

Propargylaldehyd. Unter geringer Wärmeentwicklung bildet sich ein voluminöser gelber Niederschlag, der sich zu harten dunkelgelben Krystallkrusten absetzt. Beim Verdünnen der Mutterlauge mit Wasser fällt eine weitere Fraktion aus „Acetat des Malondialdehyddianils (VI). Schmp. bis 80° unscharf. Ausb. 25.65 g (Theorie 29.4 g). Das Hydrochlorid schmilzt bei 215—216° (Dunkelfärbung ab 210°).

Aus beiden Salzen wird mit Sodalösung und Äther die freie Base gewonnen. Schmp. (aus Methanol) 114—115°. Gelbe zugespitzte Prismen; kommt oft in dicken honigbraunen Platten mit violetter Oberflächenschimmer.

3.159 mg Sbst. (60° im Vak.): 0.380 ccm N<sub>2</sub> (22°, 706 mm).

C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub> (222.3). Ber. N 12.61. Gef. N 12.93.

Beim Kochen des Dianils mit verd. Schwefelsäure läßt sich im Destillat Malondialdehyd nachweisen. Auch nach 5-stdg. Kochen war noch mehr als die Hälfte unverändertes Dianil vorhanden.

### Propargylaldehyd und Phenylhydrazin: Methylglyoxalphenylosazon.

0.5 g Propargylaldehyd, in Wasser gelöst, werden zu 3 g Phenylhydrazin, in Wasser-Eisessig gelöst, unter Eiskühlung gegeben. Es entsteht eine gelbe Trübung und ein dunkles Öl, das nach mehrtägigem Stehenlassen zu einer schwarzen grobkörnigen Masse erstarrt (1.7 g). Diese wird in Äther gelöst, von Unlöslichem abfiltriert und an Aluminiumoxyd chromatographiert. Mit Ausnahme der oben hängenden dunklen Zonen und des ersten substanzhaltigen Filtrats krystallisieren alle Fraktionen, die, soweit sie beim Entwickeln nicht ins Filtrat gehen, mit Alkohol eluiert werden. Es werden 0.9 g Methylglyoxal-phenylosazon vom Schmp. 147—148° erhalten.

### 260. Fritz Turba\*): Chromatographie der basischen Aminosäuren an Bleicherden, I. Mitteil.: Über das Adsorptionsverhalten von Eiweiß-Spaltprodukten.

[Aus d. Chem. Institut d. Deutschen Karls-Universität in Prag.]

(Eingegangen am 21. Oktober 1941.)

Der Gedanke, die Adsorption als Hilfsmittel für die Unterscheidung von Aminosäure-Gruppen bzw. einzelnen Aminosäuren heranzuziehen, ist nicht neu. So haben M. Mashino und N. Shikazono<sup>1)</sup> festgestellt, daß durch japanischen, sauren Ton aus einem Gemisch verschiedener Aminosäuren die Diaminosäuren zu 86%, die Monoaminosäuren nur zu 20% adsorbiert werden. Die japanischen Autoren beschreiben ein Herauslösen der adsorbierten Aminosäuren durch Erdalkalihydroxyd, insbesondere Calciumhydroxyd, und ferner Natriumcarbonat, Natriumhydroxyd und Ammoniumhydroxyd. Etwa gleichzeitig haben D. Ackermann und H. Fuchs<sup>2)</sup> die Adsorption stickstoffhaltiger Substanzen, wie tierischer Extraktlösungen oder Eiweißhydrolysate

\*) Frl. M. Richter u. Hrn. K. Wiesner bin ich für die fleißige Unterstützung zu Dank verpflichtet.

<sup>1)</sup> Journ. Soc. chem. Ind. Japan [Suppl.] **39**, 54 B—55 B, 88 B, 136 B [1936].

<sup>2)</sup> Ztschr. physiol. Chem. **240**, 198 [1936].

durch Lloyds Reagens und Frankonit KL beschrieben. Durch Schütteln mit genügenden Mengen Adsorbens in 5-proz. Schwefelsäure gelang ihnen eine ähnlich weitgehende Abscheidung der stickstoffhaltigen Substanzen, wie mit Phosphorwolframsäure. Durch Elution mit Barytwasser konnten sie einen großen Teil der Basen wieder vom Adsorptionsmittel trennen. Die Möglichkeit einer schichtweisen Trennung, z. B. von Arginin und Histidin, ergab sich in ihren Versuchen nicht. Etwas später hat Fuchs<sup>3)</sup> die quantitativen Verhältnisse systematisch untersucht und gefunden, daß unter den angegebenen Versuchsbedingungen neben den Diaminosäuren auch ein beträchtlicher Teil der Monoaminosäuren (67—80%) durch die verwendeten sauren Adsorptionsmittel (Frankonit KL und Lloyds Reagens) festgehalten wird, während neutrale Adsorbentien (Fullererde, Floridin, Bleicherde Merck) neben 80—85% Arginin rund 50% z. B. von Glykokoll adsorbieren.

