

GÜNTER KRESZE und VOLKMAR SCHMIDT
BASENANALOGES VERHALTEN VON AMINOSÄUREN
IN TRIFLUORESSIGSÄURE

Aus dem Organisch-Chemischen Institut
der Technischen Universität Berlin, Berlin-Charlottenburg

(Eingegangen am 6. Mai 1957)

Aminosäuren und Peptide lassen sich durch Leitfähigkeitstiteration in wasserfreier Trifluoressigsäure gut bestimmen. Grenzen und einige Anwendungsmöglichkeiten der Methode werden geschildert.

Für die Bestimmung von Aminosäuren durch Titration sind viele Methoden vorgeschlagen worden; eine kritische Zusammenstellung geben A. J. P. MARTIN und R. L. M. SYNGE¹⁾. Bei vielen dieser Verfahren wird durch Wahl des geeigneten Lösungsmittels die Acidität bzw. Basizität einer der beiden funktionellen Gruppen, CO_2H bzw. NH_2 , so stark herabgesetzt, daß eine Säure-Basen-Titration der anderen Gruppe möglich wird. Elektrometrische Verfahren haben sich dabei im Vergleich zu Indikatorverfahren bewährt. Die Aminosäuren sind nun in den meisten zur Titration grundsätzlich günstigen Lösungsmitteln nur wenig löslich; dies ist die wichtigste Einschränkung aller dieser Methoden, die vor allem auch für Bestimmungen in Eisessig gilt. Auf Vorschlag von Herrn Prof. F. WEYGAND haben wir als Lösungsmittel Trifluoressigsäure verwendet, in der Aminosäuren²⁾ und vor allem auch Peptide²⁾ und Proteine³⁾ reichlich löslich sind. Wir haben zunächst das basenanaloge Verhalten verschiedener Aminosäuren in Trifluoressigsäure untersucht. Für die reine Trifluoressigsäure fanden wir eine Leitfähigkeit κ von $3.73 \cdot 10^{-7} \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ bei 20° — Literaturwert nach J. M. TEDDER⁴⁾ $3.5 - 4.2 \cdot 10^{-7} \Omega^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ bei 25° ; für die *Aminosäurelösungen* wurden die in Tab. 1 zusammengestellten Werte gemessen.

Die Leitfähigkeit der Lösungen ist danach im Vergleich zu der der reinen Säure stark erhöht, sie steigt mit der Konzentration des gelösten Stoffes stark an. Bei ähnlichen Konzentrationen zeigen wäßrige Aminosäurelösungen einen leichten Leitfähigkeitsabfall mit der Konzentration, Lösungen in Essigsäure besitzen viel geringere Leitfähigkeit als die Trifluoressigsäurelösungen, der Anstieg mit der Konzentration ist vergleichsweise gering. Wie zu erwarten, verhalten sich die untersuchten Aminosäuren in Trifluoressigsäure also wie starke Basen.

Die *Titration der Aminosäuren* wurde konduktometrisch, analog der in Essigsäure, durchgeführt. Titriermittel war $1n$ bzw. $0.5n$ HClO_4 in Trifluoressigsäure, ein Wassergehalt von 5% im Lösungsmittel störte die Bestimmung, geringe Mengen waren jedoch ohne Einfluß auf die Titrationskurven. Die Messungen wurden bei 20° im geschlossenen System unter Verwendung blanker Pt-Elektroden und eines *Metrohm*-Konduktometers durchgeführt. Tab. 2 zeigt die Ergebnisse. Während der Titration sank die Leitfähigkeit in den meisten Fällen linear bis zum Äquivalenzpunkt und

¹⁾ *Advances Protein Chem.*, Bd. II, S. 53—56.

²⁾ F. WEYGAND und R. GEIGER, *Chem. Ber.* **89**, 647 [1956].

³⁾ J. J. KATZ, *Nature [London]* **174**, 509 [1954]. ⁴⁾ *Chem. Reviews* **55**, 821 [1955].

stieg dann wieder relativ steil an (vgl. Abbild.). Bei mehreren Aminosäuren fielen die Perchlorate der Aminosäuren in Form farbloser Flocken bzw. Nadeln aus den Meßlösungen aus.

Tab. 1. Leitfähigkeiten von Aminosäuren in Trifluoressigsäure

| Verbindung | Konz. (mMol/l) | $\kappa \cdot 10^4$ ($\Omega^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) | Verbindung | Konz. (mMol/l) | $\kappa \cdot 10^4$ ($\Omega^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) |
|--------------|-------------------|---|----------------|-------------------|---|
| Glycin | 16.0 | 0.42 | Tyrosin | 29.5 | 0.68 |
| | 46.1 | 1.06 | Glutaminsäure | 34.4 | 0.96 |
| | 51.0 | 1.20 | Asparaginsäure | 38.9 | 0.84 |
| | 53.0 | 1.23 ₅ | Cystin | 27.1 | 0.79 |
| | 98.2 | 2.85 ₅ | Methionin | 40.7 | 0.96 |
| Alanin | 15.0 | 0.49 | Tryptophan | 17.2 | 0.59 |
| | 40.7 | 1.14 | Prolin | 30.9 | 1.53 |
| | 79.5 | 2.38 | Histidin | 21.5 | 0.79 |
| Leucin | 35.6 | 0.90 | Glycyl-glycin | 25.5 | 0.70 |
| Valin | 39.3 ₅ | 1.14 | | 47.8 | 1.34 |
| Phenylalanin | 30.5 | 0.84 | Serin | 31.6 | 0.76 |

Urtitersubstanz war in allen Fällen Glycin; das ursprünglich zur Einstellung benutzte *p*-Nitranilin ergab — wahrscheinlich wegen seiner schwachen Basizität auch in Trifluoressigsäure — mit steigender Einwaage fallende Faktoren der Perchlorsäure.

