

# Vollautomatische, quantitative Aminosäure - Bestimmung

Von Dr. G. BRAUNITZER

Max-Planck-Institut für Biochemie, München

Vor 10 Jahren haben S. Moore und W. H. Stein ein rationelles und genaues, chromatographisches Verfahren zur Bestimmung von Aminosäuren entwickelt. Die Grundlage der Methode ist die quantitative Aminosäure-Bestimmung mit Ninhydrin. Heute gelingt die Analyse eines Proteinhydrolysates vollautomatisch in 24 Stunden. Damit ist eine der wesentlichen Voraussetzungen für die chemische Erschließung der Proteine gegeben.

## Einleitung

Die Ermittlung der Struktur einer chemischen Verbindung beginnt mit der quantitativen Bestimmung ihrer Bausteine. Die Methoden zur Analyse natürlicher Hochpolymerer stehen heute erst im Anfangsstadium. Am weitesten fortgeschritten sind die Methoden zur Strukturermittlung in der Proteinchemie. Hier wurden in den letzten 10 Jahren wesentliche Fortschritte erzielt.

Proteine bestehen aus Aminosäuren, die durch Peptidbindungen miteinander verknüpft sind. Je nach Art und Zahl der Verknüpfungen haben wir die in ihrer Art verschiedenen, nach ihrer spezifischen biologischen Aktivität definierten Proteine, die als Katalysatoren wesentlich das biologische Geschehen bestimmen. Das Verständnis der Wirkungsweise der Proteine setzt die Kenntnis ihrer Struktur voraus. Es gilt, die chemische Struktur, d. h. bei Proteinen die Sequenz der Aminosäuren, zu ermitteln<sup>1)</sup>. Das ist jedoch nur nach vorheriger Bestimmung der Bruttoformel möglich, was einer Bestimmung der Aminosäure-Reste in Proteinen und Peptiden gleichkommt.

## Die manuellen Methoden nach Stein und Moore

Die Methoden zur quantitativen Bestimmung der Aminosäuren sind seit 50 Jahren bekannt. Bereits Emil Fischer hat erste Verfahren angegeben; diese und auch neuere entsprechen jedoch bei weitem nicht den Anforderungen der heutigen Proteinchemie. Erst nach Einführung der Chromatographie wurden erste systematische Erfolge erzielt. Die erste vollständige Aminosäure-Analyse eines Proteins, die den heutigen Anforderungen entspricht, publizierte E. Brand im Jahre 1945, es war die des  $\beta$ -Lactoglobulins<sup>2)</sup>. Es waren die Resultate der mehrjährigen Arbeit eines Instituts, die für die Analyse benötigten Mengen an Protein waren sehr groß.

Von den vielen Forschergruppen, die sich um die Entwicklung eines systematischen und rationellen Mikroverfahrens bemühten, war dem Arbeitskreis des Rockefeller Instituts um Moore und Stein ein endgültiger und dauerhafter Erfolg beschieden. Die in den Proteinen vorkommenden Aminosäuren sind oft homolog und in vielen physikali-

schen Konstanten sehr ähnlich. Eine vollständige Auftrennung konnte daher nur gelingen, wenn die höchste Trennfähigkeit chromatographischer Verfahren ausgenutzt werden konnte, was grundsätzlich nur bei Verwendung von möglichst geringen Substanzmengen möglich ist. Die genannten Forscher haben daher — als einzige — die empfindlichste chemische Methode zum Nachweis von Aminosäuren, die Ninhydrin-Reaktion, zur Analyse angewandt. Diese Reaktion hat bereits Ruhemann vor 50 Jahren beschrieben; sie war in allen Handbüchern der Biochemie zu finden. Sie gelang jedoch nur qualitativ; die reproduzierbare und quantitative Gestaltung der Ninhydrin-Reaktion wurde des öfteren ohne Erfolg versucht. Sie gelang Moore und Mitarbeitern. Durch genaue Festlegung der Versuchsbedingungen ( $p_H$ , Temperatur, Milieu, Zeit, usw.), konnte eine Genauigkeit von 1% erreicht werden<sup>3)</sup>. Die Empfindlichkeit des Verfahrens ist jedoch um  $1 \cdot 10^2$  größer, als die der meisten anderen chemischen Reaktionen, und deshalb konnte die zu untersuchende Substanzmenge entscheidend reduziert werden. Während man früher 50 bis 100 mg Substanz benötigte, brauchte man jetzt für eine Analyse nur mehr 1–2 mg eines Proteins.

Diese Substanzmenge entspricht auch der Kapazität einer Verteilungssäule aus Stärke, deren große Trennfähigkeit für Aminosäuren bereits Synge<sup>4)</sup> gezeigt hat. In der Tat konnten Moore und Mitarbeiter über Stärke die ersten vollständigen quantitativen Analysen des  $\beta$ -Lacto-