Das Verfahren, die basischen von den restlichen Aminosäuren und voneinander zu trennen, das auf der verschiedenen Löslichkeit der Silbersalze beruht, ist bekanntlich durch die ausgezeichneten Untersuchungen von A. Kossel und Mitarbeitern<sup>4)</sup> geschaffen worden. Da es in seiner Ausführung schwierig und langwierig ist, wurde es verschiedentlich abgeändert<sup>5)</sup>; es gestattet jetzt eine verhältnismäßig genaue Bestimmung der basischen Aminosäuren, wenn auch unter Benützung größerer Mengen von Ausgangsmaterial, die bei kostbaren Präparaten nicht immer zu beschaffen sind. So haben R. Kuhn und P. Desnuelle<sup>6)</sup> zur Bestimmung der basischen Aminosäuren im gelben Ferment mit Erfolg die Elektrodialyse (G. L. Foster und C. L. A. Schmidt<sup>7)</sup>; G. J. Cox, H. King und C. P. Berg<sup>8)</sup>) herangezogen. Es genügen für das Verfahren je etwa 20 mg der Aminosäuren. Allerdings verbleibt Arginin im Gemisch mit Lysin, und der Lysingehalt muß indirekt aus der Stickstoffbilanz errechnet werden. Die Verluste betragen zwischen 5 und 10% der angewandten Mengen.

Es ist naheliegend, für die Trennung der basischen Aminosäuren durch Adsorption das von Tswett geschaffene chromatographische Verfahren anzuwenden. Denn die Aminosäuren bedürfen als niedrig molekulare Substanzen kräftiger Adsorptionsmittel; mit der Steigerung der Adsorptionskraft geht aber stets eine Einbuße an Selektivität parallel. Deshalb sollte das Tswettsche Verfahren, bei dem durch kontinuierlich aufeinanderfolgende Adsorptions- und Elutionsvorgänge die auswählende Wirkung des Adsorbens gesteigert wird, gerade hier besonders geeignet sein. W. Koschara<sup>9)</sup> hat in seiner bemerkenswerten Veröffentlichung die Anwendbarkeit der Adsorptionsanalyse wäßriger Lösungen eingehend beschrieben. Es wurde nun versucht, Arginin, Lysin und Histidin von den übrigen Aminosäuren und weiterhin auch von einander quantitativ und scharf zu trennen.

<sup>3)</sup> Ztschr. physiol. Chem. **246**, 278 [1937].

<sup>4)</sup> A. Kossel u. F. Kutscher, Ztschr. physiol. Chem. **31**, 165 [1900]; A. Kossel u. A. J. Patten, Ztschr. physiol. Chem. **38**, 39 [1903]; A. Kossel u. R. E. Groß, Ztschr. physiol. Chem. **135**, 167 [1924].

<sup>5)</sup> Vergl. H. B. Vickery u. Ch. S. Leavenworth, Journ. biol. Chem. **76**, 707 [1928]; **93**, 105 [1931]; R. J. Block, Journ. biol. Chem. **106**, 457 [1934].

<sup>6)</sup> B. **70**, 1907 [1937].

<sup>7)</sup> Journ. biol. Chem. **56**, 545 [1923].

<sup>8)</sup> Journ. biol. Chem. **81**, 755 [1929].

<sup>9)</sup> Ztschr. physiol. Chem. **289**, 89 [1936].

1) Die Diaminosäuren lassen sich durch Chromatographie an der aktivierten Bleicherde Filtrol-Neutrol<sup>10)</sup> (bei Arginin und Lysin läßt sich auch die Naturerde Floridin XXF Extra verwenden) von den übrigen Aminosäuren trennen. Wie die folgende Zusammenstellung zeigt (Tafel 1), liegen die Ausbeuten durchweg bei 100%. Die Elution der im Adsorbens verbliebenen Diaminosäuren erfolgte mit einem Pyridin-Schwefelsäure-Gemisch; die Elution mit alkalischen Mitteln, z. B. Barytwasser, sollte im Falle quantitativer Untersuchungen unterbleiben. Es wurde überall, wo es zugänglich war (d. h. außer bei den Iminosäuren Prolin und Oxyprolin) die Bestimmung des Aminostickstoffs nach van Slyke der des Gesamtstickstoffs nach Kjeldahl vorgezogen, weil bei den verwendeten kleinen Mengen von Aminosäuren durch zufällig in der Bleicherde vorhandene und eluierbare stickstoffhaltige Beimengungen die Analysenwerte gefälscht werden können; zudem läßt sich der Aminostickstoff bei gleicher Genauigkeit rascher bestimmen.

Tafel 1.

| Basische Aminosäure | Wiedergefunden | Monoaminosäure      | Wiedergefunden |
|---------------------|----------------|---------------------|----------------|
| Arginin .....       | 100 %          | Glykokoll .....     | 100 %          |
|                     |                | Alanin .....        | 99 %           |
|                     |                | Valin .....         | 101 %          |
| Lysin .....         | 99 %           | Leucin .....        | 100 %          |
|                     |                | Serin .....         | 100 %          |
|                     |                | Tyrosin .....       | 100 %          |
| Histidin .....      | 100 %          | Tryptophan .....    | 98 %           |
|                     |                | Cystin .....        | 95 %           |
|                     |                | Glutaminsäure ..... | 100 %          |
|                     |                | Prolin .....        | 100 %          |
|                     |                | Oxyprolin .....     | 98 %           |
|                     |                | Methionin .....     | 100 %          |

2) Die Abtrennung des Histidins vom Arginin bzw. Lysin gelingt an der unvorbehandelten Naturerde Floridin XXF Extra: Während Histidin ins Filtrat geht, bleiben die übrigen basischen Aminosäuren unter den angegebenen Versuchsbedingungen im Adsorbens (Tafel 2).

