

Bestimmung der quantitativen Aminosäurezusammensetzung der alkalischen Darmphosphatase mit Hilfe einer modifizierten Ninhydrinbestimmungsmethode

Autor(en): **Horvath-Erös, Margrit**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Bulletin de la Société Fribourgeoise des Sciences Naturelles = Bulletin der Naturforschenden Gesellschaft Freiburg**

Band (Jahr): **54 (1964)**

PDF erstellt am: **30.06.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-308417>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Bestimmung der quantitativen Aminosäurezusammensetzung der alkalischen Darmphosphatase mit Hilfe einer modifizierten Ninhydrinbestimmungsmethode

VON MARGRIT HORVATH-ERÖS

EINLEITUNG

Die Kenntnis der Struktur der Proteine ist Vorbedingung für das Verständnis ihrer biologischen Wirkung insbesondere als Hormone oder als Fermente. Erst in den letzten zehn Jahren wurden Methoden entwickelt, die gestatten, eine Strukturaufklärung mit kleinen Mengen von Proteinen durchzuführen. Aber auch heute noch sind diese Untersuchungen trotz der verbesserten Methodik schwierig, und die verfügbaren Methoden sind lange nicht alle völlig zufriedenstellend.

Die Strukturaufklärung eines Eiweißes setzt seine Reindarstellung voraus, die in jedem Falle eine spezielle und eine oft sehr schwierig zu lösende Aufgabe darstellt. Darauf folgt eine Untersuchung der qualitativen Bausteinzusammensetzung des isolierten Proteins, wobei die Aminosäuren, Hexosen, Pentosen, Hexosamine, Sialinsäuren, Metallionen und, in speziellen Fällen, besondere organische Moleküle in Frage kommen. Für diese Untersuchung haben sich besonders die Papierchromatographie und die Dünnschichtchromatographie als nützlich erwiesen.

Den nächsten Schritt stellt die quantitative Bausteinanalyse des Eiweißes dar. Die Einführung der Aminosäurechromatographie auf sauren und basischen Ionenaustauscherharzen vom Typ Dowex-50 X4

und X8 oder Dowex-1 X8 durch *Moore* und *Stein* 1,2,3,4) bedeuteten den größten Fortschritt in dieser Hinsicht. Dadurch wurde es erstmals möglich, die quantitative Aminosäurezusammensetzung eines Eiweißes mit wenigen Milligramm Protein aufzuklären. Diese Methode werden wir im folgenden Abschnitt ausführlich diskutieren, da sie den Inhalt dieser Arbeit darstellt.

Ist die quantitative Aminosäurezusammensetzung eines Eiweißes bekannt, muß man die Aminosäuresequenz und, falls es sich um ein zusammengesetztes Eiweiß handelt, die Bindungsart und die Bindungs-orte zusätzlicher vorhandener Bausteine ermitteln. Die wichtigsten Methoden für diese Untersuchungen sind: die Bestimmung der endständigen Aminosäuren durch Markierung mit Dinitrofluorbenzol 5), durch Hydrazinolyse 6) und durch partiellen Abbau des Eiweißes mit Hilfe spezifischer Fermente – Carboxypolypeptidase, Pepsin, Trypsin und Chymotrypsin – gefolgt von einer Strukturaufklärung der dabei entstandenen Polypeptide.

Ist die Aminosäuresequenz eines Eiweißes bekannt, so muß die Strukturaufklärung des untersuchten Proteins durch die Ermittlung der räumlichen Gestalt des Eiweißmoleküls, die durch sekundäre Bindungen innerhalb der gefalteten, gewundenen oder aufgekäuerten Peptidkette zustandekommt, vervollständigt werden. Diese Untersuchungen werden mit Hilfe röntgenoptischer Verfahren durchgeführt. Bis heute sind nur sehr wenige Eiweiße in ihrer Gesamtstruktur einigermaßen aufgeklärt worden, z. B. das Hämoglobin und die Ribonuclease.

Alle diese Untersuchungen stellen aber nur die Voraussetzung dar, auf der die physiologische Wirkung der Eiweiße untersucht werden kann; denn selbst wenn die Struktur eines Eiweißes vollständig bekannt ist, muß man dazu noch die aktiven Gruppen oder Molekülbezirke der Proteine und deren Wirkungsweise kennen, um die Wirkungsart zu verstehen, mit der biologisch aktive Eiweiße (Hormone und Fermente) in spezifischer Art humoral regulierend oder als Katalysatoren in biochemische Reaktionen einzugreifen vermögen.

Theoretischer Teil

Die Untersuchung der quantitativen Aminosäurezusammensetzung eines Eiweißes bedingt zunächst eine vollständige und verlustlose Hydrolyse des Proteins bis zu den Aminosäuren. Dies ist auch heute noch mit keiner der bekannten Methoden in einwandfreier Weise möglich. Hydrolysiert man mit 6N HCl bei 110° während 36-72 Stunden oder mit 6N HCl bei 135-140° während 22 Stunden, erhält man wohl einen vollständigen Abbau des Eiweißes, aber gleichzeitig eine mehr oder weniger weitgehende Zerstörung einzelner Aminosäuren unter Huminbildung. Diese ist besonders groß, wenn das untersuchte Eiweiß Zucker und Sialinsäure enthält. Tryptophan wird unter diesen Bedingungen vollständig zerstört, Serin, Threonin und Methionin zu 5-10 %; Cystein wird zu Cystin oxydiert und zum Teil weiter abgebaut. Tryptophan muß deswegen entweder in einem alkalischen Hydrolysat oder spektroskopisch im Eiweißmolekül selbst bestimmt werden. Bei alkalischer Hydrolyse bleibt das Tryptophan intakt, dafür wird aber Cystein und Cystin vollständig, Serin und Threonin weitgehend zerstört. Eine Perameisensäureoxydation des Eiweißes erlaubt, Cystin und Cystein vollständig in Cysteinsäure überzuführen, wobei aber auch ein Teil des Methionins in Methioninsulfoxyd oxydiert wird. Glutamin und Asparagin werden sowohl bei saurer wie bei alkalischer Hydrolyse vollständig in Glutaminsäure bzw. Asparaginsäure und Ammoniak gespalten, sodaß die Anzahl der Amidgruppen, die in einem Eiweiß vorliegen, nur mit speziellen Methoden bestimmt werden können. Die Huminbildung bei der sauren Hydrolyse von zuckerhaltigen Eiweißen kann durch Zusatz von $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (7,8) oder von Titanchlorid (9,10) vermindert werden.

Trotz aller dieser Verbesserungen bietet die Hydrolyse eine nicht zu unterschätzende Schwierigkeit für die quantitative Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung eines Eiweißes.

Die Trennung der Aminosäuren eines Eiweißhydrolysates wird heute meistens durch Chromatographie auf Dowex-50 X4 oder X8 durchgeführt. *Moore* und *Stein* selbst und andere Autoren, *Hamilton* (11,12) *Hannig* et al (13) haben verschiedene Modifikationen angegeben, bezüglich Harztyp (Vernetzungsgrad), bezüglich der Elutionsflüssig-

keiten (pH-Werte, Pufferart und Natriumionenkonzentration) und bezüglich der zu wählenden Temperatur. Daraus ist bereits ersichtlich, daß für eine gute und quantitative Trennung eines Aminosäurengemisches sehr viele Faktoren eine Rolle spielen. Diese können nach *Hamilton* 12) bei gegebener Temperatur und gegebenen Elutionspufferlösungen in folgende Gleichung zusammengefaßt werden:

