

3 ml-samples of a solution of creatine phosphate (Ca-salt) were shaken, in the presence of 0.5 ml of 10 N H_2SO_4 and 0.5 ml of 10 % $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$, with 5 ml of isobutanol-benzene mixture (1:1), for 15 sec. Temp. 22° C. — Series A: shaken immediately after the addition of the creatine phosphate, whereafter the samples were allowed to stand for various periods of time. — Series B: shaken after the addition of creatine phosphate, and again after various periods of time. — At the end of each period, a 1.0 ml sample of the organic layer was removed for the phosphate determination. Colour intensity was measured in a Beckman spectrophotometer at 730 m μ .

1. Martin, J. M., and Doty, D. M. *Anal. Chem.* **21** (1949) 965.
2. Ernster, L., Zetterström, R., and Lindberg, O. *Acta Chem. Scand.* **4** (1950) 942.
3. Zetterström, R., Ernster, L., and Lindberg, O. *Arch. Biochem. Biophys.* **31** (1951) 113.
4. Zetterström, R., and Engfeldt, B. *Nature* **168** (1951) 81.
5. Lindberg, O., and Ernster, L. *Exp. Cell Research* **3** (1952) 209.
6. Ennor, A. H., and Rosenberg, H. *Biochem. J.* **50** (1952) 524.

Received March 22, 1952.

Aminosäuren in Meeresalgen

L.-E. ERICSON und A. G. M. SJÖSTRÖM

Institutionen för Livsmedelskemi, Kungl. Tekniska Högskolan, Stockholm, Schweden

Die Aminosäuren in Meeresalgen sind früher schon Gegenstand von Untersuchungen von Mazur und Clarke^{1,2} sowie von Lugg³ gewesen. Haas⁴ wie auch Dekker, Stone und Fruton⁵ haben gewisse in Algen vorkommende Peptide isoliert. Roche und Lafon⁶ haben das Vorkommen von Dijodtyrosin in *Laminaria flexicaulis* und *Laminaria saccharina* nachgewiesen. Die Aminosäurezusammensetzung in gewissen einzelligen Grünalgen ist von Fowden^{7,8} und Stepka, Benson und Calvin⁹ ermittelt worden.

In der vorliegenden Arbeit sind drei Braunalgen (*Phaeophyceae*) — *Sphacelaria arctica* (*Sphacelariales*), *Laminaria saccharina* (*Laminariales*) *Fucus vesiculosus* (*Fucales*) — hinsichtlich ihres Aminosäureinhaltes qualitativ untersucht worden. Die letztgenannte Alge ist in der Nähe von Fiskebäckskil im Skagerrak im Monat November 1951 geerntet worden, die zwei übrigen im Oktober desselben Jahres ausserhalb Simpnäs in der Ostsee. Zur Identifizierung der Aminosäuren haben wir ein- und zweidimensionale Papierchromatographie angewandt¹⁰.

Zur Verminderung des Salzgehaltes wurden die Algenproben vor der Hydrolyse ca. 12 Stunden mit Wasser bei gewöhnlicher Temperatur behandelt; auch dieses Wasser wurde nach Eindampfen auf kleineres Volumen chromatographiert. Die entsalzten Algenproben — ungefähr 1 Gramm — wurden dann mit 6 N HCl oder mit 14 % $Ba(OH)_2$ 24 Stunden lang bei 100° C hydrolysiert. Die Salzsäure wurde vor dem Chromatographieren durch Eindampfen im Vakuum entfernt, das Bariumhydroxyd mit Schwefelsäure gefällt. Eine qualitative Veränderung der Aminosäurezusammensetzung konnte nicht festgestellt werden, wenn die Hydrolyse auf 48 Stunden ausgedehnt wurde. Das Entsalzen der Algenproben führte zu einem besser aufgeteilten Chromatogramm, bewirkte aber keine qualitative Veränderung. Das zur Entsalzung verwendete Wasser enthielt keine Aminosäuren, die nicht auch im Hydrolysat nachweisbar waren.