Tafel 2.

| Aminosäure     | Wiedergefunden |
|----------------|----------------|
| Arginin .....  | 98 %           |
| Histidin ..... | 100 %          |
| Lysin .....    | 99 %           |
| Histidin ..... | 100 %          |

3) Arginin läßt sich von Lysin an der aktivierten Bleicherde Filtrol-Neutrol durch Entwickeln mit primärem Kaliumphosphat quantitativ ab-

<sup>10)</sup> Alle verwendeten Bleicherden wurden bezogen von H. Bensmann, Bremen.

trennen (Tafel 3). Vom Phosphat wird das Lysin durch Fällern mit Alkohol befreit.

**Tafel 3.**

| Aminosäure    | Wiedergefunden |
|---------------|----------------|
| Arginin ..... | 98 %           |
| Lysin .....   | 97 %           |

4) Durch Kombination der Verfahren gelingt die Aufteilung eines Gemisches in die 3 Diaminosäuren und die Monoaminosäuren. Durch Chromatographie an Floridin XXF Extra wird zunächst das Histidin gemeinsam mit den Monoaminosäuren von dem Gemisch von Arginin und Lysin getrennt; abermaliges Chromatographieren an Filtrol-Neutrol trennt einerseits das Lysin vom Arginin, andererseits das Histidin von den Monoaminosäuren (Tafel 4).

**Tafel 4.**

| Aminosäure                           | Wiedergefunden |
|--------------------------------------|----------------|
| Arginin . . . . .                    | 98 %           |
| Lysin . . . . .                      | 98 %           |
| Histidin . . . . .                   | 100 %          |
| Monoamino-säure-Gemisch *) . . . . . | 100 %          |

\* Das Monoamino-säure-Gemisch war einem Eiweißhydrolysat nachgebildet (s. Beschreibung der Versuche).

Um neben der Bestimmung des Aminostickstoffs noch eine spezifische Kontrolle zu haben, wurde die Reaktion nach J. Sakaguchi<sup>11)</sup> zur colorimetrischen Bestimmung des Arginins, das von Kapeller-Adler<sup>12)</sup> angegebene Verfahren zu der des Histidins herangezogen. Die Ergebnisse bestätigten die Bestimmungen des Aminostickstoffs nach van Slyke.

Das Verfahren erfordert etwas Erfahrung. Es arbeitet andererseits rasch und ist apparativ anspruchslos und billig. Sein größter Nachteil ist der verhältnismäßig große Verbrauch an Bleicherde, doch fällt dies bei analytischen Arbeiten nicht ins Gewicht. Über die Anwendung des Verfahrens auf verschiedene Eiweißhydrolysate, auch bei Anwendung größerer Mengen, soll noch berichtet werden.

Die Möglichkeit einer chromatographischen Trennung der einander in ihren chemischen Eigenschaften nahestehenden basischen Aminosäuren auf Grund ihrer verschiedenen Basizität beansprucht nicht allein um ihrer selbst willen einiges Interesse; die dabei gewonnenen Ergebnisse und Erfahrungen sollten auch auf zusammengesetzte Eiweiß-Spaltprodukte übertragbar sein<sup>13)</sup>. Darüber wird nach Abschluß einer im Gang befindlichen Untersuchung zu berichten sein.

<sup>11)</sup> Journ. Biochemistry 5, 25 [1925]; C. J. Weber, Journ. biol. Chem. 86, 217 [1930]; G. Klein u. K. Tauböck, Biochem. Ztschr. 251, 10 [1932].

<sup>12)</sup> Biochem. Ztschr. **264**, 131 [1933].

<sup>13)</sup> Über die Trennung basischer Peptide vergl. E. Waldschmidt-Leitz u. F. Turba, Journ. prakt. Chem. [2] 156, 55 [1940]; E. Waldschmidt-Leitz, J. Ratzer u. F. Turba, Journ. prakt. Chem. [2] 158, 72 [1941].

### Beschreibung der Versuche.

Wesentlich ist bei allen Trennungen rasches Arbeiten: Langes Stehenlassen bringt die Bleicherden zum Quellen, die Durchlässigkeit geht verloren und die Schichten des Adsorbens zeigen die Neigung, zu reißen und sich von der Wand zu lösen. Auf die Anwendung der üblichen Säulen wurde daher verzichtet und die Bleicherde in verhältnismäßig dünner Schicht auf eine Glasfritte (Schott, Typen G 2 oder 3) gebracht. Ein Zerschneiden zwischen den einzelnen Zonen der getrennten Substanzen kommt daher nicht in Frage; durch Anwendung verschiedener Elutionsmittel (Wasser,  $m/6$  Kaliumhydrophosphat, Pyridin-Schwefelsäure-Gemisch) werden die einzelnen Bestandteile einzeln und nacheinander in das Filtrat gewaschen, wobei durch Wechseln der Vorlage eine bequeme Trennung möglich wird. Empfindliche Farbreaktionen (Sakaguchi-Reaktion für Arginin, Diazo-Reaktion für Histidin, Ninhydrin-Reaktion für Lysin und die meisten übrigen Aminosäuren), die mit je 2—3 Tropfen des gerade ablaufenden Anteils des Filtrats angestellt werden, dienen als Indicatoren für den Beginn und die Beendigung der Elution. Von entscheidender Wichtigkeit ist ferner das Auswaschen aller Niederschläge und Rückstände mit heißem Wasser bis zum Verschwinden der entsprechenden Farbreaktion. Die Bleicherde-Schicht muß stets von Flüssigkeit bedeckt bleiben. Tritt trotzdem durch zu rasches Ansaugen (im allgemeinen genügt Saugen mit der Wasserstrahlpumpe bei Offenstehen eines dazwischengeschalteten 3-Weg-Hahnes; ist stärkeres Saugen notwendig, so reguliert man sehr fein durch mehr oder minder festes Verschließen mit etwas Watte oder dergl.) oder plötzliches Aufheben des Druckes ein Reißen oder Ablösen von der Wand ein, so hilft man sich, indem man einige Kubikzentimeter einer Suspension der Bleicherde in Wasser mit einer Pipette aufsaugt und unter dem Flüssigkeitsspiegel, dicht über der Oberfläche der Schicht des Adsorptionsmittels, auströmen läßt. Durch langsames Ansaugen, u. U. unter Klopfen an der Frittenwand, bewirkt man ein Auffüllen und Verstopfen der Lücken.