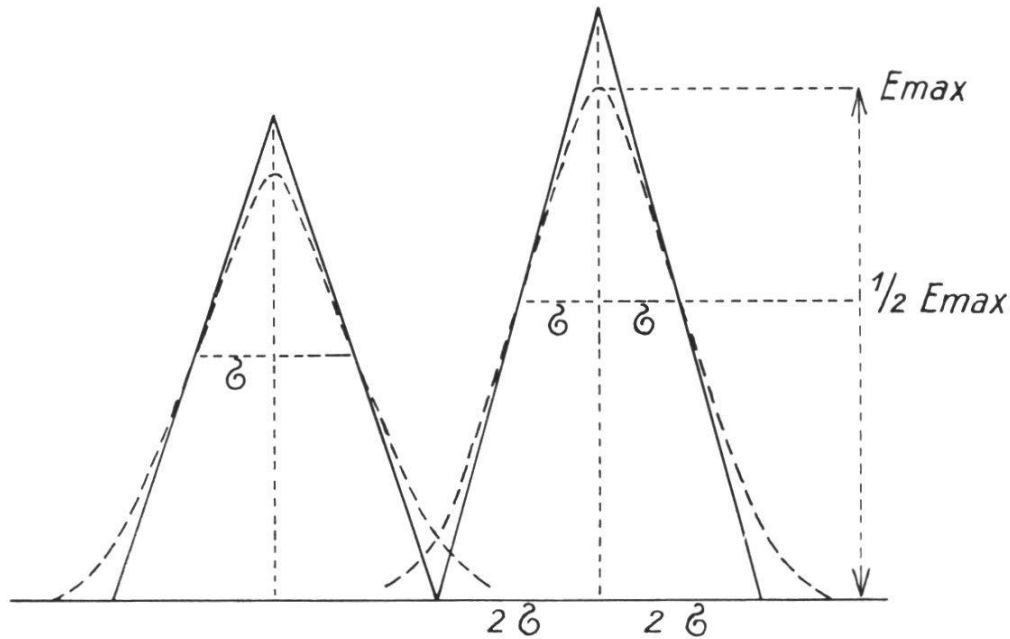


Abb. I : Gauss'sche Verteilungskurven von 2 benachbarten Chromatogrammfraktionen mit eingezeichneten gleichflächigen Dreiecken. Abszisse: Fraktionsvolumen; Ordinate: Extinktion: $E = \log \frac{I_0}{I}$

$$\sigma^2 = 2 A^2 \cdot Z [\lambda \cdot dp (a + F)^2 + b \cdot U_0]$$

A = Querschnitt der Harzkolonne

Z = Harzkolonnenhöhe in cm

a, b und λ = Konstanten

dp = Teilchendurchmesser des Harzes

U_0 = Durchflußgeschwindigkeit

F = freies Flüssigkeitsvolumen zwischen den Harzpartikelchen

σ = halbe Breite des Aminosäuregipfels in halber Höhe als Ausdruck der Trennschärfe für zwei benachbart eluierte Aminosäuren, d. h. je schlanker der Gipfel, umso besser die Trennung.

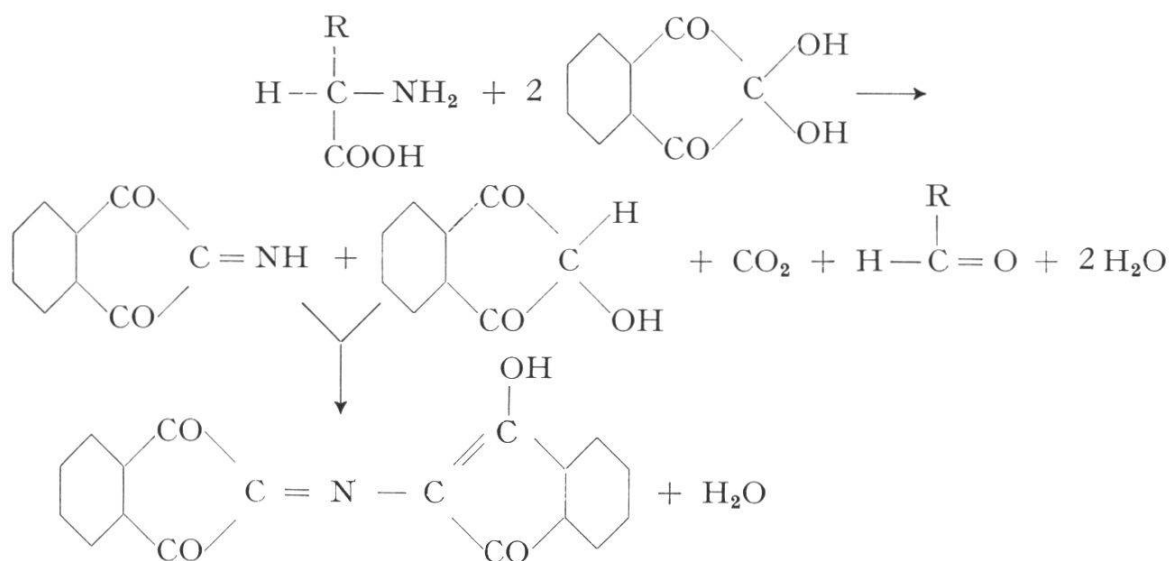
Z ist optimal bei ca. 133 cm. Diese Gleichung zeigt, daß bei gegebener Kolonnenhöhe und gegebenem Kolonnendurchmesser die Durchflußgeschwindigkeit der Elutionsflüssigkeit über die ganze Chromato-

graphiedauer, welche bis zu 10 Tagen betragen kann, konstant gehalten werden muß, damit reproduzierbare Werte erhalten werden können. Außerdem muß bei Neufüllung der Kolonne die Teilchengröße und die Packungsdichte genau gleich wie beim vorangehenden Chromatogramm sein. Da die *Hamilton'sche* Gleichung für eine gegebene Temperatur gilt, muß weiter – über Tage – die Temperatur der Kolonne auf den vorgeschriebenen optimalen Werten konstant gehalten werden. Von entscheidender Wichtigkeit ist ferner der genaue pH-Wert der Pufferlösungen und eine vollständige Gleichgewichtseinstellung des Harzes mit der ersten Pufferlösung zu Beginn des Chromatogramms.

Die Trennschärfe der Chromatogrammsäule entscheidet aber nicht allein über die Genauigkeit der quantitativen Aminosäurebestimmung eines gegebenen Gemisches. Wesentlich beteiligt sind:

- a) die Genauigkeit der photometrischen quantitativen Bestimmung der im Eluat erscheinenden Aminosäuren,
- b) die Beständigkeit einzelner Aminosäuren gegenüber dem in den Elutionspufferlösungen vorhandenen Sauerstoff und
- c) die quantitative Elution der Aminosäuren.

a) Als quantitative, genügend empfindliche Bestimmungsmethode wird heute allgemein die Ninhydrinreaktion verwendet, deren genaue Reaktionsgleichung noch nicht sicher bekannt ist. Man nimmt auf Grund der bisher vorliegenden Untersuchungen an, daß sich der blauviolette Farbstoff nach folgender Reaktionsgleichung bildet:



Diketohydrindyliden-Diketohydrindamin (Farbstoff)

Das pH-Optimum der Farbstoffbildung liegt scharf bei pH 5,1-5,2. Wenn die Reaktion mit Aminosäuren und Ninhydrin allein durchgeführt wird, muß ein äquivalenter Teil des Ninhydrins durch die Aminosäuren oder eventuell durch die bei der Reaktion entstehenden Aldehyde reduziert werden. Da diese Reaktion unvollständig verläuft, ist die Farbausbeute bei weitem nicht quantitativ. Man suchte deshalb die Reaktionsempfindlichkeit dadurch zu steigern, daß man Reduktionsmittel z.B. SnCl_2 zufügte oder dem Ninhydrinreagens von Anfang an Hydrindantin im Überschuß beigab. Die Anwendung von SnCl_2 hat den Nachteil, daß leicht Trübungen in der Reaktionslösung auftreten, die störend die photometrische Bestimmung beeinflussen. Es ist weiter schwierig, eine genau gleichbleibende Konzentration an Reduktionsmittel im Reagens aufrecht zu erhalten. Bei Aufbewahrung des Reagens oxydiert der Luftsauerstoff das Sn^{++} langsam, und bei der Neuherstellung des Reagens beschränkt der meist ungenau bekannte und sich langsam ändernde Gehalt der käuflichen Zinnsalze an zweiwertigem Zinn die erreichbare Genauigkeit. Die besten Resultate erhielten wir, wenn wir bei jeder Reagensherstellung eine genau abgewogene Menge reinen Zinnmetalls in HCl auflösten und einen aliquoten Teil der frisch hergestellten Zinnchloridlösung dem Ninhydrinreagens zusetzten.

