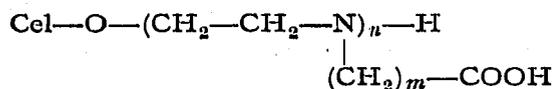


CHROM. 3342

## Trennung von Aminosäuren und Dipeptiden durch Ionenaustauschchromatographie an einem amphoteren Celluloseionenaustauscher

In einer früheren Publikation<sup>1</sup> haben wir über die Synthese amphoterer Celluloseionenaustauscher durch Pfropfpolymerisation von Äthyleniminoessigsäureäthylester sowie  $\beta$ -Äthyleniminopropionsäuremethylester<sup>2</sup> auf vernetzter Cellulose<sup>3</sup> und nachfolgender Verseifung der Estergruppen berichtet. Das komplexchemische Verhalten dieser amphoteren Cellulosederivate gegenüber Schwermetallionen ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ) gleicht dem entsprechender Ionenaustauscherharze, die von uns durch Polymerisation von Äthyleniminoalkylcarbonsäureestern erhalten wurden<sup>4-6</sup>. Die Cellulose-Pfropfpolymerisate stellen mit grosser Wahrscheinlichkeit Verbindungen folgenden Strukturtyps dar:



wobei:

$$m = 1 \text{ bzw. } 2.$$

Amphotere Celluloseionenaustauscher wurden bisher noch nicht für säulenchromatographische Trennungen verwendet. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Anwendbarkeit amphoterer Cellulosederivate für die Trennung organischer Ampholyte, speziell von Aminosäuren und Dipeptiden zu prüfen, um aus den Ergebnissen möglicherweise Rückschlüsse auf die Verwendbarkeit der Austauscher für andere Trennprobleme ziehen zu können.

TABELLE I

POLYÄTHYLENIMINOESSIGSÄURECELLULOSE (CELLULOSE MIT 1,3-DICHLORPROPANOL-(2) VOR-  
VERNETZT<sup>3</sup>)

Kapazität*	2.3 mÄquiv./g (Zwitterionenform)
Wassergehalt der lufttrockenen Form	8.9%
Schüttvolumen in Wasser	12.4 ml/g (Zwitterionenform)
Atmungsdifferenz zwischen pH 4 und pH 8	ca. 10% (McIlvaine-Puffer, Ionenstärke 0.5)..

\* Berechnet aus dem analytisch bestimmten Stickstoffgehalt.

### Experimentelles

Die Untersuchungen wurden mit einem Polyäthyleniminoessigsäurecellulosederivat durchgeführt, dessen Eigenschaften aus Tabelle I hervorgehen. Als Testsubstanzen dienten Gemische ausgewählter Aminosäuren (Fluka, puriss.) und Dipeptide (Mann Research Lab., New York, N.Y., chromatograph. rein).

Der amphotere Celluloseionenaustauscher wurde bei allen in dieser Arbeit beschriebenen Versuchen in Form seines Alkalisalzes eingesetzt. Zur Elution wurden Phosphat- oder Citratpuffer benutzt. Die quantitative Bestimmung der Aminosäuren und Dipeptide im Eluat erfolgte mit Ninhydrin nach der Methode von MOORE

TABELLE II

## SÄULENCHROMATOGRAPHISCHE TRENNUNG VON AMINOSÄURE- UND DIPEPTIDGEMISCHEN

Versuch I, II, IV durch pH-Gradientenelution; Versuch III sowie V bis IX durch Konzentrationsgradientenelution.

Versuch-Nr.	Verbindung	ml Eluat bis zum Peak*	Elutionsbedingungen
I	Glu, Asp	39	<i>M</i> /15 Phosphatpuffer, pH 4.9 bis 8.3; 40°
	Gly, Ala, Phe	50	
	Try	59	
	Lys	66	
	Arg	69	
II	Asp	36	<i>M</i> /30 Phosphatpuffer pH 4.9 bis 8.0; 40°
	Gly' His	51	
	Try	60	
	Lys	94	
	Arg	102	
III	Gly	53	Phosphatpuffer pH 6 <i>M</i> /30 bis <i>M</i> /15; 40°
	Try	66	
	His	74	
	Lys	94	
	Tyramin	121	
IV	Asp, Glu,	44	<i>M</i> /10 Citratpuffer pH 3.95 bis 6.49; 40° (Trennungen Try, Lys, Arg nur unvollständig, vgl. Text)
	Gly, Phe, Alu	51	
	Try	59	
	Lys	62	
	Arg	64	
V	Val-val	39	Phosphatpuffer pH 8 <i>M</i> /30 bis <i>M</i> /15; 40°
	Val	49	
VI	Gly-val	42	
	Gly, Val	50	
VII	Leu-try	46	(Die Trennversuche V bis IX wurden unter identischen Bedingungen durchgeführt)
	Gly-try	50	
	Try	63	
VIII	Gly-Phe	43	
	Phe-gly	46	
	Phe	53	
IX	Leu-tyr	43	
	Gly-tyr	50	
	Tyr	59	

\* Angegeben sind ml Eluat bis zur Peakspitze.