#### 1) Beispiele für die Abtrennung der Diaminosäuren von den Monoaminosäuren.

##### Abtrennung des Histidins von Monoaminosäuren.

3 g Filtrol-Neutrol wurden mit Wasser aufgeschlämmt und die Suspension auf eine Glasfritte (Schott, 11 G 3) gebracht. Nach etwa 5 Min. wurde ganz schwach angesaugt, bis sich eine feste, allseitig gleich hohe Schicht der Bleicherde festgesetzt hatte. Darauf wurde ein Gemisch von Histidin und der betreffenden Monoaminosäure (je etwa 5—10 mg in 2 ccm;  $p_H$  der Lösung 7.0), ohne das Adsorptionsmittel aufzuwirbeln, mit der Pipette aufgegeben und mit einigen Kubikzentimeter Wasser nachgespült. Nach dem Waschen mit 30—60 ccm Wasser war die Monoaminosäure quantitativ ins Filtrat gegangen, was am Ausbleiben einer Reaktion beim Kochen von 5 Tropfen des Durchlaufs mit 0.5 ccm einer 1-proz. Ninhydrinlösung und 0.5 ccm einer Phosphatpuffer-Lösung ( $m/3$ ,  $p_H = 7$ ) erkennbar war. Darauf wurden durch die Bleicherde 80 ccm eines Gemisches von 500 ccm 1-n.  $H_2SO_4$ , 100 ccm Pyridin und 400 ccm Wasser gesaugt und so das gesamte Histidin eluiert. Der letzte ablaufende Anteil des Eluats wie der Rückstand zeigten

keine Reaktion mit den Diazo-Reagenzien<sup>14)</sup> mehr. Das Eluat wurde in ein 250 ccm-Zentrifugenglas gebracht, mit 5 g feingepulvertem BaCO<sub>3</sub> versetzt und unter häufigem Umrühren 1 Stde. stehergelassen. Vom Niederschlag wurde durch Zentrifugieren getrennt und mit Wasser bis zum Verschwinden der Diazoreaktion ausgekocht. Die beiden, Histidin und die Monoaminosäure enthaltenden Eluate wurden im Vak. auf ein kleines Volumen gebracht. Nach Abzentrifugieren einiger Flocken (anorganische Bestandteile aus der Bleicherde) und sehr gründlichem Waschen mit heißem Wasser bis zum Verschwinden der Diazo-Reaktion bzw. der Ninhydrin-Reaktion, wurde die Analyse vorgenommen.

**Trennung Histidin-Glykokoll:** 2 ccm einer aus dem Monohydrochlorid dargestellten Lösung von Histidin (enthaltend 7.00 mg Histidin) ergaben nach van Slyke: 1.76 ccm N<sub>2</sub>, Nullversuche 0.67 ccm N<sub>2</sub> (19°, 755 mm), d. s. 0.63 mg Aminostickstoff. 2 ccm einer Glykokoll-Lösung (enthaltend 9.5 mg Glykokoll) ergaben nach van Slyke: 4.04 ccm N<sub>2</sub>, Nullversuche 0.74 ccm N<sub>2</sub> (19°, 755 mm), d. s. 1.88 mg Aminostickstoff.

Zur Trennung angewandt 2 ccm Histidin- und 2 ccm der Glykokoll-Lösung. Nach der Trennung wiedergefunden (die im folgenden angegebenen Werte sind Mittelwerte aus mehreren gesonderten Analysen): Histidin-Fraktion nach van Slyke: 1.76 ccm N<sub>2</sub>, Nullversuche 0.67 ccm N<sub>2</sub> (19°, 755 mm), d. s. 1.88 mg Aminostickstoff, entspr. 7.00 mg Histidin (100% d. Th.). Glykokoll-Fraktion nach van Slyke: 4.07 ccm N<sub>2</sub>, Nullversuche 0.74 ccm N<sub>2</sub> (19°, 755 mm); d. s. 1.89 mg Aminostickstoff, entspr. 9.5 mg Glykokoll (100% d. Th.).

**Trennung Histidin-Alanin:** 2 ccm einer Alanin-Lösung (enthaltend 9.65 mg Alanin) ergaben nach van Slyke: 3.35 ccm N<sub>2</sub>, Nullversuche 0.69 ccm N<sub>2</sub> (19°, 755 mm), d. s. 1.54 mg Aminostickstoff.

Nach der Trennung wiedergefunden: Alanin-Fraktion nach van Slyke: 3.38 ccm N<sub>2</sub>, Nullversuche 0.69 ccm N<sub>2</sub> (19°, 755 mm), d. s. 1.52 mg Aminostickstoff, entspr. 9.57 mg Alanin (99% d. Th.).

Die Histidin-Werte sind im folgenden nicht mehr angegeben; die Ausbeuten bewegen sich zwischen 98–100%.

