

## Neuere Methoden der präparativen organischen Chemie II

### 1. Die chromatographischen Methoden zur Trennung von Aminosäuren

Von Doz. Dr. THEODOR WIELAND, Heidelberg,

Kaiser Wilhelm-Institut für med. Forschung, Institut für Chemie

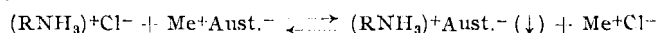
Seit erkannt wurde, daß alle Eiweißstoffe zum weitaus größten Teil aus Aminosäuren aufgebaut sind, hat es nicht an Versuchen gefehlt, die durch Hydrolyse verschiedener Proteine erhaltenen Aminosäure-Mischungen möglichst quantitativ in die einzelnen Komponenten zu zerlegen oder wenigstens durch spezifische Farb- oder Fällungsreaktionen den Gehalt der Hydrolysate an bestimmten Aminosäuren quantitativ zu bestimmen. E. Fischer hat seine Ester-Methode (1901), bei der das Gemisch der Aminosäureäthylester einer fraktionierten Destillation im Vakuum unterworfen wird, als qualitative bezeichnet. Spätere Bearbeiter haben sie zwar für manche Fälle quantitativ auszugestalten versucht<sup>1)</sup>, doch verursacht schon die unvermeidliche Zersetzung der Ester bei der Destillation einen Verlust von 10—20% sogar bei Anwendung künstlicher Aminosäure-Gemische<sup>2)</sup>.

Mit geringeren Verlusten arbeitet Dakins Butylalkohol-Methode, bei der die Aminosäuren durch kontinuierliche Butanol-Extraktion gemäß ihren Verteilungskoeffizienten zwischen wasser-gesättigtem Butanol und butanol-gesättigtem Wasser in mehrere Gruppen getrennt werden. Sie benötigt jedoch ziemlich große Substanzmengen, ein Erfordernis, dem die moderne Biochemie nicht immer nachkommen kann. Dasselbe gilt für die Methode der fraktionierten Auflösung der kristallisierten Kupfer-Salze der Aminosäuren in Wasser und Methanol, die von Schryver stammt und von Brazier ausgearbeitet wurde. All diese Methoden sind ausführlich in den einschlägigen Handbüchern besprochen<sup>3)</sup>. Sie liefern jedoch nicht so genaue Werte, daß man mit Sicherheit für jede Aminosäure die Zahl der Moleküle in 1 Mol Protein ausrechnen könnte; sie sind zudem sehr zeitraubend.

Die guten Trennungserfolge, die man in der Biochemie mit Adsorptionsmitteln erzielt hat, und die bestechende Leistungsfähigkeit der Tswetschen chromatographischen Analyse haben auch die Aminosäure-Chemiker zu Versuchen veranlaßt. Bei säulenförmiger Anordnung des Materials, das die Aminosäuren oder deren Derivate adsorbiert, können kleine Unterschiede in der Adsorbierbarkeit stark zur Geltung kommen. G. Hesse<sup>4)</sup> hat sehr treffend die Ausbildung eines Chromatogramms mit einem Hindernisrennen verglichen. Dabei kommen die Molekülararten, die die Hindernisse der Adsorptionssäule am schnellsten nehmen, am raschesten vorwärts. Der Vorsprung wirkt sich aber erst dann als Trennung aus, wenn eine genügend große Anzahl von Hindernissen nacheinander überwunden werden muß. Hindernisse sind alle die Stellen, an denen die Moleküle der Analysenlösung mit dem Säulenmaterial reagieren, und zwar in einer solchen Weise, daß sie nicht irreversibel hängen bleiben. Zur Einstellung eines Gleichgewichts führt theoretisch jede Adsorption eines Stoffes aus einer Lösung oder aus der Gasphase, aber auch die Verteilung eines Stoffes zwischen zwei nicht miteinander mischbaren Flüssigkeiten sowie die Fällung eines Moleküls oder Ions. Hierbei ist allerdings das Gleichgewicht oft ganz nach einer Seite verschoben. Grundsätzlich sollte die Ausnützung der unterschiedlichen Lage der Gleichgewichte von allen genügend rasch, unter Umständen katalytisch oder fermentativ beschleunigt verlaufenden reversiblen Reaktionen eine Trennung auf „chromatographischer“ Grundlage ermöglichen.