Der Zusatz von Hydrindantin ist nur dann möglich, wenn die Reaktion unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt wird, sonst wird das Hydrindantin durch den Luftsauerstoff in nur schwer kontrollierbarem Ausmaß oxydiert. Das Hydrindantin hat weiter die unangenehme Eigenschaft, mit Ninhydrin unlösliche Molekülassoziate einzugehen, welche die Reagensbeständigkeit in Frage stellen können.

Eine weitere Verbesserung der Methode wurde darin gefunden, daß man die Ninhydrinreaktion in Gegenwart von 2-Methoxy-äthanol (Methylcellosolve) durchführt. Dieses mit Wasser mischbare organische Lösungsmittel erhöht die Empfindlichkeit der Ninhydrinreaktion und stabilisiert den entstandenen Farbstoff. Es hat aber den Nachteil, daß es an der Luft Peroxyde bildet, die das Ninhydrin und die Aminosäuren zerstören.

b) Zur Verhinderung der Oxydation von Cystin und Methionin während der Chromatographie kann den Pufferlösungen Thiodiglykol zugesetzt oder das Chromatogramm unter Stickstoff ausgeführt

werden. Beides kann aber nicht verhindern, daß etwa 4-6 % des Methionins verloren geht.

c) Nach den Untersuchungen von *Moore* und *Stein* werden alle Aminosäuren bei Verwendung einer 100 cm langen Harzsäule zu praktisch 100% zurückgewonnen. Nur die basischen Aminosäuren haften so stark, daß sie mit Puffern, die 0,1 m an Natriumionen sind, auch bei pH 8-11 höchstens zu 65-85% eluiert werden können. Deshalb haben sie eine Trennung des Aminosäuregemisches auf zwei Chromatogrammsäulen durchgeführt. Auf einer 15 cm langen Kolonne werden zunächst die sauren und die neutralen Aminosäuren von den basischen Aminosäuren abgetrennt. Letztere haften bei pH 5,0 so stark, daß sie auf der kleinen Kolonne vollständig zurückgehalten werden, während die sauren und neutralen Aminosäuren bereits in den ersten 30-40 ml Eluat quantitativ zurückgewonnen werden. Wird darauf die kleine Kolonne mit Puffern von pH 6,5 und 6,85, die 0,1 und 0,2 m an Natriumionen sind, durchgespült, können die basischen Aminosäuren quantitativ getrennt und bestimmt werden. Das im Vakuum konzentrierte erste Eluat kann auf die 100 cm Kolonne aufgetragen und die darin enthaltenen sauren und neutralen Aminosäuren getrennt und quantitativ bestimmt werden. Mit Hilfe dieser beiden Chromatogramme ist es möglich, ein Gemisch von 18 Aminosäuren, wie es in den meisten Fällen in einem Proteinhydrolysat vorliegt, zu trennen und zu 98-100 % (Methionin etwa 96 %) in den Eluatfraktionen wiederzufinden, wenn ein Gemisch, das etwa 150 bis 300 γ von jeder Aminosäure enthält, auf die Kolonne aufgetragen wird.

Eigene Untersuchungen

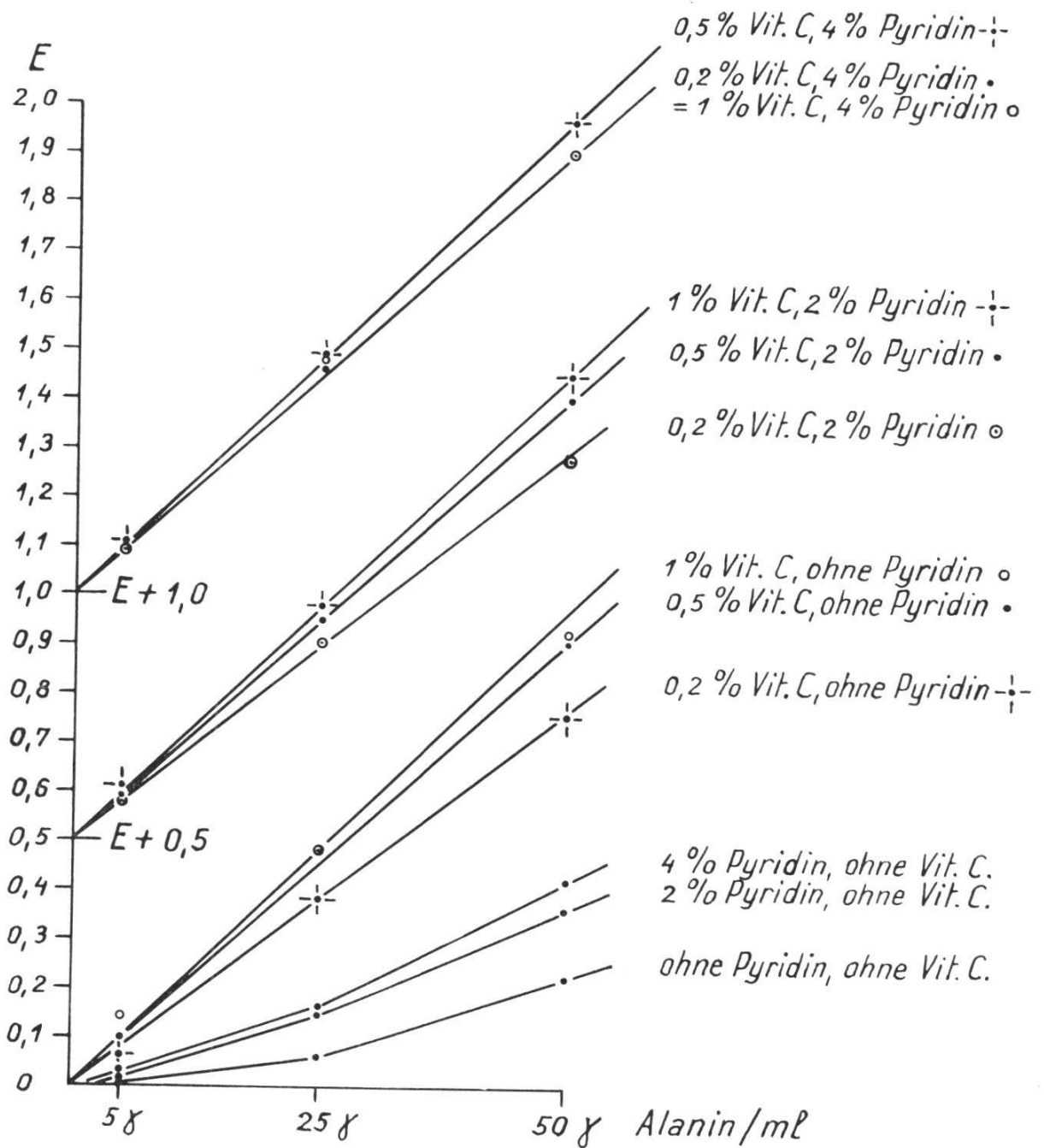
1. Bestimmung der Aminosäuren mit Hilfe eines modifizierten Ninhydrinreagens

Im Zusammenhange mit der Untersuchung der quantitativen Aminosäurezusammensetzung der Phosphatase wurde der Versuch unternommen, eine genügend empfindliche und reproduzierbare

Aminosäurebestimmung mit Ninhydrin ohne Anwendung von peroxyd-bildendem 2-Methoxyäthanol (Methylcellosolve) und ohne Zusatz von Hydrindantin auszuarbeiten. Es waren in der Literatur bereits Hinweise vorhanden, daß ein Zusatz von Pyridin oder von Vitamin C die Empfindlichkeit der Ninhydrinreaktion steigern kann (14,15). Doch waren diese Zusätze noch nie einzeln oder in Kombination für die quantitative Aminosäurebestimmung ohne Verwendung von Hydrindantin oder Methylcellosolve untersucht worden. Wir haben deshalb zunächst den Einfluß dieser Substanzen auf die Empfindlichkeit der Ninhydrinreaktion geprüft und gleichzeitig Methylcellosolve durch 70 Vol.-% Äthylalkohol ersetzt. Da die Reaktionstemperatur 100° beträgt, wurde der Alkohol nicht dem Ninhydrinreagens sondern der Reaktionsmischung nach dem Erwärmen zugefügt.