**Trennung Histidin-Valin:** 2 ccm einer Valin-Lösung (enthaltend 9.07 mg Valin) ergaben nach van Slyke: 2.64 ccm N<sub>2</sub>, Nullversuche 0.74 ccm N<sub>2</sub> (19°, 755 mm), d. s. 1.08 mg Aminostickstoff.

Nach der Trennung wiedergefunden: Valin-Fraktion nach van Slyke: 2.66 ccm N<sub>2</sub>, Nullversuche 0.74 ccm N<sub>2</sub> (19°, 755 mm), d. s. 1.09 mg Aminostickstoff, entspr. 9.16 mg Valin (101% d. Th.).

**Trennung Histidin-Leucin:** 2 ccm einer Leucin-Lösung (enthaltend 9.08 mg Leucin) ergaben nach van Slyke: 2.44 ccm N<sub>2</sub>, Nullversuche 0.74 ccm N<sub>2</sub> (19°, 755 mm), d. s. 0.97 mg Aminostickstoff.

Nach der Trennung wiedergefunden: Leucin-Fraktion nach van Slyke: 2.45 ccm N<sub>2</sub>, Nullversuche 0.74 ccm N<sub>2</sub> (19°, 755 mm), d. s. 0.97 mg Aminostickstoff, entspr. 9.1 mg Leucin (100% d. Th.).

**Trennung Histidin-Serin:** 2 ccm einer Serin-Lösung (enthaltend 10.19 mg Serin) ergaben nach van Slyke: 3.06 ccm N<sub>2</sub>, Nullversuche 0.69 ccm N<sub>2</sub> (19°, 755 mm); d. s. 1.36 mg Aminostickstoff.

Nach der Trennung wiedergefunden: Serin-Fraktion nach van Slyke: 3.06 ccm N<sub>2</sub>; Nullversuche 0.69 ccm N<sub>2</sub> (19°, 755 mm); d. s. 1.36 mg Aminostickstoff, entspr. 10.2 mg Serin (100% d. Th.).

<sup>14)</sup> H. Pauly, Ztschr. physiol. Chem. 42, 508 [1904]; 94, 284 [1915].

Trennung Histidin-Tyrosin: 20 ccm einer Tyrosin-Lösung (enthaltend 13.58 mg Tyrosin) ergaben nach van Slyke: 2.48 ccm  $N_2$ , Nullversuche 0.63 ccm  $N_2$  (19°, 743 mm), d. s. 1.05 mg Aminostickstoff.

Nach der Trennung wiedergefunden: Tyrosin-Fraktion nach van Slyke: 2.47 ccm  $N_2$ , Nullversuche 0.63 ccm  $N_2$  (19°, 743 mm), d. s. 1.05 mg Aminostickstoff, entspr. 13.6 mg Tyrosin (100% d. Th.).

Trennung Histidin-Tryptophan: 2 ccm einer Tryptophan-Lösung (enthaltend 9.32 mg Tryptophan) ergaben nach van Slyke: 1.84 ccm  $N_2$ , Nullversuche 0.72 ccm  $N_2$  (19°, 755 mm), d. s. 0.64 mg Aminostickstoff.

Nach der Trennung wiedergefunden: Tryptophan-Fraktion nach van Slyke: 1.82 ccm  $N_2$ , Nullversuche 0.72 ccm  $N_2$  (19°, 755 mm), d. s. 0.63 mg Aminostickstoff, entspr. 9.14 mg Tryptophan (98% d. Th.).

Trennung Histidin-Cystin: 20 ccm einer Cystin-Lösung (enthaltend 2.15 mg Cystin) ergaben nach van Slyke: 0.87 ccm  $N_2$ , Nullversuche 0.65 ccm  $N_2$  (19°, 743 mm), d. s. 0.125 mg Aminostickstoff.

Nach der Trennung wiedergefunden: Cystin-Fraktion nach van Slyke: 0.86 ccm  $N_2$ , Nullversuche 0.65 ccm  $N_2$  (19°, 743 mm), d. s. 0.12 mg Aminostickstoff, entspr. 2.05 mg Cystin (95% d. Th.).

#### Abtrennung des Arginins bzw. Lysins von Monoaminosäuren.

Die Trennung erfolgt in gleicher Weise wie beim Histidin. Statt Floridin XXF Extra kann man auch hier die Bleicherde Filtrol-Neutrol verwenden. Als Kennzeichen der Beendigung der Elution bzw. zur Prüfung auf die Vollständigkeit des Auswaschens der Niederschläge wurde die Reaktion nach Sakaguchi bzw. die Ninhydrin-Reaktion verwendet.

Trennung Arginin-Glutaminsäure: 2 ccm einer Lösung von Arginin-nitrat (enthaltend 6.74 mg Arginin) ergaben nach van Slyke: 1.56 ccm  $N_2$ , Nullversuche 0.67 ccm  $N_2$  (21°, 755 mm), d. s. 0.517 mg Aminostickstoff. 2 ccm einer aus Glutaminsäure bereiteten neutralen Lösung (enthaltend 7.67 mg Glutaminsäure) ergaben nach van Slyke: 2.00 ccm  $N_2$ , Nullversuche 0.72 ccm,  $N_2$  (19°, 755 mm), d. s. 0.73 mg Aminostickstoff.

Zur Trennung angewandt 2 ccm der Arginin- und 2 ccm der Glutaminsäure-Lösung.

