

47. Fritz Turba und Margit Richter: Über das Adsorptionsverhalten von Eiweiß-Spaltprodukten, II. Mitteil.: Chromatographie der Aminodicarbonsäuren an Aluminiumoxyd.

[Aus d. Chem. Institut d. Deutschen Karls-Universität in Prag.]
(Eingegangen am 2. Februar 1942.)

Die besondere Eignung saurer Adsorptionsmittel, insbesondere bestimmter Bleicherden, für das Studium des Adsorptionsverhaltens der basischen Aminosäuren¹⁾ leitete uns zur Annahme, daß sich für die Isolierung und Trennung der sauren Aminosäuren basische Adsorptionsmittel bewähren müßten. Schon früher haben A. Lottermoser und K. Edelmann²⁾ Aluminiumoxyd als Adsorptionsmittel für Amine und Aminosäuren benutzt; aus den Adsorptionsisothermen leiten die Autoren die Notwendigkeit ab, praktische Versuche über die Möglichkeit einer chromatographischen Trennung anzustellen: denn Voraussagen über das Verhalten der Aminosäuren in der Adsorptionssäule schienen unmöglich.

Unvorbehandeltes Aluminiumoxyd erwies sich indes nach unseren Versuchen als zu wenig aktiv; selbst die ziemlich sauren Dicarbonsäuren Glutaminsäure und Asparaginsäure liefen ebenso wie die übrigen Aminosäuren glatt durch die Säule. Vorbehandeln mit Mineralsäuren, z. B. Schütteln mit 1-n. Salzsäure, wie es schon gelegentlich zur Aktivierung von Aluminiumoxyd angewendet wurde (R. Kuhn und Th. Wieland³⁾, G. M. Schwab und M. Dattler⁴⁾), selbst mit 1-n. Essigsäure führte nicht zum Ziel; denn obwohl z. B. Glutaminsäure stark fixiert wurde, lief ein kleiner Teil (etwa 5 %) sofort durch die Säule. Erst Vorbehandeln mit Essigsäure-Aacetatpuffer vom pH 3.3, also in der Nähe des isoelektrischen Punktes, ermöglichte die spezifische und völlig quantitative Abtrennung von den Amino-monocarbonsäuren, die schon beim Waschen mit Wasser (bzw. n/20-Essigsäure-Aacetatpuffer, pH 3.3) ins Filtrat gingen.

Wie aus Tafel 1 zu entnehmen ist, gelingt es so, die Monoamino-monocarbonsäuren und die Diamino-monocarbonsäuren in durchweg nahezu 100-proz. Ausbeute von den Amino-dicarbonsäuren Glutaminsäure und Asparaginsäure zu trennen; die letzteren wurden nach Elution mit verdünntem Alkali gleichfalls quantitativ wiedergefunden:

Tafel 1.

Amino-dicarbonsäure	Wiedergefunden	Amino-monocarbonsäure	Wiedergefunden
Asparaginsäure	100 %	Glykokoll	99 %
Glutaminsäure	100 %	Alanin	99 %
		Leucin	100 %
		Serin	100 %
		Arginin	100 %
		Histidin	100 %
		Tryptophan	100 %
		Prolin	100 %
		Cystin	98 %
		Methionin	98 %

¹⁾ F. Turba, B. 74, 1829 [1941].

²⁾ Kolloid-Ztschr. 83, 262 [1938].

³⁾ B. 73, 968 [1940].

⁴⁾ Angew. Chem. 50, 691 [1937].

Die ausgeprägte Spezifität des Adsorptionsvorgangs ermöglicht darüber hinaus eine Trennung der beiden in ihrer Struktur so ähnlichen Dicarbon-säuren Asparaginsäure und Glutaminsäure. Unter den angegebenen Versuchsbedingungen wird die Glutaminsäure durch 1-*n*. Essigsäure-Acetatpuffer, p_{H} 3.3, quantitativ (99%) ins Filtrat gewaschen, während die Asparaginsäure ebenfalls quantitativ (100%) im Adsorbens verbleibt und hieraus mit verdünntem Alkali eluiert werden kann.