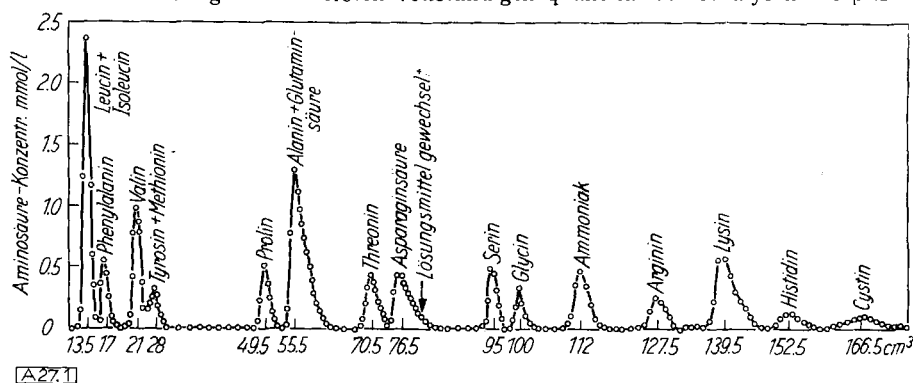


Abb. 1. Stärkesäule-Chromatographie von  $2\frac{1}{2}$  mg eines Hydrolysates von Rinderserumalbumin nach Moore und Stein. Säule: 13,4 g Stärke, Durchmesser 0,9 cm, Lösungsmittel 1:2:1 n-Butanol/n-Propanol/0,1 n Salzsäure gefolgt von 1 n Propanol 0,5 n Salzsäure. Das Eluat wurde in Portionen zu  $0,5\text{ cm}^3$  aufgefangen und anschließend mit der Hand die einzelnen Fraktionen mit Ninhydrin vermessen

globulins und des Rinderserumalbumins ausführen<sup>5,6)</sup>. Sie unterteilten das Eluat automatisch in kleine aliquote Teile mit Hilfe eines Fraktionssammlers. Nach der manuell vorgenommenen quantitativen Ninhydrin-Reaktion in den einzelnen Fraktionen wurde die erhaltene Extinktions-

<sup>1)</sup> G. Braunitzer, Angew. Chem. 69, 189 [1957].

<sup>2)</sup> E. Brand, L. J. Seidel, H. Goldwater, B. Kassel u. F. J. Ryan, J. Amer. chem. Soc. 67, 1524 [1945].

<sup>3)</sup> S. Moore u. W. H. Stein, J. biol. Chemistry 176, 367 [1948].

<sup>4)</sup> R. L. M. Synge, Biochemic. J. 38, 285 [1944].

<sup>5)</sup> S. Moore u. W. H. Stein, Ann. New York Acad. Sci. 49, 265 [1948].

<sup>6)</sup> W. H. Stein u. S. Moore, J. biol. Chemistry 176, 337 [1948].

kurve für die einzelnen Aminosäuren integriert und daraus der Molanteil jeder Aminosäure berechnet. Die Genauigkeit betrug annähernd 3%, die Versuchsdauer 1 Woche. Die Arbeit erforderte jedoch neben viel Erfahrung gut eingewöhntes Personal. Dieses erste vollständige chromatographische Verfahren zur Analyse eines Proteinhydrolysates stellte einen großen Fortschritt dar (Abb. 1).

Man versuchte, das Verfahren weiter zu vereinfachen. Wichtig war die Herabsetzung des Zeitbedarfs. Für die Verteilungschromatographie bedeutet dies die Erhöhung des Diffusionskoeffizienten, eine Forderung, die nur schwer erfüllt werden kann.

Moore und Mitarbeiter versuchten daher das Aminosäure-Gemisch an Ionenaustauschern zu trennen. Bereits erste Versuche, noch im  $H^+$ -Cyclus ausgeführt, brachten Erfolge. Ein vollständig neues Verfahren wurde mit Dowex 50 $\times$ 8 im  $Na^+$ -Cyclus<sup>7)</sup> entwickelt; dabei wurde ein Austauscher von gleichmäßiger und sehr kleiner Korngröße (200–400 mesh) verwendet und das Verfahren ständig weiter ausgebaut und verbessert. Es zeigte sich, daß die Verwendung desselben Austauschers in verschiedener Vernetzung Vorteile bietet<sup>8)</sup> und daß die gesonderte Bestimmung der basischen Aminosäuren in einer kurzen Säule (15 cm Länge) die Genauigkeit der Analyse dieser Aminosäuren wesentlich erhöht. Jedoch dauerte eine Analyse nach dieser Methode noch mehrere Tage (Abb. 2).