Nach der Trennung wiedergefunden: Arginin-Fraktion nach van Slyke: 1.56 ccm  $N_2$ , Nullversuche 0.67 ccm  $N_2$  (21°, 755 mm); d. s. 0.517 mg Aminostickstoff, entspr. 6.7 mg Arginin (100% d. Th.).

Glutaminsäure-Fraktion nach van Slyke: 2.00 ccm  $N_2$ , Nullversuche 0.72 ccm  $N_2$  (19°, 755 mm), d. s. 0.73 mg Aminostickstoff, entspr. 7.67 mg Glutaminsäure (100% d. Th.).

Trennung Arginin-Prolin: 2 ccm einer Prolin-Lösung (enthaltend 8.10 mg Prolin) ergaben nach Kjeldahl: 4.93 ccm  $n/10$ -Säure, entspr. 0.985 mg Gesamtstickstoff.

Nach der Trennung wiedergefunden: Prolin-Fraktion nach Kjeldahl: 4.93 ccm  $n/10$ -Säure, d. s. 0.985 mg Gesamtstickstoff, entspr. 8.1 mg Prolin (100% d. Th.).

Trennung Lysin-Oxyprolin: 2 ccm einer aus dem Dihydrochlorid bereiteten Lösung von Lysin (enthaltend 5.55 mg Lysin) ergaben nach van Slyke (30 Min. geschüttelt): 2.58 ccm  $N_2$ , Nullversuche 0.73 ccm  $N_2$  (21°, 752 mm), d. s. 1.064 mg Aminostickstoff. 2 ccm einer Lösung von Oxyprolin (enthaltend 8.94 mg Oxyprolin) ergaben nach Kjeldahl 4.81 ccm  $n/10$ -Säure, d. s. 0.963 mg Gesamtstickstoff.

Nach der Trennung wiedergefunden: Lysin-Fraktion nach van Slyke: 2.56 ccm  $N_2$ , Nullversuche 0.73 ccm  $N_2$  (21°, 752 mm), d. s. 1.05 mg Aminostickstoff, entspr.

5.49 mg Lysin (99% d. Th.). Oxyprolin-Fraktion nach Kjeldahl: 4.87 ccm  $n_{70}^{\circ}$ -Säure, d. s. 9.85 mg Gesamtstickstoff, entspr. 9.15 mg Oxyprolin (102% d. Th.).

Trennung Lysin-Methionin: 2 ccm einer Lösung von Methionin (enthaltend 9.58 mg Methionin) ergaben nach van Slyke: 2.30 ccm  $N_2$ , Nullversuche 0.74 ccm  $N_2$  (22°, 757 mm), d. s. 0.899 mg Aminostickstoff.

Nach der Trennung wiedergefunden: Methionin-Fraktion nach van Slyke: 2.30 ccm  $N_2$ , Nullversuche 0.74 ccm  $N_2$  (22°, 757 mm), d. s. 0.899 mg Aminostickstoff, entspr. 9.58 mg Methionin (100% d. Th.).

## 2) Beispiel einer Trennung Arginin-Histidin.

12 g Floridin XXF Extra werden in Wasser aufgeschlämmt und auf eine Fritte 17 G 2 gebracht. Auf die festgesaugte, eben von Flüssigkeit bedeckte Bleicherde-Schicht wird ein Gemisch von etwa 20 mg Arginin und etwa 20 mg Histidin in je 5 ccm Wasser gebracht. Nach dem Spülen mit wenig Wasser wird durch Waschen mit 200 ccm Wasser das gesamte Histidin eluiert, was etwa 1 Stde. in Anspruch nimmt. Nach dem Verschwinden der Diazo-Reaktion in den letzten Anteilen des Filtrats folgt ein Zwischenlauf, der keine Sakaguchi-Reaktion zeigt. Man wechselt die Saugflasche und eluiert das Arginin mit 100 ccm des angegebenen Pyridin-Schwefelsäure-Gemisches, entfernt die Schwefelsäure mit  $BaCO_3$  und verfährt weiter, wie oben angegeben. Die eingeeengten, Histidin und Arginin enthaltenden Filtrate wurden auf 25 ccm aufgefüllt und zur Analyse 10 ccm entnommen.

2 ccm einer Lösung von Argininnitrat (enthaltend 6.7 mg Arginin) ergaben nach van Slyke: 1.59 ccm  $N_2$ , Nullversuche 0.70 ccm  $N_2$  (19°, 753 mm), d. s. 0.514 mg Aminostickstoff.

2 ccm einer aus dem Monohydrochlorid bereiteten Histidin-Lösung (enthaltend 7.00 mg Histidin) ergaben nach van Slyke: 1.79 ccm  $N_2$ , Nullversuche 0.70 ccm  $N_2$  (19°, 753 mm), d. s. 0.63 mg Aminostickstoff.

Nach der Trennung wiedergefunden: Arginin-Fraktion nach van Slyke: 1.57 ccm  $N_2$ , Nullversuche 0.70 ccm  $N_2$  (19°, 753 mm), d. s. 5.04 mg Aminostickstoff, entspr. 6.57 mg Arginin (98% d. Th.).

Histidin-Fraktion nach van Slyke: 1.79 ccm  $N_2$ , Nullversuche 0.70 ccm  $N_2$  (19°, 753 mm), d. s. 0.63 mg Aminostickstoff, entspr. 7.00 mg Histidin (100% d. Th.).

Die Trennung Lysin-Histidin verläuft analog; an die Stelle der Sakaguchi-Reaktion tritt die Ninhydrin-Reaktion. Zur Analyse wurden nach der Trennung von dem Gesamtvolumen von 25 ccm wie oben 10 ccm entnommen.

