

auftreten. Gewisse im UV fluoreszierende Filterpapiersorten lassen dabei größere Substanzmengen als dunklere Flecken schon mit dem Auge erkennen⁵⁾, im Licht einer sog. *Mineralight lamp* treten sie fluoreszierend hervor⁶⁾. Man kann diese Fluoreszenzlösung zu einer recht empfindlichen Methode zur raschen Feststellung von UV-absorbierenden Substanzen auf dem Filtrerpapier machen, indem man die Chromatogramme mit sehr verdünnter (ca. 0.005 proz.) Lösung von Fluorescein in 0,5n Ammoniak besprüht und, ohne sie ganz zu trocknen, im gefilterten UV-Licht betrachtet. Als Lichtquelle dient eine Hannauer Analysenquarzlampe, deren Licht durch ein UG 5-Glas (Schott u. Gen.) und eine mit Chlor von Atmosphärendruck gefüllte, 30 mm dicke Quarzküvette tritt, in die noch ein Tropfen Brom eingebbracht ist. In diesem Licht, das zur Hauptsache die Quecksilberlinien 254 und 265 $\mu\mu$ enthält, fluoresziert das besprühte Blatt deutlich gelbgrün, während die absorbierenden Substanzen als dunkle Flecken erscheinen. Die untere Sichtbarkeitsgrenze liegt bei 5–10 γ im pfenniggroßen Flecken.

Nach Abschluß unserer Versuche erschien eine Arbeit von *Gordon* und *Reichard*⁷⁾, in der zur Sichtbarmachung von Oligonucleotiden im Agar-Ionophorogramm ebenfalls Fluorescein benutzt wird. Nachdem sich unser Sprühverfahren zur Sichtbarmachung von Knollenblätterpilzgiften auf Filtrerpapier, sowie zur Lokalisierung von absorbierenden Proteinen (wobei höhere Substanzkonzentrationen erforderlich sind) bewährt hatte, haben wir es auch bei Papierchromatogrammen von Purinen herangezogen.

Die Xanthin-Derivate 7-Methylxanthin (I), 3-Methylxanthin (II), 3,7-Dimethylxanthin (Theobromin (III)), 1,7-Dimethylxanthin (Paraxanthin (IV)), 1,3-Dimethylxanthin (Theophyllin (V)) und 1,3,7-Trimethylxanthin (Coffein (VI)) lassen sich durch 2-dimensionale aufsteigende Papierchromatographie in gebräuchlichen Lösungsmitteln gut trennen. In Bild 1 ist ein solches Chromatogramm (je 0,1 proz. Lösung der Komponenten) wiedergegeben, das zuerst mit Wasser-gesättigtem n-Butanol und dann mit n-Propanol-wäbr. Ammoniak (6 Vol n-Prop.: 4 Vol 20 proz. Amm.) gelaufen war. Die geschilderte Nachweismethode zeigte die im Diagramm wiedergegebene Lage der absorbierenden Flecken, deren R_F -Werte in den beiden Lösungsmitteln an der Ordinate und Abszisse abzulesen sind. Leider war keine definierte Abhängigkeit der Fleckengröße von der Substanzkonzentration festzustellen, weshalb man Mengenangaben nur in grober Schätzung geben kann und besser die Absorption der Eluate aus den Flecken im Maximum quantitativ bestimmt. Dabei stört die winzige Fluorescein-Menge nicht.

Bei diesen Studien leitete uns die Neugier, ob in den bekannten Purin-haltigen Pflanzen neben den als Inhaltsstoffen bekannten vielleicht noch andere Purine in kleiner Menge vorhanden seien. Wir wurden aber bei dieser Suche enttäuscht, denn es fand sich im Extrakt von Kaffeebohnen nur Coffein, in Tee- und Mate-

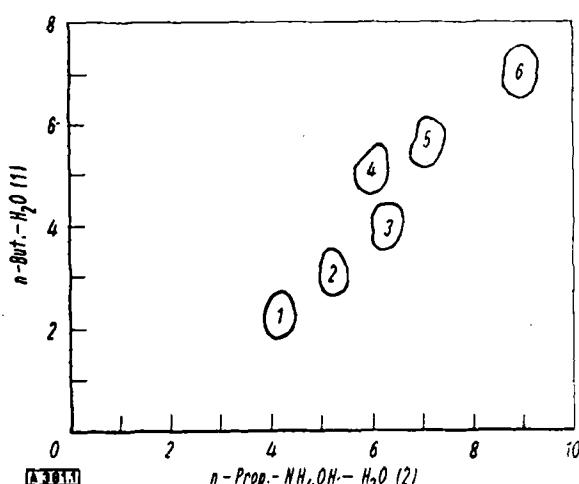


Bild 1

Zweidimensionales Papierchromatogramm eines Gemisches von 6 methylierten Xanthinen (Bezeichnung s. Text)