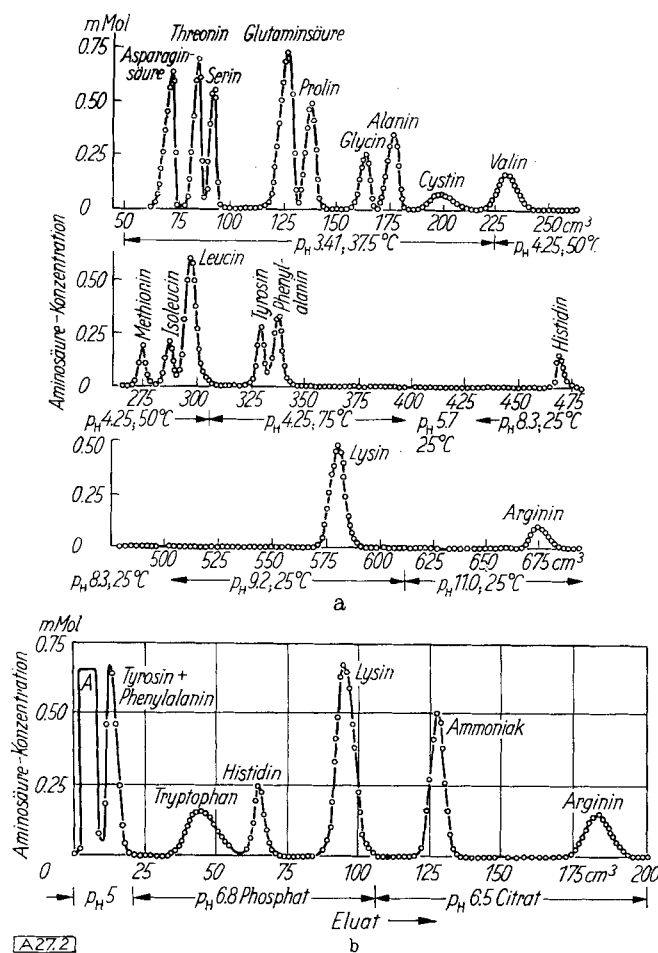


Abb. 2. a) Die Trennung der proteinogenen Aminosäuren über Dowex 50 $\times$ 8 (6 mg Gemisch). b) Die gesonderte Bestimmung des Tryptophans und der basischen Aminosäuren

<sup>7)</sup> S. Moore u. W. H. Stein, ebenda 192, 669 [1951].

<sup>8)</sup> S. Moore u. W. H. Stein, ebenda 211, 179 [1954].

## Die automatische Methode

Die letzten beiden Schritte, Verkürzung der Versuchsdauer und Vollautomatisierung der Versuchsanordnung, wurden praktisch gleichzeitig vollzogen<sup>9–11)</sup>. Um den Zeitbedarf zu vermindern, muß der Austausch an der Säule beschleunigt werden. Dies wurde dadurch erreicht, daß durch Herabsetzung der Austauscher-Korngröße der Diffusionsweg der Aminosäuren verringert wurde; außerdem wurde bei höherer Temperatur gearbeitet. Es gelang so, die Versuchszeit auf 20 Stunden zu reduzieren.

Gleichzeitig wurde der Ablauf der Analyse voll automatisiert. Während bisher das Eluat stets in kleine Fraktionen unterteilt wurde, die einzeln manuell analysiert wurden, wurde es nunmehr mit einer Ninhydrin-Lösung im konstanten Volumenverhältnis kontinuierlich gemischt: Das Gemisch wird in einen Teflon®-Schlauch eingeleitet,

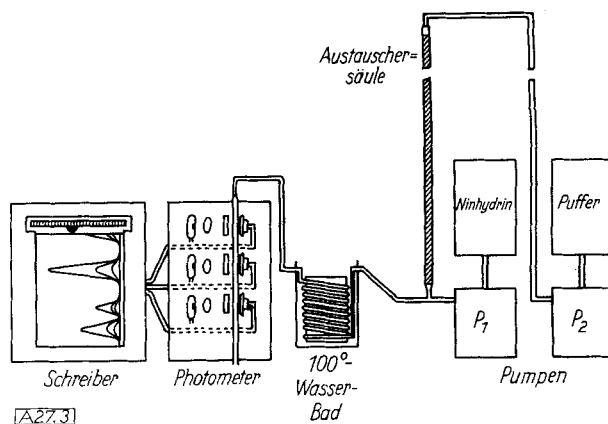


Abb. 3. Schema der Versuchsanordnung der automatischen Aminosäure-Analyse nach Spackmann, Moore und Stein

der sich in einem Wasserbad befindet. Die Länge des „Teflon-Coils“ wird so bemessen, daß die Lösung (Eluat + Ninhydrin) genau 15 min im Wasserbad verweilt; während dieser Zeit findet die Reaktion statt. Das Reaktionsgemisch passiert anschließend eine Photozelle, um die Extinktion automatisch und kontinuierlich zu messen, die über einen elektronischen Verstärker mit einem Mehrpunktschreiber registriert wird.

Hierdurch ist der Arbeitsaufwand auf ein Minimum reduziert und die Genauigkeit des Verfahrens erhöht worden, da die Analyse in einem geschlossenen System ausgeführt und so die „base line“ (= Nulllinie) praktisch auf ein Minimum herabgesetzt wird. Das Prinzip des Gerätes ist in Abb. 3 wiedergegeben.

Neben diesen prinzipiell methodischen Neuerungen bedarf jedoch das Gerät, wie es Moore und Mitarbeiter entwickelt haben, noch einiger zusätzlicher Erläuterungen, welche die Eleganz des Verfahrens und die Sorgfalt, mit der die technischen Probleme behandelt wurden, beleuchten.

Die Durchflußgeschwindigkeit wird mit Präzisionspumpen aufrecht erhalten. Um die Analyse in den Säulen unter vergleichbaren Bedingungen ablaufen zu lassen, muß der Arbeitsdruck der Pumpen stets derselbe, d. h. der Widerstand der langen wie der kurzen Säule von gleicher Größenordnung sein. Dies wird dadurch erreicht, daß die jeweiligen Säulen mit Austauscher-Teilchen verschiedener Größe doch gleicher Form gefüllt werden.

<sup>9)</sup> D. H. Spackmann, W. H. Stein u. S. Moore, Federation Proc. 15, 358 [1959].