#### A. Chromatographische Aminosäure-Trennungen mit Austauschern.

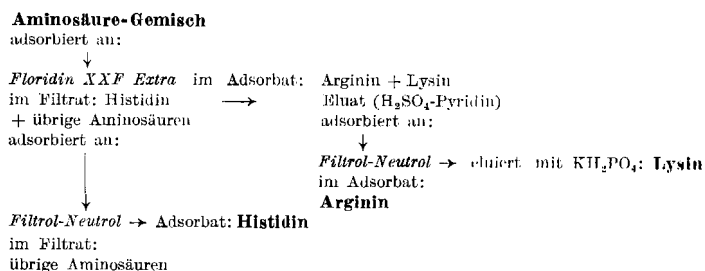
Die Reaktion eines Kations ( $\text{RNH}_3^+$ ) oder Anions ( $\text{RO}^-$ ) mit dem entgegengesetzt geladenen Ion eines Austauschers (Aust.- bzw. Aust.+) ist im Grunde eine Fällungsreaktion; es bildet sich unter doppelter Umsetzung ein schwer lösliches ( $\downarrow$ ) Salz:



Dies hat zur Folge, daß in der Austauschersäule die Zonen nur äußerst langsam wandern, besonders da es bald zum Verschwinden des leicht löslichen Reaktionsproduktes ( $\text{Me}^+\text{Cl}^-$ ) auf der rechten Seite kommt, so daß das Verfahren nicht zur Trennung physikalisch und chemisch sehr ähnlicher Verbindungen führt.

**I. Permutit.** Der erstmals für Aminosäuren angewendete Austauscher Permutit ist ein künstlicher Zeolith der Zusammensetzung  $2\text{SiO}_2 \cdot \text{Al}_2\text{O}_3 \cdot \text{Na}_2\text{O} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , der unter Abgabe von Natrium-Ionen mit den Kationen von Basen reagiert. Nachdem schon 1917 O. Folin<sup>5)</sup> gezeigt hatte, daß man  $\text{NH}_4$ -Ionen an Permutit adsorbieren kann, studierte J. C. Whitehorn<sup>6)</sup> das Verhalten vieler Basensalze, allerdings nicht mit quantitativen Testreaktionen, beim Durchlaufen durch eine Permutitsäule. Er fand, daß alle Kationen, deren Basen eine basische Dissoziationskonstante von mehr als  $5 \cdot 10^{-9}$  aufweisen, unter Austausch adsorbiert werden. Zu diesen gehören auch die basischen Aminosäuren Lysin mit  $k_{\text{bas}} > 1 \cdot 10^{-7}$ , Arginin  $k_{\text{bas}} > 1 \cdot 10^{-7}$  und eben noch Histidin mit  $k_{\text{bas}} 5,7 \cdot 10^{-9}$ .

**II. Bleicherden.** Nach teilweise erfolgreichen Versuchen, die basischen Aminosäuren durch Schütteln mit Bleicherden selektiv zu adsorbieren (M. Mashino u. N. Shikazono<sup>7)</sup> sowie D. Ackermann und H. Fuchs<sup>8)</sup>), wandte F. Turba die säulenförmige Anordnung des Adsorptionsmittels auf dieses Problem an<sup>9)</sup>. Er zeigte, daß die Diaminosäuren Arginin, Lysin und Histidin beim Durchlaufen der neutralen wäßrigen Lösung durch eine Schicht der Bleicherde Filtrol-Neutrol quantitativ adsorbiert werden, während alle anderen Aminosäuren ins Filtrat gehen. Die unvorbehandelte Naturerde Floridin XXF Extra hält dagegen nur Arginin und Lysin fest; Histidin läuft durch dieses Material durch. Eine quantitative Abtrennung des Lysins vom Arginin ist durch Elution des Adsorbats an Filtrol-Neutrol mit prim. Kaliumphosphat-Lösung möglich, wobei nur Lysin eluiert wird. Die Elution aller adsorbierten Aminosäuren gelingt mit einem Pyridin-Schwefelsäure-Gemisch. Auf diese Befunde konnte eine quantitative Trennung der drei basischen Aminosäuren untereinander und von den anderen aufgebaut werden:



<sup>1)</sup> S. in H. H. Mitchell u. T. S. Hamilton: The Biochemistry of Amino Acids, New York (1929); R. A. Gortner: Outlines of Biochemistry, New York (1929).

