

Serienmethode zur photometrischen Bestimmung von Aminosäuren auf Filtrierpapier

Von Dr. E. SCHWERDTFEGER*), Rostock

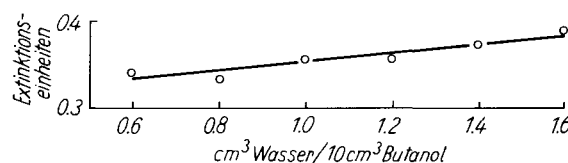
Oskar-Kellner-Institut für Tierernährung

Es wird eine kolorimetrische Ninhydrin-Methode beschrieben, die für die Aminosäuren praktisch quantitative Farbausbeuten liefert, ohne NH_3 zu erfassen, so daß sie für die Auswertung von Papierchromatogrammen geeignet ist.

Die kolorimetrische Methode von Moore und Stein¹⁾ zur quantitativen Bestimmung von Aminosäuren in Eluaten von Chromatographiesäulen ist auf die Papierchromatographie nicht ohne weiteres zu übertragen. Dies liegt hauptsächlich an den Ammoniak-Spuren, die vom Papier leicht adsorbiert werden und die, da sie ebenfalls quantitativ erfaßt werden, für die hohen und inkonstanten Blindwerte verantwortlich sind. Die Ninhydrin-Methoden zur quantitativen Auswertung von Aminosäure-Papierchromatogrammen erfordern Testlösungen bekannten Gehaltes, die gleichzeitig mit den zu analysierenden Proben chromatographiert, ausgewertet und auf die erhaltenen Werte bezogen werden. Dies ist notwendig, da die Ninhydrin-Färbung bisher nicht die theoretisch mögliche Ausbeute an Farbstoff (Diketo-hydrindyliden-diketohydrindamin; im folgenden als DYDA abgekürzt) lieferte und die Werte schlecht reproduzierbar waren.

Anschließend an die früher von uns entwickelte Methode²⁾ untersuchten wir die Wirkung verschiedener Einflüsse auf die Ninhydrin-Färbung. Benutzt wurde ein Ninhydrin-Reagens ohne Zusatz reduzierender Verbindungen, so daß anwesendes Ammoniak nicht erfaßt wird. Am stärksten wird die Farbausbeute von der Anheizzeit beeinflusst, d. h. der Zeit, die erforderlich ist, um das Reaktionsge-

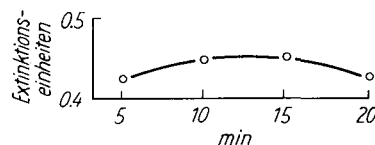
misch auf seine Siedetemperatur zu bringen. Diese Anheizzeit läßt sich leicht dadurch genügend kurz ($1\frac{1}{2}$ min) und verhältnismäßig konstant halten, daß zur Erwärmung ein auf 130°C vorgeheiztes Glycerin-Bad benutzt wird. Bereits so läßt sich die kolorimetrische Ninhydrin-Reaktion weitgehend quantitativ und reproduzierbar gestalten. Andere Faktoren wie pH -Wert, Ninhydrin-Konzentration, Wassergehalt des Reagens und Erhitzungsdauer beeinflussen ebenfalls die Farbbildung, doch lassen sich diese Einflüsse leicht konstant halten (vgl. Bilder 1–4).



A853.3)

Bild 3

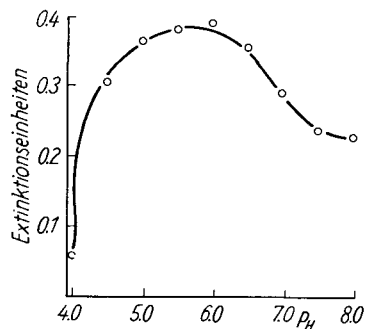
Einfluß des Wassergehaltes des Ninhydrin-Reagens auf die Farbausbeute



A853.4)

Bild 4

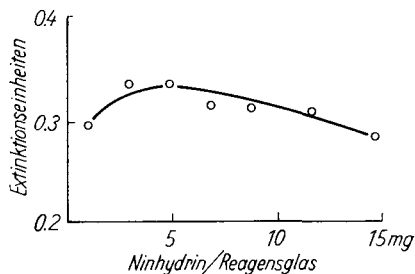
Einfluß der Erhitzungsdauer auf die Farbausbeute