Die Möglichkeit, die wichtigen sauren Aminosäuren von den übrigen Aminosäuren und voneinander zu trennen, dürfte trotz der vorhandenen guten Verfahren besonders bei kleinen Mengen die Lösung bestimmter Fragen erleichtern. Trotzdem liegt unser Interesse hauptsächlich auf präparativem Gebiet; denn wir beabsichtigen, die so gewonnenen Erfahrungen im Verein mit chemischen Methoden zur Trennung zusammengesetzter Eiweiß-Abbauprodukte anzuwenden. Darum legen wir zum Unterschied von A. Tiselius⁵⁾, der ein geistreiches Verfahren zur Adsorptionsanalyse von Aminosäuren und Peptiden mittels Aktivkohle entwickelt hat, Wert auf eine tatsächlich erfolgte Trennung, nicht auf einen Trennungseffekt (aus dem die Anzahl der Komponenten und rechnerisch deren Konzentration zu entnehmen ist). Auch beschränken wir uns mit Absicht nicht auf ein Adsorptionsmittel; denn die Ausführung einer Trennung der Vielzahl der Monoaminosäuren ist, wie wir in anderem Zusammenhang eingehend zeigen wollen, erst nach einer Aufteilung in verschiedene Gruppen nach dem Verhalten gegen mehrere Adsorbenzien unterschiedlicher Spezifität aussichtsreich.

Beschreibung der Versuche.

Als Adsorptionsmittel verwendeten wir in der Regel das nach Brockmann standardisierte Aluminiumoxyd wegen seiner besonders gleichmäßigen Körnung; indes ist „Aluminium oxydum anhydricum“ ebenfalls geeignet. Zur leichteren Reproduzierbarkeit haben wir wie in unseren früheren Versuchen die Menge Adsorptionsmittel nicht nach Höhe und Durchmesser der Adsorptionssäule, sondern dem Gewicht nach festgelegt. Die angemessenste Filtriergeschwindigkeit zeigten Säulen, deren Höhe 2–3-mal so groß war wie ihr Durchmesser; sie soll etwa 30 Tropfen je Min. betragen. Als Indicator für den Verlauf der Elution diente uns die Ninhydrin-Reaktion: 3 Tropfen (bei Prüfung auf Abwesenheit von Aminosäuren im Zwischenlauf 0.5 ccm) des eben ablaufenden Anteils wurden neutralisiert, mit 5 Tropfen $m/3$ -Phosphatpuffer (p_{H} 7.0) versetzt und mit 3 Tropfen 1-proz. Ninhydrin-Lösung auf ein sehr kleines Volumen eingedampft. Ein Reißen der Säule lässt sich mit Sicherheit durch Verwendung luftfreien Wassers und kurzes Erhitzen einer wässr. Suspension des Aluminiumoxyds im siedenden Wasserbad vermeiden.

1) Beispiele für die Abtrennung der Glutaminsäure bzw. Asparaginsäure von den Monocarbonsäuren.

5 g Aluminiumoxyd wurden mit 10 ccm 1-*n*. Essigsäure-Acetatpuffer (p_{H} 3.3) versetzt und 10 Min. geschüttelt; die überstehende Flüssigkeit wurde dann sorgfältig abgesaugt, das Aluminiumoxyd 2-mal mit je 10 ccm Wasser geschüttelt und dekantiert. Darauf wurde es mit 20 ccm Wasser

⁵⁾ Ark. Kem., Mineral. Geol., Ser. B. 15, Nr. 6, 1 [1941]; 14, Nr. 22, 1 [1941].

in das Adsorptionsrohr gespült und zur Ausbildung einer festen Säule angesaugt. Nun gab man, ohne das Adsorptionsmittel aufzuwirbeln, eine Lösung von je 10—15 mg der Dicarbonsäure und der Monocarbonsäure in je 2 ccm Wasser auf und spülte mit 30—50 ccm Wasser in 10-ccm-Anteilen nach. Die Säule muß stets von Flüssigkeit bedeckt bleiben. Nach dem Verschwinden der Ninhydrin-Reaktion im ablaufenden Anteil des Eluats der Monocarbonsäure wurde eben zur Trockne gesaugt, die Säule auf eine Fritte gestoßen, mit 10 ccm $n/20$ -NaOH das Adsorptionsrohr nachgespült und das Aluminiumoxyd mit weiteren 40 ccm $n/20$ -NaOH auf der Fritte verrührt (die Suspension reagiert dann alkalisch), einige Minuten stehengelassen und abgesaugt. Das Verrühren, Stehenlassen und Absaugen wurde mit je 10 ccm $n/20$ -NaOH noch 5-mal wiederholt. Danach soll der ablaufende Anteil des Eluats aminosäurefrei sein. Das alkalische Filtrat wurde mit starker Salzsäure deutlich mineralsauer gemacht und im Vak. (bei 40° Badtemperatur) wiederholt völlig zur Trockne verdampft, der Rückstand in Wasser aufgenommen und wieder verdampft. Nach 3-maligem Eindampfen zeigte die Lösung des Rückstandes etwa p_{H} 5. Dann wurde der Amino-Stickstoff nach van Slyke bestimmt. Das Eluat der Monocarbonsäuren wurde im Vak. weitgehend eingeengt und darauf die Analyse nach van Slyke vorgenommen.