UND STEIN<sup>7,8</sup>, die zur Anpassung an die experimentellen Gegebenheiten etwas modifiziert wurde.

*Apparatur.* Die Chromatographie-Säulen hatten eine Länge von 750 mm und einen Innendurchmesser von 10 mm. Die Elutionsgeschwindigkeit wurde mit einer peristaltischen Pumpe auf 3.5 bis 3.7 ml/h eingestellt. Das Eluat wurde mittels eines Fraktionssammlers unter Benutzung eines Tropfenzählers (LKB-Produkte, Stockholm) aufgefangen.

### *Ergebnisse und Diskussion*

In Tabelle II sind die Trennergebnisse angegeben, die unter verschiedenen pH- und Konzentrationsbedingungen erzielt wurden.

Die Auswertung der in Tab. II zusammengestellten Trennergebnisse macht folgendes deutlich: Eine Gruppentrennung in saure, neutrale und basische Aminosäuren gelang in jedem Fall. Saure und neutrale Aminosäuren mit sehr ähnlichen isoelektrischen Punkten konnten untereinander nicht aufgetrennt werden (Versuch I, II und IV). Die Aminosäuren wurden in der Reihenfolge eluiert, die durch die Lage der isoelektrischen Punkte gegeben war. Die unter den Versuchsbedingungen überwiegend als Anion vorliegenden Asparagin- sowie Glutaminsäure wurden von dem überwiegend als Anion vorliegenden Austauscher praktisch nicht festgehalten. Die neutralen Aminosäuren lagen im untersuchten pH-Bereich wohl überwiegend als Zwitterion vor, bei pH 8 teilweise als Anion, unterhalb pH 6 teilweise als Kation. Sie wurden demzufolge stärker festgehalten als die sauren Aminosäuren. Eine Sonderstellung nahm das nach der Lage seines isoelektrischen Punktes (5.89) den neutralen Aminosäuren zuzurechnende Tryptophan ein (zum Vergleich: Glycin 5.97, Alanin 6.00). Es konnte stets von allen anderen Aminosäuren abgetrennt werden. Hierfür könnte eine nichtionische Adsorption an dem amphoteren Celluloseaustauscher verantwortlich gemacht werden. Nichtionische Adsorptionseffekte sind für die Trennungen von Aminosäuren mit fast identischen isoelektrischen Punkten bereits diskutiert worden<sup>9-11</sup>. Die als bivalentes Kation vorliegenden basischen Aminosäuren Lysin und Arginin wurden im pH-Bereich 5 bis 8 vom Austauscher relativ stark festgehalten und auch voneinander getrennt. Auch liessen sie sich von der Base Tyramin abtrennen.

Wenn die Elution im schwach sauren Bereich vorgenommen wurde (Versuch IV), wurde die Auftrennung der Aminosäuren sehr viel schlechter. Es kann angenommen werden, dass der amphotere Austauscher zwischen pH 4 bis 6 wenigstens teilweise als Zwitterion vorliegt. Die als bivalentes Kation vorliegenden basischen Aminosäuren werden nicht mehr so stark fixiert und die sauren Aminosäuren müssen relativ stärker gebunden werden. Durch diesen Effekt rücken alle Banden zusammen und auch eine vollständige Gruppentrennung ist nicht mehr möglich.