A853.1)

Bild 1

Einfluß des pH -Wertes auf die Farbausbeute



A853.2)

Bild 2

Einfluß der Ninhydrin-Konzentration auf die Farbausbeute

Optimale Farbwerte wurden wie folgt erhalten:

Reagenzien: A) wäßriges Butanol: 1000 cm^3 n-Butanol (D_{20} 0,809–0,815) werden mit 160 cm^3 Wasser versetzt und bis zum Klarwerden geschüttelt. Der pH -Wert des wäßrigen Butanols (mit Universal-Indikator bestimmt) soll zwischen 5,5 und 6,0 liegen. Ist dies nicht der Fall, so wird durch Zugabe von $n/10$ HCl korrigiert. Die hierfür benötigten Mengen sind von den zuzusetzenden 160 cm^3 Wasser abzuziehen.

B) Ninhydrin-Reagens: In 1000 cm^3 des wäßrigen Butanols werden 0,8 g Ninhydrin gelöst.

Methode: Die Papierstücke mit den Aminosäure-Flecken werden direkt in Reagensgläser mit 10 cm^3 -Marke gebracht und mit 5 cm^3 Ninhydrin-Reagens überschichtet. Die so vorbereiteten, in einem metallischen Ständer befindlichen Gläser (144 Stück) werden dann gleichzeitig in ein Glycerinbad von 130°C gestellt und verbleiben dort, ohne weitere Beheizung, 15 min. Dann werden sie gleichzeitig entnommen, unter fließendem Wasser auf Zimmertemperatur abgekühlt und mit dem wäßrigen Butanol zur Marke aufgefüllt. Die Farblösung wird, wenn nötig, filtriert und im Kolorimeter bei 570 m μ gemessen. Bei Verwendung von Schleicher & Schüll-Papier 2043 b erübrigt sich ein Filtrieren, da keine herausgelösten Papierfasern die Messung beeinflussen. Man mißt nach 20 min und vor 1 h nach Entnahme aus dem Glycerin-Bad.

Zur Prüfung der Methode wurden je 0,01 cm^3 20 μmolar Aminosäure-Lösung auf Papierflecken (2×2 cm) Schleicher & Schüll 2043b gesetzt und wie angegeben behandelt. Tabelle 1 zeigt die erhaltenen Farbausbeuten unter Abzug des Papier- und Reagensblindwertes. Die Werte beziehen sich auf 0,2 μmol DYDA in wäßrigem Butanol = 100. Das DYDA wurde nach der bei Moore und Stein angegebenen

*) Nach einem Vortrag auf der GDCh-Hauptversammlung Berlin am 7. Oktober 1957.

1) S. Moore u. W. H. Stein, J. biol. Chemistry 176, 367 [1948].

2) K. Nehrung u. E. Schwerdtfeger, Pharmazie 9, 913 [1954].

	Farb- Ausb. %	Leucin-Faktoren	
		eigene	Moore u. Stein
Glycin	96	99	101
Alanin	105	108	101
Valin	103	106	102
Leucin	97	100	100
Isoleucin	97	100	100
Phenylalanin	91	94	88
Tyrosin	88	91	88
Tryptophan	84	87	72
Methionin	95	98	100
Cystin/2	68	70	54
Arginin	86	89	100
Histidin	91	94	104
Lysin	97	100	112
Asparaginsäure	80	83	88
Glutaminsäure	89	92	105
Threonin	98	101	92
Serin	95	98	94
γ-Aminobuttersäure	106	109	
α-Aminobuttersäure	100	103	
Sarcosin	98	101	84
Dijodtyrosin	73	75	
Ornithin	70	72	
Glutathion	51	53	76
β-Alanin	47	49	
Histamin	39	40	65
Glucosamin	28	29	100
Prolin	13	13	5
Harnstoff	2	2	3
Glucose	0	0	0
NH ₄ Cl	0	0	98

Tabelle 1

Farbausbeuten verschiedener Verbindungen (je 0,2 μMol auf 2 cm² Papier) bezogen auf 0,2 μMol DYDA = 100 und die sich daraus errechnenden Leucin-Faktoren. Mittelwerte von je 20 Einzelmessungen

Vorschrift dargestellt. Außerdem sind in der Tabelle die sich aus diesen Werten errechnenden „Leucinfaktoren“ (Farbausbeute des Leucins = 100) und die von Moore und Stein¹⁾ erhaltenen Leucin-Faktoren angeführt.