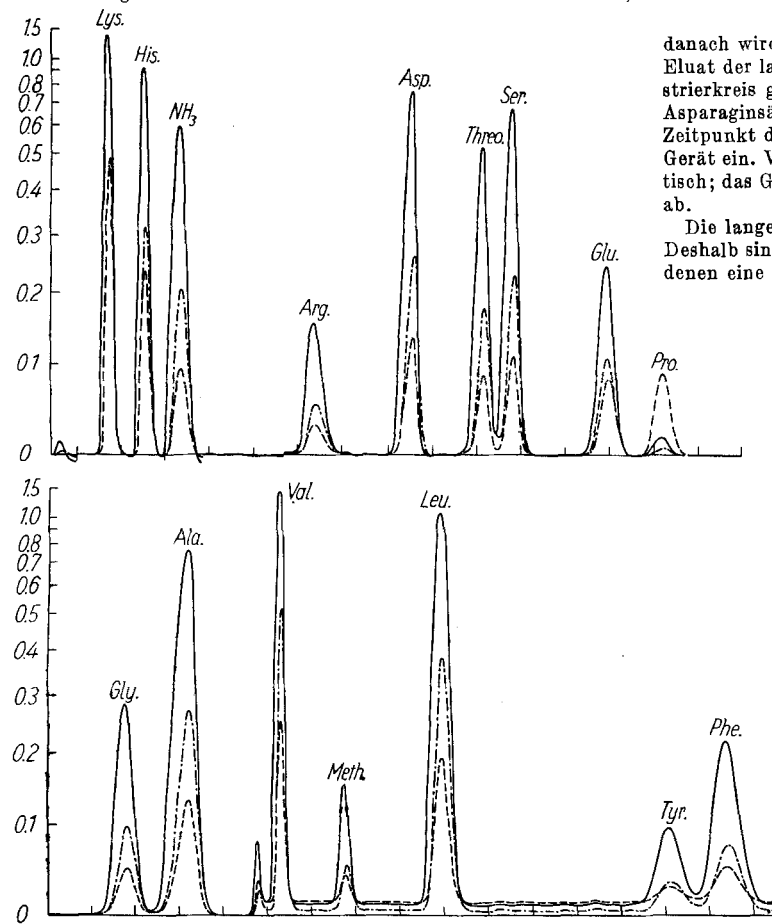
<sup>10)</sup> D. H. Spackmann, W. H. Stein u. S. Moore, Analytic. Chem. 30, 1190 [1958].

<sup>11)</sup> S. Moore, D. H. Spackmann u. W. H. Stein, ebenda 30, 1185 [1958].

Das Photometer ist dreiteilig. Es ist mit einer Küvette für optimale Extinktion bei 570 m $\mu$ , einer für 440 m $\mu$  (Prolin und Hydroxyprolin) sowie mit einer weiteren dünneren Zelle versehen, die mit einer geringeren Schichtdicke mißt.

Als weitere technische Neuerung wird ein einfaches, numerisches Verfahren zur Berechnung der Fläche des Extinktionsgipfels einer Aminosäure verwendet. Das Schreibgerät besteht aus einem Punktschreiber, der in Abständen von 4 sec die Extinktion automatisch auf logarithmischem Papier registriert. Nach einem von D. W. Pickels gefundenen Verfahren kann die Fläche numerisch berechnet werden. Zur Berechnung einer Fläche werden zwei Parameter benötigt. Der eine Parameter, die Höhe, kann abgelesen werden; an Stelle der Vermessung des 2. Parameters, der Halbwertsbreite in der Extinktionskurve, wird die Zeit als Funktion der Halbwertsbreite eingeführt. Die Zeit kann durch einfaches Abzählen der Punkte über der halben Höhe ermittelt werden. Hierdurch wird die Auswertung wesentlich vereinfacht. Die Genauigkeit des Verfahrens beträgt 0,25%, sie wird bei der Ermittlung einer Fläche durch geometrische Methoden, z. B. durch das Planimetrieren, nicht erreicht.

Die Analyse geht im allgemeinen folgendermaßen von statten: Morgens wird die Substanz an beiden Säulen aufgetragen. In der kurzen Säule wird der Versuch sofort begonnen. Die Pumpe zum Durchfluß des Puffers wird eingestellt, nach 20 min das Ninhydrin, nach 40 min das Registriergerät. Inzwischen werden die sauren und neutralen Aminosäuren auf die lange Säule gebracht. Während das Gerät den Durchlauf der basischen Aminosäuren registriert, wird nach 2 h der Versuch in der langen Säule durch Einschalten der entsprechenden Pufferpumpen gestartet. Nach etwa 4 h wird Arginin als letzte der basischen Aminosäuren vermessen;



Δ27.4

Abb. 4. Die Analyse eines Hydrolysates der  $\alpha$ -Kette aus Humanhämoglobin A nach der automatischen Methode von Spackmann und Moore. (Gerät der Beckman Instruments, Fullerton, USA)