<sup>2)</sup> Vgl. T. B. Osborne u. D. B. Jones, Amer. J. Physiol. **26**, 305 [1910].

<sup>3)</sup> S. z. B. A. Winterstein in G. Kleins Handbuch der Pflanzenanalyse, Wien 1933, Bd. III, S. 1; F. Abderhalden: Handbuch der biolog. Arbeitsmethoden, Abt. I, Teil 7, Berlin Wien 1923.

<sup>4)</sup> G. Hesse u. B. Tschachotin, Naturwiss. **30**, 387 [1942].

<sup>5)</sup> O. Folin u. R. D. Bell, J. biol. Chemistry **29**, 329 [1917].

<sup>6)</sup> Ebenda **56**, 751 [1923]; vgl. dagegen die negativen Befunde von R. Kapeller-Adler u. E. Stern, Biochem. Z. **235**, 390 [1931].

<sup>7)</sup> J. Soc. chim. Ind. Japan, Suppl. **39**, 54B—55B, 58B, 136B [1936].

<sup>8)</sup> Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **240**, 198 [1936].

<sup>9)</sup> Ber. dtsh. chem. Ges. **74**, 1829 [1941].

**III. Organische Austauscher.** Die in den letzten Jahren von der Industrie auf Kunstharzbasis entwickelten organischen Austauscher (Wofatite)<sup>10)</sup> sind von K. Freudenberg u. Mitarb. mit Erfolg zur Trennung von Aminosäuren herangezogen worden<sup>11)</sup>. Es wurde gefunden, daß die durch Kondensation von stark sauren (mit aromatischen und aliphatischen SO<sub>2</sub>H-Gruppen substituierten) Phenolen mit Formaldehyd erhältlichen sauren Wofatite (K, KS und A) alle Aminosäuren aus wäßriger Lösung festhalten.

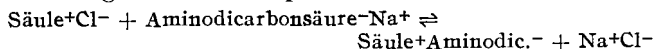
Aus den sauren Wofatiten lassen sich die neutralen und basischen Aminosäuren mit Pyridin-Wasser eluieren, während durch das schwache Pyridin die Salze der basischen Aminosäuren nicht zerlegt und daher nicht eluiert werden. Ihre Elution gelingt durch Anwendung von Säuren, wobei sie als Salze in Lösung gehen. Nach eigenen Versuchen adsorbiert der schwächer saure Wofatit C (—CO<sub>2</sub>H-Gruppen-haltig) von allen Aminosäuren nur die basischen, deren Abtrennung mit diesem Mittel leicht gelingt. Mit verdünnten Mineralsäuren werden sie als Chlorhydrate aus der Säule eluiert. Die durch Kondensation von Aminen mit Formaldehyd gewonnenen basischen Wofatite (M) halten hingegen nur saure Aminosäuren fest. Deren Elution gelingt durch Anwendung basischer Mittel (K. Freudenberg und Mitarbeiter).

**IV. Aluminiumoxyd.** Basische Säule. Das zur chromatographischen Adsorptionsanalyse in den Handel gebrachte Aluminiumoxyd reagiert in wäßriger Aufschwemmung ziemlich stark basisch. Es enthält Natrium-Ionen, die als Aluminat, besonders aber als Carbonat und Bicarbonat gebunden vorliegen<sup>12)</sup>. In einer Säule aus diesem Material werden, wie Schwab u. Mitarb. fanden<sup>13)</sup>, verschiedene Metallionen in charakteristischer Reihenfolge festgehalten, wobei die Natrium-Ionen der Säule durch die Metallionen mehr oder weniger leicht verdrängt werden und diese, wahrscheinlich als Carbonate, auf der Säule ausfallen. Auch die basischen Aminosäuren Arginin und Lysin werden aus neutraler Lösung an diesem Material festgehalten und können mit Säure leicht eluiert werden. Histidin, dessen isoelektrischer Punkt weiter im Sauren liegt, läuft durch die Säule durch<sup>14)</sup>.

