

Zeitschrift: Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène
Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit
Band: 54 (1963)
Heft: 1

Artikel: Bewertung ausgewählter Methoden zur quantitativen Papierchromatographie essentieller Aminosäuren
Autor: Doboszyski, T. / Wierzchowski, J.
DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-982722>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

Download PDF: 08.02.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>



MITTEILUNGEN

AUS DEM GEBIETE DER

LEBENSMITTELUNTERSUCHUNG UND HYGIENE

VERÖFFENTLICHT VOM EIDG. GESUNDHEITSAMT IN BERN

Offizielles Organ der Schweizerischen Gesellschaft für analytische und angewandte Chemie

TRAVAUX DE CHIMIE ALIMENTAIRE ET D'HYGIÈNE

PUBLIÉS PAR LE SERVICE FÉDÉRAL DE L'HYGIÈNE PUBLIQUE À BERNE

Organe officiel de la Société suisse de chimie analytique et appliquée

ABONNEMENT:

Schweiz Fr. 17.— per Jahrgang (Ausland Fr. 22.—)
Suisse fr. 17.— par année (étranger fr. 22.—)

Preis einzelner Hefte Fr. 3.— (Ausland Fr. 4.—)
Prix des fascicules fr. 3.— (étranger fr. 4.—)

BAND – VOL. 54

1963

HEFT – FASC. 1

Bewertung ausgewählter Methoden zur quantitativen Papierchromatographie essentieller Aminosäuren

Von *T. Doboszyński* und *J. Wierzchowski*

(Mitteilung aus dem Lehrstuhl für Lebensmittelchemie der Med. Akademie in Gdańsk)

Die große Anzahl von Arbeiten aus dem Gebiet der papierchromatographischen Aminosäurenbestimmung ist nicht nur ein Maßstab für die Bedeutung dieses Gebietes, sondern auch für die Schwierigkeiten, die hier zu bewältigen sind. Mit Rücksicht auf die Bedeutung der essentiellen Aminosäuren im Nahrungsmittelprotein ist ihre quantitative Bestimmung in gewisser Hinsicht ein besonderes Problem.

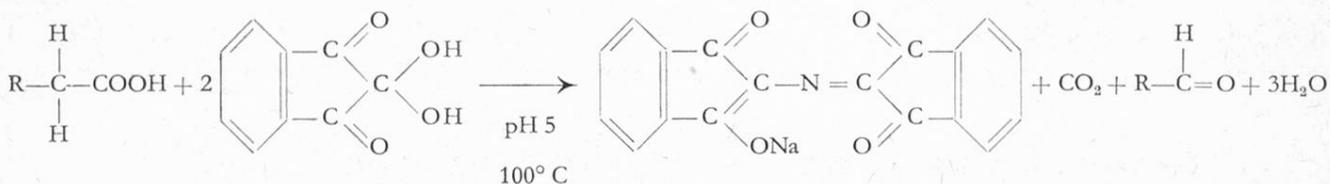
Als essentiell bezeichnet man 10 Aminosäuren (1, 3, 16, 37, 40), wenn auch nach *Rose*³³ Arginin und Histidin zur Aufrechterhaltung der Stickstoffbilanz eines erwachsenen Menschen nicht notwendig sind. Nicht alle essentiellen Aminosäuren können jedoch in dem mit Säure behandelten Proteinhydrolysat quantitativ bestimmt werden. Bei den sauren Hydrolysen gehen so bedeutende Mengen von Tryptophan verloren, daß eine Bestimmung dieser Aminosäure unmöglich ist. Bei der alkalischen Hydrolyse und der Anwendung von p-Dimethylaminobenzaldehyd, welches mit dem Tryptophan spezifisch reagiert, erübrigt sich eine chromatographische Trennung dieser Aminosäure von den restlichen Bestandteilen³⁶. Aus diesen Gründen kann man mit Hilfe der Papierchromatographie praktisch genommen 9 essentielle Aminosäuren bestimmen, und zwar: Arginin, Phenylalanin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Threonin und Valin.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Wahl und eingehenden Beurteilung der Methoden, die einerseits den obengenannten Forderungen entsprechen, andererseits in den einschlägigen Laboratorien weitere Anwendung finden können.

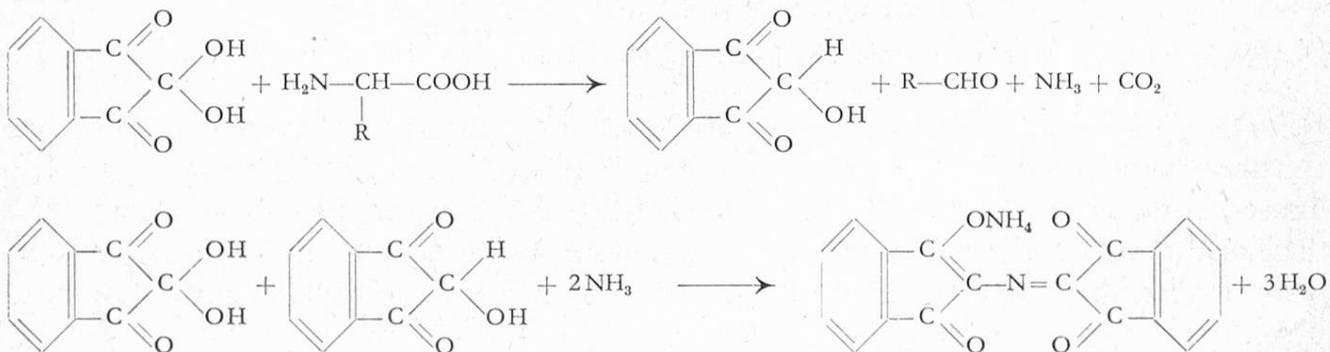
Theoretischer Teil

Von den angewandten quantitativen Methoden der Papierchromatographie wie z. B. visuelle Fleckenvergleiche, planimetrische oder densimetrische Auswertung, sowie eluieren der Flecke gilt die letztgenannte als genaueste³¹. Das Eluieren der durch Einwirkung von Ninhydrin entstandenen Flecke bzw. der Ninhydrin-Kupfersalzkomplexe gestattet Ergebnisse mit einer Genauigkeit von: $\pm 2\%$ (44), $\pm 4\%$ (15), $\pm 4-5\%$ (9), $\pm 5-7\%$ (29). Bemerkt sei, daß die angegebenen Werte in großem Maße nur Standardmischungen von einigen Aminosäuren betreffen. Die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse der papierchromatographischen Methode bei Anwendung der Elution von Farbkomplexen ist vor allem abhängig von den Bedingungen, unter welchen der Farbkomplex entsteht, sowie von der Trennung der zu bestimmenden Aminosäuren.

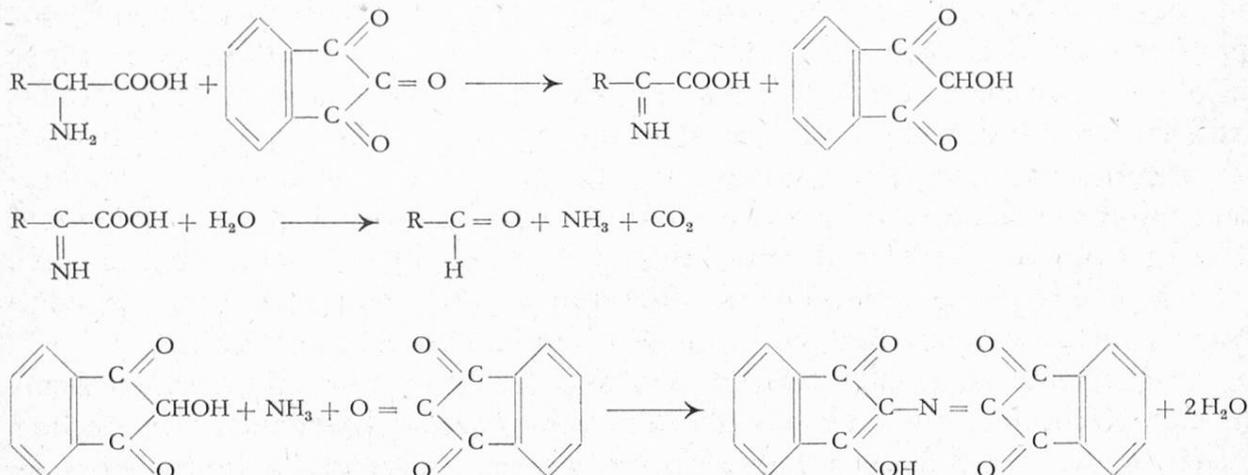
Die Farbreaktion der Aminosäuren mit Ninhydrin verläuft nach folgendem Schema^{24, 27}:



Diese Reaktion kann auch auf folgende Weise dargestellt werden^{14, 35}:

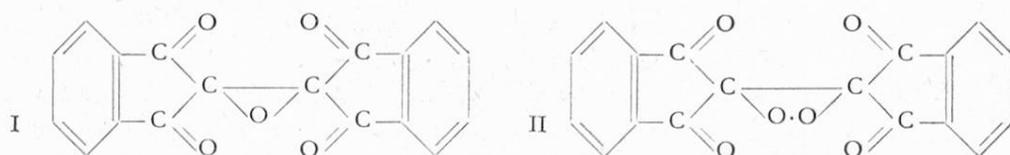


Die Reaktion unter Berücksichtigung der aktiven Ninhydrinform verläuft wie folgt⁴⁰:



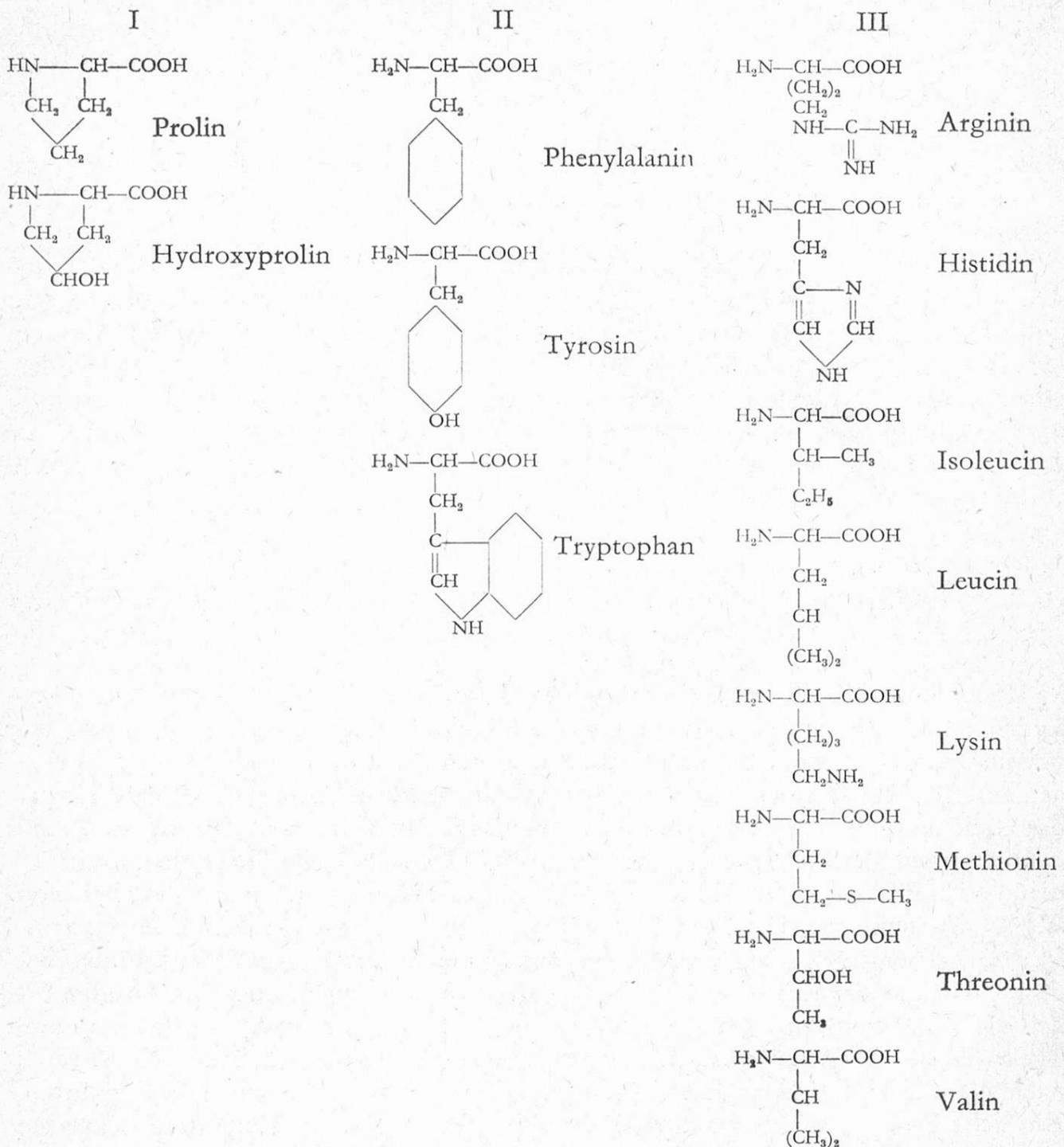
In der ersten Reaktionsstufe erfolgt die oxidative Desamination der Aminosäure, wobei je ein Molekül Hydrindantin (reduziertes Ninhydrin) und NH_3 entsteht. In der zweiten Stufe folgt die Kondensation von Hydrindantin, Ammoniak und Ninhydrin, wobei das farbige Anion des Diketohydrindeliden-diketohydrindamin, auch DYDA³⁹ genannt, entsteht. Der Verlauf der Reaktion wird dadurch bestätigt, daß Ammoniak mit Ninhydrin nur bei Anwesenheit von reduzierenden, hydrindantinbildenden Substanzen, zu DYDA kondensiert. Der Umstand, daß unter gleichen Bedingungen NH_3 langsamer und nicht vollständig im Vergleich zu den Aminosäuren reagiert, bestätigt jedoch nicht den obgenannten Verlauf.