Aus der untersten Kurvenschar der Abbildung II geht hervor, daß ein Zusatz von 2 bzw. 4 % analysenreinem Pyridin die Extinktion des bei der Ninhydrinreaktion mit 50 γ Aminosäure/ml gebildeten Farbstoffes um den Faktor 1,6 bzw. 1,9 erhöht. Die Standardkurven weisen aber, wie jene, die mit Ninhydrin und Alanin allein, ohne Pyridinzusatz, erhalten wurden, eine Abknickung bei 25 γ auf und lassen eine sichere Bestimmung unterhalb dieses Wertes nicht zu. Durch Zugabe von Vitamin C allein (0,05 ml einer 0,2 %, 0,5 % oder 1 % Lösung) werden die Standardkurven zunehmend steiler, doch liegen nur die Meßpunkte der Eichkurve mit 0,2 % Vitamin C genau auf einer Geraden. Die Kurve mit 1,0 % Vitamin C ist nur wenig steiler als jene mit 0,5 % Vitamin C, und die Linearität beider Kurven läßt zu wünschen übrig. Die verschieden großen Zusätze an Vitamin C ergeben zudem eine Erhöhung der Extinktion des Blindwertes, die etwa 0,03 bei 0,2 % Vitamin C, 0,07 bei 0,5 % und 0,2 bei 1,0 % Vitamin C beträgt. Die durch den Vitamin C Zusatz erhaltene größere Reaktionsempfindlichkeit ist aber verbunden mit einer relativ kleinen Reproduzierbarkeit, weil die einzelnen Meßpunkte ziemlich stark um die Mittelwertgerade der Standardkurve streuen. Wird Vitamin C dem Reaktionsgemisch und gleichzeitig Pyridin dem Ninhydrinreagens zugefügt, ergeben sich Standardkurven, die bei gleichem Pyridin-gehalt umso steiler werden, je größer die zugegebene Menge Vitamin C ist. Bei gegebener Vitamin C Konzentration nimmt umgekehrt die Farbintensität mit steigender Pyridinkonzentration zu. Beide Zusätze erhöhen die Extinktion der sich rötlich färbenden Lösung des Blind-

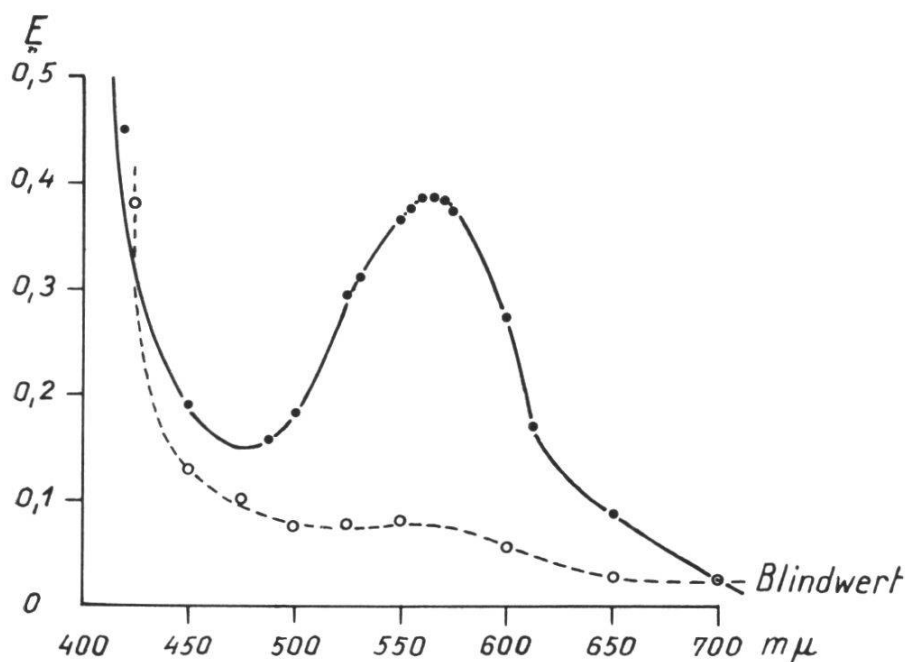
Abb. II: Alanin-Ninhydrin-Reaktion: Änderung der Standardkurve in Abhängigkeit der Konzentration von zugesetztem Pyridin und Vit. C.



wertansatzes, was besonders im Hinblick auf die Prolinbestimmung, bei der ein gelbbrauner Farbstoff entsteht, von Bedeutung ist. Aus dem Vergleich aller Kurven geht hervor, daß der Zusatz von 2 % Pyridin und 0,5 % Vitamin C, wenn auch nicht die größte Empfindlichkeit, so doch eine fast optimale Farbausbeute bei wenig gefärbtem Blindwert ergibt.

Die unter diesen Bedingungen (2 % Pyridin und 0,05 ml von 0,5 % Vitamin C) für alle in Frage kommenden Aminosäuren erhaltenen Mittelwertstandardkurven zeigen ebenfalls einen linearen Verlauf mit relativ kleiner Streubreite der Einzelmeßwerte um ihren Mittelwert. Die Reproduzierbarkeit der Standardkurven beträgt je nach der zu bestimmenden Aminosäure bei 50 γ /ml etwa $\pm 1\%$ bis $\pm 2\%$ und bei 10 γ /ml ungefähr $\pm 5\%$. Anstelle der Standardkurven sind in der Tabelle I (S. 15) die Faktoren angegeben, mit denen der unter Verwendung einer Küvettenschichtdicke von 13 mm erhaltene Extinktionswert ($2\text{-log } T \%$) multipliziert werden muß, um die entsprechende γ Aminosäuren in 10 ml Reaktionslösung zu erhalten.

Abb. III : Absorptionsspektrum von Diketohydrindylidendiketohydrindamin und vom Ninhydrinreagens-Blindwert in Gegenwart von Vitamin C.



Die Nullwertfärbung ist unmittelbar nach der Reaktion nicht ganz beständig, sie verändert sich aber praktisch nicht mehr, wenn die Messung $\frac{3}{4}$ bis 1 Stunde nach Beendigung der Farbreaktion durchgeführt wird. Die Spektren der mit 0,2 μ Mol Asparaginsäure und Ninhydrin in Gegenwart von 2 % Pyridin und unter Zugabe von 0,05 ml 1 % Vitamin C Lösung erhaltenen Farblösung und des entsprechenden Blindwertes sind aus der Abbildung III ersichtlich. Daraus geht hervor, daß die Extinktion der Blindwertprobe bei Zusatz einer 1 % Vitamin C Lösung im Gebiet von 570 $m\mu$ (Absorp-

Tabelle I: Faktoren, die mit dem Extinktionswert multipliziert die γ Aminosäure/10 ml Reaktionslösung ergeben. E gemessen bei 570 bzw. 440 m μ und bei einer Schichtdicke von 13 mm.