2 ccm einer aus dem Dihydrochlorid bereiteten Lösung von Lysin (enthaltend 5.55 mg Lysin) ergaben nach van Slyke (30 Min. geschüttelt): 2.58 ccm  $N_2$ , Nullversuche 0.73 ccm  $N_2$  (19°, 749 mm), d. s. 1.066 mg Aminostickstoff.

2 ccm einer aus dem Monohydrochlorid hergestellten Histidin-Lösung (enthaltend 7.00 mg Histidin) ergaben nach van Slyke: 1.79 ccm  $N_2$ , Nullversuche 0.70 ccm  $N_2$  (19°, 753 mm), d. s. 0.63 mg Aminostickstoff.

Nach der Trennung wiedergefunden: Lysin-Fraktion (entnommen 10 ccm) nach van Slyke: 2.56 ccm  $N_2$ , Nullversuche 0.73 ccm  $N_2$  (19°, 749 mm), d. s. 1.05 mg Aminostickstoff, entspr. 5.49 mg Lysin (99% d. Th.).

Histidin-Fraktion (entnommen 10 ccm) nach van Slyke: 1.79 ccm  $N_2$ , Nullversuche 0.70 ccm  $N_2$  (19°, 753 mm), d. s. 0.63 mg Aminostickstoff, entspr. 7.00 mg Histidin (100% d. Th.).



## 3) Beispiel einer Trennung Arginin-Lysin.

25 g Filtrol-Neutrol wurden in  $m/6$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Lösung suspendiert, und auf einer Fritte (Schott 17 G 2) nach  $\frac{1}{2}$ -stdg. Stehenlassen durch schwaches Ansaugen eine feste Schicht ausgebildet. Danach wurden etwa 25 mg Arginin und 25 mg Lysin in je 5 ccm aufgegeben und mit der Phosphat-Lösung bis eben zum Eintreten einer Ninhydrin-Reaktion in den ablaufenden Anteilen des Filtrats gewaschen (etwa 100 ccm). Dann wurde die Vorlage gewechselt und mit etwa 200 ccm  $m/6$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$  alles Lysin eluiert. Der Zwischenlauf war frei von Aminosäuren. Das Arginin wurde wieder mit 100 ccm der Pyridin- $\text{H}_2\text{SO}_4$ -Mischung eluiert und, wie oben angegeben, weiter verarbeitet. Die phosphathaltige Lysin-Fraktion wurde im Vak. soweit als möglich eingeeengt. Durch Eintauchen des Gefäßes in ein siedendes Wasserbad wurde der Rückstand völlig klar gelöst, nötigenfalls durch Hinzufügen von wenig heißem Wasser und einigen Tropfen Salzsäure. Dann wurde mit dem 10-fachen Volumen Alkohol das Phosphat ausgefällt und nach dem Erkalten abfiltriert und mit Alkohol nachgewaschen. Gibt ein kleiner Teil des Rückstandes in genau neutraler Lösung bei längerem Kochen mit 5 Tropfen einer 1-proz. Ninhydrin-Lösung mehr als eine ganz schwache Färbung, so muß der trockne Rückstand abermals in möglichst wenig Wasser klar gelöst und mit dem 10-fachen Volumen Alkohol ausgefällt werden. Die alkohol. Lysin-Lösung wurde im Vak. eingedampft und das Konzentrat zur Analyse mit Wasser auf 25 ccm gebracht.

2 ccm einer aus dem Dihydrochlorid bereiteten Lösung von Lysin (enthaltend 5.52 mg Lysin) ergaben nach van Slyke (30 Min. geschüttelt): 2.62 ccm  $\text{N}_2$ , Nullversuche 0.76 ccm  $\text{N}_2$  (24°, 752 mm), d. s. 1.058 mg Aminostickstoff.

2 ccm einer Lösung von Argininnitrat (enthaltend 7.19 mg Arginin) ergaben nach van Slyke: 1.69 ccm  $\text{N}_2$ , Nullversuche 0.72 ccm  $\text{N}_2$  (24°, 752 mm), d. s. 0.55 mg Aminostickstoff.

Nach der Trennung wiedergefunden: Lysin-Fraktion (entnommen 10 ccm) nach van Slyke: 2.58 ccm  $\text{N}_2$ , Nullversuche 0.76 ccm  $\text{N}_2$  (24°, 752 mm), d. s. 1.035 mg Aminostickstoff, entspr. 5.40 mg Lysin (98 % d. Th.).

Arginin-Fraktion nach van Slyke: 1.68 ccm  $\text{N}_2$ , Nullversuche 0.72 ccm  $\text{N}_2$  (24°, 752 mm), d. s. 0.55 mg Aminostickstoff, entspr. 7.12 mg Arginin (99 % d. Th.).