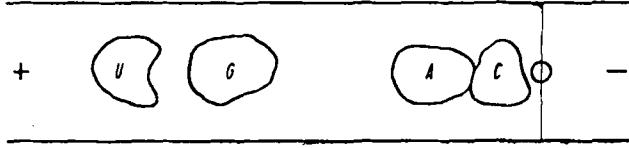
⁵⁾ E. Chargaff, B. Magasanik, R. Doniger u. E. Vischer, J. Amer. Chem. Soc. 71, 1513 [1949].

⁶⁾ C. E. Carter, J. Amer. Chem. Soc. 72, 1466 [1950].

⁷⁾ Biochem. J. 48, 569 [1951].

blättern neben Coffein etwas Theophyllin und im Kakaomehl nur Theobromin.

Mit der Fluorescein-Methode läßt sich auch das Verhalten von Nucleotiden bei der Papierionophorese⁸⁾ gut verfolgen, das wir an den Komponenten der Hefenucleinsäure untersucht haben. Diese lassen sich ähnlich wie die Spaltprodukte der Adenosin-triphosphorsäure⁹⁾ in saurem Acetatpuffer im elektrischen Feld auf dem Filtrerpapier trennen. Im Gegensatz zu dem Befund bei der Ionophorese im Agar-gel¹⁰⁾ werden auf dem Papier auch Uridyl- und Guanylsäure auseinandergezogen, wie aus Bild 2 hervorgeht¹⁰⁾. Zur quantitativen Bestimmung der Nucleotide kann man hier nach streifenförmiger Auftragung des Gemisches die Retentionsanalyse mit Cu heranziehen, worüber Experimente im Gange sind.



A 381.2

Bild 2

Pherogramm eines Gemisches (je 0,5 proz.) von Hefadenylsäure (A), Cytidylsäure (C), Guanylsäure (G) und Uridylsäure (U) in m/20 Acetessigsäure (pH 2,8, 120 V, 5 h 1/2 nat. Größe)

Aminosäuren

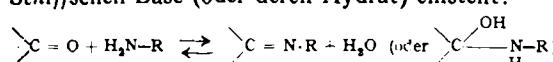
Die Papierchromatographie der Aminosäuren, die heute über einige Dutzend geeigneter Lösungsmittel verfügt, entbehrt immer noch eines schnell arbeitenden Mittels zur Trennung von Leucin und Isoleucin. Nach längeren Bemühungen sind wir durch Verwendung von Ketonen zum Ziel gelangt. In Bild 3 ist das absteigende Papierchromatogramm einer Mischung aller wichtigen Aminosäuren (Proteinhydrolysat) neben einem Gemisch von Valin, Methionin, Isoleucin und Leucin reproduziert. Als Lösungsmittel wurde dabei eine Mischung aus 70 Vol. Methyl-äthyl-keton, 15 Vol. Pyridin und 15 Vol. Wasser 24 h durch den 40 cm langen Papierstreifen absteigen und durchlaufen gelassen.

Wie man sieht, ist die Abtrennung des Leucins vom Isoleucin dabei sehr glatt gelungen. Bei Versuchen mit einzelnen Aminosäuren ergab es sich, daß die aromatischen sowohl im hier beschriebenen Gemisch, als auch mit Ketonen in Gegenwart von Essigsäure chemische Veränderungen erleiden. Zwei-fellos reagiert die prim. Amino-Gruppe aller Aminosäuren mit



Bild 3
Papierchromatogramm (absteigend) von 1) Valin, 2) Methionin, 3) Isoleucin, 4) Leucin und 2) Caseinhydrolysat und Oxyprolin. Lösungsmittel: 70 Vol. Methyl-äthyl-Keton, 15 Vol. Pyridin, 15 Vol. Wasser. Laufzeit: 24 h.

Aldehyden und Ketonen, auch in Anwesenheit von Wasser, wobei sich ein Gleichgewicht zwischen diesen Reaktionspartnern und einer Schiffschen Base (oder deren Hydrat) einstellt:



Die Existenz einer solchen Reaktion gibt sich z. B. in *Neubergers*¹¹⁾ Befund zu erkennen. Danach läßt die Papierchromatographie von Tryptophan in Gegenwart von Formaldehyd eine

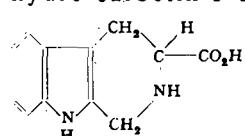
⁸⁾ Th. Wieland u. E. Fischer, Naturwiss. 35, 29 [1948]; diese Ztschr. 61, 452 [1949].