Bei zweidimensionaler Chromatographie wurde in der einen Richtung mit Wasser gesättigtes Phenol, in der anderen ein Gemisch von Pyridin (35), Isoamylalkohol (35) und Wasser (30) verwendet; für eindimensionale Chromatographie bedienten wir uns eines Gemisches von *n*-Butanol (50), Essigsäure (15) und Wasser (50). Die angewandte Papiersorte war Whatman Nr. 1, die Probemengen entsprachen 10 bis 50 γ Aminostickstoff. Die zweidimensio-

nalen Chromatogramme wurden nach Trocknen in einem 40° C warmen Luftstrom mit einer 0,5 %-igen Lösung von Ninhydrin in *n*-Butanol besprüht und hierauf wieder im Trockenschrank bei einer Temperatur zwischen 80 und 100° C 5 Min. lang getrocknet. Die eindimensionalen Chromatogramme wurden teils mit Ninhydrin, teils mit für verschiedene Aminosäuren spezifischen Reagentien entwickelt. Um Tryptophan nachzuweisen, wurden Chromatogramme von Alkalihydrolysaten mit einer 1 %-igen Lösung von *p*-Dimethylaminobenzaldehyd in mit Wasser gesättigtem *n*-Butanol, das 5 % HCl enthielt, besprüht. Für Prolin und Oxyprolin wurde eine Lösung, bestehend aus 0,2 % Isatin in einem Gemisch vom 96 Vol. % *n*-Butanol und 4 Vol. % Essigsäure, angewandt. Histidin und Tyrosin wurden mit Hilfe von diazotiertem *p*-Bromanilin (1 %) in Sodalösung; die schwefelhaltigen Aminosäuren Cystin und Methionin durch Aufsprühen einer Mischung von KJ und H₂PtCl₆¹¹ auf die eindimensionalen Chromatogramme, nachgewiesen. Das Vorkommen von Arginin wurde u.a. mit α -Naphthol in einer alkalischen Lösung vom Natriumhypochlorit nach Sakaguchi festgestellt. Um Leucin und Isoleucin zu trennen, führten wir die Chromatographie auf gepuffertem Whatman-Papier aus¹².

Kein qualitativer Unterschied in der Aminosäurezusammensetzung der drei Algen konnte beobachtet werden, obgleich diese innerhalb der Division der Braunalgen drei wohldifferenzierte Ordnungen repräsentieren. Die chromatographisch identifizierten Säuren waren folgende:

Glycin, α -Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Phenylalanin, Tyrosin, Serin, Threonin, Cystin, Methionin, Arginin, Lysin, Prolin, Histidin, Asparaginsäure und Glutaminsäure.

Sämtliche Aminosäuren konnten sowohl mit Hilfe von Ninhydrin als auch mit den betreffenden Spezialreagentien nachgewiesen werden. Innerhalb des Dreiecks, wel-

ches auf einem zweidimensionalen, mit Ninhydrin entwickelten Chromatogramm von den Flecken von α -Alanin, Tyrosin und Valin gebildet wird, wurde ein schwacher, aber gut sichtbarer blauer Fleck beobachtet, welcher wahrscheinlich von Methioninsulfon herrührt.

Oxyprolin konnte in den genannten Algen weder mit Ninhydrin noch mit Isatin nachgewiesen werden. Diese Tatsache steht nicht in Übereinstimmung mit den Befunden von Mazur und Clarke. Nach den Angaben in der Literatur scheint Oxyprolin in Landpflanzen sehr selten vorzukommen. Mazur und Clarke sind der Meinung, dass in *Laminaria* (ohne nähere Bestimmung)¹ Lysin und Methionin fehlen, und dass *Fucus furcatus*² kein Arginin enthält. Nach unseren Ergebnissen enthalten Braunalgen aus verschiedenen Ordnungen sowohl Arginin, Methionin als auch Lysin, und es ist deshalb wenig wahrscheinlich, dass Algen von ein und derselben Ordnung sich in Hinsicht auf diese Aminosäuren unterscheiden. Tryptophan, welches nach Mazur und Clarke in *Laminaria*¹ und *Fucus furcatus*² sowie in der Grünalge *Ulva lactuca* (vgl. auch Lugg³) vorkommt, konnten wir in den Alkalihydrolysaten der von uns untersuchten Algen nicht finden. Dagegen beobachteten wir in *Laminaria saccharina* und *Fucus vesiculosus* andere Substanzen, welche eine stark blaue Farbe mit *p*-Dimethylaminobenzaldehyd gaben, deren R_F-Werte aber mit dem des Tryptophans nicht übereinstimmten und die keine Ninhydrinreaktion gaben. Diese Substanzen traten innerhalb desselben Bereichs auf, in welchen sich die braunen Algenfarbstoffe befinden und man könnte deshalb vielleicht vermuten, dass sie mit den Farbstoffen in Zusammenhang stehen, Dijodtyrosin, das eine schwache Ninhydrinreaktion gibt¹³, konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