Bei schwerlöslichen Aminosäuren (z. B. Cystin) wurden der Analysenlösung einige Tropfen Essigsäure-Acetatpuffer (p_{H} 3.3) zugesetzt und statt mit Wasser mit $n/20$ -Essigsäure-Acetatpuffer (p_{H} 3.3) eluiert; dies verhindert eine Abscheidung in der Säule, die sonst zu niedrige Ergebnisse verursacht.

Trennung Glutaminsäure—Glykokoll: 2 ccm einer Lösung von Glutaminsäure (enthaltend 12.21 mg Glutaminsäure) ergaben nach van Slyke: 2.62 ccm N_2 , Nullversuche 0.62 ccm N_2 (18°, 752 mm), d. s. 1.16 mg Aminostickstoff. 2 ccm einer aus Glykokoll bereiteten Lösung (enthaltend 9.44 mg Glykokoll) ergaben nach van Slyke: 3.85 ccm N_2 , Nullversuche 0.58 ccm N_2 (20°, 750 mm), d. s. 1.88 mg Aminostickstoff.

Zur Trennung angewandt 2 ccm der Glutaminsäure- und 2 ccm der Glykokoll-Lösung. Nach der Trennung wiedergefunden (die im folgenden angegebenen Werte sind Mittelwerte aus mehreren gesonderten Analysen): Glutaminsäure-Fraktion nach van Slyke: 2.62 ccm N_2 , Nullversuche 0.62 ccm N_2 (18°, 752 mm), d. s. 1.16 mg Aminostickstoff, entsprechend 12.21 mg Glutaminsäure (100 % d. Th.).

Glykokoll-Fraktion nach van Slyke: 3.82 ccm N_2 , Nullversuche 0.58 ccm N_2 (20°, 750 mm), d. s. 1.86 mg Aminostickstoff, entspr. 9.35 mg Glykokoll (99 % d. Th.).

Die Glutaminsäure-Werte sind im folgenden nicht mehr angegeben; die Ausbeuten bewegen sich immer um 100 %.

Trennung Glutaminsäure—Alanin: 2 ccm einer Alanin-Lösung (enthaltend 9.50 mg Alanin) ergaben nach van Slyke: 3.18 ccm N_2 , Nullversuche 0.58 ccm N_2 (20°, 750 mm), d. s. 1.48 mg Aminostickstoff.

Nach der Trennung wiedergefunden: Alanin-Fraktion nach van Slyke: 3.15 ccm N_2 , Nullversuche 0.58 ccm N_2 (20°, 750 mm), d. s. 1.47 mg Aminostickstoff, entspr. 9.40 mg Alanin (99 % d. Th.).

Trennung Glutaminsäure—Leucin: 2 ccm einer Lösung von Leucin (enthaltend 11.50 mg Leucin) ergaben nach van Slyke: 2.70 ccm N_2 , Nullversuche 0.58 ccm N_2 (19°, 753 mm), d. s. 1.228 mg Aminostickstoff.

Nach der Trennung wiedergefunden: Leucin-Fraktion nach van Slyke: 2.70 ccm N_2 , Nullversuche 0.58 ccm N_2 (19°, 753 mm), d. s. 1.228 mg Aminostickstoff entspr. 11.50 mg Leucin (100 % d. Th.).

Trennung Glutaminsäure-Serin: 2 ccm einer Serin-Lösung (enthaltend 10.24 mg Serin) ergaben nach van Slyke: 2.92 ccm N₂, Nullversuche 0.58 ccm N₂ (20°, 750 mm), d. s. 1.36 mg Aminostickstoff.

Nach der Trennung wiedergefunden: Serin-Fraktion nach van Slyke: 2.92 ccm N₂, Nullversuche 0.58 ccm N₂ (20°, 750 mm), d. s. 1.36 mg Aminostickstoff, entspr. 10.24 mg Serin (100 % d. Th.).