Hieraus geht hervor, daß die Desamination und Kondensation höchstwahrscheinlich in Verbindung stehen. Auf andere Weise reagiert Ninhydrin mit Prolin und Hydroxyprolin, es fehlt die Desamination und es entsteht nicht DYDA, nach der Dekarboxylierung erfolgt Kondensation mit Ninhydrin. Der Vergleich der verschiedenen Reaktionsbedingungen mit DYDA-Bildung weist darauf hin, daß die Ursache für den ungleichen Verlauf und niedrigen Ausbeute der Reaktion in der leichten Oxydation des durch oxydierte Desamination der Aminosäuren entstandenen Hydrindantin zu suchen ist²³.

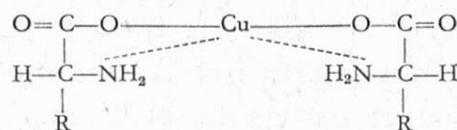


In organischen Lösungsmitteln bildet Hydrindantin (I), ähnlich wie Ninhydrin (II), eine aktive Form, die zwei Moleküle Wasser verliert. Die aktiven Formen von Hydrindantin und Ninhydrin treten meist in niedrigen Konzentrationen auf. Der Wassergehalt der organischen Lösungsmittel bedingt eine Verschiebung des Gleichgewichts zu den inaktiven Formen. Dies beweist der Umstand, daß zum quantitativen Verlauf der Reaktion ein großer Überschuß von Ninhydrin und Hydrindantin nötig ist. Der Abfall der Aktivität des Ninhydrins in Anwesenheit von Wasser ist somit mit dem Zerfall der aktiven Form in zwei Moleküle Ninhydrinhydrat verbunden²³. Der vorgesehene theoretische, mit der DYDA-Bildung bedingte Verlauf der Reaktion zwischen Ninhydrin und den Aminosäuren findet mit den meisten Aminosäuren, mit Ausnahme von Prolin, Hydroxyprolin, Phenylalanin, Thyrosin und Tryptophan statt. Die genannten Aminosäuren haben nach Meyer²¹, nach der Farbreaktion, eine viel kleinere Intensität als die übrigen Aminosäuren. Ähnliche Beobachtungen machten Yemm und Coking⁴³ mit Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan. Die Geschwindigkeit, mit welcher bei den obgenannten Aminosäuren die Farbverbindung entsteht, gemessen von Blauth-Opienska und Mitarb. mit dem Ninhydrin-Kalttest²⁷, sowie von Saifer und Oreskes³⁸ bei 100 °, ist zuweilen größer als bei den übrigen Aminosäuren. Dies betrifft vor allem Tyrosin und Phenylalanin. Die verschiedenen Reaktionsbedingungen erlauben es zwar nicht, bestimmte Folgerungen für die einzelnen Fälle zu ziehen, jedoch zeigen sie, daß der Verlauf der Reaktion spezifisch ist und die Ausbeute der Farbreaktion nicht von der Geschwindigkeit des Verlaufes abhängig ist.

Die Abhängigkeit der Farbintensität von der chemischen Struktur zeigt die unten angegebene Aufteilung der Aminosäuren.



Sind auf dem Papier zweiwertige Kupfersalze vorhanden, so reagiert Ninhydrin nicht mit den Aminosäuren. Die Aminosäuren verhalten sich gegenüber den Kupferverbindungen einwertig. Im Verlauf der Reaktion entstehen Verbindungen folgender Art²⁰:



Der Reaktionsverlauf zwischen den Aminosäuren und Ninhydrin bei Abwesenheit von Verunreinigungen ist abhängig von der Menge des Ninhydrins, Wasser, Art des Lösungsmittels, pH, sowie der Temperatur und Zeit, welche zum Entwickeln der Chromatogramme verwendet wurde. Wird die Temperatur von 100 – 120 °, bei einer Exponierung von 5 Minuten, überschritten, so tritt ein Zerfall des Farbproduktes ein¹⁰. Es ist jedoch bei dem Entwickeln von Chromatogrammen nicht notwendig, die Temperatur von 100 ° zu überschreiten^{23, 30}. Im Falle, daß die Reaktion auf dem Papier stattfindet, kommt zu den obgenannten Faktoren noch die Eigenschaft des Papiers hinzu.

Horner und Mitarb. fanden an Hand der Änderungen in der Zusammensetzung der beim Chromatographieren durchfließenden Lösungsgemischen einen Cellulose-Wasser-Komplex, sowie einen Komplex des organischen Lösungsmittels mit Cellulose. Auf Grund dieser Beobachtungen stellten sie das Bestehen eines dreifachen Cellulose-Wasser-Lösungsmittel-Komplexes fest. Man fand, daß die Menge des adsorbierten Wassers von dem Gemisch der organischen Lösungsmittel, in Wasser gelösten Salzen und von der Art des Papiers abhängig ist. Die Verteilung der Substanz während des Chromatographierens ist bei der Papierchromatographie von der Anwesenheit zweier stationärer und einer beweglichen Phase abhängig. Der Cellulose-Wasser-Komplex stellt die erste Phase dar, das an Cellulose adsorbierte Wasser die zweite Phase und als dritte wird das organische Lösungsmittel mit dem restlichen, ungebundenen Wasser betrachtet. Das organische Lösungsmittel kann gleich wie mit Wasser sich mit der Cellulose (vor allen Dingen mit den Hydroxylgruppen) verbinden und in diesem Falle ist der entstandene Cellulose-Wasser-Lösungsmittel-Komplex die stationäre Phase. *Burma*⁷ betont, daß in der Papierchromatographie die Teilung zwischen der zweiten und der dritten Phase von grundsätzlicher Bedeutung, während die Teilung zwischen der ersten und zweiten Phase weniger wichtig ist. Aus diesem Grunde hat die Anwendung von Lösungsmitteln einen großen Einfluß auf die Farbreaktion der Aminosäuren mit Ninhydrin.

Im Gegensatz zum DYDA hat der DYDA-Komplex mit $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$ (5), CoCl_2 (17), CdCl_2 (2), SnCl_2 (34) eine größere Stabilität. Der Abfall des Extinktionswertes des Kupfer-Komplexes nach 60stündigem Aufbewahren beträgt in Bezug auf den Anfangswert 15 – 20 %. Trotz großer Stabilität der Farbkomplexe muß man sie von Cl_2 , N-Oxyde, H_2S fern halten, da sie in deren Anwesenheit von rosarot zu gelblich übergehen. Die beobachtete Übereinstimmung mit dem Lambert-Beerschen Gesetz erlaubt eine quantitative Bestimmung in den Konzentrationsgrenzen 0 – 5 μg , auf Alfa-Aminostickstoff berechnet. Die Farbe der Komplexe ist vom pH abhängig. In saurer Lösung haben sie eine rosa-rote Färbung, in alkalischer Lösung blau-violett. Der blau-violette Komplex kann ebenfalls zu quantitativen Bestimmungen verwendet werden, er hat jedoch kleinere Extinktionswerte¹⁹.

Die quantitative Aminosäurebestimmung mit Hilfe der stabilen Farbkomplexe, z. B. Kupfer-Komplexe, ist der kolorimetrischen Aminosäurebestimmung in der DYDA-Form überlegen.

Eine der wichtigsten Bedingungen in der quantitativen Papierchromatographie ist die genaueste Trennung der zu bestimmenden Komponenten. Daher spielt die Wahl der geeigneten Technik eine sehr wichtige Rolle. Man behauptet, daß die zweidimensionale Chromatographie hierfür aus folgenden Gründen nicht geeignet ist:

1. unscharfe Trennung der Aminosäuren;
2. einige Aminosäuren bleiben ungetrennt (Leucin, Isoleucin);
3. das Auftragen der Vergleichslösung ist unmöglich¹⁰.

Diese Schwierigkeiten sind unter anderem dadurch bedingt, daß in der zweidimensionalen Technik die untersuchte Lösung in Form eines Tropfens aufgetragen werden kann, dessen Größe und Konzentration sehr begrenzt ist. (Der Durchmesser des Tropfens darf nicht größer als 1,5 cm und die Konzentration nicht zu groß sein, da die Trennung um so schlechter ist, je mehr Substanz auf die Flächeneinheit fällt.) Die Trennung der Aminosäuren auf einem Bogen begrenzt die Wahl der Lösungsmittel und verhindert daher gleichgute Trennung der Komponenten. Die Kreuzung der Komponenten schafft zusätzliche Schwierigkeiten in der quantitativen Bestimmung und erlaubt nicht, die Vergleichslösung gleichzeitig einzutragen. Die eindimensionale Chromatographie besitzt diese Nachteile nicht.

Versuchsteil

Mit Rücksicht auf die Technik der Aminosäuretrennung, sowie die Eigenschaften der erhaltenen Farbverbindungen und die Bedingungen ihrer quantitativen Bestimmung, wurden von vielen Methoden und Modifikationen die Methode von *Fischer* und *Dörfel*¹¹, *Giri* und Mitarb.¹⁰ sowie *Bode*⁶ in Betracht gezogen. Diese Methoden sind gekennzeichnet durch die Anwendung der eindimensionalen, absteigenden Chromatographie der Aminosäuren und durch die nachfolgende kolorimetrische Bestimmung des DYDA-Kupfer-Komplexes. Die Vorversuche begannen mit der chromatographischen Trennung der Aminosäuren in einer Vergleichslösung. Zur Anwendung kamen die Papiere Whatmann Nr. 1 und Schleicher Nr. 2043a, sowie folgende in den Methoden angegebene Lösungsmittel:

1. n-Butanol-Eisessig-Wasser (4 : 1 : 5), Lösungsmittel nach *Partridge*³⁰;
2. n-Butanol- mit Puffer von pH 8,4 gesättigter Benzylalkohol;
3. o-Kresol-Puffer von pH 6,2;
4. Phenol-Puffer von pH 12,0.

Gleichzeitig wurden quantitative Bestimmungen von unmittelbar auf das Papier aufgetragenen Aminosäuren durchgeführt, wobei die obgenannten Lösungsmittel Anwendung fanden. Es wurden auch zusätzliche Bestimmungen mit lösungsmittelgetränktem Papier durchgeführt. Im ersten Falle (Lösungsmittel nach *Partridge* und andere von *Bode* angegebene Lösungsmittel) bemerkte man keine Abweichungen. Minimale Schwankungen lagen in der Fehlergrenze. Die Bestimmungsergebnisse der einzelnen Aminosäuren (mit Ausnahme von Phenylalanin), umgerechnet auf Alfa-Aminostickstoff, zeigten große Übereinstimmung.

In anderen Fällen wurden sehr bedeutende Abweichungen in den Ergebnissen festgestellt, wobei die Werte nach dem Chromatographieren niedriger werden. Bestimmungen, bei welchen die Aminosäuren auf vorher getränktes Papier aufgetragen werden, hatten ebenfalls im Vergleich zu den Anfangswerten Abweichungen, worauf auch andere Autoren aufmerksam machten²⁵. Außer der niedrigeren Ausbeute der Reaktion und größeren Schwankungen der Ergebnisse wurden keine Wechselbeziehungen zwischen den einzelnen Aminosäuren und den Alfa-Aminostickstoff-Werten beobachtet. Vergleiche der Ergebnisse von Bestimmungen mit dem Lösungsmittel nach *Partridge* und anderen lassen vermuten, daß ihre niedrigen Werte und große Streuung die Folge einer nicht quantitativ verlaufenden Reaktion waren, was nicht mit Aminosäureverlusten erklärt werden kann. Dies scheint einerseits begründet zu sein in dem pH-Wert des Mediums, welcher vom optimalen abwich, andererseits in der Anwesenheit von aromatischen Verbindungen auf dem Papier.

Beide der obgenannten Faktoren haben Einfluß auf die Ausbeute von DYDA und weiter auf den Verlauf der Komplexbildung mit Kupfersalzen. Mit Rücksicht darauf, daß einer der grundsätzlichen Vorteile der Chromatographie ihre Einfachheit ist, wurde als Kriterium in der Bewertung der Methode die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sowie die Anzahl der unerläßlichen Manipulationen angenommen.