⁹⁾ F. Turba u. H. J. Enenkel, Naturwiss. 38, 189 [1951].

¹⁰⁾ Als Verbesserung unserer Elektrophoreseanordnung⁷⁾ hat sich der Ersatz der Kohleelektroden durch Platindrähte herausgestellt. Diese werden ohne Zwischengefäße oder Diaphragmen in genügend große (5000 cm²) Elektrodenchälen getaucht, in die auch die Papierstreifenenden eintauchen. Bei dieser Anordnung ist Spannungs- und pH-Konstanz über viele Stunden gewährleistet.

¹¹⁾ A. Neuberger, Biochem. J. 48, 111 [1951].

schnellwandernde Komponente erkennen, die mit Ninhydrin gelbe Farbreaktion gibt und der die Struktur einer Tetrahydro-carbolin-3-carbonsäure zugeschrieben wird. Hier



hat sich das primäre Reaktionsprodukt mit dem Aldehyd durch Ringschluß stabilisiert. In gleicher Weise scheinen auch aus Ketonen und den aromatischen Aminosäuren heterocyclische Säuren zu entstehen, die mit Ninhydrin viel schwächere und anders getönte Farbreaktionen als die Ausgangsaminosäuren geben. Sie tauchen deshalb bei der im normalen Proteinhydrolysat vorliegenden Konzentration im Papierchromatogramm gar nicht auf. Die anderen Aminosäuren wandern vielleicht in Form der Schiffschen Basen und verlieren die Carbonyl-Komponente beim Trocknen der Chromatogramme.

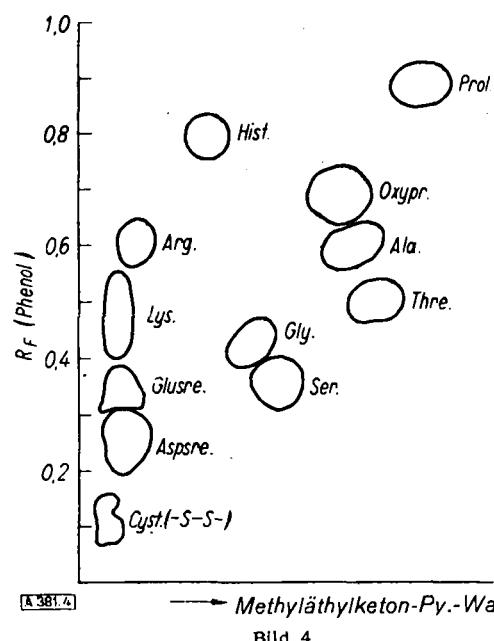


Bild 4

Die im Chromatogramm (Bild 3) vor dem Valin befindlichen Eiweißbausteine lassen sich in der zweiten Dimension aufsteigend mit Phenol-Wasser vollständig trennen, wie aus Bild 4 ersichtlich ist.

Zu einer Gesamtanalyse müßten deshalb noch die drei verschwundenen aromatischen Aminosäuren in einfacher Weise nachzuweisen sein. Wir haben deshalb die Brauchbarkeit der Reaktion mit Zimtaldehyd-HCl zum Nachweis des Tryptophans in Papierchromatogrammen genauer untersucht. Wie be-

reits bei unseren Arbeiten über die Giftstoffe des Knollenblätterpilzes berichtet¹²⁾ und von H. Dilger in seiner Dipl.-Arbeit über die Farbreaktionen auf Indol-Verbindungen eingehend untersucht wurde, besteht eine sehr empfindliche Nachweisreaktion dieser Substanzklasse darin, daß man das Papierchromatogramm mit einer 1 proz. Lösung von frisch destilliertem Zimtaldehyd in Methanol besprüht und nach dem Verdunsten des Methanols in eine möglichst konzentrierte Atmosphäre von HCl-Gas bringt. Dabei entsteht aus Tryptophan ein dunkel rotbrauner Farbstoff, der noch beim Vorliegen von 5 γ Tryptophan gut zu erkennen ist. Zu seinem Nachweis in Aminosäure-Gemischen muß eine Papierchromatographie vorausgehen. Dazu ist als Lösungsmittel ganz verdünnte (ca. m/50) wäßrige Salzsäure gut geeignet¹³⁾. Darin wandern alle Aminosäuren mit großem R_F (ca. 0,9), Phenylalanin und Tyrosin mit R_F ca. 0,8, während Tryptophan als einzige mit R_F 0,7 zurückbleibt. Es läßt sich dann nach einer solchen Chromatographie mit der Zimtaldehyd-Reaktion in tryptischen oder alkalischen Hydrolysaten der gewöhnlichen Proteine (von 0,5% ab), auch nach erfolgter Sichtbarmachung der Aminosäuren mit Ninhydrin, gut nachweisen. Als weitere natürliche Aminosäuren, die mit Zimtaldehyd nach Färbung mit Ninhydrin eine violett-braune Reaktion geringerer Empfindlichkeit geben, wurden das Prolin und Oxyprolin gefunden, deren spez. Nachweis auf diese Weise ebenfalls gelingt. Oxytryptophan gibt in höherer Konzentration als Tryptophan eine gelbe Farbreaktion.