Aminosäure	0,5 % Vit. C + 2 % Pyridin	1 % Vit. C + 2 % Pyridin	pH der verwendeten Standardaminosäure- lösungen
Asparaginsäure	85,5	75,6	3,41
Threonin	75,2	69	3,41
Serin	65,8	62,1	3,41
Glutaminsäure	90,5	80	3,41
Prolin	216	255	3,41
Glykokoll	51,0	50	3,41
Alanin	56,2	56,9	3,41
Cystin	—	144,1	3,41
Valin	72,4	76,8	4,25
Methionin	87	78	4,25
Isoleucin	75,6	69	4,25
Leucin	74,6	69	4,25
Tyrosin	112,6	95	4,25
Phenylalanin	102,5	87	4,25
Histidin	79,4	—	6,85
Lysin	79,3	—	6,85
Arginin	111	—	6,5
Ammoniak	13,8	—	6,5

tionsmaximum) ungefähr 0,07, bei 440 m μ (Maximum für Prolinbestimmung) aber bereits 0,2 beträgt. Da die Prolinstandardkurve sehr flach verläuft, stört dieser Blindwert die Prolin- und Hydroxyprolinbestimmung zu stark. Auch aus diesem Grunde war es angezeigt, auf die etwas größere Reaktionsempfindlichkeit bei Zugabe einer 1 % Vitamin C Lösung zu verzichten, um mit einer 0,5 % Vitamin C Lösung eine bessere und empfindlichere Prolinbestimmung durchführen zu können. In der zweiten Kolonne der Tabelle I haben wir zum Vergleich die Faktoren angegeben, die aus den Standardkurven berechnet sind, welche mit einer 1 % Vitamin C Lösung und einem mit 2 % Pyridin versetzten Ninhydrinreagens erhalten wurden. In der dritten Kolonne sind die pH-Werte der Aminosäurestandardlösungen aufgeführt. Sie entsprechen den pH-Werten der Kolonneneffluat der verschiedenen Aminosäuren. Obwohl der Reagenspuffer (2 m) eine genügende Pufferkapazität aufweist, um die für die Kolonne gebrauchten Pufferlösungen (0,1 m) auf pH 5,15 zu bringen, wurden die Standardkurven der Aminosäuren – um alle Faktoren gleich zu behalten – mit denselben Pufferlösungen hergestellt, mit denen sie aus der

Tabelle II : Testchromatogramme mit bekannten Aminosäuregemischen

Aminosäure	Testgemisch I										Testgemisch II			Mittlere prozentuale Abweichung I-V	
	aufgetragen γ*	γ	I % Abw.	gefunden in II % Abw.	γ	III % Abw.	γ	IV % Abw.	Mittel I-IV γ	Aufgetragen γ*	gefunden V % Abw.				
Asp	550	598	+ 8,7	562	+ 2,2	570	+ 3,6	590	+ 5,4	580	+ 5,4	294	282	- 4,0	+ 3,5
Thr	134	147	+ 10,0	140	+ 4,5	127	- 5,0	124,5	- 7,0	134,6	+ 0,5	162	161,7	- 0,2	+ 0,46
Ser	109	119	+ 9,0	115	+ 5,5	106	- 2,5	84	- 27,0	106	- 2,7	114	113,5	- 0,5	- 3,1
Glu	447	453	+ 1,3	460	+ 2,9	392	- 12,2	483	+ 8,0	447	+ 0	211	192	- 9,0	- 1,8
Pro	230	187	- 18,5	226	- 1,7	220	- 4,5	240	+ 4,5	219	- 4,7	-	-	-	- 5,0
Gly	201	225	+ 12,0	209	+ 4,5	203	+ 1,5	195	- 2,5	208	+ 3,5	173	172,7	- 0,2	+ 3,0
Ala	255	288	+ 13,0	278	+ 9,0	260	+ 2,0	237	- 5,0	266	+ 4,2	226	206	- 4,4	+ 2,9
Val	270	310	+ 14,8	290	+ 7,2	310	+ 14,8	330	+ 22,0	313	+ 14,6	90	83,2	- 7,5	+ 10,2
Met	64,5	66,8	+ 3,6	67,4	+ 4,0	70	+ 8,5	57,5	- 11,0	64,8	+ 1,7	50	53	+ 6,0	+ 2,2
Ileu	286	293	+ 2,5	282	- 1,5	302	+ 5,5	295	+ 3,0	293	+ 2,5	67,5	69,5	+ 3,0	+ 2,5
Leu	230	231	+ 0,5	219	- 5,0	228	- 1,0	197	- 14,0	219	- 5,0	122	121,8	- 0,15	- 3,9
Tyr	129	135	+ 4,6	147	+ 14,0	150	+ 16,0	135	+ 4,6	142	+ 10,0	86	87,1	+ 1,3	+ 8,1
Phe	84	-	-	86	+ 2,4	83	- 1,2	87	+ 3,6	85	+ 1,2	52	52,3	+ 0,5	+ 1,3
His	131	135,6	+ 3,5	110	- 16,0	116	- 11,5	-	-	120,5	- 8,0	-	-	-	- 8,0
Lys	235	244	+ 3,8	250	+ 7,2	246	+ 4,6	-	-	247	+ 5,2	-	-	-	+ 5,2
Arg	395	417	+ 5,4	415	+ 5,0	385	- 2,5	-	-	404	+ 2,2	-	-	-	+ 2,3

* γ der betreffenden Aminosäure im aufgetragenen Testgemisch

Dowex-50-Kolonnen eluiert werden. Die Faktoren, die mit einer 1 % Vitamin C Lösung erhalten wurden, sind im allgemeinen etwas kleiner als jene mit 0,5 % Vitamin C, was der etwas größeren Steilheit dieser Eichkurven entspricht. Die Werte der 1. Kolonne der Tabelle I entsprechen den Mittelwerten aus 8 bis 12 Einzelmessungen, die für jede der gemessenen Konzentrationen (10, 20, 30, 40 und 50 γ Aminosäure/ml) durchgeführt wurden.

2. Überprüfung der modifizierten Aminosäure-Bestimmungsmethode mit Chromatogrammen bekannter Aminosäuregemische.

Während eines Aminosäurechromatogrammes ändert die Konzentration jeder Aminosäure innerhalb der Chromatogrammfraktion nach einer symmetrischen Verteilungskurve. Die Anzahl der Eluatfraktionen, die weniger als 10 γ Aminosäure/ml enthalten, hängt von der Schlankheit des Kurvengipfels ab und beeinflußt wesentlich die Bestimmungsgenauigkeit der Gesamtfraktion. Wie oben ausgeführt wurde, muß man bereits bei Bestimmung einer Konzentration von 10 γ Aminosäure/ml mit einem mittleren Fehler von $\pm 5\%$ rechnen. Dieser Fehler beträgt $\pm 10\%$ und mehr, wenn Konzentrationen von 5 γ /ml und weniger zu bestimmen sind. Es war deshalb nötig, die modifizierte Aminosäurebestimmungsmethode an einem Testaminosäurechromatogramm zu erproben, um den Gesamtfehler der Bestimmung unter den Chromatographiebedingungen festzustellen. Die prozentuale Zusammensetzung des verwendeten Testaminosäuregemisches wurde so gewählt, daß es der Aminosäurezusammensetzung des zu bestimmenden Phosphatasehydrolysates annähernd entsprach. Die Zusammensetzung dieses Hydrolysates wurde zunächst in einem Vorversuch möglichst genau ermittelt. Es wurden zwei verschiedene Aminosäuregemische bekannter Konzentrationen hergestellt und unter genau denselben Bedingungen wie das Phosphatasehydrolysat auf einer 15 cm und einer 100 cm Dowex-50 X 8 Kolonne getrennt und mit der modifizierten Aminosäurebestimmungsmethode ausgewertet. Die Einzelwerte und die Mittelwerte von 5 solchen Testchromatogrammen sind in der Tabelle II (Seite 16) aufgeführt.

Betrachtet man zunächst die mittleren prozentualen Abweichungen von den Sollwerten, die für die 16 Aminosäuren in den Testchromato-

grammen erhalten wurden, so sieht man daß für 13 Aminosäuren der mittlere Bestimmungsfehler innerhalb $\pm 5\%$ liegt. Die Bestimmungen der drei übrigen Aminosäuren ergaben einen Fehler von $\pm 8\%$ bzw. $+ 10\%$. Dieses Bild wird etwas, aber nicht wesentlich schlechter, wenn man die prozentualen Abweichungen der Einzelresultate untersucht. Von 72 Werten zeigen 45 Abweichungen, die kleiner sind als $\pm 5,5\%$, 15 Resultate liegen innerhalb $\pm 11\%$ des Sollwertes, 8 innerhalb $\pm 16\%$ und nur 3 Werte weisen einen Fehler von $- 18$, $+ 22$ und $- 27\%$ auf.