Aus den Vorversuchen ging hervor, daß bei der Methode von *Fischer* und *Dörfel* eine Vergleichslösung gleichzeitig angewandt werden muß, was von den Autoren selbst betont wird. Sie bemerkten ebenfalls, daß die Vergleichslösung in der Zusammensetzung der untersuchten Lösung ähnlich sein muß. Dieser Umstand ist bei der Methode von *Bode* nicht notwendig. Nach den Angaben der Autoren kann man von 9 essentiellen Aminosäuren (ohne Tryptophan), die im sauren Hydrolysat gefunden werden können, 8 (ohne Histidin) bestimmen, indem man 5 Lösungsmittel (Phenol-Puffer pH 1, Phenol-Puffer pH 12, n-Butanol-Benzylalkohol-Puffer pH 8,4, o-Kresol-Puffer pH 6,2, Lutidin-Puffer pH 6,2) und 2 Ninhydrinlösungen verschiedener Zusammensetzung (eine für die saure Phenol-Lösung, die andere für die restlichen Lösungsmittel) verwendet. Die Methode von *Bode* erlaubt Bestimmungen von 7 Aminosäuren (ohne Lysin und Isoleucin) mit nur einem Lösungsmittel nach *Partridge*. Zusammen mit der Methode von *Giri* schafft die von *Bode* modifizierte Methode durch den Zusatz von Essigsäure zur Ninhydrinlösung und der Änderung in der Entwicklung der Chromatogramme (erhöhte Temperatur und kürzere Zeit) bessere Bedingungen zum quantitativen Verlauf der Reaktion zwischen den Aminosäuren und Ninhydrin. In der Beurteilung der Methoden zur Bestimmung von allen essentiellen Aminosäuren im sauren Hydrolysat kann man feststellen, daß die Methode von *Fischer*:

1. Histidin nicht bestimmt;
2. die Bestimmung der restlichen Aminosäuren mit Anwendung von 5 Lösungsmitteln (also fünffaches Auftragen, was den Fehler vergrößert) vorsieht;
3. die gleichzeitige Auftragung von Vergleichslösungen für die Aminosäuren vorsieht;

4. mit ihren Standardmischungen von Aminosäuren nicht ohne Einfluß auf das Ergebnis der quantitativen Bestimmung bleibt.

Die Methode von *Bode*:

1. bestimmt Lysin und Isoleucin nicht;
2. erlaubt die Bestimmung der übrigen essentiellen Aminosäuren auf einem Chromatogramm;
3. zeigt eine gewisse Übereinstimmung (mit Ausnahme von Phenylalanin) der einzelnen Aminosäuren mit dem Alfa-Aminostickstoff-Wert;
4. verlangt der reproduzierbaren Trennung und Farbreaktion wegen die gleichzeitige Anwendung von Vergleichslösungen nicht.

Mit Rücksicht auf die Möglichkeit, eine größere Anzahl von Aminosäuren auf einem Chromatogramm zu bestimmen, sowie die besseren Bedingungen der quantitativen Reaktion zwischen den Aminosäuren und Ninhydrin, wandte man bei weiteren Versuchen die Methode von *Bode* an.

Die Trennung der Aminosäuren wurde auf den Papieren Whatmann 1 und Schleicher Nr. 2043a vorgenommen. Es wurden 10–30 μ l einer Lösung, die 40–80 mg der einzelnen Aminosäuren in 100 ml 10 % Isopropylalkohol enthielt, aufgetragen. Die Trennung auf anderen empfohlenen Papieren, wie z. B. Schleicher 2043b, 2045a, 2045b wurde nicht durchgeführt, da diese Papiere nicht zur Verfügung standen.

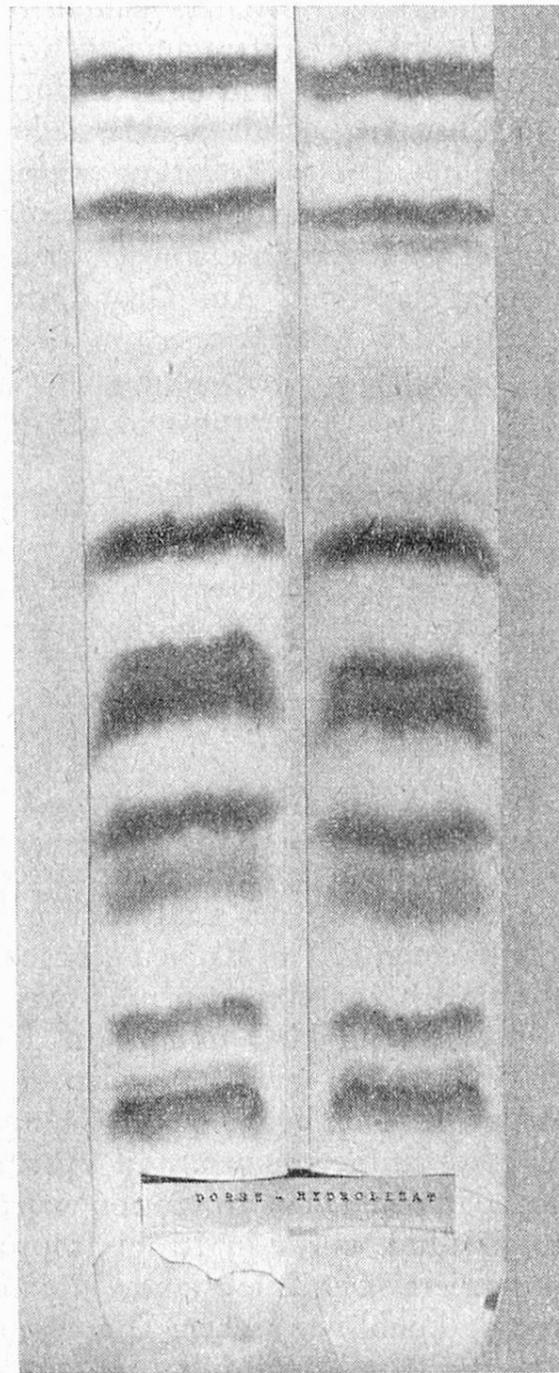
Während der Trennung von Mischungen der essentiellen Aminosäuren wurde beobachtet, daß die Trennschärfe von Valin und Methionin, ähnlich wie die von Histidin und Lysin, nicht befriedigend ist. Was Leucin und Isoleucin anbetrifft, so stellte man fest, daß sie einen gemeinsamen Flecken bildeten. Gleichzeitig wurde festgestellt daß:

1. die Auftragung der Lösung in Form eines Striches von ca. 7 mm Breite bessere Trennungen gibt, als die Auftragung in Tropfenform;
2. Anfang und Ende des Striches mindestens 1 cm vom Rande des Papierstreifens entfernt sein muß, da sonst die Flecke der Aminosäuren mit größerem Rf teilweise deformiert (am Rande verwischt) werden;
3. die Breite der Papierstreifen bei Auftragung von 15–20 μ l Lösung nicht weniger als 7 cm sein muß;
4. im Falle der ungenügenden Sättigung der Kammer mit der wässrigen Phase der Lösungsmittel (die untere Schicht des Lösungsmittels nach *Patridge*) Histidin von Lysin nicht getrennt wird;
5. das Entwickeln der Chromatogramme in einer höheren als 95 ° Temperatur das Rosawerden des ganzen Streifens verursacht;
6. besser als das Besprühen das Durchziehen der Streifen durch die Ninhydrinlösung in einer Petri-Schale ist;
7. bei einer Lysin-Konzentration von mehr als 2,5 μ g, berechnet als Alfa-Aminostickstoff, die lineare Beziehung zwischen Extinktion und Konzentration Abweichungen aufweist;

8. das Eluieren des farbigen Kupferkomplexes von Lysin die längste Zeit beansprucht;

9. das Auftragen der Aminosäuren-Vergleichslösung (in 10 % Isopropylalkohol) keinerlei Schwierigkeiten verursacht (der niedrigen Oberflächenspannung von Isopropylalkohol wegen)⁴.

Die durch saure Hydrolyse des Proteins von Fischkonserven erhaltenen Hydrolysate wurden im weiteren Teil der Arbeit chromatographiert²⁶. Zu Beginn erhielt man mit den untersuchten Lösungen keine befriedigende Trennung. Die Trennung von Threonin und Glutaminsäure war ebenfalls ungenügend scharf.



Leucin
Isoleucin
Phenylalanin

Valin
Methionin

Threonin

Arginin
Histidin
Lysin

Chromatogramm vom Dorsch-Hydrolysat

Aus diesem Grunde begnügte man sich nicht mit den erhaltenen Ergebnissen und nach einer Reihe von Bestimmungen führte man im weiteren Teil der Arbeit Modifikationen ein. Das Lösungsmittel ließ man dreimal durchlaufen und erhielt so eine bessere Trennung von Valin und Methionin, sowie Leucin und Isoleucin. Außerdem wurden die Papierstreifen so gehängt, daß sie im Anfangsstadium aufsteigend, sodann absteigend chromatographierten. Dies erlaubte längere Streifen im Vergleich zu der Kammerhöhe anzuwenden. (Kammerhöhe 46 cm – Länge der Streifen 60 cm). Mit diesen Abänderungen, zusammen mit der Auftragung in Strichform, erhielt man mehr kompakte und gut getrennte Farbflecke (mit Ausnahme von Threonin, dessen Trennung sich nicht verbesserte).

Was die obgenannten Abänderungen betrifft, so muß bemerkt werden, daß in der Papierchromatographie sowohl die Auftragung in Strichform^{10, 12}, wie auch die kombinierte auf-absteigende Technik⁴¹ und das mehrfache Chromatographieren derselben Streifen⁴¹ schon früher angewandt wurde, jedoch hat man dies nicht in komplexer Form durchgeführt. Dieser Änderung wegen wurden zur besseren Kontrolle der Ergebnisse bei quantitativen Bestimmungen gleichzeitig Vergleichslösungen chromatographiert. Die Ergebnisse wurden anhand der Geraden von Versuch und Vergleichslösung berechnet. Auf Grund der Untersuchungen der Hydrolysate wurde festgestellt, daß Extinktionen im Bereiche von 0,2 – 1,2 auf dem Pulfrich-Photometer abgelesen werden konnten, wenn man 180 – 250 µg hydrolysiertes Protein in 15 µl Lösung auftrug und die Absorptionsküvetten F4, 992 anwandte.

Damit wurden die einleitenden Arbeiten in bezug auf Wahl und Modifikation der Methode beendet und zum grundsätzlichen Teil der Arbeit, d. h. der Beurteilung der Methoden übergegangen. Zu diesem Zweck wurden quantitative Bestimmungen der essentiellen Aminosäuren in vorbereiteten Proteinhydrolysaten durchgeführt und die Ergebnisse statistisch bearbeitet.

Hydrolyse

Von dem zur Hydrolyse vorbereiteten Material (entfettetes und entwässertes Protein aus Fischkonserven) wurden auf der analytischen Waage ca. 0,5 g abgewogen. Die Einwaage wurde in einen 100 ml Kolben gebracht, 8 ml 80 % HCOOH zugegeben und unter Schütteln bis zur homogenen Lösung mit Rückflußkühlung leicht erwärmt. Sodann wurden 8 ml H₂O und 24 ml HCl (D = 1,19) zugeführt. Die Probe wurde 20 Stunden bei leichtem Sieden hydrolysiert. Nach dieser Zeit wurde das Hydrolysat im Vakuum bei 45 – 55 ° C eingedampft, der Trockenrückstand mit ca. 20 ml H₂O aufgenommen und erneut zur Entfernung der Säurereste im Vakuum eingedampft. Diese Operation wurde dreimal wiederholt. Der so erhaltene Trockenrückstand wurde in 10 ml Isopropylalkohol gelöst und durch ein Schottfilter G4 filtriert. Der Rückstand (Huminverbindungen) wurde sorgfältig mit 10 % Isopropylalkohol gewaschen. Die vereinigten Filtrate wurden mit 10 % Isopropylalkohol auf 30 ml aufgefüllt. So wurden 4 Hydrolysate zur Bestimmung vorbereitet und im Kühlschrank aufbewahrt.

Herstellung der Vergleichslösungen

Zur Herstellung der Vergleichslösungen verwendete man 9 essentielle Aminosäuren von hohem Reinheitsgrade.

1. dl-Arginin	—	Schuchardt, D. B. R.
2. dl-Histidin	—	Feinchemie, D. D. R.
3. dl-Phenylalanin	—	B. D. H., London
4. dl-Isoleucin	—	Merck, D. B. R.
5. l-Leucin	—	Merck, D. B. R.
6. dl-Lysin	—	B. D. H., London
7. dl-Methionin	—	Merck, D. B. R.
8. dl-Threonin	—	B. D. H., London
9. dl-Valin	—	Schuchardt, D. B. R.