Es soll darauf hingewiesen werden, dass der Proteingehalt in Meeresalgen sehr stark mit der Jahreszeit schwankt, für *Laminaria*

saccharina von ca. 4 % im Spätsommer bis zu 14 % im Winter. Nach Haas⁴ tritt das von ihm aus der Rotalge *Griffithsia flosculosa* isolierte Peptid nur im Winter und Frühling auf. Man kann deshalb annehmen, dass auch die Aminosäurezusammensetzung bei Meeresalgen mit der Jahreszeit variiert. Die Abweichungen unserer Resultate von denen anderer Verfasser können möglicherweise auf solchen jahreszeitlichen Schwankungen beruhen.

Die Aminosäuren der Braunalgen scheinen mit den gewöhnlich in Landpflanzen gefundenen übereinzustimmen. Von den essentiellen Aminosäuren konnte Tryptophan von uns nicht nachgewiesen werden.

Die Verfasser sind Herrn Dr. Mats Waern, Växtbiologiska Institutionen, Uppsala, herzlichen Dank schuldig für die Hilfe bei der Einsammlung der Algen und deren botanischer Klassifizierung, sowie Herrn Ing. Lars Ljungdahl, A.B. Stockholms Bryggerier, für die Kontrolle der Chromatogramme.

Professor Dr. Harry Lundin, Vorstand des Instituts, zeigte förderndes Interesse an vorliegender Arbeit und gab uns Gelegenheit zu fruchtbaren Diskussionen.

1. Mazur, A. und Clarke, H. T. *J. Biol. Chem.* **123** (1938) 729.
2. Mazur, A. und Clarke, H. T. *J. Biol. Chem.* **143** (1942) 39.
3. Lugg, J. W. H. *Biochem. J.* **37** (1943) 132.
4. Haas, P. *Biochem. J.* **46** (1950) 503.
5. Dekker, C. A., Stone, D. und Fruton, J. S. *J. Biol. Chem.* **181** (1949) 719.
6. Roche, J. und Lafon, M. *Compt. rend.* **229** (1949) 481.
7. Fowden, L. *Nature* **167** (1951) 1030.
8. Fowden, L. *Biochem. J.* **50** (1952) 355.
9. Stepka, W., Benson, A. A. und Calvin, M. *Science* **108** (1948) 304.
10. Conden, R., Gordon, A. H. und Martin, A. J. P. *Biochem. J.* **38** (1944) 224.
11. Winegard, H. M., Toennies, G. und Block, R. J. *Science* **108** (1948) 506.
12. Mc Farren, E. *Anal. Chem.* **23** (1951) 168.
13. Dent, C. E. *Biochem. J.* **43** (1948) 169.

Eingegangen am 26. April 1952.

Determination of Ethylenediamine in Cupriethylenediamine Solutions

GUNNAR GRAN and CARL-ULRIK WETLESEN *

*Analytical Laboratory, Department of Wood
Chemistry, Swedish Forest Products Research
Laboratory, Stockholm, Sweden*

During the last ten years the cupriethylenediamine (CED) reagent has found extended use as a solvent for cellulose, especially in connection with measurements of its degree of polymerisation. It is therefore not surprising that many attempts have been made to work out methods for the analysis of this reagent. All the procedures described in the literature¹⁻⁷ are based on the same principle. Copper is first determined by an iodometric titration, and the CED solution is then titrated with acid to an end point at about pH 3.0–3.5. The ethylenediamine content is then related to the difference in the number of equivalents of the titrants used in the two titrations. However, it appears that no published method is free from more or less serious objections.

If the cupric ions are precipitated with hydrogen sulfide prior to the acid titration the equivalence point will be much more easily indicated, and as one equivalent of hydroxyl ions is used up for each equivalent of copper present in the original solution the acid consumption will be a direct measure of the amount of ethylenediamine present. When analytically pure cupric hydroxide is used in the preparation of the reagent this new method appears to be much superior to the previous ones. However, the commercial cupric hydroxide now sometimes employed often contains appreciable amounts of anions of strong

* Holder of a fellowship from Papirindustriens Forskningsinstitut, Oslo, Norway.