsversuche mit anionotropem Aluminiumoxyd.

Versuchsbedingungen: Säule aus 10 g Aluminiumoxyd. Nach dem Spülen mit  $\text{H}_2\text{O}$  bzw.  $\text{H}_2\text{S}$ -gesättigtem Wasser wurden die Dicarbonsäuren mit 25 ccm 0.5-n.KOH eluiert.

Vers. Nr.	Aminosäuren	Menge in mg N	$\text{H}_2\text{O}$ -Eluat (Glykokoll-N)		$\text{H}_2\text{S}$ -Eluat (Cystin-N) 50 ccm	KOH-Eluat Dicarbonat- säure-N
			1 25 ccm	2 25 ccm		
1	Asparaginsäure Glutaminsäure	3.110	0.0	0.0	0.0	3.098 (- 0.012)
2	Pyrrolidoncarbonsäure	1.974	0.0	0.0	0.008	1.952 (- 0.022)
3	Cystin	0.334	0.0	0.0	0.334	—
4	Cystin	0.334	0.896		0.248 (- 0.086)	—
	Glykokoll	0.816	( + 0.080)			
5	Cystin	0.420	1.410 ( + 0.048)		0.408 ( - 0.012)	1.632 ( + 0.060)
	Glykokoll	1.362				
	Asparaginsäure Glutaminsäure	1.572				

Vers. 1 zeigt, daß die Aminodicarbonsäuren weder mit Wasser noch mit  $\text{H}_2\text{S}$ -Lösung eluiert werden. Die durch trockenes Erhitzen aus *l*-Glutaminsäure hergestellte Pyrrolidoncarbonsäure (Schmp. 180—182°) unterscheidet sich in ihrem Adsorptionsverhalten nicht merklich von der Ausgangssubstanz (Vers. 2). Nach Wieland kann das Cystin gemein-



sam mit den Aminodicarbonsäuren adsorbiert und nach dem Auswaschen der übrigen Aminosäuren mit Wasser getrennt mit H<sub>2</sub>S-haltigem Wasser eluiert werden. In Übereinstimmung hiermit zeigt Versuch 3, daß reines Cystin mit 50 ccm Wasser nicht ausgewaschen wird, wohl aber mit Schwefelwasserstoffwasser. Enthält die Lösung außer Cystin aber noch andere Aminosäuren, wie z. B. Glykokoll (Vers. 4), so wird hierdurch die Löslichkeit des Cystins erhöht, so daß es bereits mit 50 ccm Wasser eluiert wird und hierdurch der Glykokollwert zu hoch ausfällt. Wiederholte Versuche zur Trennung des Cystins und Glykokolls von Asparaginsäure und Glutaminsäure ergaben dementsprechend zu hohe Glykokoll- und zu niedrige Cystinwerte. Wenn bei dem angeführten Beispiel (Vers. 5) der Fehler auch nur gering ist, so könnte er unter Umständen beträchtlich höher sein, wenn noch andere Aminosäuren anwesend sind, welche die Löslichkeit des Cystins weiter erhöhen.

Im Gegensatz zu Vers. 2 (Tafel 3) zeigte sich, daß das Cystin nur zu 50% mit H<sub>2</sub>S eluierbar ist, wenn es vorher ohne besondere Vorsichtsmaßregeln der Kohleadsorption unterworfen wurde. Hierfür ist wohl die Oxydation des Cystins zu der entsprechenden Sulfonsäure verantwortlich zu machen. Bereits nach dem Eindampfen einer Cystinlösung zur Trockne auf dem Wasserbade sind 10% des Cystins unter den Analysenbedingungen nicht mehr aus dem Aluminiumoxyd eluierbar. Wird dagegen die Adsorption an Aktivkohle in H<sub>2</sub>S-haltiger Essigsäure vorgenommen, das Eluat auf dem Wasserbad bei 90° eingengt und die konz. Lösung im Exsiccator zur Trockne eingedampft, so wird, wie das folgende Beispiel zeigt, die Oxydation des Cystins vollkommen vermieden.