Aus den obgenannten, über P_2O_5 getrockneten Aminosäuren, wurden Lösungen in 10 % Isopropylalkohol mit HCl-Zusatz hergestellt, die in der Zusammensetzung dem Hydrolysat ähnlich waren. Zur Herstellung von 100 ml wurden folgende Mengen Aminosäuren angewandt (Lösung Nr. 1):

Arginin	—	85 mg
Histidin	—	35 mg
Phenylalanin	—	75 mg
Isoleucin	—	85 mg
Leucin	—	125 mg
Lysin	—	125 mg
Methionin	—	35 mg
Threonin	—	85 mg
Valin	—	85 mg
Zusammen		735 mg/100 ml

Von der Lösung Nr. 1 wurden durch Verdünnung Lösung 2 und 3 hergestellt, die zur Zeichnung der Geraden und Lösung Nr. 2 außerdem zum gleichzeitigen Chromatographieren mit den Hydrolysaten verwendet wurden.

Lösung Nr. 2: 30 ml Lösung Nr. 1 + 20 ml 10 % Isopropylalkohol

Lösung Nr. 3: 20 ml Lösung Nr. 1 + 30 ml 10 % Isopropylalkohol.

Gehalt der Aminosäuren $\mu\text{g}/15 \mu\text{l}$ Lösung (die zum Chromatographieren aufgetragene Menge).

1. Arginin	12.75	7.65	5.10
2. Histidin	5.25	3.15	2.10
3. Phenylalanin	11.25	6.75	4.50
4. Isoleucin	12.75	7.65	5.10
5. Leucin	18.75	11.25	7.50
6. Lysin	18.75	11.25	7.50
7. Methionin	5.25	3.15	2.10
8. Threonin	12.75	7.65	5.10
9. Valin	12.75	7.65	5.10

Die vorbereiteten Lösungen wurden im Kühlschrank aufbewahrt und in der Zeit von 6 Wochen zu Bestimmungen verwendet.

Chromatographische Trennung

Reagenzien und Papier:

n-Butanol prim. p. a., Zakł. Chem. «Estron»

Eisessig p. a., Zakł. Chem. Oświęcim

Redestilliertes Wasser

Schleicher-Schüll-Chromatographiepapier Nr. 2043a

Aus den Papierbogen vom Format 58×60 cm wurden Streifen von 60 cm Länge und 7,25 cm Breite geschnitten. Mit einer Mikropipette wurden $15 \mu\text{l}$ der zu untersuchenden Lösung auf die Streifen aufgetragen. Die Lösung wurde in Form eines Striches von 6×50 mm aufgetragen. Die Startlinie befand sich 9 cm vom unteren Rande des Streifens. Der feuchte Fleck wurde bei Zimmertemperatur getrocknet. Die Papierstreifen wurden dann in untypisierte, mit den Dämpfen des Lösungsmittels gesättigten Kammern von $16 \times 21 \times 46$ cm gebracht. In einer Kammer wurden 4 Streifen aufgehängt. Als Lösungsmittel diente die obere Schicht einer Mischung von n-Butanol-Eisessig-Wasser im Verhältnis von 4 : 1 : 5 (nach *Patridge*). Die Trennung wurde dreifach bei $18 - 25^\circ \text{C}$ so durchgeführt, daß die ersten 9 cm aufsteigend, sodann absteigend chromatographiert wurden. Die Kammer war mit den Dämpfen der wäßrigen Phase des Lösungsmittels gesättigt. Nach 42 Stunden, als die Lösungsmittelfront $4/5$ der Streifenlänge erreicht hatte, wurden die Streifen herausgenommen und zum Trocknen auf ein Stativ gehängt. Nach zwei Stunden wurden die Streifen erneut in die Kammer gebracht. Nach dem dritten Lauf wurden die Streifen 1 Stunde bei Zimmertemperatur getrocknet. Die so vorbereiteten Chromatogramme dienten zur quantitativen Bestimmung.

Quantitative Bestimmung

Für die quantitativen Bestimmungen wurden folgende Reagenzien verwendet:

Ninhydrin p. a., Politechnika Śląska, Gliwice;

Aceton puriss., Fabr. Odcz. Chem., Gliwice;

Eisessig p. a., Zakł. Chem. Oświęcim;

$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ p. a., Fabr. Odcz. Chem., Gliwice;

HNO_3 p. a. $D = 1,4$, Fabr. Odcz. Chem., Gliwice;

Methanol puriss., Zakł. Chem. Oświęcim;

Redestilliertes Wasser.

Von den obgenannten Reagenzien wurden folgende Lösungen hergestellt:

1. 0,5 % Ninhydrin-Lösung (0,5 g Ninhydrin in 90 ml Aceton gelöst und 5 ml H_2O sowie 5 ml Eisessig zugegeben);

2. Kupfernitratlösung (1 ml gesättigte $\text{Cu}[\text{NO}_3]_2$ -Lösung und 0,02 ml HNO_3 $D = 1,4$ wurden mit Aceton auf 100 ml aufgefüllt).

Die getrockneten Chromatogramme wurden in einer Petri-Schale durch die Ninhydrinlösung gezogen¹ und im Trockenschrank 15 Minuten lang auf 90°

erhitzt. Die entwickelten Chromatogramme wurden dann in einer Petri-Schale durch die Kupferlösung gezogen² und im Dunkeln bei 20° 30–40 Minuten lang getrocknet. Die in Form von Kupferkomplexen fixierten, farbigen, rosa-roten oder violetten (Phenylalanin) Flecke wurden ausgeschnitten, zerkleinert und in Reagenzgläser gebracht. Gleichzeitig wurden Kontrollproben von demselben Papierstreifen ausgeschnitten. In die Reagenzgläser wurde 8 ml Methanol gegeben, die Gläser verschlossen und geschüttelt. Nach einer Stunde wurde das Eluat zu den kolorimetrischen Bestimmungen verwendet.

Die kolorimetrischen Bestimmungen wurden mit dem Pulfrich-Photometer, den Absorptionsküvetten F4, 992 und dem Filter S53 ausgeführt. Die erhaltenen Extinktionswerte wurden an der Geraden (Diagramme 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9), sowie Vergleichslösungen ausgewertet.