Aus diesen Versuchen geht deshalb hervor, daß ein Aminosäuregemisch unter Verwendung der hier beschriebenen modifizierten Ninhydrinmethode mit einem mittleren Fehler von $\pm 5\%$ bis höchstens $\pm 10\%$ bestimmt werden kann, wenn man die Mittelwerte aus mindestens fünf chromatographischen Trennungen berechnet. Es war weiter zu erwarten, daß bei Einsatz etwas größerer Mengen von Aminosäuren der photometrische Bestimmungsfehler noch etwas verkleinert werden kann, weil dann eine kleinere Zahl von Bestimmungen mit weniger als 10γ Aminosäure/ml durchzuführen ist. Dieser Verbesserung sind aber zwei Grenzen gesetzt: Die chromatographische Trennung der Aminosäuren wird schlechter, wenn die Trennkolonnen überladen wird, und die photometrische Bestimmung jener Fraktionen wird ungenau, deren Aminosäurenkonzentration/ml die für die meisten Aminosäuren geltende obere Grenzkonzentration von $60-80 \gamma$ ml überschreitet.

3. Quantitative Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung der alkalischen Darmphosphatase.

Für die Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung der Phosphatase waren zwei weitere Schwierigkeiten zu berücksichtigen. Die eine war, wie im vorangehenden Teil dargelegt, die vollständige, aber möglichst verlustlose Hydrolyse; die zweite, die Berechnung des Aminosäuregehaltes der Phosphatase auf Grund der erhaltenen Resultate. Da bei der sauren Hydrolyse das Tryptophan ganz, andere Aminosäuren mindestens teilweise zerstört werden und weil die Phosphatase neben den Aminosäuren auch noch Hexosamin und Hexosen enthält, konnte nicht die Summe der erhaltenen Amino-

säuren gleich 100 % gesetzt werden. Ebenso war es unmöglich, die für die Hydrolyse eingesetzte Menge Phosphatase genau abzuwägen, weil der Aschegehalt je nach Vorbehandlung schwankt und mit den zur Verfügung stehenden kleinen Mengen (10-20 mg) nur schwer mit genügender Genauigkeit bestimmbar war. Als Berechnungsbasis wurde deshalb der Stickstoffgehalt des Phosphatasehydrolysates gewählt, der mit einer Genauigkeit von etwa $\pm 2\%$ bestimmt werden kann. Die bei der Hydrolyse zerstörten Aminosäuren werden dabei berücksichtigt, sofern ihr Stickstoffgehalt nicht durch Bildung von unlöslichem Humin der Bestimmung entzogen wird. Ganz ist dieser Verlust nicht zu umgehen, weil ein Teil der kleinen Huminmenge, die sich trotz Zusatz von TiCl_3 bildet, beim Eindampfen des Hydrolysates so stark an den Glaswänden haftet, daß er beim Wiederauflösen des Rückstandes zurückbleibt und bei der nachfolgenden Stickstoffbestimmung nicht miterfaßt werden kann. Die Berechnung auf den Stickstoffgehalt des Hydrolysates hat weiter den Vorteil, daß Ungenauigkeiten des Volumens, in dem der Hydrolysatrückstand aufgelöst wird, keine Rolle spielen; denn die Hydrolysatmenge, die auf die Kolonne aufgetragen wird, ist durch den im gleichen Volumen bestimmten Stickstoff eindeutig bekannt.

Zur Verhinderung der Huminbildung wurde die Hydrolyse der Phosphatase unter Zusatz von Titanchlorid mit 6 N HCl bei 110° durchgeführt. Die zur Hydrolyse angesetzte alkalische Kalbsdünndarm-Phosphatase wurde so gewählt, daß 1,5 bis 2 ml der chromatographiebereiten Hydrolysatlösung ungefähr 3-5 mg Aminosäuren enthielten. Das verwendete Phosphatasepräparat¹ war im Rahmen einer anderen Phosphatasearbeit im Institut hergestellt worden. Es handelte sich um ein Reinpräparat mit einer spezifischen Aktivität von 460 000 Phosphataseeinheiten/mg Protein-N. 1,2 ml der hydrolysierten Phosphataselösung, die 1,75 mg N/ml enthielt, entsprachen bei einem N-Gehalt von 14,6 % 16) 14,7 mg Phosphatase. Wurde der Hydrolysatrückstand von 1,2 ml dieser Phosphataselösung in 7 ml Puffer pH 2,4 aufgenommen, enthielt jeder ml ungefähr 2,2-2,3 mg Aminosäuren. Dies stellte die kleinste Menge dar, die unter den hier beschriebenen Chromatographiebedingungen noch gut getrennt und

¹ Wir danken Herrn Dr. med. G. Nuoffer für das von ihm hergestellte Phosphatase-Reinpräparat.

Tabelle III: Aminosäurezusammensetzung der alkalischen Kälberdarm-Phosphatase

Aufgetragener Hydrolysatstickstoff = 100 %;
 Chromatogramm I: 290 γ N; II: 435 γ N; III: 585 γ N; IV: 585 γ N; V: 290 γ N.

Amino- säure	I gefunden		II		III		IV		V		Mittelwert ($\pm\sigma$) in %
	γ	γ N %	γ	γ N %	γ	γ N %	γ	γ N %	γ	γ N %	
Asp	213	22,4	320	33,7	450	47,3	420	43,2	221	23,25	7,8 ($\pm 0,2$)
Thr	80	9,42	155	18,2	163	19,2	157	18,5	93	13,0	3,7 ($\pm 0,61$)
Ser	70,5	9,38	132	17,6	137	18,3	135	18,0	61	8,55	3,3 ($\pm 0,44$)
Glu	250	23,8	343	32,7	420	40	450	42,8	170	16,2	7,1 ($\pm 1,0$)
Pro	128	15,6	148	18,0	—	—	220	26,8	—	—	4,7 ($\pm 0,6$)
Gly	110,8	20,5	175	32,7	212	39,6	212	39,6	96,5	18,0	6,9 ($\pm 0,48$)
Ala	175	27,5	272	42,7	265	41,8	280	44	184	28,9	8,8 ($\pm 1,32$)
Val	166	19,9	205	24,5	270	32,3	313	37,4	125	15,0	6,0 ($\pm 0,67$)
Met	25	2,35	20	1,88	34	3,2	59	5,6	15,2	1,4	0,65 ($\pm 0,24$)
Ileu	59	6,3	87	9,3	127	13,6	108	11,5	51	5,3	2,1 ($\pm 0,21$)
Leu	140	15	212	22,7	246	26,3	219	23,4	117	12	4,65 ($\pm 0,54$)
Tyr	119	9,2	172	13,5	146	11,4	186	14,4	83,3	6,5	2,5 ($\pm 0,5$)
Phe	81,4	6,9	109	9,3	89	7,6	96	8,15	103	8,7	2,0 ($\pm 0,71$)
His	65	17,4	90	24,4	144*	39,0	—	—	—	—	5,6 ($\pm 0,46$)
Lys	74	14,2	151	29,0	222*	42,5	—	—	—	—	5,7 ($\pm 0,88$)
Arg	—	—	187	62,4	375*	110,5	—	—	—	—	15,1

* 100 % N = 765 γ N

bestimmt werden konnte. Da aber einzelne Aminosäuren in sehr kleinen Prozentzahlen vorlagen, wurden auch Chromatogramme mit der 1,5 und 2fachen Menge durchgeführt. Dies stellte die obere Grenze dar, weil sonst jene Aminosäuren nicht mehr genau bestimmbar waren, die im Gemisch in großer Konzentration vorlagen. Auf eine der Hydrolyse vorangehende Perameisensäureoxydation konnte verzichtet werden, da Cystin weder papierchromatographisch, noch durch Dünnschichtchromatographie, noch bei der Chromatographie des Phosphatasehydrolysates auf Dowex-50 nachgewiesen werden konnte.