Die Trennversuche von Dipeptiden sowie Dipeptiden und Aminosäuren (Versuch V bis IX) an dem amphoteren Celluloseaustauscher ergaben ein von den oben beschriebenen Verhältnissen abweichendes Bild. So konnten alle untersuchten Dipeptide von ihren einzelnen Aminosäurekomponenten vollständig abgetrennt werden, obwohl die Unterschiede in den isoelektrischen Punkten nur äusserst geringfügig waren. (Beispiel: Glycyltyrosin 5.69; Tyrosin 5.66 oder Glycylvalin 5.71; Valin 5.96.) Auch bei den untersuchten Dipeptidgemischen (Versuche VII bis IX) waren gute Trennerfolge zu beobachten. So konnte auch Glycylphenylalanin von Phenylalanyl-glycin getrennt werden. Er scheint, dass sich bei der Trennung von Dipeptiden an dem

amphoteren Celluloseaustauscher sowohl ein Einfluss der pK-Werte der ionischen Gruppen als auch ein Einfluss der Molekülgröße und des nichtionischen Teils der Moleküle bemerkbar machten.

*Institut für Organische Chemie, Freie Universität Berlin,  
Berlin-Dahlem (Deutschland)*

G. MANECKE  
P. GERGS

- 1 G. MANECKE UND P. GERGS, *Naturwiss.*, 50 (1963) 329.
- 2 H. BESTIAN, *Liebigs Ann. Chem.*, 566 (1950) 210.
- 3 J. D. GUTHRIE UND A. L. BULLOCK, *Ind. Eng. Chem.*, 52 (1960) 935.
- 4 G. MANECKE UND H. HELLER, *Makromol. Chem.*, 55 (1962) 51.
- 5 G. MANECKE UND A. GROHMANN, *Makromol. Chem.*, 82 (1965) 146.
- 6 G. MANECKE, P. GERGS UND H. P. AURICH, unveröffentlicht.
- 7 S. MOORE UND W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.*, 176 (1948) 367.
- 8 S. MOORE UND W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.*, 211 (1954) 907.
- 9 S. M. PARTRIDGE UND R. C. BRIMLEY, *Biochem. J.*, 49 (1951) 153.
- 10 C. S. CLEAVER UND H. G. CASSIDY, *J. Am. Chem. Soc.*, 72 (1950) 1147.
- 11 C. S. KNIGHT, *J. Chromatog.*, 8 (1962) 205.

Eingegangen den 9. Oktober 1967; modifiziert den 24. November 1967

*J. Chromatog.*, 34 (1968) 125-128

CHROM. 3334

### **Kontinuierliches Elutionssystem für die Ionenaustausch-Chromatographie unter Verwendung linearer Gradienten**

Die von COHN<sup>1,2</sup> für die Auftrennung der Nucleotide eingeführte Ionenaustausch-Chromatographie wurde von HURLBERT *et al.*<sup>3</sup> zu einem System weiterentwickelt, in dem für diese Auftrennung die Konzentration des Elutionsmittels kontinuierlich ansteigt. Nachteilig sind dabei aber der oftmalige Wechsel der Elutionsmittelvorratsflaschen, die schlechte Konstanz des Flüssigkeitsvolumens in der Mischflasche und die nach kurzer Zeit eintretende starke Verflachung des Gradienten. Dem letzten Nachteil begegneten GILBERT UND YEMM<sup>4</sup> später durch schrittweises Reduzieren des Mischungsvolumens.

Der einfachste Gradient wird durch Verbindung zweier gleicher zylindrischer Behälter an der Basis erreicht. Durch das Hintereinanderschalten solcher Systeme kann der Gradient steiler gelegt bzw. ein zweites Elutionsmittel eingeführt werden.

Für die Auftrennung der freien Nucleotide und Zuckerphosphate an Dowex 1 × 10 (Formiatform) wurde das in Fig. 1 schematisch dargestellte Mischflaschensystem verwendet, wobei die Verbindungen aus Silikonschläuchen und die Unterbrechungen als Schlauchquetschhähne ausgeführt waren. Für die Inbetriebnahme wurden bei den geschlossenen Schlauchquetschhähnen a, b, c und den offenen d, f, g die einzelnen Flaschen mit folgenden Elutionsmitteln gefüllt.

- A<sub>I</sub> = H<sub>2</sub>O (400 ml)
- B<sub>I</sub> = 0.3 N HCOOH (400 ml)
- A<sub>II</sub> = 0.3 N HCOOH (500 ml)
- B<sub>II</sub> = 4.0 N HCOOH (500 ml)
- A<sub>III</sub> = 4.0 N HCOOH (500 ml)
- B<sub>III</sub> = 1.0 M HCOONH<sub>4</sub> in 4.0 N HCOOH (500 ml).

In den Glaskapillaren S<sub>I</sub>, S<sub>II</sub> und S<sub>III</sub> steigt dabei das Flüssigkeitsniveau