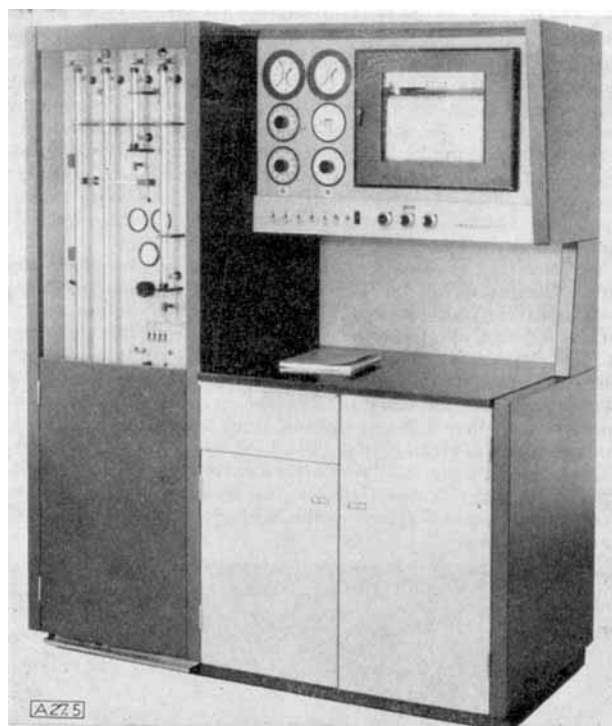


Abb. 5. Gerät zur vollautomatischen Bestimmung der Aminosäuren nach Stein und Moore der Beckman Instruments, Fullerton (USA). Links die Säulen, rechts oben das Registriergerät, links davor die Druckanzeiger, wie die Uhren zur Einstellung und zum automatischen Wechsel der Temperatur der Puffer wie Versuchsdauer. Die Pumpen sind im Gerät unten rechts (nicht sichtbar), die Puffer und Ninhydrin-Flaschen wie Thermostaten im Inneren des Gerätes angeordnet

danach wird der Versuch in der basischen Säule beendet und das Eluat der langen Säule, das bisher verworfen wurde, in den Registrierkreis gebracht. Nach etwa einer weiteren Stunde erscheint Asparaginsäure als erster Gipfel. Man stellt am besten zu diesem Zeitpunkt den Pufferwechsler und die gesamte Versuchsdauer am Gerät ein. Von diesem Zeitpunkt an verläuft die Analyse automatisch; das Gerät schaltet sich nach Beendigung des Versuchs selbst ab.

Die lange Säule wird vor jedem Versuch mit NaOH gereinigt. Deshalb sind zwei Säulen von etwa 150 cm Länge vorhanden, von denen eine zur Analyse, die andere zur Regeneration dient.

Die zur Untersuchung benötigten Mengen sind gering; die größte Genauigkeit erhält man bei 1  $\mu$ Mol je Komponente. Es können jedoch auch 4  $\mu$ Mol mit gleichgroßer Genauigkeit erfaßt werden; bei Anwendung von nur  $1/16$   $\mu$ Mol je Komponente kann der Bestimmungsfehler 5% betragen. Es kann daher schon mit Mengen, die für ein zweidimensionales Papierchromatogramm benötigt werden, mit großer Genauigkeit gearbeitet werden (Abb. 4).

Zur genauen Bestimmung der Aminosäuren ist es notwendig, daß sie in der Säule vollständig getrennt werden, d. h. daß keine Überlappungen vorkommen. Hierzu ist eine sehr große Temperaturkonstanz in der Säule erforderlich und der Austauscher muß besonders gleichmäßig eingefüllt werden. Außerdem ist es wichtig, daß das pH der Puffer sorgfältig eingestellt wird. Im allgemeinen darf die Abweichung nur 0,01 bis 0,02 pH-Einheiten betragen. Kritisch sind die Trennungen Threonin/Serin und Alanin/Cystin. Die Güte der Trennung von Serin und Threonin gilt als Maß für eine gute Einbettung des Austauschers in der Säule. Die Trennung Cystin/Alanin gilt als Kriterium für die richtige Einstellung des pH-Wertes des 3,25-Puffers. Der Säuregrad wird am besten empirisch eingestellt, wobei z. B. die Lage des Cystin-Gipfels gegenüber Alanin als Kriterium dient („das genaueste pH-Meter ist ein Austauscher“).

Durch die bereits kommerziell hergestellten Geräte, die alle nach dem Prinzip von Moore und Mitarbeitern arbeiten, ist die Bestimmung der Aminosäuren zu einer Routineuntersuchung geworden.

Von den Geräten sei als erstes das Gerät der Firma *Beckman-Instruments*, Fullerton (USA), erwähnt. Dieses Gerät entstand in engster Zusammenarbeit mit dem Rockefeller-Institut und ist gegenüber dem ursprünglichen Gerät von *Moore* und *Stein* noch weiter vervollkommen worden. Die vorhergehende Beschreibung des Verfahrens gilt streng für das Gerät der Firma *Beckman-Instruments*. Es ist auf größte Präzision gearbeitet und in einem handlichen Kasten untergebracht. Dank der Überwachung des Baues des Gerätes durch das Rockefeller-Institut und die weitere wissenschaftliche Zusammenarbeit dürfte dieses Gerät auch in Zukunft den höchsten Anforderungen entsprechen (Abb. 5).