Die quantitative Aminosäurezusammensetzung der Dünndarmphosphatase wurde mit zwei verschiedenen Hydrolysaten in total fünf Chromatogrammen ermittelt. Die gleiche Zahl und die gleichen Arbeitsbedingungen bei den Test- und den Hydrolysatchromatogrammen erlaubten anzunehmen, daß die Resultate beider Serien ungefähr dieselben Fehlergrenzen aufweisen würden. Dies war aber, wie die Tabelle III zeigt, nicht der Fall. Während bei den Testchromatogrammen (Tab. II) die Abweichungen bei 2/3 der Bestimmungen nur bis zu $\pm 5,5\%$ betrug, zeigen die σ -Werte der Tab. III, die für alle Aminosäuren mit drei oder mehr Resultaten ausgerechnet wurden, eine prozentuale Abweichung vom Mittelwert, die für die meisten Fälle $\pm 10\%$ bis $\pm 16\%$ beträgt. Für die in kleinen Konzentrationen vorliegenden Aminosäuren Methionin, Tyrosin und Phenylalanin beträgt die Streuung der Einzelwerte um den Mittelwert sogar zwischen $\pm 20\%$ und $\pm 35\%$. Die in der Tabelle III angegebenen Mittelwerte dürften demnach kaum genauer sein als $\pm 10\%$ des effektiven Wertes und können deshalb nur in erster Näherung die wirkliche Aminosäurezusammensetzung der alkalischen Dünndarmphosphatase wiedergeben. Die Resultate der Tabelle III sind als Prozente des gefundenen Aminosäurestickstoffs, bezogen auf den Phosphatase-Hydrolysatstickstoff, angeführt. Unter Verwendung des von *Portmann* et al. 16) für eine Phosphatase gleicher Reinheit angegebenen Stickstoffgehaltes von $14,6\%$ (Umrechnungsfaktor Hydrolysat-N in Phosphatase $6,85$) ergeben sich die in der Tabelle IV angegebenen Prozentzahlen der einzelnen Aminosäuren und die molare Zusammensetzung der einzelnen Aminosäuren und die molare Zusammensetzung der Phosphatase bei Annahme eines Molekulargewichtes von 10^5 g. Die Summe aller Aminosäuren machen $91,65\%$ der hydrolysierten Phosphatase aus. Die Phosphatase enthält aber neben

den Aminosäuren noch 5 % Hexosamin und 7 % Hexosen 16); weiter ist der schätzungsweise 1–1,5 % betragende Amid-NH₂-gehalt und der kleine Aschegehalt (wahrscheinlich kleiner als 1 %) der Phosphatase nicht berücksichtigt. Zählt man die Prozentzahlen aller Bausteine zusammen, findet man auf Grund der vorliegenden Befunde etwa 106 %. Berechnet man auf Grund der sich aus der oben angeführten molaren Zusammensetzung ergebenden Prozente des bei der Hydrolyse eingetretenen Wassers, muß man dafür 14 % in Abzug bringen. Die angegebenen Analysendaten erfassen demnach 92 % der Phosphatase. Auf Grund dieser Überlegungen ist anzunehmen, daß die Aminosäureprozentzahlen im Gesamten um etwa 8 % zu klein sind. Immerhin sieht man aus den Ergebnissen dieser Arbeit, daß die alkalische Kälberdünndarmphosphatase zur Hauptsache aus den beiden Dicarbonsäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure und den apolare Reste enthaltenden Aminosäuren Glykokoll, Alanin, Valin und Leucin aufgebaut ist. Auch die basische Aminosäure Arginin und die Hydroxyaminosäuren Threonin und Serin sind mit relativ hohen Molzahlen

Tabelle IV :

Aminosäurezusammensetzung in g % und in Mol/10⁵ g Phosphatase

Aminosäure	g %	Mol/10 ⁵ g
Asp	10,85	81,4
Thr	4,6	38,6
Ser	3,6	34,4
Glu	10,9	74,0
Pro	5,65	49,0
Gly	5,4	72,0
Ala	8,2	92,0
Val	7,3	62,4
Met	1,0	6,8
Ileu	2,9	22,0
Leu	6,4	48,5
Tyr	4,7	26,0
Phe	3,45	20,8
His	3,0	19,5
Lys	4,35	29,7
Arg	6,85	39,4
Try ¹	2,5	12,3

¹ Tryptophan wurde spektrophotometrisch bestimmt 16)

vertreten. Die beiden letzterwähnten Aminosäuren sind deshalb von besonderem Interesse, weil man vermutet, daß ihre OH-Gruppen (besonders jene des Serins) 17, 18) für die aktiven Bezirke der Phosphatase verantwortlich sind.

Experimenteller Teil

1. Aminosäuren-Standardkurven

25 mg, bzw. die äquivalente Menge Chlorhydrat von jeder der untersuchten 16 Aminosäuren (über P_2O_5 getrocknete Reinpräparate von Hoffmann-La Roche) wurden genau eingewogen und in 250 ml Pufferlösung (Zusammensetzung cf. S. 24) (pH-Werte cf. Tabelle I) gelöst. 2 ml dieser Stammlösungen wurden mit derselben Pufferlösung auf 20 ml, und 2, 3, 4 und 5 ml auf 10 ml verdünnt. 1 ml dieser Lösungen, die pro ml 10, 20, 30, 40 und 50 γ Aminosäure enthielten, wurde mit 1 ml Zitratpuffer (2 m, pH 5,15), 0,05 ml Vit. C (0,5 %) und zuletzt mit 1 ml Ninhydrinreagens, das 2 % Pyridin enthält, versetzt.

Die gut verschlossenen Röhrchen wurden genau 20 min in einem auf 100° eingestellten Glycerinbad erwärmt, sofort in Wasser abgekühlt und das Reaktionsgemisch mit 5 ml 70 Vol. % Alkohol versetzt. Nach 1 Stunde wurde mit demselben Alkohol auf 10 ml verdünnt und die Extinktion bei 570 $m\mu$ in einer Küvette mit 13 mm Schichtdicke im Coleman Spektrophotometer (Modell 14) bestimmt. Bei Prolin erfolge die Messung bei 440 $m\mu$. Als Blindwert wurde 1 ml der entsprechenden Pufferlösung mit denselben Reagentien erwärmt und mit Alkohol (70 Vol. %) auf 10 ml verdünnt. Dieser Blindwert, der 1 Stunde nach dem Erwärmen nur noch eine ganz schwache braunrötliche Färbung zeigt, wurde gleich 100 % T gesetzt. Zur Konstruktion der Standardkurven dienten die Mittelwerte aus 8-12 Parallelbestimmungen, wobei jede Bestimmungsserie mit einer frisch aus der Aminosäurestammlösung hergestellten Verdünnungsreihe und einer frisch hergestellten Vit. C Lösung durchgeführt wurde.

2. Ninhydrinreagens

10 g reinstes Ninhydrin (Fluka oder Merck) werden in 500 ml Zitratpuffer (2 m, pH 5,15) und 400 ml dest. Wasser gelöst und die Lösung nach Zugabe von 20 ml Pyridin purissimum Fluka mit dest. Wasser auf 1000 ml verdünnt.

3. Pufferlösungen

Die Zitratpufferlösungen: 2 m, pH 5,15; 0,1 m, pH 3,41; 0,1 m, pH 4,25; 0,1 m, pH 5,0 und 0,1 m, pH 6,5 und der Phosphatpuffer 0,2 m pH 6,85 wurden genau nach den Angaben von *Moore* und *Stein* 1, 4) hergestellt.

4. Chromatogramme auf Dowex-50 X 8

Das nach den Angaben von *Moore* und *Stein* vorbehandelte Dowex-50 W X 8 Harz 200-400 mesh (Fluka) wurde als Suspension aus einem aufgesetzten Tropftrichter in das 120 cm lange, mit Puffer pH 3,41 gefüllte Chromatogrammrohr durch Spontansedimentation eingefüllt. Dies ermöglicht eine homogene Füllung des Rohres, während ein nach der Vorschrift von *Moore* und *Stein* 2) mit 5 Harzportionen gefülltes Rohr eine sich wiederholende Schichtung gröberer und feinerer Harzpartikel aufweist. Wir verwendeten eine 110 cm lange Harzsäule, die eine etwas bessere Trennung mit dem von uns verwendeten Harze ergab als die in der Originalvorschrift beschriebene 100 cm Kolonne.

Die 15 cm Kolonne wurde mit demselben Harz, suspendiert in Zitratpuffer (0,1 m pH 5,0) hergestellt. Auch bei dieser Kolonne wurde die vorgeschriebene Temperatur von 25° durch thermostatisiertes Wasser, das durch den Heizmantel gepumpt wird, aufrecht erhalten. Dies erwies sich für eine gute Trennung der basischen Aminosäuren als unbedingt nötig.