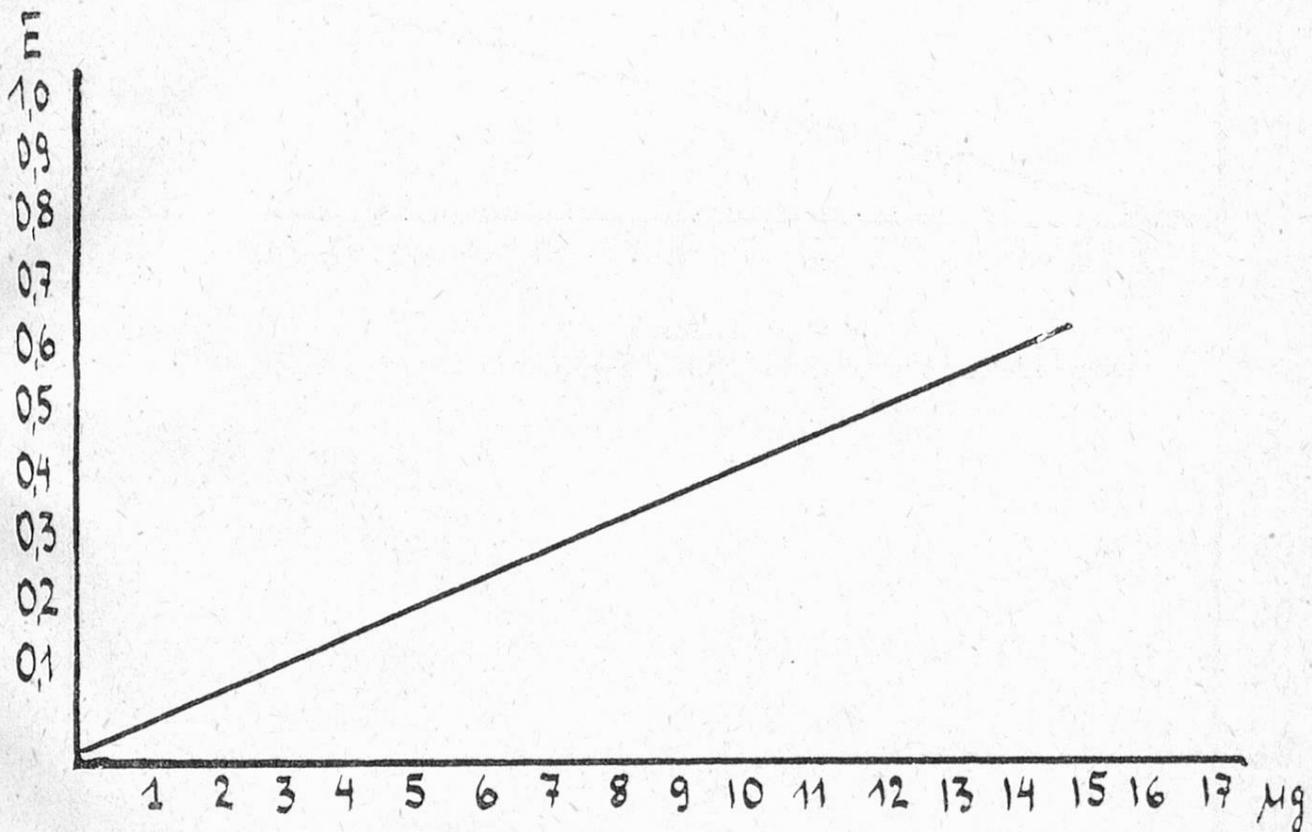


Diagramm 1
Eichgerade für Arginin. Filter S-53, Absorptionsküvetten F4, 992

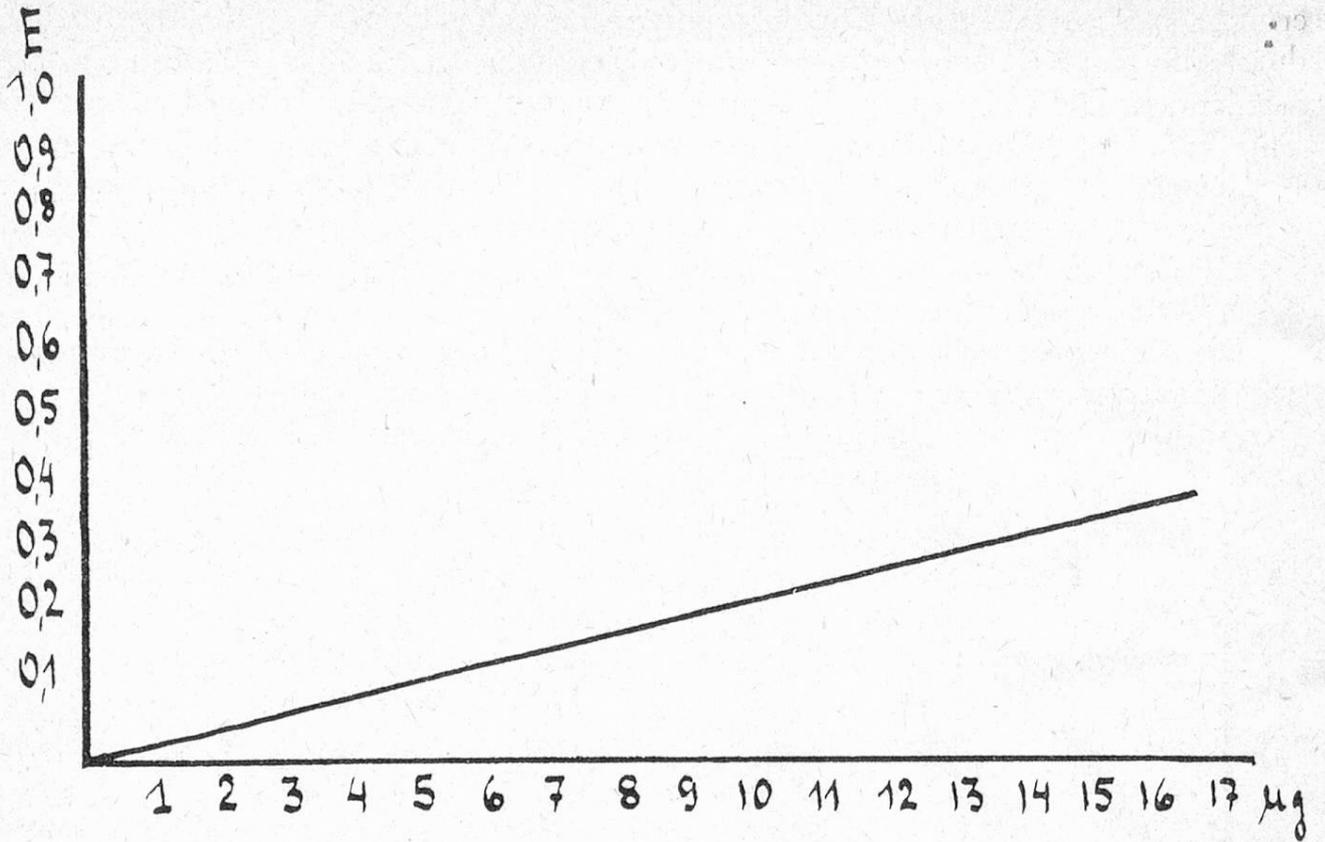


Diagramm 2
Eichgerade für Phenylalanin. Filter S-53, Absorptionsküvetten F4, 992

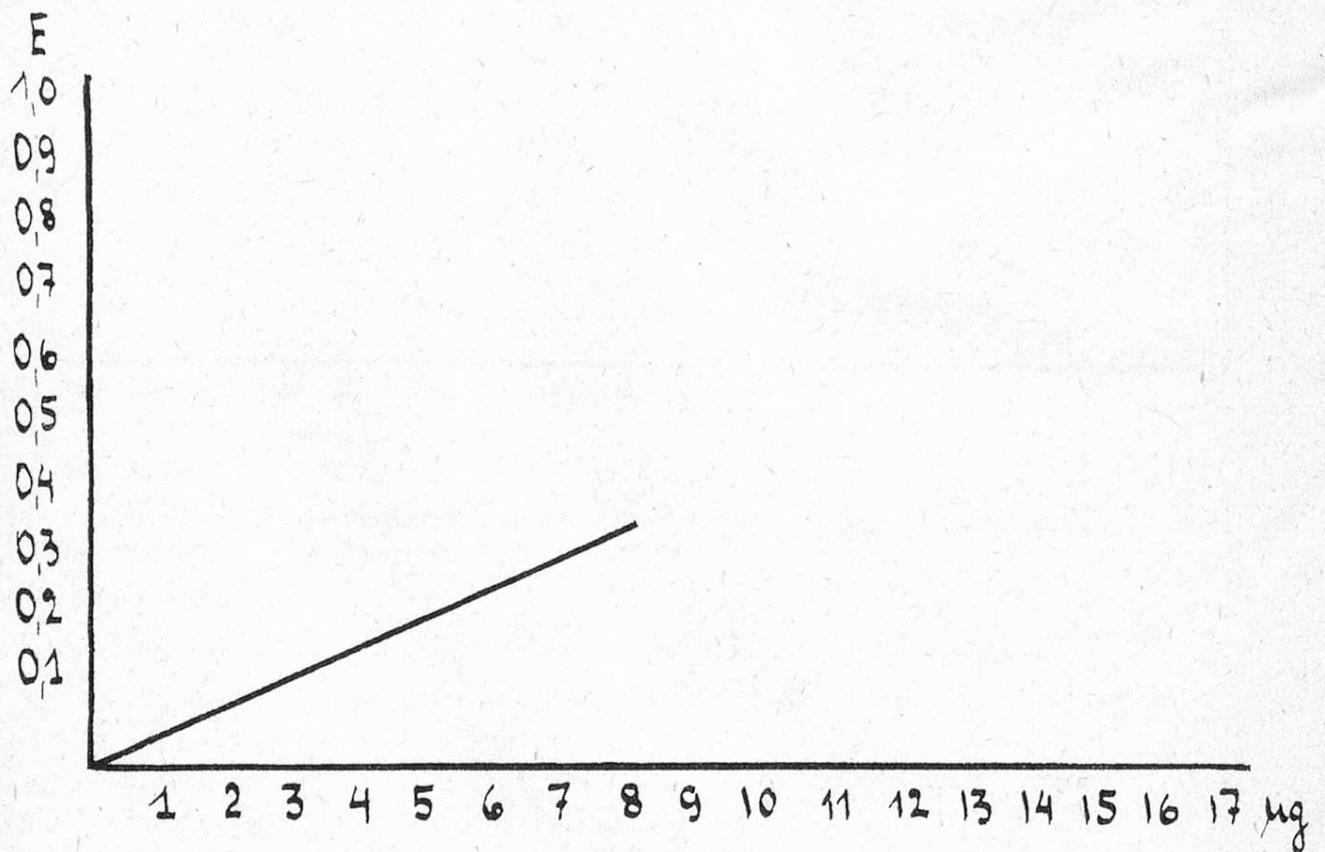


Diagramm 3
Eichgerade für Histidin. Filter S-53, Absorptionsküvetten F4, 992

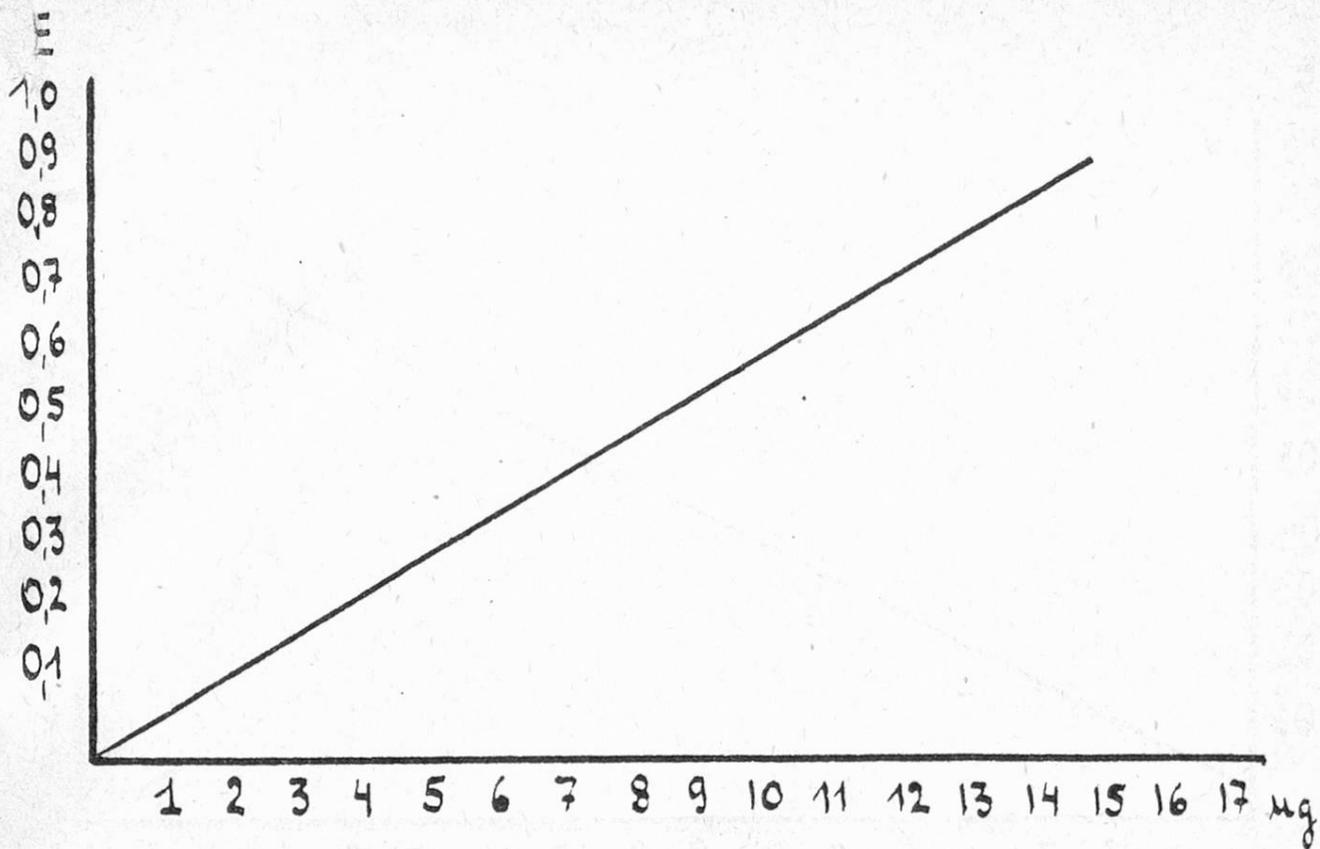


Diagramm 4
Eichgerade für Isoleucin. Filter S-53, Absorptionsküvetten F4, 992

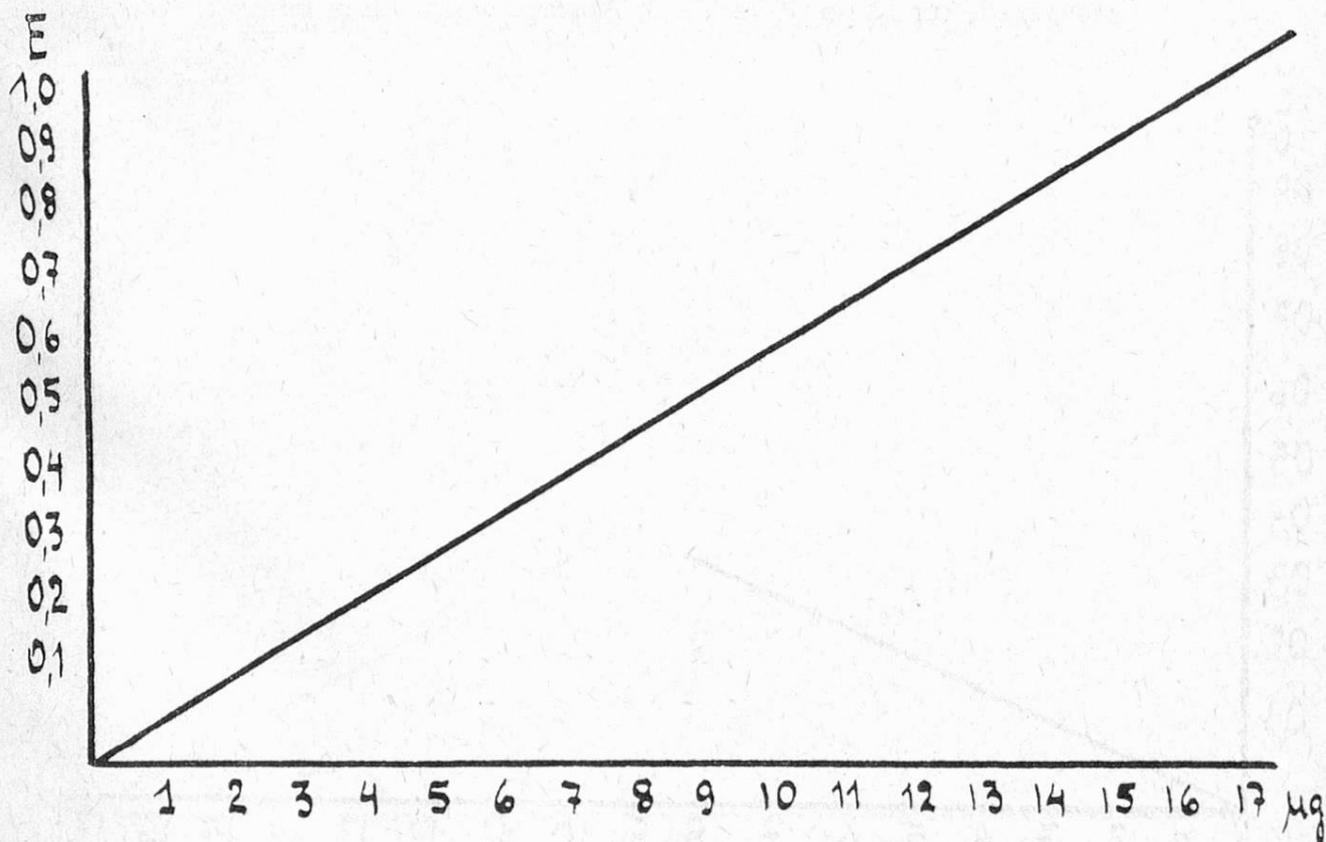


Diagramm 5
Eichgerade für Leucin. Filter S-53, Absorptionsküvetten F4, 992

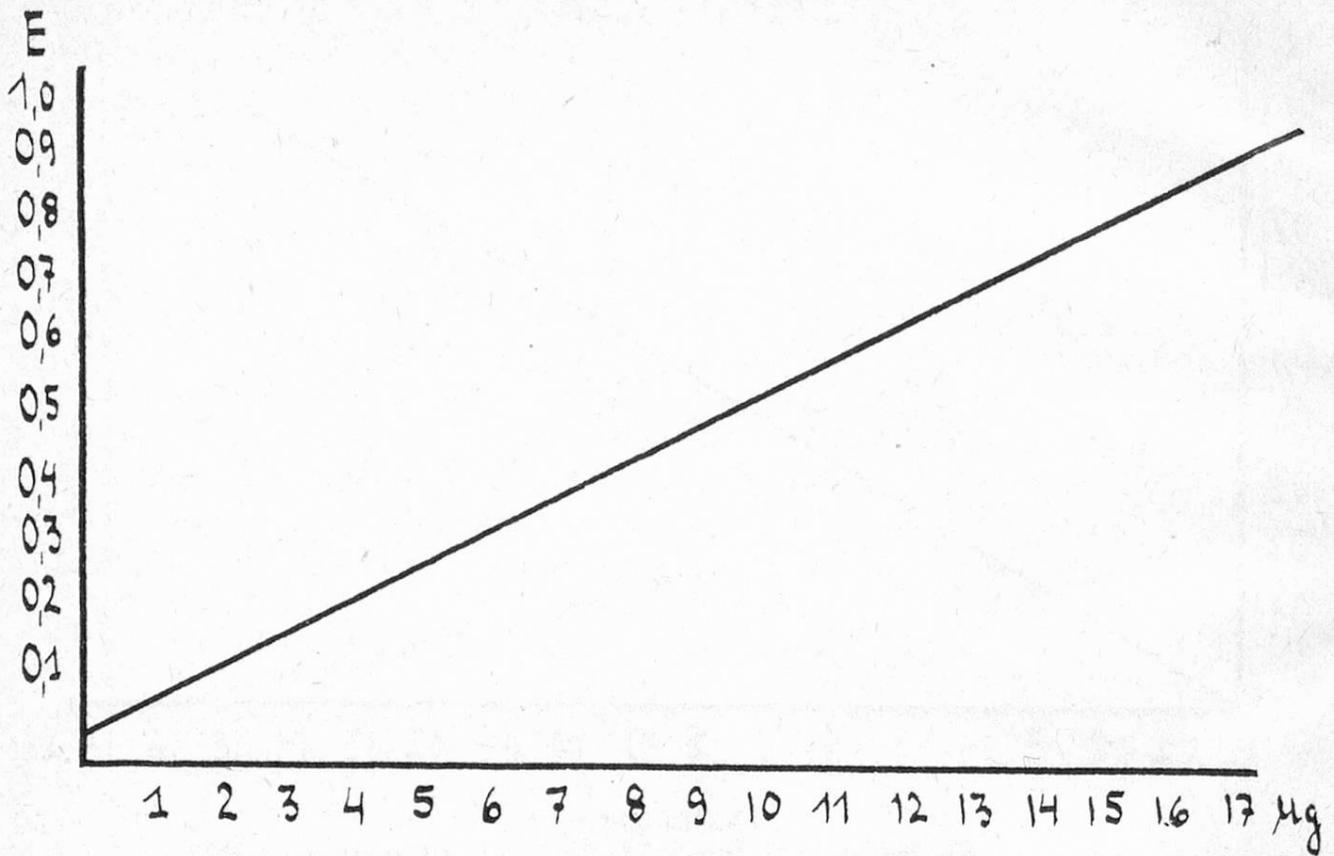


Diagramm 6
Eichgerade für Lysin. Filter S-53, Absorptionsküvetten F4, 992

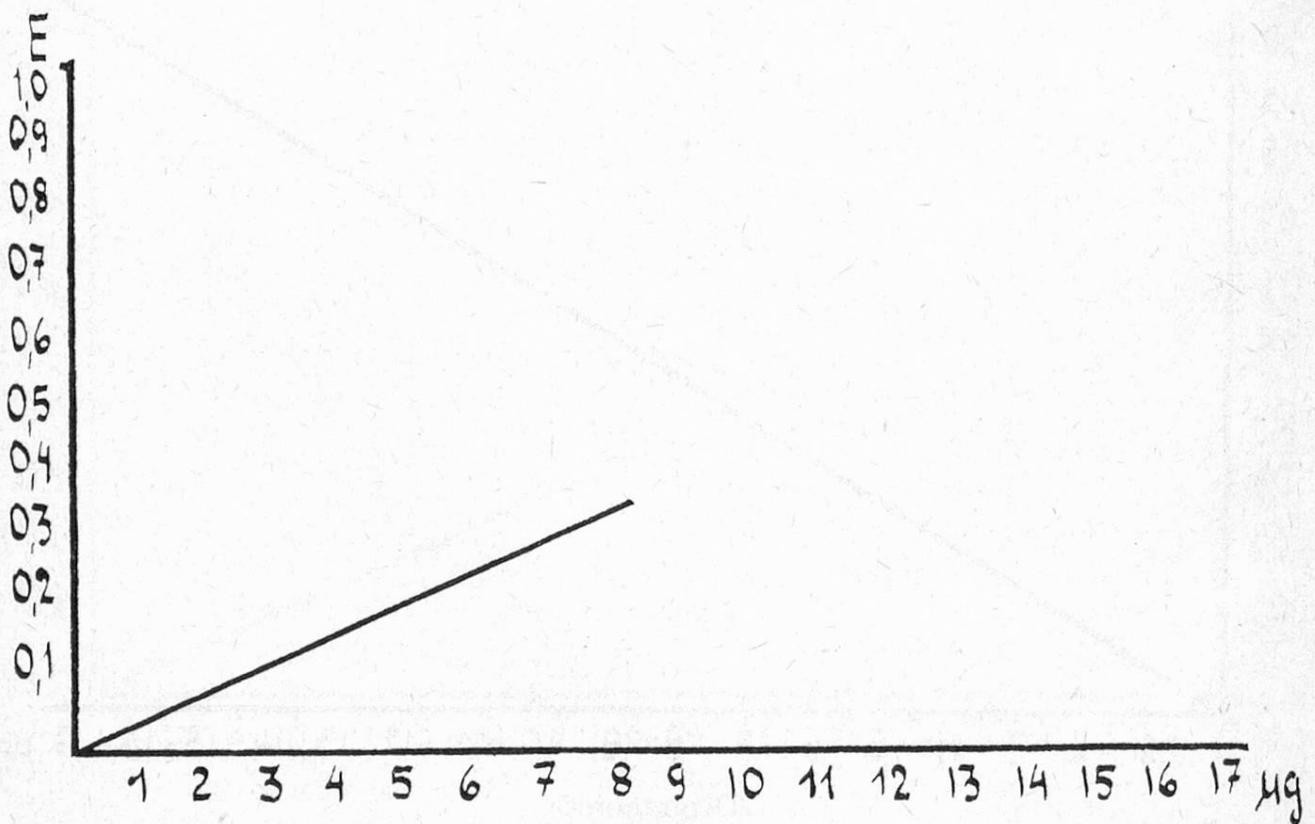


Diagramm 3
Eichgerade für Histidin. Filter S-53, Absorptionsküvetten F4, 992

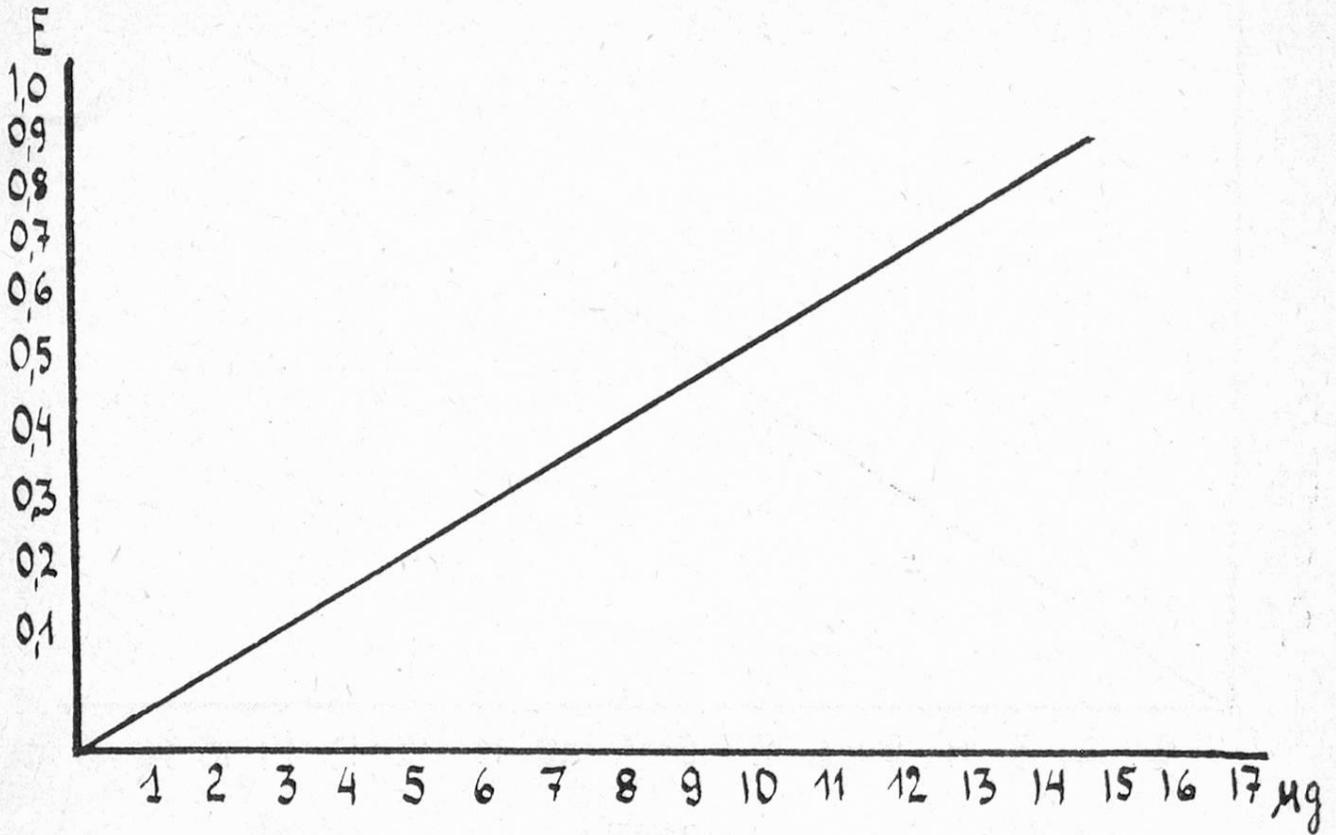


Diagramm 4
Eichgerade für Isoleucin. Filter S-53, Absorptionsküvetten F4, 992

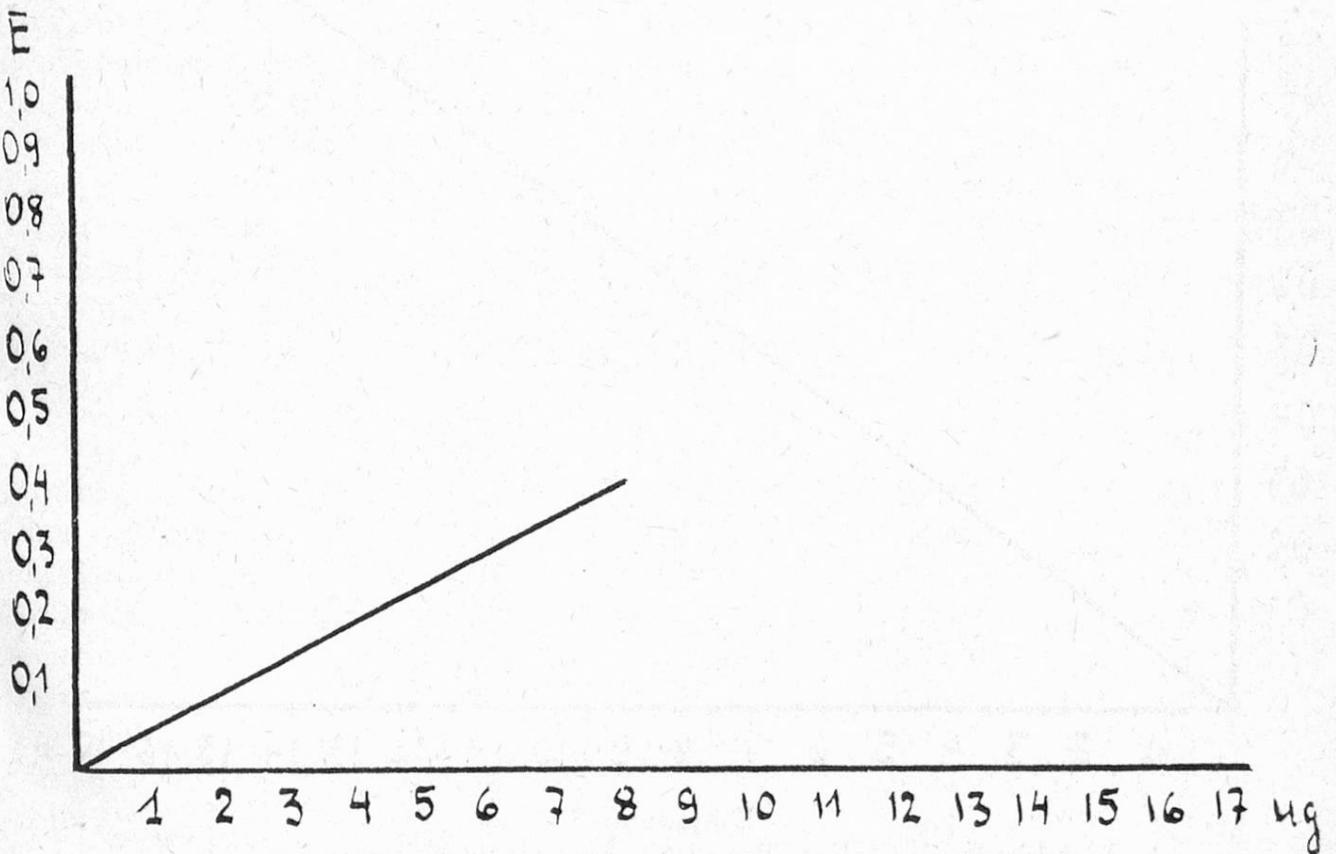


Diagramm 7
Eichgerade für Methionin. Filter S-53, Absorptionsküvetten F4, 992

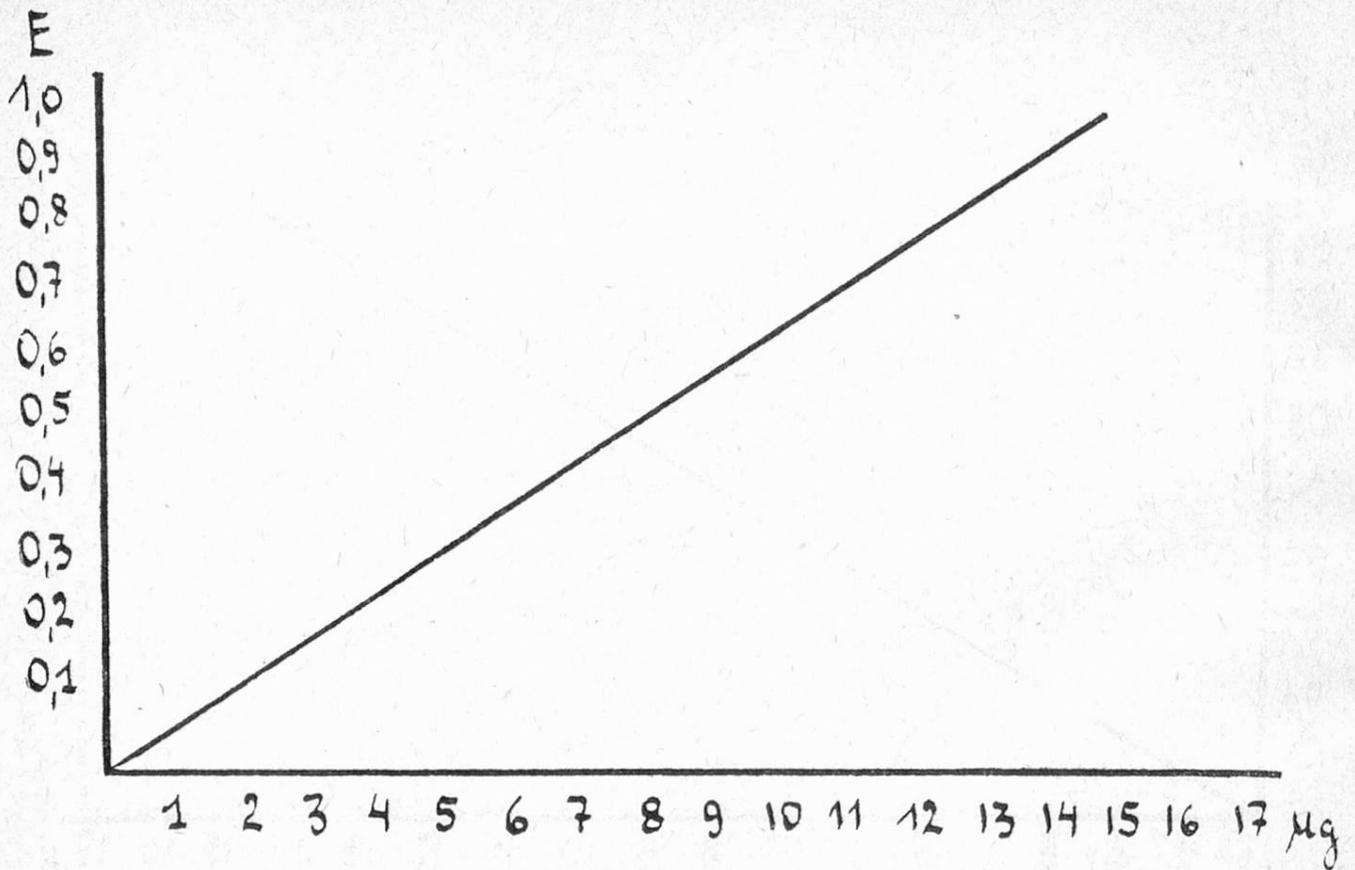


Diagramm 8
Eichgerade für Threonin. Filter S-53, Absorptionsküvetten F4, 992

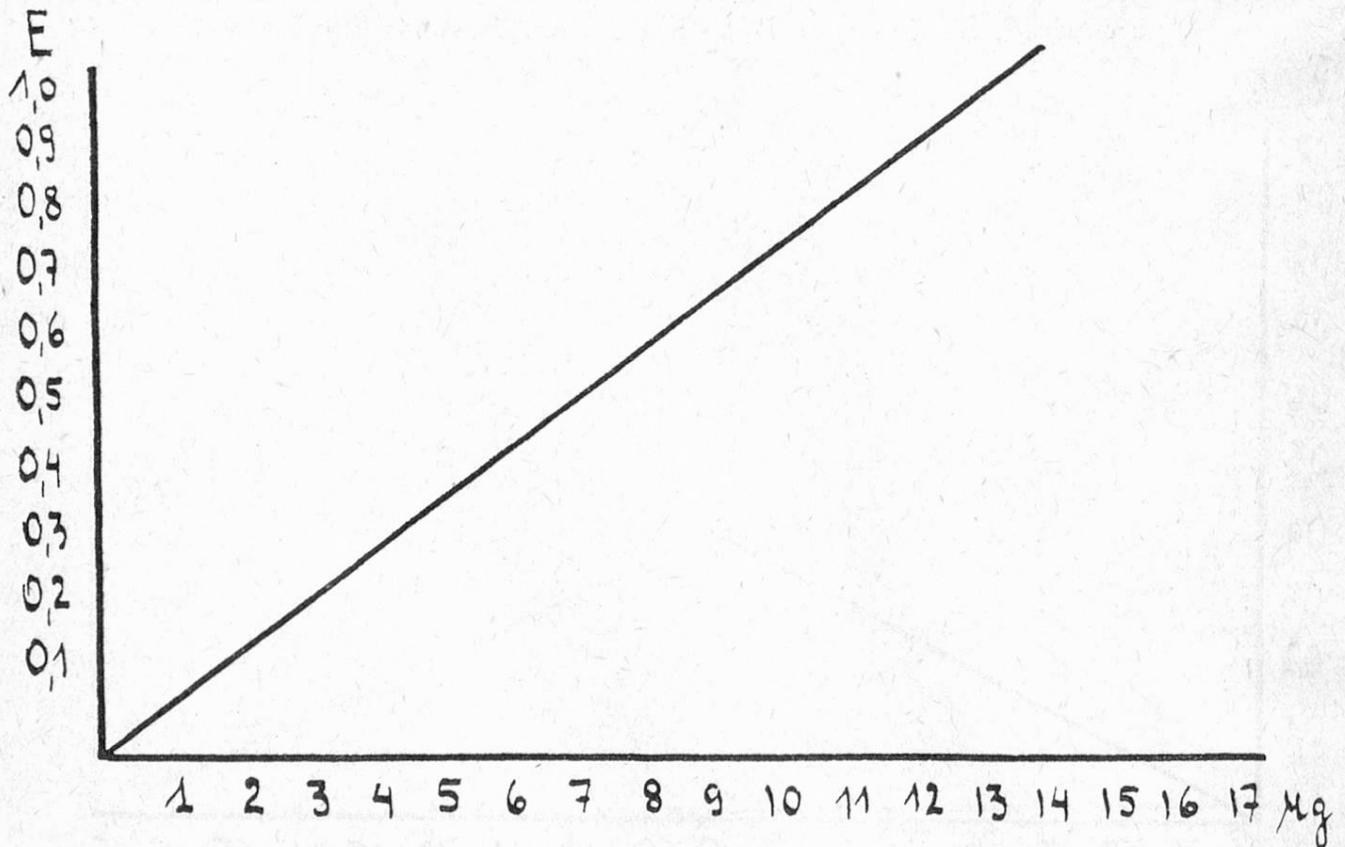


Diagramm 9
Eichgerade für Valin. Filter S-53, Absorptionsküvetten F4, 992

Statistische Analyse der Ergebnisse

\bar{x} — arithmetischer Mittelwert der Versuchsreihe

$$\bar{x} = \frac{(x_1 + x_2 + \dots + x_n)}{n}$$

$\varepsilon(\bar{x})$ = Standardfehler