Trennung Glutaminsäure-Arginin: 2 ccm einer Arginin-Lösung (enthaltend 7.00 mg Arginin) ergaben nach van Slyke: 1.56 ccm N₂, Nullversuche 0.58 ccm N₂ (20°, 750 mm), d. s. 0.560 mg Aminostickstoff.

Nach der Trennung wiedergefunden: Arginin-Fraktion nach van Slyke: 1.56 ccm N₂, Nullversuche 0.58 ccm N₂ (20°, 750 mm), d. s. 0.56 mg Aminostickstoff, entspr. 7.00 mg Arginin (100 % d. Th.).

Trennung Asparaginsäure—Histidin: 2 ccm einer Lösung von Asparaginsäure (enthaltend 9.47 mg Asparaginsäure) ergaben nach van Slyke: 2.34 ccm N₂, Nullversuche 0.62 ccm N₂ (19°, 753 mm), d. s. 0.996 mg Aminostickstoff. 2 ccm einer Histidin-Lösung (enthaltend 7.42 mg Histidin) ergaben nach van Slyke: 1.74 ccm N₂, Nullversuche 0.58 ccm N₂ (19°, 750 mm) d. s. 0.67 mg Aminostickstoff.

Nach der Trennung wiedergefunden: Asparaginsäure-Fraktion nach van Slyke: 2.34 ccm N₂, Nullversuche 0.62 ccm N₂ (19°, 753 mm), d. s. 0.996 mg Aminostickstoff, entspr. 9.47 mg Asparaginsäure (100 % d. Th.). Histidin-Fraktion nach van Slyke: 1.74 ccm N₂, Nullversuche 0.58 ccm N₂ (19°, 750 mm), d. s. 0.67 mg Aminostickstoff, entspr. 7.42 mg Histidin (100 % d. Th.).

Die Asparaginsäure-Werte sind im folgenden nicht mehr angeführt; sie ergaben jeweils 100 %.

Trennung Asparaginsäure-Tryptophan: 2 ccm einer Tryptophan-Lösung (enthaltend 8.74 mg Tryptophan) ergaben nach van Slyke: 1.65 ccm N₂, Nullversuche 0.62 ccm N₂ (19°, 757 mm), d. s. 0.60 mg Aminostickstoff.

Nach der Trennung wiedergefunden: Tryptophan-Fraktion nach van Slyke: 1.65 ccm N₂, Nullversuche 0.62 ccm N₂ (19°, 757 mm), d. s. 0.60 mg Aminostickstoff, entspr. 8.74 mg Tryptophan (100 % d. Th.).

Trennung Asparaginsäure—Prolin: 2 ccm einer Prolin-Lösung (enthaltend 8.10 mg Prolin) ergaben nach Kjeldahl: 4.93 ccm n/70-Säure, entspr. 0.985 mg Gesamtstickstoff.

Nach der Trennung wiedergefunden: Prolin-Fraktion nach Kjeldahl: 4.93 ccm n/70-Säure, d. s. 0.985 mg Gesamtstickstoff, entspr. 8.1 mg Prolin (100 % d. Th.).

Trennung Asparaginsäure—Cystin: 15 ccm einer Lösung von Cystin (enthaltend 5.37 mg Cystin) ergaben nach van Slyke: 1.15 ccm N₂, Nullversuche 0.60 ccm N₂ (19°, 753 mm), d. s. 0.319 mg Aminostickstoff.

Nach der Trennung wiedergefunden: Cystin-Fraktion nach van Slyke: 1.14 ccm N₂, Nullversuche 0.60 ccm N₂ (19°, 753 mm), d. s. 0.313 mg Aminostickstoff, entspr. 5.27 mg Cystin (98 % d. Th.).

Trennung A: Asparaginsäure-Methionin: 1 ccm einer Methionin-Lösung (enthaltend 4.87 mg Methionin) ergab nach van Slyke: 1.40 ccm N₂, Nullversuche 0.60 ccm N₂ (19°, 749 mm), d. s. 0.46 mg Aminostickstoff.

Nach der Trennung wiedergefunden: Methionin-Fraktion nach van Slyke: 1.38 ccm N₂, Nullversuche 0.60 ccm N₂ (19°, 749 mm), d. s. 0.45 mg Aminostickstoff, entspr. 4.78 mg Methionin (98 % d. Th.).

2) Beispiel einer Trennung Asparaginsäure-Glutaminsäure.