Das Auftragen der Aminosäurelösung bzw. des Hydrolysates erfolgte genau nach der Vorschrift von *Moore* und *Stein* 2). Die Pufferdurchlaufgeschwindigkeit wurde möglichst genau auf 4 ml/Stunde eingestellt. Zum Auffangen der Fraktionen von 1 ml bedienten wir uns eines selbstgebauten Fraktionenkollektors, der entweder die Tropfen zählte oder das Eluat über ein 1 ml Siphon unterteilte. Die zweite Art der Fraktionierung erwies sich als bedeutend günstiger und ergab

auch regelmäßiger Resultate, weil die Tropfengröße je nach verwendetem Puffer und je nach der Kolonnentemperatur variierte und deshalb ziemlich schwankende Fraktionsvolumen ergab.

Die ersten 50 ml des 15 cm Kolonneneffluates wurden im Rotationsverdampfer unter Vakuum eingedampft, in einem möglichst kleinen Volumen (2-3 ml) Wasser gelöst, mit HCl auf pH 2,5-3 eingestellt und diese Lösung auf die 110 cm Kolonne aufgetragen. Als Variante wurden die Chromatogramme auf der 15 und der 110 cm Säule parallel mit dem vollständigen Aminosäuregemisch durchgeführt.

In diesem Falle muß das Chromatogramm auf der 110 cm Kolonne nur bis zur Eluierung des Tyrosins und des Phenylalanins durchgeführt werden. Obwohl diese zweite Methode die doppelte Menge Hydrolysat braucht, ist sie vorteilhaft, weil die hohe Puffersalzkonzentration des die neutralen Aminosäuren enthaltenden ersten Eluates der 15 cm Kolonne die gute Trennung dieser Aminosäuren bei der Rechromatographie auf der 110 cm Kolonne erschwert. Eine fast ebenso gute Vortrennung der basischen Aminosäuren konnte durch eine papierelektrophoretische Trennung erreicht werden. Dazu wurde das Hydrolysat oder die Lösung des Aminosäure-Testgemisches auf einem mit 1 % Oxalsäure vorgereinigtem Filterbogen (Whatman No 1 oder No 3 MM) von $32,5 \times 28,5$ cm bei pH 3,9 (Essigsäure-Pyridin Puffer) und bei 380-400 V während $1\frac{1}{2}$ Stunden elektrophoretisch getrennt. Die basischen Aminosäuren wandern als einheitliche Fraktion am weitesten kathodenwärts und können leicht und quantitativ von den sauren und neutralen Aminosäuren, die drei wenig wandernde Fraktionen bilden, abgetrennt werden. Die Lokalisierung erfolgt durch Anfärben von getrennt, aber parallel auf den beiden Randpartien mitwandernden Testgemischen. Je ein Streifen, der die basischen Aminosäuren und die drei andern Fraktionen enthält, wird nach Trocknen des Filterbogens herausgeschnitten und mit 0,01 N HCl eluiert. Die beiden Eluate werden unter Vakuum im Rotationsverdampfer zur Trockene eingedampft, in 2 ml Puffer pH 4 bzw. 2,5 aufgenommen und auf die 15 bzw. 110 cm Kolonne aufgetragen und chromatographiert. Die photometrische Bestimmung der Aminosäuren in den Chromatogrammfraktionen wurde, wie unter 1. beschrieben, durchgeführt. Als Blindwert diente 1 ml aminosäurefreies Kolonneneffluat, doch wurde zur Kontrolle immer ein 2. Blindwert mit 1 ml reiner Pufferlösung angesetzt.

5. Hydrolyse

1,2 ml einer Phosphatase-Lösung, die pro ml 1,75 mg N und eine Aktivität von 808 000 Phosphataseeinheiten enthielt, wurde mit 1,2 ml conc. HCl und mit drei Tropfen einer 15 %-igen Titanchlorid-Lösung (Merck) in einem Glasrohr unter Vakuum eingeschmolzen und während 44 Stunden in einem siedenden Toluolbad (Sdp. 110°) erhitzt. 2-3 Stunden nach dem Ansetzen färbt sich das Hydrolysat schwach gelb-bräunlich, doch kam es zu keiner sichtbaren Bildung von unlöslichen Huminflocken. Nach Beendigung der Hydrolyse wurde der Inhalt des Röhrchens in ein 20 ml Kölbchen gespült und das Hydrolysat zur Entfernung der Salzsäure im Rotationsverdampfer unter Vakuum zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wurde 3 mal in dest. Wasser aufgenommen und jedesmal bis zur Trockene verdampft. Der Hydrolysatrückstand wurde in 7 ml (I) bzw. 5 ml (II) Citratpufferlösung von pH 2,4 aufgenommen und der genaue Stickstoffgehalt mit einer Halbmikro-Kjeldahlmethode bestimmt. Er betrug für das Hydrolysat I 290 γ /ml, für das Hydrolysat II 390 γ /ml.

6. Aminosäurenachweis

Um die im Hydrolysat anwesenden Aminosäuren qualitativ nachzuweisen, wurde die Dünnschichtchromatographie auf Silicagel G (Merck) in Puffer pH 5 mit n-Butanol-Eisessig-Wasser (60:20:20) genau nach *M. Brenner* und *A. Niederwieser* (19) durchgeführt. Diese Methode wurde sowohl für die Überprüfung der qualitativen Aminosäurezusammensetzung der Phosphatase, als auch für die Identifizierung der einzelnen Aminosäurefraktionen des Kolonneneluates durchgeführt, wobei Dünnschichtchromatographie gegenüber der Papierchromatographie den Vorteil bot, daß man die Trennung und den Nachweis mit sehr kleinen Mengen von Aminosäuren durchführen kann. 1-2 γ je Aminosäure sind noch gut nachweisbar.

7. pH-Messung

Die pH-Werte der Pufferlösungen wurden mit einem pH-Meter Knick Typ 35 oder Metrohm E 388 auf 0,01 pH Einheiten genau gemessen und eingestellt.

LITERATURVERZEICHNIS

1. S. MOORE, W. H. STEIN: *J. biol. Chem.* *176*, 367 (1948)
2. S. MOORE, W. H. STEIN: *J. biol. Chem.* *192*, 663 (1951)
3. S. MOORE, W. H. STEIN: *J. biol. Chem.* *211*, 893 und 907 (1954)
4. C. H. W. HIRS, S. MOORE, W. H. STEIN: *J. biol. Chem.* *195*, 669 (1952).
5. F. SANGER: *Biochem. J.* *39*, 507 (1945)
6. S. AKABORI, H. OHNO und K. NARITA: *Bull. Chem. Soc. Japan* *25*, 214 (1952)
7. H. HLASIWETZ und J. HABERMANN: *Liebigs Ann. Chem.* *169*, 195 (1873)
8. E. KOFRANY: *Z. physiol. Chem.* *283*, 14 (1948)
9. M. X. SULLIVAN, W. C. HESS: *J. biol. Chem.* *117*, 423 (1937)
10. J. GOA: *Acta Chem. Scand.* *15*, 1975 (1961)
11. P. B. HAMILTON: *Annals of the New York academy of sciences.* *102* Art. 1 1-180 (1962)
12. P. B. HAMILTON, D. C. BOGUE, R. A. ANDERSON: *Analyt. Chem.* *32*, 1782 (1960)
13. K. HANNING: *Clinica Chimica Acta* *4*, 51 (1959)
14. E. TETZNER: *Microchem.* *28*, 141 (1940)
15. W. TROLL und K. R. CANNAN: *J. biol. Chem.* *200*, 803 (1953)
16. P. PORTMANN, R. ROSSIER und H. CHARDONNENS: *Helv. Physiol. Acta* *18*, 414 (1960)
17. L. ENGSTROEM: *Biochem. Biophys. Acta* *52*, 49 (1961)
18. L. ENGSTROEM: *Biochem. Biophys. Acta* *54*, 179 (1961)
19. M. BRENNER und A. NIEDERWIESER: *Experientia* *16*, 378 (1960)