## 4) Beispiel einer Trennung Arginin-Lysin-Histidin-Monoamino-säure.

Aus einer Schicht von 12 g Floridin XXF Extra wurden mit etwa 200 ccm Wasser 25 mg Histidin und 25 mg Leucin quantitativ eluiert, während die angewandten 25 mg Arginin und 25 mg Lysin im Adsorptionsmittel verblieben. Nach dem Eindampfen des Filtrats auf 10–20 ccm wurde das Histidin durch Hindurchsaugen des Gemisches durch 5 g Filtrol-Neutrol und Waschen mit etwa 100 ccm Wasser vom Leucin, das im Filtrat wiedergefunden wurde, getrennt. Die Elution des Histidins erfolgte mit 100 ccm Pyridin- $\text{H}_2\text{SO}_4$ -Gemisch. Das Arginin und Lysin wurde mit 100 ccm Pyridin- $\text{H}_2\text{SO}_4$  eluiert, die Schwefelsäure mit  $\text{BaCO}_3$  und das Pyridin durch mehrmaliges Eindampfen im Vak. bis zum Verschwinden der Pyridin-Reaktion (A. Brüning u. M. Schnetka<sup>15)</sup>) entfernt. Die Kolben wurden besonders

<sup>15)</sup> Chem.-Ztg. 58, 156 [1934].

sorgfältig mit heißem Wasser ausgespült, um Adsorption an ausgefallenen unlöslichen Teilchen aus der Bleicherde zu verhindern. Dann wurde das Arginin vom Lysin, wie oben beschrieben, getrennt. Zur Analyse wurden die 4 Fraktionen auf 25 ccm aufgefüllt und jeweils 10 ccm entnommen.

2 ccm einer aus dem Dihydrochlorid bereiteten Lösung von Lysin (enthaltend 6.159 mg Lysin) ergaben nach van Slyke (30 Min. geschüttelt): 2.74 ccm  $N_2$ , Nullversuche 0.67 ccm  $N_2$  (21°, 747 mm), d. s. 1.181 mg Aminostickstoff.

2 ccm einer Lösung von Arginin-nitrat (enthaltend 7.37 mg Arginin) ergaben nach van Slyke: 1.59 ccm  $N_2$ , Nullversuche 0.60 ccm  $N_2$  (21°, 747 mm), d. s. 0.56 mg Aminostickstoff.

2 ccm aus dem Monohydrochlorid hergestellten Histidin-Lösung (enthaltend 6.89 mg Histidin) ergaben nach van Slyke: 1.69 ccm  $N_2$ , Nullversuche 0.60 ccm  $N_2$  (21°, 747 mm), d. s. 0.62 mg Aminostickstoff.

2 ccm einer Leucin-Lösung (enthaltend 9.08 mg Leucin) ergaben nach van Slyke: 2.30 ccm  $N_2$ , Nullversuche 0.60 ccm  $N_2$  (21°, 747 mm), d. s. 0.97 mg Aminostickstoff.

Nach der Trennung wiedergefunden: Lysin-Fraktion (entnommen 10 ccm) nach van Slyke: 2.70 ccm  $N_2$ , Nullversuche 0.67 ccm  $N_2$  (21°, 747 mm), d. s. 1.16 mg Aminostickstoff, entspr. 6.04 mg Lysin (98% d. Th.).

Arginin-Fraktion nach van Slyke (entnommen 10 ccm): 1.57 ccm  $N_2$ , Nullversuche 0.60 ccm  $N_2$  (21°, 747 mm), d. s. 0.55 mg Aminostickstoff, entspr. 7.23 mg Arginin (98% d. Th.).

Colorimetrische Bestimmung: Entnommen 2 ccm der Lösung, auf 25 ccm aufgefüllt; davon 1 ccm (enthaltend 58  $\gamma$  Arginin) zur Bestimmung.

Schichthöhe 40, Filter 53: Extinktion 1.16; entsprechend 57  $\gamma$  Arginin.

Histidin-Fraktion (entnommen 10 ccm) nach van Slyke: 1.69 ccm  $N_2$ , Nullversuche 0.60 ccm  $N_2$  (21°, 747 mm), d. s. 0.62 mg Aminostickstoff, entspr. 6.89 mg Histidin (100% d. Th.).

Colorimetrische Bestimmung: Entnommen 3 ccm der Lösung, auf 10 ccm aufgefüllt; davon 2 ccm (enthaltend 413  $\gamma$  Histidin) zur Bestimmung.

Schichthöhe 40, Filter 530: Extinktion 1.08; entsprechend 410  $\gamma$  Histidin.

Leucin-Fraktion (entnommen 10 ccm) nach van Slyke: 2.30 ccm  $N_2$ , Nullversuche 0.60 ccm  $N_2$  (21°, 747 mm), d. s. 0.97 mg Aminostickstoff, entspr. 9.08 mg Leucin (100% d. Th.).

Eine ähnliche Trennung wurde statt mit Leucin mit einem Gemisch von Monoaminosäuren durchgeführt. In einem Volumen von 100 ccm waren enthalten: 9.65 mg Alanin, 54.42 mg Valin, 72.64 mg Leucin, 75.25 mg Glutaminsäure, 20.4 mg Serin, 8.16 mg Tyrosin, 3.22 mg Cystin und 18.64 mg Tryptophan.

Von dieser Lösung wurden 20 ccm zur Trennung verwendet: 2 ccm des Aminosäure-Gemisches ergaben nach van Slyke: 1.71 ccm  $N_2$ , Nullversuche 0.60 ccm  $N_2$  (24°, 752 mm), d. s. 0.555 mg Aminostickstoff.

Nach der Trennung wiedergefunden: Von einem Volumen von 20 ccm entnommen 2 ccm: nach van Slyke: 1.71 ccm  $N_2$ , Nullversuche 0.60 ccm  $N_2$  (24°, 752 mm), d. s. 0.555 mg Aminostickstoff (100% d. Th.).

Hrn. Prof. E. Waldschmidt-Leitz habe ich für die Möglichkeit, diese Arbeit ausführen zu können, auch an dieser Stelle ergebenst zu danken.