Zur Zeit sind zwei weitere Geräte im Handel. Das Gerät der Firma *Phoenix* ähnelt im Aufbau dem ursprünglichen Gerät des Rockefeller-Instituts. Das dritte Gerät verdient insofern besondere Beachtung, als es in seinem Bau einfacher und sehr preiswert ist. Das Prinzip ist dasselbe, die technische Ausführung jedoch wesentlich vereinfacht<sup>12)</sup>. Es wurde im *Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung* in München nach den Versuchsprinzipien von *Stein* und *Moore* gebaut, stellt technisch jedoch eine unabhängige Entwicklung dar. Die Lösungen laufen kontinuierlich aus einem Kolben. Als Photometer dient ein kommerziell erhältliches Registriergerät. Die Dosierung der Substanzmenge ist etwas kritischer. Die Auswertung geschieht durch Planimetrieren der Kurven (Abb. 6).

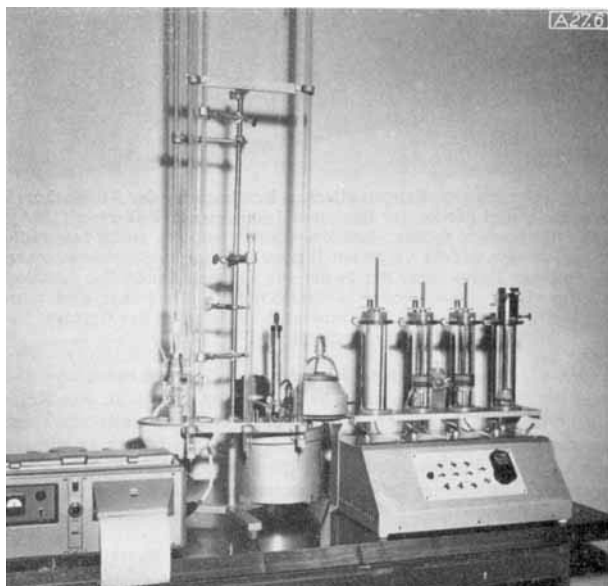


Abb. 6. Das Gerät zur quantitativen Bestimmung der Aminosäuren wie es im Max-Planck-Institut für Eiweißforschung, München, entwickelt wurde. (Gerät der Firma Bender & Hobein, München.) Links das Registriergerät, rechts die Pufferkolben; die Säulen sind senkrecht dazwischen angeordnet. Dahinter die Thermostaten für die Säulen und das Reaktionsgefäß

### Bedeutung und Möglichkeiten

Das vollautomatische Gerät öffnete den Weg zur systematischen Erforschung der Struktur der Proteine. Es ist möglich, Proteine, Peptide und deren Derivate zu vermessen und mit großer Genauigkeit die Bruttoformel eines Proteins vom Mol-Gewicht 15000 anzugeben. Während früher die Hydrolysen-Methodik meist vernachlässigt wurde, ist heute die Genauigkeit einer Protein-Analyse nicht mehr vom Meßverfahren abhängig, sondern der begrenzende Faktor ist die Hydrolyse. Während z. B. die Valyl-Serin-Bindung mit 6 n HCl bei 110 °C sehr schnell gespalten wird, ist die Hydrolyse der Valyl-Valyl-Bindung auch nach 150 h nicht vollständig, was sich in den Ergebnissen bemerkbar macht. Die Tetra-peptide Val-Ser-Val-Ser und Val-Val-Ser-Ser z. B. geben trotz gleicher Bruttoformel verschiedene Analyseergebnisse. Auch findet während der Hydrolyse von Proteinen stets ein Zerfall von Aminosäuren statt, der bei Gegenwart von Fremdstoffen, wie z. B. Kohlenhydraten, besonders stark ins Gewicht fällt. Man kann durch Variation der Hydrolysezeiten und Extrapolation

<sup>12)</sup> K. Hannig, Clin. chim. Acta 4, 51 [1959].

auf die Zeit 0 diese Schwierigkeiten meist umgehen. Schließlich zeigt sich, daß die benutzte Salzsäure je nach Herkunft auch nach sorgfältiger Reinigung heute noch einen unkontrollierbaren Einfluß auf das Ergebnis hat. Der weitere Fortschritt in der Genauigkeit der quantitativen Bestimmung der Aminosäuren muß daher bei der Hydrolyse der Proteine einsetzen. Ob hierbei das Ideal einer schonenden, jedoch vollständigen Hydrolyse durch Peptidasen, wie dies kürzlich am Glukagon gelungen ist<sup>13)</sup>, allgemein erreicht werden kann, muß die Zukunft lehren.

Es sei noch auf die Anwendung des Analysators zur Sequenz-Analyse hingewiesen. Wird ein Peptid modifiziert oder abgebaut, so ändert sich die Bruttoformel des Restpeptides. Nach Einwirkung eines Enzyms, wie Carboxy- oder Amino-polypeptidase, werden Aminosäuren in bestimmter Reihenfolge abgespalten. Durch ihre quantitative Vermessung können die Reihenfolgen der Aminosäuren im Peptid sehr genau ermittelt werden.

Beim systematischen Abbau einer Peptid-Kette nach *Edman*<sup>14)</sup> mit Phenylsenföhl wird schrittweise durch eine Cyclisierungs-Reaktion die Aminosäure vom N-terminalen Ende aus dem Peptid entfernt. Hier kann ebenfalls durch quantitative Analyse des Restpeptides mit dem Analysator die Sequenz eines Peptides genau ermittelt werden (Abb. 7).