Es liefern also die meisten der als Eiweiß-Bausteine auftretenden Aminosäuren, mit Ausnahme von Prolin (und Oxyprolin), Farbausbeuten von 85–105% der Theorie. Diese Farbausbeuten sind für die einzelnen Aminosäuren charakteristisch und im optimalen Konzentrationsbereich (~ 0,2 μMol) mit einem mittleren Fehler des Mittelwertes von unter ± 2% reproduzierbar. NH₄-Salze, wie NH₄Cl, geben in äquimolaren Konzentrationen praktisch keine Färbung. Es sind keine Störungen durch das im Verlauf der HCl-Hydrolyse amid-haltiger Proteine anfallende NH₄Cl sowie durch das an der Papierfaser adsorbierte Ammoniak zu erwarten. Die Methode ist für Serienbestimmungen brauchbar.

Für die Auswertung ist zu beachten, daß die Farbausbeuten durch die papierchromatographische Methodik und dabei in erster Linie von den benutzten Lösungsmittel-Gemischen beeinflusst werden. Dieser Einfluß bleibt jedoch konstant, wenn die Arbeitsbedingungen konstant gehalten werden. Es ist daher nur notwendig, Testgemische bekannter Zusammensetzung in verschiedenen Konzentrationen zu chromatographieren und wie beschrieben auszuwerten. Die erhaltenen Eichkurven sind, bei konstanten Arbeitsbedingungen, innerhalb ± 5% reproduzierbar. Die benutzten Testlösungen müssen vollständige Aminosäure-Gemische sein, d. h. alle in der Analyse zu erwartenden Komponenten enthalten.

Eingegangen am 27. November 1957 [A 853]

Zuschriften

Octakis- und Nonakis-cyclo-ε-aminocaproil

Von Prof. Dr.-Ing. H. ZAHN und Dipl.-Chem. J. KUNDE

Deutsches Wollforschungsinstitut an der T. H. Aachen

Entsprechend unserer Synthese der cyclischen Oligomeren der ε-Aminocapronsäure nach der Azid-Methode bis zum Heptamer¹⁾ haben wir auch das Octa- und Nonamere synthetisiert.

Die Synthese nahm in Anlehnung an Sheehan und Richardson²⁾ folgenden Verlauf: a) Cap_8 ($\text{Cap} = -\text{HN}[\text{CH}_2]_5\text{CO}-$). Aus $\text{Z}(\text{Cap})_2\text{OH}^3$ und $\text{HClH}(\text{Cap})_6\text{OCH}_3$ (Fp 198°C) wurde durch Verknüpfung nach der Methode des gemischten Anhydrids mit Chlorkohlensäureäthylester $\text{Z}(\text{Cap})_8\text{OCH}_3$ (Fp 178°C) gewonnen. Daraus wurde durch Kochen mit Hydrazin $\text{Z}(\text{Cap})_8\text{NHNH}_2$ (Fp 198°C) dargestellt. Nach Abspalten der Carbobenzoxy-Gruppe wurde azidiert und das in Ameisensäure/Wasser gelöste Azid in Wasser als Verdünnungsansatz bei pH 8 cyclisiert. Für die Abtrennung des Cap_8 von Verunreinigungen bewährte sich der Ionenaustauscher Dowex 50. Cap_8 schmilzt bei 226–230°C; Ausbeute 25% der Theorie.

b) Cap_9 Die Synthese dieser 63-gliedrigen Ringmolekel des Molekulargewichtes 1017 verlief analog der von Cap_8
 $\text{Z}(\text{Cap})_3\text{OH}^3 + \text{HClH}(\text{Cap})_6\text{OCH}_3 \rightarrow \text{Z}(\text{Cap})_9\text{OCH}_3$ (Fp 184°C) \rightarrow
 Decarbenzoxylierg.
 $\text{Z}(\text{Cap})_9\text{NHNH}_2$ (Fp 205°C) $\xrightarrow{\text{Azidierg.}}$ Cap_9
 Ringschluß
 (Fp 224–226°C); Ausbeute 22% d. Th.