Tab. 2. Titration von Aminosäuren in Trifluoressigsäure mit Perchlorsäure

| | Einwaage mg | Gef. mg | Fehler % |
|--------------------------------|----------------|------------|-------------|
| Glycin (D) | 294.3 | 295.1 | + 0.3 |
| | 153.0 | 153.5 | + 0.3 |
| | 48.1 | 47.9 | — 0.4 |
| Alanin | 283.4 | 285.3 | + 0.7 |
| | 145.0 | 141.9 | — 2.1 |
| | 53.6 | 52.2 | — 2.6 |
| Leucin | 186.6 | 184.1 | — 1.3 |
| Valin | 184.5 | 188.6 | + 2.2 |
| Phenylalanin | 201.7 | 199.1 | — 1.3 |
| Glutaminsäure | 202.2 | 201.3 | — 0.4 |
| Asparaginsäure | 207.5 | 202.9 | — 2.2 |
| Serin | 132.8 | 129.1 | — 2.8 |
| Cystin (A) (D) | 260.7 | 265.5 | + 1.8 |
| Methionin | 242.9 | 240.6 | — 1.0 |
| Tyrosin (A) (D) | 213.5 | 258.7 | +21 |
| | 229.1 | 271.6 | +18.7 |
| 3,4-Dihydroxy-phenylalanin (E) | 149.9 | 145.5 | — 2.9 |
| Prolin | 142.3 | 138.5 | — 2.7 |
| Tryptophan (B) (C) | 140.4 | a) 142.8 | + 1.7 |
| | | b) 133.7 | — 4.8 |
| Histidin (C) (D) | 133.8 | 134.2 | + 0.3 |

(A) Gelbfärbung der Lösung Aminosäure + Perchlorat beim Stehenlassen.

(B) Perchlorat-Niederschlag gelb.

(C) Verbraucht 2 Äquivalente.

(D) Perchlorat fällt aus.

(E) Perchloratlösung getrübt.

a) 1. Stufe

b) 2. Stufe

Tab. 2 zeigt, daß fast alle untersuchten Aminosäuren in Konzentrationen von 50–200 mg/40 ccm Trifluoressigsäure durch Leitfähigkeitstiteration einwandfrei zu

bestimmen sind. Der mittlere Fehler bei den bisherigen Messungen beträgt 2%, er ist zum großen Teil apparatbedingt. Ebenso glatt verläuft die Bestimmung bei basischen Aminosäuren (Verbrauch 2 Äquivv.); hier ist es beim Tryptophan möglich, beide Stufen zu trennen, beim Histidin mit unserem Gerät nicht. Von den phenolischen Aminosäuren verhält sich 3,4-Dihydroxy-phenylalanin normal, allein bei Tyrosin treten starke Abweichungen auf. Hier färbt sich der Niederschlag beim Stehenlassen gelb; im Papierchromatogramm sind mehrere neue Flecke nachweisbar; wahrscheinlich wird das ausgefallene Perchlorat durch die Perchlorsäure oxydativ angegriffen. Cystin läßt sich nur einwandfrei bestimmen, wenn die Titration nach dem Äquivalenzpunkt rasch beendet wird, da sich das gebildete Perchlorat beim Stehenlassen ebenfalls nach einiger Zeit unter Gelbfärbung zersetzt.

GRENZEN UND ANWENDUNGSBEREICH DER METHODE WERDEN DURCH FOLGENDE VERSUCHE ABGESCHÄTZT:

a) *Peptide*: Glycyl-glycin, Isoleucyl-glycin und Glycyl-glycyl-alanin konnten einwandfrei bestimmt werden (vgl. Tab. 3). Eine Schwierigkeit liegt hier darin, daß die ausfallenden Perchlorate leicht zusammenbacken, die Elektroden verkleben und eine exakte Leitfähigkeitsmessung unmöglich machen.