$$\varepsilon(\bar{x}) = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n(n-1)}}$$

ϑ — Standard, mittlere Abweichung vom arithmetischen Mittelwert

$$\vartheta = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n-1}}$$

V — Variabilitätsindex

$$V = \frac{\vartheta}{\bar{x}} \cdot 100$$

Tabelle 1

Aminosäuregehalt in $\mu\text{g}/15 \mu\text{l}$ des Hydrolysates Nr. 1

Bestimmungs-Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
Arginin	11,75	12,67	12,21	13,35	11,99	11,99	12,89	16,67
Phenylalanin	7,67	8,08	9,28	9,68	8,08	8,88	8,46	9,28
Histidin	2,10	2,52	2,94	3,36	3,57	3,15	3,57	3,57
Isoleucin	9,14	11,80	11,13	12,30	9,32	10,96	11,96	12,12
Leucin	15,94	14,30	14,62	14,80	16,13	14,48	14,48	14,62
Lysin	16,78	18,11	17,54	16,95	16,95	17,35	18,30	16,78
Methionin	6,43	5,67	6,62	7,37	6,05	6,24	5,86	5,67
Threonin	8,01	10,82	7,41	9,06	8,16	7,25	—	9,21
Valin	8,67	10,11	9,98	10,83	9,98	10,26	10,26	10,68

	\bar{x}	$\varepsilon(\bar{x})$	ϑ	V
Arginin	12,44	0,192	0,543	4,4 %
Phenylalalin	8,67	0,251	0,710	8,2 %
Histidin	3,09	0,193	0,546	18,1 %
Isoleucin	11,09	0,437	1,240	11,2 %
Leucin	14,92	0,246	0,703	4,7 %
Lysin	17,34	0,211	0,596	3,4 %
Methionin	6,24	0,202	0,571	9,2 %
Threonin	8,56	0,470	1,245	14,5 %
Valin	10,09	0,231	0,653	6,5 %

Tabelle 2

Aminosäuregehalt in $\mu\text{g}/15 \mu\text{l}$ des Hydrolysates Nr. 2

Bestimmungs-Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
Arginin	11,09	11,09	11,32	12,01	10,42	11,32	11,32	11,54
Phenylalanin	6,85	8,07	8,07	8,46	8,46	8,46	7,66	8,07
Histidin	3,36	3,78	1,68	3,57	3,99	3,78	3,99	3,57
Isoleucin	9,14	11,12	11,63	10,47	10,80	10,48	10,63	10,80