Versuchsbeispiel: Ein Gemisch von Glutaminsäure (0.352 mg N) und Cystin (1.864 mg N) wurde, wie unter A) angegeben, an Kohle adsorbiert, mit 50 ccm H<sub>2</sub>S-haltiger Essigsäure eluiert und unter Vermeidung der Luftoxydation die Essigsäure entfernt. Bei der Trennung der beiden Aminosäuren in der Aluminiumoxydsäule ergaben sich dann folgende Analysenwerte:

mg N in aufeinanderfolgenden Eluaten mit H <sub>2</sub> S-haltigem Wasser			KOH-Eluat mg N
1. Eluat 100 ccm	2. Eluat 50 ccm	3. Eluat 25 ccm	
1.760	0.082	0.00	0.358
1.842 mg N = 99% Cystin-N			= 100% Glutaminsäure-N

4) Abtrennung von Glykokoll, Serin, Cystein und Threonin durch Adsorption an Aluminiumoxyd in Formaldehydlösung.

Die in Tafel 4 angeführten Versuchsbeispiele zeigen, daß Threonin<sup>15)</sup> und Cystin, genau wie das früher untersuchte Glykokoll und Serin\*), auch mit nahezu 100 ccm Formaldehydlösung nicht ausgewaschen werden.

<sup>15)</sup> Für die Überlassung von Threonin danken wir Hrn. Dr. Walch, Heidelberg.

Tafel 4.

Adsorption des Threonins und Cystins  
in 10-proz. Formaldehydlösung an Aluminiumoxyd.

Versuchsbedingungen: Die Säule aus 10 g Aluminiumoxyd (anionotrop) wurde vor der Adsorption mit 50 ccm 10-proz. Formaldehydlösung von  $p_H$  7 gespült. Die Cystinlösung wurde vor der Adsorption mit  $H_2S$  bei  $60^\circ$  reduziert. Als Elutionsmittel diente neutrale 10-proz. Formaldehydlösung, die bei dem Versuch mit Cystin mit  $H_2S$  gesättigt war.

Aminosäuren	Menge in mg N	mg N in aufeinanderfolgenden Eluat				KOH-Eluat
		1 25 ccm	2 25 ccm	3 25 ccm	4 25 ccm	
<i>d,l</i> -Threonin	0.584	0.006 <sup>16)</sup>	0.00	0.00	0.020	0.564
Cystin	0.488	0.006 <sup>16)</sup>		0.036		—

## 76. Gerhard Schramm und Josef Primosigh: Über einige Versuche, die Adsorption der Aminosäuren sichtbar zu machen.

[Aus d. Arbeitsstätte für Virusforschung d. Kaiser-Wilhelm-Institute für Biochemie u. Biologie, Berlin-Dahlem.]

(Eingegangen am 16. Mai 1944.)

Die in der vorangehenden Arbeit<sup>1)</sup> beschriebenen chromatographischen Trennungen der Aminosäuren arbeiten im allgemeinen sicher genug, so daß auf eine optische Kontrolle der Adsorption verzichtet werden kann. Bei anderen analytischen Aufgaben und zur Prüfung der benutzten Adsorbentien mag es aber hin und wieder erwünscht sein, den Adsorptionsvorgang sichtbar zu machen.

Der einfachste Weg hierzu ist die Bildung einer farbigen Verbindung der Aminosäuren in der Säule. So kann man die Aminosäuren dadurch sichtbar machen, daß man durch die Säule eine verdünnte Kupferacetatlösung fließen läßt. Hierbei bildet sich eine blaue Komplexverbindung der Aminosäuren, während in dem aminosäurefreien Teil der Säule kein Kupfer adsorbiert wird. Es läßt sich auf diese Weise zeigen, daß die sauren Aminosäuren sehr fest an das anionotrope Aluminiumoxyd adsorbiert werden und nach dem Auswaschen der übrigen Aminosäuren in einer schmalen blauen Zone am oberen Rand der Säule enthalten sind<sup>2)</sup>. Durch die Komplexbildung wird jedoch die Adsorption der Aminosäuren gelockert, so daß hierdurch nicht das wahre Verhalten der freien Aminosäuren wiedergegeben wird. Dies zeigt sich besonders deutlich, wenn man versucht, die an Silicagel adsorbierten basischen Aminosäuren, insbesondere das Histidin, nach diesem Verfahren sichtbar zu machen. Man erhält hierbei eine sehr breite, verwaschene, blaue Zone,

<sup>16)</sup> Der Wert ist nicht mit Sicherheit von Null verschieden.

<sup>1)</sup> G. Schramm u. J. Primosigh, B. 77, 417 [1944].

<sup>2)</sup> In ähnlicher Weise lassen sich die adsorbierten Aminosäuren durch die Rotfärbung mit Chinon nachweisen.