Beide Verbindungen zeigen das typische Polycaprolactam-Röntgenogramm; darüber hinaus werden auf Kratky-Kleinwinkel-aufnahmen Reflexe gefunden, die größeren Identitätsperioden zukommen.

Interessant ist ferner der Gang der Schmelzpunkte der cyclischen Oligamide. Wir finden vom Hexameren ausgehend bei steigender Ringgliederzahl einen Abfall der Schmelzpunkte in Richtung auf den des Hochpolymeren.

Eingegangen am 7. März 1958 [Z 586]

¹⁾ H. Zahn u. H. Determann, Chem. Ber. 90, 2176 [1957]; H. Zahn u. J. Kunde, diese Ztschr. 69, 713 [1957]. — ²⁾ J. Amer. chem. Soc. 76, 6329 [1954]. — ³⁾ H. Zahn u. D. Hildebrand, Chem. Ber. 90, 320 [1957].

Zur Struktur der isomeren Bis-(4-pyridyl)-glykole

Von Prof. Dr. D. JERCHEL und Dipl.-Chem. J. HEIDER¹⁾

Organisch-chemisches Institut der Universität Mainz

Bei der Acyloinkondensation von Pyridin-4-aldehyd²⁾ entstehen sowohl in Anwesenheit von wenig HCN als auch von Zinkstaub zwei in Wasser sehr schwer lösliche Reaktionsprodukte, nämlich eine in Methanol leichter lösliche, in farblosen Nadeln vom Fp 178–180°C kristallisierende Verbindung und eine in diesem Lösungsmittel sehr schwer lösliche, in farblosen Oktaedern vom Fp 214°C anfallende Verbindung. In beiden Fällen handelt es sich um Bis-(4-pyridyl)-glykol. Die IR-Spektren beider Verbindungen wurden aufgenommen³⁾. Wir konnten beweisen, daß das niedrigere schmelzende Glykol das Racemat, das höhere schmelzende die dazu gehörende Mesoform darstellt.

Setzt man bei 178–180°C schmelzendes Bis-(4-pyridyl)-glykol in Eisessig mit $\text{p}(+)$ -Weinsäure im Molverhältnis 1:0,25 um, dann entsteht ein in derben Kristallen anfallendes Salz vom Fp 174°C. Dieses wird mit gesättigter Sodalösung bei Zimmertemperatur gespalten; das entstehende Glykol zeigt in Eisessig den Drehwert $[\alpha]_D^{25} = +20^\circ$. Jetzt folgt erneute Reaktion mit Weinsäure im Mol-Verhältnis 1:0,15, die zu einem Tartrat mit dem Fp 179°C ($[\alpha]_D^{25} = +32,5^\circ$ in Wasser) führt. Dessen Spaltung ergibt die rechtsdrehende Form des Bis-(4-pyridyl)-glykols mit dem Fp 189°C und dem von uns maximal erreichten Drehwert von $[\alpha]_D^{25} = +39,2^\circ$ (Eisessig).

Um die linksdrehende Form zu gewinnen, wird Bis-(4-pyridyl)-glykol (Fp 178–180°C) der Umsetzung mit $\text{p}(+)$ -Camphersulfonsäure im Molverhältnis 1:1 in Dimethylformamid unterworfen. Das in sehr kleiner Menge isolierbare Salz mit dem Fp 238°C und $[\alpha]_D^{25} = +14^\circ$ (Wasser) ist einer fraktionierten Kristallisation nur in einer zur Weiterverarbeitung völlig unzureichenden Ausbeute zugänglich. Seine Spaltung führte zu einem Bis-(4-pyridyl)-glykol mit dem Fp 192°C (Beginn des Schmelzens bei 172°C) und $[\alpha]_D^{25} = -10,4^\circ$ (Eisessig). Auch die Verwendung von Eisessig als Lösungsmittel ergab keine besseren Ergebnisse.

Spaltungsversuche an dem bei 214°C schmelzenden Bis-(4-pyridyl)-glykol sowohl unter Verwendung von $\text{p}(+)$ -Weinsäure (Fp des Tartrates 174°C) als auch von $\text{p}(+)$ -Camphersulfonsäure (Fp des Camphersulfonates 239°C) in Eisessig und Dimethylformamid, angesetzt im Molverhältnis 1:0,25, führten zu keinem Ergebnis.