Saure Säule. Wie G.-M. Schwab u. Dattler zeigten, wird beim Behandeln des basischen Aluminiumoxyds mit verdünnten Mineralsäuren das Na<sup>+</sup> durch H<sup>+</sup> verdrängt und gleichzeitig das Aluminat-Ion zu einem Aluminium-Kation umgeladen. Dieses liegt dann in Bindung mit dem Anion der zur Vorbehandlung benutzten Säure vor. An einer solchen Säule werden die anorganischen Anionen unter Verdrängung des Anions der Säule festgehalten<sup>15)</sup>. Wir zeigten später, daß auch organische Säure-Ionen unter Austausch an mit HCl vorbehandeltem Aluminiumoxyd adsorbiert werden<sup>16)</sup>. Unter den Aminosäuren werden nur die sauren (Glutaminsäure, Asparaginsäure, Oxyglutaminsäure) aus neutraler Lösung festgehalten, während alle anderen die Säule passieren, außer Cystin, das infolge seiner Schwerlöslichkeit beim Säulen-p<sub>H</sub> (4–5) ausfällt. Seine selektive Elution gelingt mit H<sub>2</sub>S-gesättigtem Wasser<sup>16)</sup>. Die Auftrennung von Aminosäure-Gemischen in basische, saure und neutrale Aminosäuren wurde an den Hydrolysaten verschiedener Proteine durchprobiert, wobei sich Werte ergaben, die mit denen der Literatur in guter Übereinstimmung stehen<sup>17)</sup>.

Die sauren Aminosäuren können eluiert werden: durch Laugen, durch Ionen, welche stärkere Adsorptionsneigung zeigen (z. B. Phosphat), oder durch die Anionen der sauren Säule in höherer Konzentration.

Im letzten Fall beruht die eluierende Wirkung auf der Umkehrung der zur Adsorption führenden Reaktion:



Da die Gleichgewichte für die verschiedenen Aminodicarbonsäuren bei verschiedenen Werten zu liegen scheinen, besteht hierin eine Möglichkeit der fraktionierten Elution.

Ganz kurze Zeit später haben F. Turba u. M. Richter über die Möglichkeit berichtet, die Aminodicarbonsäuren an eine mit Essigsäure/Acetat-Puffer von p<sub>H</sub> 3,3 vorbehandelte Alu-

miniumoxyd-Säule aus saurer Lösung zu adsorbieren<sup>18)</sup>. Sie konnten ferner bei 50° mit dem zur Vorbehandlung des Aluminiumoxyds verwendeten Puffer die Glutaminsäure aus der Säule quantitativ lösen, während Asparaginsäure haften blieb. Wir konnten eine ähnliche Trennung der beiden Aminodicarbonsäuren aus der HCl-behandelten Säule mit 1/2 Essigsäure bei Zimmertemperatur erreichen<sup>19)</sup>.

In 80–90%igem Alkohol lassen sich bekanntlich die neutralen Aminosäuren mit Alkali wie Säuren gegen Phenol- oder Thymolphthalein titrieren. Demgemäß werden auch sie in diesem Lösungsmittel als Natrium-Salze von der sauren Aluminiumoxyd-Säule festgehalten, wodurch ihre Abtrennung von Neutralkörpern und manchen Basen gelingt<sup>17)</sup>. Die andere Möglichkeit, die neutralen Aminosäuren zu wahren Säuren zu machen und sie so mit Alkali zu titrieren, nämlich die Reaktion mit Formaldehyd, haben in jüngster Zeit G. Schramm u. J. Primosigh in ihrer Anwendbarkeit auf die Adsorption an saures Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> untersucht<sup>20)</sup>. Sie fanden, daß von den in 10%iger Formalin-Lösung gegen Phenolphthalein neutralisierten Monoaminomonocarbonsäuren nur Glykokoll und Serin, deren p<sub>K</sub>-Wert in diesem Lösungsmittel am weitesten ins Saure verschoben ist, festgehalten werden. Sie werden durch verdünnte Lauge eluiert.