Leucin	15,29	16,62	13,46	15,45	15,12	15,12	15,28	15,45
Lysin	18,90	18,52	17,13	17,35	17,13	17,13	17,11	17,35
Methionin	5,67	4,73	6,44	5,67	5,86	6,06	5,67	5,48
Threonin	6,04	7,24	4,38	9,06	8,31	6,34	5,74	8,76
Valin	9,54	10,11	10,40	10,68	10,55	10,40	10,25	10,68

	\bar{x}	$\varepsilon(\bar{x})$	σ	v
Arginin	11,26	0,159	0,448	4,0 %
Phenylalanin	8,01	0,192	0,539	6,7 %
Histidin	3,52	0,267	0,755	21,4 %
Isoleucin	10,63	0,252	0,714	6,7 %
Leucin	15,22	0,302	0,861	5,6 %
Lysin	17,57	0,252	0,713	4,1 %
Methionin	5,69	0,172	0,485	8,5 %
Threonin	6,98	0,540	1,530	21,9 %
Valin	10,32	0,131	0,371	3,6 %

Tabelle 3

Aminosäuregehalt in $\mu\text{g}/15 \mu\text{l}$ des Hydrolysates Nr. 3

Bestimmungs-Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
Arginin	11,31	11,08	12,42	12,42	11,76	11,76	12,21	12,42
Phenylalanin	7,26	6,85	8,06	8,86	7,66	7,26	8,06	8,46
Histidin	3,36	2,94	3,15	2,94	3,57	3,15	2,94	3,15
Isoleucin	9,14	9,81	11,78	11,13	9,31	9,96	11,63	10,96
Leucin	15,30	15,30	13,14	14,61	15,21	15,54	13,30	14,45
Lysin	15,80	15,49	15,98	15,49	17,14	17,34	17,34	16,39
Methionin	5,29	5,11	5,67	6,99	5,48	5,29	5,88	5,88
Threonin	9,66	9,81	11,30	7,85	6,79	6,04	9,66	6,34
Valin	9,84	9,39	11,28	10,69	9,98	9,54	11,12	10,53

	\bar{x}	$\varepsilon(\bar{x})$	ϑ	v
Arginin	11,93	0,189	0,530	4,4 %
Phenylalanin	7,80	0,238	0,675	8,7 %
Histidin	3,15	0,078	0,221	7,0 %
Isoleucin	10,47	0,366	1,040	9,9 %
Leucin	14,52	0,316	0,912	6,3 %
Lysin	16,38	0,283	0,800	4,9 %
Methionin	5,69	0,209	0,593	10,4 %
Threonin	8,42	0,684	1,940	23,1 %
Valin	10,29	0,252	0,712	6,9 %