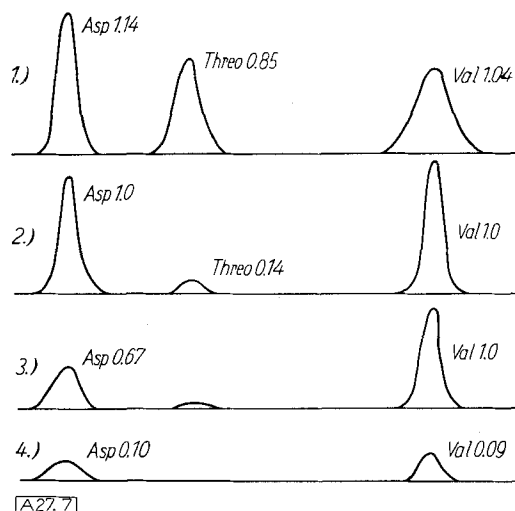


Abb. 7. Sequenzanalyse eines tryptischen Peptids aus Humanhämoglobin A der Bruttoformel  $\text{Asp}_1, \text{Threo}_1, \text{Val}_1, \text{Lys}_1 (\text{CONH}_2)_1$  durch Abbau nach *Edman*

1. Die Analyse der neutralen Aminosäuren
2. nach dem ersten
3. nach dem zweiten
4. nach dem dritten Schritt des Abbaues mit Phenylsenföhl, woraus sich die Sequenz Threo/AspNH<sub>2</sub>Val/Lys (und die C-terminale Position des Lysins) ergibt (Gerät der Firma Bender & Hobein). Nach Versuchsergebnissen von *Renate Müller*.

Vor kurzem wurde von *V. Rudloff* und *G. Braunitzer* ein einfaches selektives Verfahren zur Trennung natürlicher Peptide entwickelt<sup>15, 16)</sup>, durch das bei sehr geringem Arbeitsaufwand in kurzer Zeit komplexe Gemische von Peptiden, wie das tryptische Hydrolysat von Humanhämoglobin, analysiert werden können. Verwendet wird der Anionenaustauscher Dowex 1×2, als Puffer dienen Collidin- und Pyridinacetat. Die Analyse ist nach 3 Tagen beendet. Es werden 30–60 µMol eines Proteinhydrolysates benötigt. Die Fraktionen, die die Peptide enthalten, werden durch Rotationsverdampfen eingengt und können direkt für weitere analytische Untersuchungen verwendet werden.

<sup>13)</sup> R. L. Hill u. E. L. Smith, Biochim. biophysica Acta 31, 257 [1959].

<sup>14)</sup> P. Edman, Acta chim. Scand. 4, 277 [1952].

<sup>15)</sup> G. Braunitzer, B. Liebold, K. Hilse u. V. Rudloff, Angew. Chem. 71, 376 [1959].

<sup>16)</sup> V. Rudloff u. G. Braunitzer, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 216, im Druck [1960].

Anscheinend findet nur eine geringe Wechselwirkung mit dem Träger des Austauschers statt und die Trennung dürfte primär entsprechend der Nettoladung der einzelnen Peptide eintreten. Besonders hervorzuheben ist, daß auch Tryptophan und Cystein-peptide gefaßt werden sowie mittlere Peptide bei guter Selektivität rein anfallen. Dies ist insofern von Bedeutung, als mittlere Peptide in Säulen bisher

nur schlecht zu trennen waren. Die Isolierung von Peptiden mit 30 bis 70 Aminosäure-Resten ist wichtig, da sie bezüglich der Ermittlung der Gesamtstruktur eine Schlüsselstellung einnehmen. Ein typisches Extinktionsdiagramm von oxydiertem Humanhämoglobin ist in Abb. 8 wiedergegeben. Der wesentliche Vorteil des Verfahrens liegt darin, daß ein direkter methodischer Anschluß an die beiden weiteren Methoden zur Trennung natürlicher Peptide, nämlich die Verteilungschromatographie und Hochspannungselektrophorese gegeben ist.

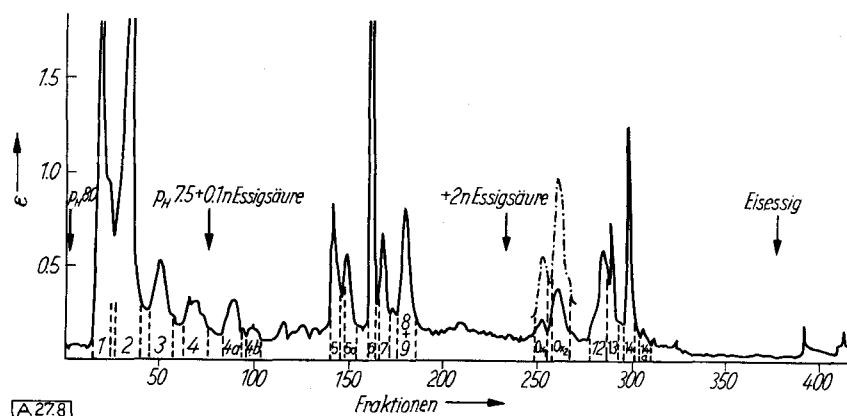


Abb. 8. Die Analyse der tryptischen Peptide aus Humanhämoglobin A. Säule: Dowex 1×2, im Acetat-Cyclus. Verwendet wurden Collidin/Pyridin-Acetatpuffer. 60 µMol Protein Fraktion je 20 cm<sup>3</sup>

weiteren Methoden zur Trennung natürlicher Peptide, nämlich die Verteilungschromatographie und Hochspannungselektrophorese gegeben ist. K. Hilse und G. Braunitzer gelang so eine quantitative Vermessung und Zuordnung der tryptischen Peptide aus Humanhämoglobin, womit sich bereits die ersten Abrisse der chemischen Struktur des Proteins des menschlichen Hämoglobins ergeben<sup>17,18</sup>).