## B. Chromatographische Aminosäure-Trennungen auf Adsorptionsgrundlage.

Der Vorgang der Adsorption, d. h. die Erhöhung der Konzentration von Stoffen an der Grenze zweier Phasen, ist reversibel. Wird die Konzentration einer Lösung, mit der ein fester Körper im Adsorptionsgleichgewicht steht, z. B. durch Verdünnen erniedrigt, so wird von dem adsorbierten Stoff so viel an das Lösungsmittel abgegeben, bis das Gleichgewicht gemäß der Adsorptionsisotherme wieder erreicht ist. Die Umkehrbarkeit bringt es mit sich, daß beim Durchlaufen eines Stoffgemischs durch eine Adsorptionssäule die Stoffe als Zonen wandern, und zwar verschiedene Stoffe gemäß ihrer verschiedenen großen Adsorptionskoeffizienten verschieden schnell. Für die Aminosäuren eignet sich nach A. Tiselius<sup>21)</sup> als Adsorptionsmittel aktive Kohle (Kahlbaum). Er ließ das Gemisch neutraler Aminosäuren in wäßriger Lösung von unten durch eine Säule von Aktivkohle treten und beobachtete in der oben austretenden Lösung mit der Schlierenmethode, daß einzelne Komponenten nacheinander erschienen. Neuerdings wurde von den Schweden auch die interferometrische Beobachtung der Konzentrationsunterschiede im Durchlauf angewendet<sup>22)</sup>. Glykokoll oder Alanin traten unverzögert mit dem Flüssigkeitsmeniscus aus, wurden also nicht adsorbiert. Etwas später folgten Valin und Isoleucin, während die aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tryptophan aus einer Säule von 1 g Kohle erst austraten, als 62,5 bzw. 76,5 cm<sup>3</sup> Lösungsmittel bereits durchgeflossen waren. Diese „spezifischen Verzögerungsvolumina“, die ein Maß für die Adsorbierbarkeit sind, gibt für eine Reihe von neutralen Aminosäuren in 0,1 molarer Kochsalzlösung die Tabelle<sup>20)</sup> wieder.

wieder.		Tabelle.			
Glykokoll . . . .	0,0	Prolin . . . . .	2,5	Isoleucin . . . . .	9,2
Alanin . . . . .	0,3	Valin . . . . .	3,2	Phenylalanin . . .	62,5
Oxyprolin . . . .	1,9	Leucin . . . . .	7,7	Tryptophan . . . .	76,5

Schramm u. Primosigh nutzten den großen Unterschied im Adsorptionskoeffizienten zwischen den aliphatischen und aromatischen Monoaminomonocarbonsäuren in einer einfachen Methodik zur Trennung aus<sup>20)</sup>: In einem gewöhnlichen Chromatographieröhrchen wird z. B. das Gemisch aus Isoleucin, Leucin, Methionin, Valin, Serin, Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan (Gesamt-N im ganzen 3,546 mg) an 2 g granulierten gesiebte Aktivkohle (Schering), die mit 20%iger Essigsäure ausgekocht und zur Vermeidung von Oxydationen mit Kaliumcyanid vergiftet war, in 5%iger Essigsäure zur Adsorption gebracht. Dabei befanden sich in einem Durchlauf von 50,0 cm<sup>3</sup> die gesamten aliphatischen Aminosäuren. Die aromatischen hingegen wurden erst mit 5%igem Phenol in 20%iger Essigsäure eluiert.

Eine andere Möglichkeit der Trennung von neutralen Aminosäuren ist von Karrer vor kurzer Zeit angegeben worden<sup>23)</sup>. Dazu werden die Methylester von Glykokoll, Alanin,

<sup>10)</sup> G. Griebach, Beiheft zur Ztschr. des VDCb. Nr. 31; auszugsweise veröffentlicht diese Ztschr. 52, 215 [1939].

<sup>11)</sup> K. Freudenberg, H. Walch u. H. Molter, Naturwiss. 30, 87 [1942].

<sup>12)</sup> Vgl. G. Stewert u. H. Jungnickel, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 76, 210 [1943].

<sup>13)</sup> G.-M. Schwab u. K. Jockers, diese Ztschr. 50, 546 [1937]; G. M. Schwab in Physikal. Methoden d. analyt. Chemie, Leipzig 1939, Bd. 3, S. 60.