Tabelle 4

Aminosäuregehalt in $\mu\text{g}/15 \mu\text{l}$ des Hydrolysates Nr. 4

Bestimmungs-Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
Arginin	11,54	12,00	13,35	11,54	11,78	12,22	12,00	12,00
Phenylalanin	8,07	7,67	8,47	8,07	7,26	8,48	8,48	8,07
Histidin	4,21	3,36	2,94	2,94	3,57	3,15	3,36	3,36
Isoleucin	11,96	11,97	11,63	9,95	10,97	11,62	10,97	116,3
Leucin	13,46	14,45	13,62	13,80	14,30	13,30	14,45	13,12
Lysin	16,97	17,15	16,76	15,59	16,38	16,96	16,75	16,76
Methionin	7,19	5,49	6,41	4,91	5,86	4,91	5,86	6,24
Threonin	10,85	9,67	8,76	6,19	7,55	9,66	8,35	8,76
Valin	9,39	9,98	10,83	9,83	9,98	10,69	9,54	9,68

	\bar{x}	$\varepsilon(\bar{x})$	ϑ	v
Arginin	12,05	0,203	0,575	4,8 %
Phenylalanin	8,06	0,153	0,433	5,4 %
Histidin	3,36	0,144	0,040	12,1 %
Isoleucin	11,33	0,280	0,793	7,0 %
Leucin	13,80	0,187	0,527	3,8 %
Lysin	16,63	0,172	0,489	2,9 %
Methionin	5,86	0,275	0,771	13,1 %
Threonin	8,72	0,501	1,415	16,1 %
Valin	9,99	0,183	0,516	5,2 %

Diskussion

Die quantitativen Bestimmungen wurden nach der modifizierten Methode von Bode durchgeführt, die auf Grund der günstigen Reaktionsbedingungen der Farbkomplexe sowie der Trennung einer größeren Anzahl von Aminosäuren auf einem Streifen als die geeignetste gefunden wurde. Die Methode wurde modifiziert, da sie in den Vorversuchen keine gute Trennung der Aminosäuren, hauptsächlich Leucin, Isoleucin, Phenylalanin und Methionin, gab. Die modifizierte Methode gestattete es, auf einem Chromatogramm alle, in dem Säure-

hydrolysat zu bestimmenden essentiellen Aminosäuren, zu trennen. Die Modifikation bestand in der Auftragung des Hydrolysates, der kombinierten auf-absteigenden Technik, sowie dem dreifachen Laufen der Chromatogramme. Das Hydrolysat wurde in Form eines Striches aufgetragen und damit eine bessere Trennung der aneinander grenzenden Aminosäuren erzielt. Es wurde mit breiten Streifen chromatographiert und zwar anfangs aufsteigend, dann absteigend und damit eine größere Länge der Streifen im Vergleich zur Kammerhöhe erreicht. Das dreifache Laufen der Chromatogramme gab gut getrennte, kompakte Aminosäureflecke. Die quantitative Aminosäurebestimmung wurde mit dem haltbaren Farbkomplex von DYDA und zweiwertigem Kupfer durchgeführt. Die Vergleichslösungen von 9 Aminosäuren dienten zum Ziehen der Geraden. Die für die einzelnen Aminosäuren, berechnet als Alfa-Aminostickstoff, ausgeführten Geraden zeigen, mit Ausnahme des Phenylalanins, eine große Übereinstimmung. Einige Abweichungen wurden bei Histidin und Lysin beobachtet. Die etwas niedrigen Werte für Histidin sind höchstwahrscheinlich auf die Verluste bei der nicht vollständigen Trennung des Histidins vom angrenzenden Lysin zurückzuführen, zumal Histidin in den Vergleichslösungen in fünfmal kleinerer Konzentration als Lysin zugegen ist und nur einen wenig größeren Rf-Wert besitzt. Der niedrige Lysin-Wert ist wahrscheinlich von der großen Konzentration des Lysins in bezug auf die Flächeneinheit abhängig. Die Fläche des Farbfleckes ist, des kleinen Rf-Wertes wegen, dem Startfleck ähnlich. Bei höherer Konzentration als 2,5 µg Alfa-Aminostickstoff per Probe zeigt die Gerade eine deutliche Abweichung von der linearen Funktion.

Von jedem der 4 Hydrolysate wurden 8 Bestimmungen mit gleichzeitiger Bestimmung der Vergleichslösung durchgeführt. Die statistische Analyse der Versuchsergebnisse erlaubte eine Beurteilung der angewandten Methode^{32, 8}. Der ermittelte Variabilitätsindex ist für die gegebenen Versuchsbedingungen maßgebend, da er von den Proportionen, in welchen die Aminosäuren auftreten, abhängig ist. Die große Spannweite in dem Aminosäuregehalt der einzelnen Proben kann die gleichzeitige Bestimmung auf einem Chromatogramm verhindern. Wie aus den ermittelten Variabilitätsindices zu ersehen ist, (Tabellen 1, 2, 3, 4), wurden die genauesten Ergebnisse bei Lysin, Arginin und Leucin, ca. $\pm 5\%$, erzielt. Dann folgen Valin und Phenylalanin mit ca. $\pm 7\%$, Methionin und Isoleucin mit ca. $\pm 9\%$ und zuletzt Histidin und Threonin mit ca. $\pm 15 - 20\%$. Die reproduzierbare Genauigkeit der Ergebnisse ist von der Qualität der Trennung, sowie der Menge der zu bestimmenden Aminosäuren abhängig. Dies ist besonders deutlich an der ersten Gruppe (Lysin, Arginin und Leucin), in welcher die Komponenten in verhältnismäßig großer Menge auftreten und die Trennung deutlich ist, sowie an der letzten Gruppe zu erkennen. Von den zu bestimmenden Aminosäuren tritt Histidin in den kleinsten Mengen auf, Threonin dagegen gibt eine sehr schlechte Trennung, da es sich ungenügend von der Glutaminsäure abtrennt.

Zusammenfassung

1. Einige Methoden, insbesondere diejenige von *Fischer-Dörfel* und *Bode* werden verglichen. Die modifizierte *Bode*-Methode erlaubt Trennung und quantitative Bestimmung von 9 essentiellen Aminosäuren auf einem Chromatogramm und mit einem Lösungsmittel.

2. Die Genauigkeit der Bestimmung ist vor allen Dingen von der, für das angewandte Lösungsmittel spezifischen Trennung, sowie der Menge der zu bestimmenden Aminosäuren abhängig.

3. Die verhältnismäßig einfache Arbeitsweise, sowie die Ergebnisse der statistischen Analyse gestatten eine positive Beurteilung der von uns modifizierten *Bode*-Methode zur quantitativen Bestimmung essentieller Aminosäuren.

Résumé

1 Examen de quelques méthodes de séparation et de dosage d'acides aminés, en particulier celles de *Fischer-Dörfel* et de *Bode* qui ont été comparées entre elles.

2 La méthode de *Bode*, modifiée par les auteurs, permet, en n'utilisant qu'un dissolvant, de doser quantitativement 9 acides aminés essentiels sur un chromatogramme.

Summary

Some methods were compared with particular attention to *Fischer-Dörfel* and *Bode* methods.

The modification of *Bode's* method permits the separation of 9 essential aminoacids on one chromatogram.

The results were statistically analyzed.

Literatur

- 1 *Baldwin E.*: Biochemia dynamiczna. Tłum. z ang. P. W. R. i L. Warszawa 1959.
- 2 *Barrollier J.*: Naturwiss., 1955, 42, 126.
- 3 *Best C. H., Taylor N. B.*: Fizjologiczne podstawy postępowania lekarskiego. Tłum. z ang. P. Z. W. L., Warszawa 1959.
- 4 *Block R. J.*: Anal. Chem., 1950, 22, 1327.
- 5 *Bode F., Hunbener H. J., Hoerce K.*: Naturwiss. 1952, 39, 524.
- 6 *Bode F.*: Biochem. Z., 1955, 326, 433.
- 7 *Burma D. P.*: Anal. Chem., 1953, 25, 549.
- 8 *Chojnacka B.*: Farm. Pol., 1959, 13 — 14, 246.
- 9 *Denisowa A. A.*: Biochemia, 1957, 22, 775.
- 10 *Fischer F. G., Dörfel H.*: Bioch. Z. 1953, 324, 544.
- 11 *Giri K. W., Radhakrishnam A. N., Vaidyanathan C. S.*: J. Indian. Inst. 1953, 35, 145.
- 12 *Hiller E., Zinnert F., Frese G.*: Biochem Zeitschr. 1952, 323, 245.
- 13 *Horner L., Emrich W., Kirchner A.*: Z. Elektrochem. 1952, 56, 987.
- 14 *Janicki J., Skupin J., Zderkiewicz A.*: Roczn. Techn. i Chem. Żywn., 1959, 4, 61.
- 15 *Jermakowa E. A.*: Biochemija 1957, 5, 917.
- 16 *Kapłański S. J.*: Białki i amidokisłoty w pitaniu człowieka i zwierząt. Sbornik statiej. Tłum. z ang. Moskwa 1952.
- 17 *Kawerau E., Wieland T.*: Nature 1951, 168, 77.
- 18 *Kowalczyk J., Pompowski T.*: Wiad. Chem. 1960, 9, 576.

- 19 *Krzeczkowska I., Iskierko J., Klimek J.*: Farm. Pol. 1959, 3, 35.
- 20 *Masłowski P., Masłowska H., Minakowski W.*: Acta. Bioch. Pol. 1958, 5, 401.
- 21 *Meyer H.*: Biochem J. 1957, 67, 333.
- 22 *Mc Farren E. F., Mills J. A.*: Anal. Chem. 1952, 24, 650.
- 23 *Moore S., Stein W. H.*: J. Biol. Chem. 1948, 176, 367.
- 24 *Moore S., Stein W. H.*: J. Biol. Chem. 1951, 192, 663.
- 25 *Muszkatowa B.*: Roczn. P. Z. H. 1960, 2, 103.
- 26 *Niewiarowicz A.*: Przem. Spoż. 1955, 12, 501.
- 27 *Opieńska-Blauth J., Kowalska H., Pietrusiewicz A.*: Acta Bioch. Pol. 1956, 4, 557.
- 28 *Opieńska-Blauth J., Waksmundski A., Kański A.*: Chromatografia P. W. N. Warszawa 1957.
- 29 *Paschina T. C.*: Biochemija 1954, 19, 6.
- 30 *Partridge S. M.*: Biochem. J. 1948, 42, 238.
- 31 *Petronici C., Safina G.*: Ind. Conservo 1955, 30, 16.
- 32 *Romanowski W. J.*: Podstawowe zagadnienia teorii błędów. P. W. N. Warszawa, 1955.
- 33 *Rose W. C.*: J. Biol. Chem. 1954, 206, 421.
- 34 *Schneider F., Reinfeld E.*: Biochem. Z. 1955, 327, 189.
- 35 *Skarzyński B.*: Chemia Fizjologiczna, P. W. R. L., Warszawa, 1956.
- 36 *Spieß J. R., Chambers D. C.*: Anal. Chem., 1950, 21, 1249.
- 37 *Szczygiel A.*: Podstawy Fizjologii Żywienia, P. Z. W. L.
- 38 *Saifer A., Oreskes J.*: Anal. Chem. 1956, 28, 501.
- 39 *Troll W., Cannon R. K.*: J. Biol. Chem. 1953, 200, 803.
- 40 *Waldschmidt-Leitz E.*: Chemie der Eiweißkörper, Ferdinand Enke, Stuttgart 1957.
- 41 *Wieland T., Fischer E.*: Angew. Chem. 1948, 60, 313.
- 42 *Wiewiórkowski A., Przybylska J., Kociotkowski Z.*: Roczn. Nauk. Roln. ser. A 1958, 2, 453.
- 43 *Yemm E. W., Cocking E. C.*: Analyst 1955, 80, 209.
- 44 *Zajcewa G. N., Tuleniewa N. P.*: Łab. Deło. 1958, 3, 24.

Untersuchungen an Kaffee-Extraktpulvern

Von *P. Jakober* und *M. Staub*

(Aus dem kantonalen Laboratorium Zürich)

Anlässlich einer Kontrolluntersuchung verschiedener Kaffee-Extraktpulver des Handels wurde versucht, die von *J. Wurziger*¹ und *H. Thaler*² veröffentlichten Arbeiten über die Zusammensetzung technologisch hergestellter löslicher Kaffee-Extraktpulver weiterzuführen. Vor allem interessierte die in den erwähnten Arbeiten aufgeworfene Frage, ob bei der Herstellung von Kaffee-Extraktpulver auch Stoffe in Lösung gebracht werden, die bei der haushaltmäßigen Bereitung von Kaffeeaufgüssen fehlen. Zur Abklärung dieser Frage verglichen wir die Extraktausbeuten und Aschengehalte verschiedener Kaffeesorten mit den Aschen aus Kaffee-Extraktpulvern und unterzogen auch die Natrium- und Kaliumgehalte der Aschen einer kritischen Betrachtung.