30 g Aluminiumoxyd wurden mit 1-n. Essigsäure-Acetatpuffer (pH 3.3) versetzt und 10 Min. im Wasserbad (50°) belassen; darauf wurde

die überstehende Lösung abgesaugt und das Aluminiumoxyd 2-mal mit je 60 ccm Wasser gewaschen. Mit 120 ccm Wasser spülte man das Adsorbens in das Adsorptionsrohr. Darauf wurden je 1 ccm einer Lösung von etwa 5 mg Glutaminsäure und Asparaginsäure, die mit einigen Tropfen 1-n. Essigsäure-Acetatpuffer (p_{H} 3.3) versetzt waren, aufgegeben. Nach den Waschen mit 160 ccm 1-n. Essigsäure-Acetatpuffer (p_{H} 3.3; Temp. 50°) war alle Glutaminsäure ins Filtrat gegangen; das überschüss. Puffergemisch wurde mit 30 ccm Wasser ausgewaschen. Der letzte Anteil des ablaufenden Puffers wie auch die 30 ccm des zum Waschen verwendeten Wassers waren aminosäurefrei. Die Säule wurde eben zur Trockne gesaugt, aus dem Adsorptionsrohr auf eine Fritte gebracht; mit 30 ccm $n/2$ -NaOH verrührt, wenige Minuten stehen gelassen und abgesaugt. Die Elution wurde mit $n/10$ -NaOH, welche in 5 Anteilen zu je 30 ccm aufgegeben wurde, vervollständigt. Beide Eluate wurden mit Salzsäure deutlich mineralsauer gemacht und weiter wie oben beschrieben verfahren.

1 ccm einer Lösung von Glutaminsäure (enthaltend 6.08 mg Glutaminsäure) ergab nach van Slyke: 1.64 ccm N₂. Nullversuch 0.63 ccm N₂ (20°, 747 mm), d. s. 0.578 mg Aminostickstoff. 1 ccm einer Lösung von Asparaginsäure (enthaltend 4.73 mg Asparaginsäure) ergab nach van Slyke: 1.50 ccm N₂, Nullversuche 0.63 ccm N₂ (20°, 747 mm), d. s. 0.50 mg Aminostickstoff.

Nach der Trennung wiedergefunden: Glutaminsäure-Fraktion nach van Slyke: 1.63 ccm N₂, Nullversuche 0.63 ccm N₂ (20°, 747 mm), d. s. 0.572 mg Aminostickstoff, entspr. 6.02 mg Glutaminsäure (99% d. Th.). Asparaginsäure-Fraktion nach van Slyke: 1.50 ccm N₂, Nullversuche 0.63 ccm N₂ (20°, 747 mm), d. s. 0.50 mg Aminostickstoff, entspr. 4.73 mg Asparaginsäure (100% d. Th.).

48. Friedrich Asinger und Franz Ebeneder: Zur Kenntnis der Produkte der gemeinsamen Einwirkung von Schwefeldioxyd und Chlor auf aliphatische Kohlenwasserstoffe im ultravioletten Licht, III. Mitteilung*): Über die Sulfochlorierung von Isobutan und die Isomerenbildung bei der Sulfochlorierung und Chlorierung gasförmiger Kohlenwasserstoffe.

Aus d. Hauptlaborat. der Ammoniakwerk Merseburg G. m. b. H., Leuna Werke.[†]
(Eingegangen am 6. Februar 1942.)

I) Die Produkte der gemeinsamen Einwirkung von Schwefeldioxyd und Chlor auf Isobutan in Tetrachlorkohlenstofflösung.

Isobutan bildet bei der Sulfochlorierung nur ein einziges Monosulfochlorid, nämlich *prim.* Isobutansulfochlorid $(\text{CH}_3)_2\text{CH} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{SO}_2\text{Cl}$, im Gegensatz zum Propan und *n*-Butan, bei deren Sulfochlorierung beide isomeren Monosulfochloride entstehen. Während die direkte Chlorierung am tertiären Kohlenstoff noch glatt vor sich geht, wird die Sulfochlorierung hier, wahrscheinlich aus sterischen Gründen, verhindert.

Bei der Aufarbeitung der Reaktionsprodukte erhält man in etwa 75-proz. Ausbeute (berechnet auf die gebildeten schwefelhaltigen Verbindungen) eine bei 60—64°/3.5 mm siedende Isobutanmonosulfochlorid-Fraktion. Dies-

*) I. Mitteil.: B. 75, 34 [1942]; II. Mitteil.: B. 75, 42 [1942].