<sup>14)</sup> Th. Wieland, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 273, 24 [1942].

<sup>15)</sup> Diese Ztschr. 50, 691 [1937].

<sup>16)</sup> Th. Wieland, Ber. Dtsch. Chem. Ges. 75, 1001 [1942].

<sup>17)</sup> Th. Wieland, Naturwiss. 30, 374 [1942].

<sup>18)</sup> Ber. Dtsch. Chem. Ges. 75, 340 [1942].

<sup>19)</sup> Th. Wieland u. L. Wirth, ebenda, im Druck.

<sup>20)</sup> Ark. Kem., Mineral. Geol., Ser. B 14, Nr. 32; 15, Nr. 6 [1941].

<sup>21)</sup> A. Tiselius u. S. Claesson, ebenda 15, Nr. 18 [1942].

<sup>22)</sup> P. Karrer, R. Keller u. G. Szöngi, Helv. chim. Acta 26, 38 [1943].

Leucin und Valin mit N-p-Phenyl-azobenzoylchlorid in Pyridin in rotbraun gefärbte Acyl-Verbindungen übergeführt, die sich aus 5 Teilen Benzol + 95 Teilen Ligroin unter Zonenbildung an basisches Zinkcarbonat chromatographieren lassen. Die Reihenfolge der Zonen war: Glykokoll-, l-Alanin-, l-Leucin- und l-Valin-Derivat. Einer quantitativen Auswertung dieser Methode dürfte aber der uneinheitliche Verlauf der Acylierung im Wege stehen.

### C. Aminosäure-Trennung unter Ausnützung des Unterschiedes in den Verteilungsquotienten zwischen zwei flüssigen Phasen.

Wie eingangs ausgeführt, läßt sich eine chromatographische Trennung auch dann voraussehen, wenn der Vorgang des Ausschüttelns zwischen zwei wenig mischbaren Flüssigkeiten in vielen Stufen hintereinander durchgeführt wird. Eine geeignete Anordnung dafür haben Martin u. Synge in ihrem sogenannten „Flüssigen Chromatogramm“ angegeben<sup>24</sup>). Sie ließen Silicagel in methylorange-haltigem Wasser quellen und füllten diese gelbe stabile wäßrige Phase in Chloroform-Aufschwemmung in ein Chromatographierohr ein. Läßt man

#### Aminosäure-Gemisch

adsorbiert an:

Fluoridin XFF Extra  
oder bas.  $Al_2O_3$   
Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

Filtrat adsorbiert an:

alanins, die nächste aus dem des Leucins und Isoleucins, die dritte aus dem des Prolins, Valins und Methionins bestand, während Acetyl-glykokoll und Acetyl-alanin als fast unbewegliche Zonen oben sitzen blieben, deren Aufteilung später auch gelang<sup>25</sup>). Diese neue Chromatographiertechnik dürfte auch für andere Stoffgemische mit Vorteil anzuwenden sein.

Es erscheint möglich, daß sich die Dakinsche Butanol-Ausschüttelung nach dieser Technik chromatographisch auswerten läßt. Eigene Versuche, die fortgesetzt werden, haben nämlich ergeben, daß durch eine Säule von Aluminiumoxyd, das sich mit butanol-gesättigtem Wasser vollgesaugt hatte, in wassergesättigtem Butanol Alanin, Glykokoll und Prolin mindestens 10mal langsamer wandern als die Leucine, Valin und Methionin. Änderungen im  $pH$ , der Salzkonzentration und des Lösungsmittels und Zusatz von Formaldehyd (die Formaldehyd-Verbindungen der Aminosäuren sind in Butanol viel leichter löslich als die freien Säuren) lassen eine weitere Auftrennung der genannten Gruppen erwarten.