Eingegangen am 17. Dezember 1959

[A 27]

<sup>17)</sup> K. Hilse u. G. Braunitzer, Z. Naturforsch. 14b, 603 [1959].

<sup>18)</sup> K. Hilse u. G. Braunitzer, ebenda 14b, 604 [1959].

## Dielektrische Untersuchungen an Molekularsieben

Von Dipl.-Chem. F. OEHME\*)

Institut zur Entwicklung chemisch-physikalischer Analysenmethoden, Weilheim/Obb.

Linde-Molekularsiebe bilden mit Nichtelektrolyt-Molekülen Käfig-Einschlußverbindungen. Die Möglichkeit eines Einschlusses wird maßgeblich durch den Moleküldurchmesser bestimmt. In Ermangelung gesicherter thermodynamischer Daten kann die von Debye definierte Relaxationszeit  $\tau$  als relatives Maß für den Molekülradius verwendet werden, soweit es sich um Moleküle näherungsweise kugelförmiger (geknäuelter) Gestalt mit starr eingebauten Dipolen handelt. Eine Übertragung der Eyring'schen Theorie auf das eingeschlossene, rotationsgehemmte Molekül läßt aus der Verschiebung des Gebietes anomaler dielektrischer Dispersion eine Berechnung der Adsorptionsenthalpie zu.

### 1. Aufbau von Molekularsieben

Molekularsiebe sind Silicate von Zeolith-Struktur. Sie weisen im Kristallgitter „Käfige“ auf, welche über „Poren“ definierten Durchmessers zugänglich sind. So zeigt Abb. 1 die Käfigstruktur eines Natrium-aluminium-silicates<sup>1)</sup>, das als „Linde-Molekularsieb Type 4 A“ technisch hergestellt wird<sup>2)</sup>.

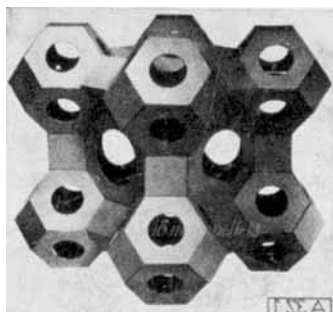


Abb. 1  
Käfigstruktur  
eines Na-Al-  
Zeoliths  
(Linde-  
Molekularsieb  
4 A)<sup>1)</sup>

Der röntgenographisch bestimmte Durchmesser der Poren zu den kleineren  $\beta$ -Käfigen beträgt  $4,2 \pm 0,2$  Å. Da dieses Silicat, wie alle Zeolithe, zum Ionenaustausch befähigt ist und die austausch-

baren Natrium-Ionen innerhalb eines  $\beta$ -Käfigs liegen, kann man den Porendurchmesser aus der Größe der eintauschbaren Ionen abschätzen. So werden nach Barrer und Meier<sup>1)</sup> Lithium-, Kalium-, Silber-, Thallium-, Calcium- und Strontium-Ionen glatt ausgetauscht. Bei den großvolumigen Alkylammonium-Ionen wird zwar noch das  $(\text{CH}_3)_3\text{NH}^+$ -Ion (Ionenradius  $a = 2,25$  Å), dagegen nicht mehr das  $(\text{CH}_3)_4\text{N}^+$ -Ion (Ionenradius  $a = 2,4$  Å) ausgetauscht, in guter Übereinstimmung mit dem röntgenographisch gefundenen Porendurchmesser.

Abb. 2 zeigt den Gitteraufbau eines Chabasits<sup>3)</sup>. Der mittlere Durchmesser der achteckigen Poren wurde röntgenographisch zu 3,9 Å bestimmt.

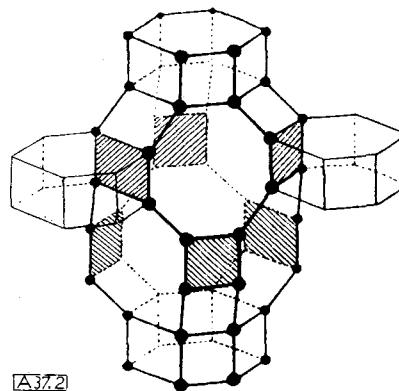


Abb. 2. Käfigstruktur von Chabasit<sup>3)</sup>

\*) Nach einem Kurzvortrag auf dem XVII. Internationalen Kongreß für Reine und Angewandte Chemie in München am 5. Sept. 1959.

<sup>1)</sup> R. M. Barrer u. W. M. Meier, Trans. Faraday Soc. 54, 1074 [1958].

<sup>2)</sup> Formblatt 8605 A der Linde Company, New York 17, USA.

<sup>3)</sup> L. S. Dent u. J. V. Smith, Nature [London] 181, 1794 [1958].