Nimmt man weiterhin die Farbreaktion mit diazotierter Sulfanilsäure zu Hilfe, so gelingt im geschilderten Chromatogramm auch der Nachweis des Tyrosins, das ja vom störenden Tryptophan getrennt ist. Auch mit der Fluorescein-Sprühmethode ist Tyrosin erkennbar, besonders wenn man das Sprühreagens in n/10 Natronlauge anwendet, weil dann die stärkere UV-Absorption des Tyrosin-phenolat-Ions zur Wirkung kommt. Phenylalanin entgeht wegen seiner relativ schwachen Absorption diesem Nachweis. Um die aromatischen Aminosäuren sicher zu finden, chromatographiert man am besten zweidimensional. Hier eignet sich als erstes Lösungsmittel 95 proz. Methanol, worin die genannten Aminosäuren mit R_F 0,33 (Try), 0,44 (Tyr) und 0,54 (PhAl) voneinander getrennt werden. In zweiter Dimension führt eine Mischung aus 75 Vol. sec. Butanol und 15 Vol. 85%iger Ameisensäure und 10 Vol. Wasser zur Abtrennung von den Begleitern. Hierbei bleiben von den schnell wandernden Aminosäuren nur Leucin-Isoleucin zusammen¹⁴⁾.

Eingeg. am 21. August 1951

[A 381]

¹²⁾ Th. Wieland, L. Wirth u. E. Fischer, Liebigs Ann. Chem. 564, 152 [1949].

¹³⁾ Private Mitt. von Dr. S. Moore, New York.

¹⁴⁾ Versuche von Fr. Sitzius.

Analytisch-technische Untersuchungen

Betriebsanalytische Bestimmung geringer Eisen-Gehalte in Zink und Aluminium

Von Dr. E. EBERIUS, A.-G. für Zink-Industrie vorm. Wilhelm Grillo, Duisburg-Hamborn

Es wird die photometrische Bestimmung von Eisen in Zink und Aluminium mit Sulfosalicylsäure beschrieben.
Das Verfahren wurde für Serienuntersuchungen ausgearbeitet.

Bestandteile unter 0,01% beeinflussen bekanntlich in vielen Fällen die Eigenschaften von Metallen und Verbindungen entscheidend. Daher ist ihre schnelle, quantitative Erfassung vor und während der Verarbeitung wichtig. Bei dem viel verwendeten Feinzink mit 99,995% Zink-Gehalt darf die Summe der meist aus Kupfer, Zinn, Blei, Cadmium und Eisen bestehenden Verunreinigungen nicht mehr als 0,005% betragen. Der Eisen-Gehalt liegt bei ca. 0,001% und darunter, ist also gewichts- und maßanalytisch erst durch Einwaagen von 200 g und darüber zu erfassen, was Stunden erfordert. Ähnliches gilt für die Bestimmung des Eisens in Reinaluminium und Aluminium-Legierungen. Spektrographie und Polarographie helfen nicht wei-

ter, weil die Eisen-Konzentration unter der für die störungsfreie Erfassung notwendigen Grenze liegt.

Es wurde nach einer Methode gesucht, die die Bestimmung von einigen Hundertstel bis Zehntausendstel % Eisen in Minuten ermöglicht.

Bei der Durchmusterung der zur Verfügung stehenden Verfahren verblieben als genügend robust und handlich die kolorimetrischen bzw. photometrischen Methoden (Unterscheidung kolorimetrischer von photometrischen Methoden¹⁾), die auch die für den vorliegenden Fall notwendige Genauigkeit zu besitzen schienen.

¹⁾ G. Kortüm: Kolorimetrie und Spektralphotometrie, Springer-Verlag 1948.