### Zusammenfassung.

Unter Benützung des heute schon vorliegenden Versuchsmaterials läßt sich ein Trennungsgang für die Analyse von Proteinhydrolysaten aufstellen:

im Adsorbat: Arginin Lysin	Eluat ( $H_2SO_4$ -Pyridin) adsorbiert an .... eluiert mit $KH_2PO_4$ ..... dann eluiert mit $H_2SO_4$ -Pyridin .....	Filtrat-Neutral Lysin Arginin
im Adsorbat: Histidin	Glutaminsäure Asparaginsäure Cystin Oxyglutaminsäure	eluiert mit $H_2S$ ges. $H_2O$ .... dann mit 0,5 n Essigsäure: .. dann mit verd. Lauge .....
im Adsorbat: Tryptophan Tyrosin Phenylalanin		
im Adsorbat: Glykokoll Serin		
im Adsorbat: Alanin		
im Filtrat nacheinander: 1. { Leucin Isoleucin	2. { Prolin Valin Methionin	

Dieser Trennungsgang würde den klassischen Methoden hinsichtlich der nötigen Materialmengen und des Zeitaufwandes und wohl auch an Genauigkeit überlegen sein. Eingeg. 28. Juni 1943. [A. 21.]

<sup>24</sup>) A. J. P. Martin u. R. L. M. Synge, Biochem. J. **35**, 1358 [1941].

<sup>25</sup>) A. H. Gordon, A. J. P. Martin u. R. L. M. Synge, Biochem. J. **36**, 1 [1942].

## Analytisch-technische Untersuchungen

### Zur photometrischen und colorimetrischen Kobalt-Bestimmung

#### Co-Bestimmung als Kobaltrhodan-Komplex in aceton-haltiger Lösung

Von BENEDIKT MADER, Berlin-Siemensstadt

Mitteilung aus dem Wernerwerk-Elektrochemie der Siemens & Halske A.-G.

Für die photometrische oder colorimetrische<sup>1)</sup> Bestimmung des Kobalts in Legierungen wurde in letzter Zeit neben anderen Farbreaktionen auch die Blaufärbung des Kobaltrhodan-Komplexes herangezogen<sup>2,3)</sup>. Diese schon seit langen bekannte Farbreaktion zeichnet sich durch besonders hohe Empfindlichkeit aus, so daß sie ebenso vorteilhaft für die Mikro- wie für die Makrobestimmung anwendbar ist.

Bei Gegenwart von Eisen arbeitet man nach dem Amylalkohol-Extraktionsverfahren. Das Eisen wird dabei mit Natriumpyrophosphat getarnt, so daß nach Zusatz von Ammoniumrhodanid der Kobaltrhodan-Komplex mit Amylalkohol extrahiert werden kann. Da sich die zugesetzte Natriumpyrophosphat-Menge nach der vorhandenen Eisen-Menge richtet, erfordert diese Methode einige Vertrautheit und Übung. Sie eignet sich vorzugsweise für die rasche Bestimmung niedriger Co-Gehalte in Ni-reicheren Legierungen.

Dagegen kann nach der Aceton-Methode mit genau festgelegten Reagentienmengen gearbeitet werden. Diese Bestimmung kann daher auch als ausgesprochene Betriebsmethode angewendet werden, die sich bei beschleunigten Arbeiten meist auch für betriebliche Verhältnisse genügend rasch durchführen läßt.

Die blaue Farbreaktion, die man nach Abtrennung der störenden Elemente, wie Fe, Cr, W usw., auf Zusatz von Kaliumrhodanid und Aceton erhält, gehorcht für alle in Frage kommenden Konzentrationen streng dem Beerschen Gesetz. Die photometrische oder colorimetrische Messung kann daher außer mit Hilfe lichtelektrischer Geräte auch mit den eingeführten visuellen Photometern<sup>3)</sup> und Colorimetern durchgeführt werden. Besonders bewährt hat sich hierfür das Zeiss-Pulfrich-Photometer<sup>4)</sup>, da sich dabei die Möglichkeit bietet, außer der rein photometrischen Messung die Bestimmung für höhere Gehalte auch auf photometrischem Wege

<sup>1)</sup> Vgl. die Definitionen der Begriffe Photometrie und Colorimetrie, diese Ztschr. **55**, 361 [1942].

<sup>2)</sup> Ebenda **55**, 206 [1942].

<sup>3)</sup> E. Stengel, ebenda **56**, 47 [1943].

<sup>4)</sup> Ausgearbeitet im Einvernehmen mit der Fa. Carl Zeiss, im September 1942.