Tab. 3. Titration von Peptiden

| | Einwaage mg | Gef. mg | Fehler % |
|----------------------|----------------|------------|-------------|
| Glycyl-glycin | 123.6 | 121.9 | -1.4 |
| Isoleucyl-glycin | 173.1 | 174.7 | +0.9 |
| Glycyl-glycyl-alanin | 78.0 | 76.6 | -1.8 |

Dies trifft verstärkt zu für Proteine (Seide, Gelatine), über die Ergebnisse bei diesen Stoffklassen soll später zusammenfassend berichtet werden.

b) Bei *Gemischen* von Aminosäuren läßt sich im allgemeinen nur die Summe der Einzelbestandteile bestimmen; untersucht wurden: Glycin-Alanin und Alanin-Prolin. Bei dem Gemisch Alanin-Tryptophan wird ein scharfer Knickpunkt nach Titration des Alanins + der 1. Stufe, ein zweiter nach Titration der 2. Stufe des Tryptophans beobachtet, hier ist also eine getrennte Bestimmung der Einzelbestandteile möglich. Ein — wenig ausgeprägter — Knickpunkt in der Leitfähigkeitskurve wurde in dem Gemisch Histidin-Alanin beobachtet, dieser gestattet aber nicht eine genaue Bestimmung.

c) *Hydrochloride* von Aminosäuren verhalten sich — soweit bisher untersucht — in Trifluoressigsäure wie Salze schwacher Säuren. Lysin als Dihydrochlorid (auch hier ergibt die 1. Stufe einen deutlichen Knickpunkt in der Kurve) und Glutaminsäurehydrochlorid konnten mit der oben genannten Fehlergrenze bestimmt werden. NH_4Cl verbraucht in Trifluoressigsäure ebenfalls eine äquivalente Menge HClO_4 , es fällt NH_4ClO_4 aus.

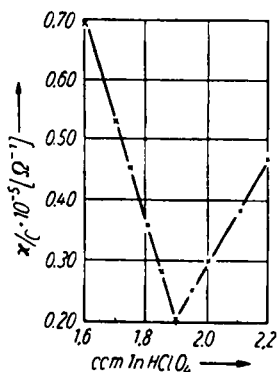
d) Das Verfahren wurde bisher angewandt zur Molekulargewichtsbestimmung von Aminosäuren bzw. Betainen, die sich von Kohlenhydraten ableiten. So wurde

für die Verbindung Methoxyneuraminsäure—2 CHO⁵⁾ ein Mol.-Gew. von 219, ber. 221, gefunden. Bei Methoxyneuraminsäure ergab sich nach 12stdg. Trocknung i. Hochvak. bei 60° ein Mol.-Gew. von 292.6 (ber. für C₁₀H₁₉O₈N 281.3). Bei diesen Verbindungen fiel die Leitfähigkeit kurz vor dem Äquivalenzpunkt stärker als linear ab. α -Methyl-D-glucosaminuronsäure als Testsubstanz zeigte das gleiche Verhalten, erst die Extrapolation des oberen, geraderen Teils der Kurve bis zum ansteigenden Ast liefert den richtigen Wert (gef. 205, ber. 207). Vielleicht ist dieses Verhalten für Polyhydroxyaminosäuren typisch.

Ein Reaktionsprodukt aus Glucose und Piperidinacetat⁶⁾, „Piperidino-hexose-reduktion“, dem Betainstruktur zugeschrieben wird, ließ sich ebenfalls glatt titrieren: Mol.-Gew. gef. 221 (ber. 211.3).

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Herstellung einer Normallösung von Perchlorsäure in Trifluoressigsäure: In einen 100-ccm-Meßkolben wurden etwa 20 ccm Trifluoressigsäure direkt unter Luftabschluß eindestilliert. Unter Kühlung mit Eis-Kochsalzmischung wurde dann die berechnete Menge 70-proz. HClO₄ in Portionen zu etwa 2 ccm hinzugefügt, zum Schluß tropfenweise eingewogen. Die Perchlorsäure vermischte sich nur zum Teil mit der Trifluoressigsäure, der Rest blieb als ölige Schicht am Boden. Der genaue Prozentgehalt der Perchlorsäure wurde durch Bestimmung der Dichte nach K. VAN EMSTER ermittelt⁷⁾. Hieraus wurde die zur Bindung des Wassers erforderliche Menge Trifluoressigsäure-anhydrid errechnet und ebenfalls in Portionen zu etwa 2 ccm unter Kühlung zugegeben. Die HClO₄-Schicht löste sich dabei im Gemisch langsam auf. Die Titrationen wurden bei 20° unter Rühren (Magnetrührer) durchgeführt, die Aminosäuren waren vorher über P₂O₅ i. Vak. bei 60° getrocknet worden. Die Trifluoressigsäure wurde aus der Destillationsapparatur direkt in das Meßgefäß abgefüllt.



Titration von Glycin
(c = 1.846 mMol/40 ccm)

Wir verwendeten ein Titriergefäß, das gegen Luftfeuchtigkeit abgeschlossen und mit einem thermostatierten Mantel versehen war. Die Elektroden bestanden aus Pt-Blech; Zellkonstante C = 3.596 cm⁻¹, gemessen mit einer 0.01-Standard-KCl-Lösung.

⁵⁾ F. WEYGAND und H. RINNO, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **306**, 177 [1957].

⁶⁾ J. E. HODGE und B. E. FISCHER, Vortrag auf dem „Fall Meeting of the Amer. Chem. Soc.“, Atlantic City, Sept. 1956.

⁷⁾ Z. anorg. allg. Chem. **52**, 273 [1907].