

CHROMATOGRAPHISCH-SPEKTROPHOTOMETRISCHE TRYPTOPHANBESTIMMUNG

M. ŠTEFL und V. HORÁK

Chemisches Institut, Landwirtschaftliche Hochschule, Prag-Suchdol

Eingegangen am 24. Februar 1971

Es wird eine Methode zur Tryptophanbestimmung durch direkte Färbung an Papierchromatogrammen mittels gepufferter Ninhydrinlösung bei Ammoniumionenüberschuß und nachfolgender Spektrophotometrie der Eluate des in den Cu-Komplex überführten Farbproduktes angeführt. Das Verfahren weist bei Maximalabweichungen von $\pm 3\%$ eine höhere Empfindlichkeit auf als die bisher in der Literatur zitierten Methoden. Das Verfahren ermöglicht die Bestimmung von 5–250 μg Tryptophan am Fleck des Chromatogramms. Es wird die Theorie der Methode erörtert.

Die Reaktion des Tryptophans mit Ninhydrin auf Papierchromatogrammen¹ oder in Lösungen² ist wenig empfindlich^{1,3}. Bei den bisher genauesten Bestimmungen mit Hilfe eines automatischen Analysators werden an der Kolonne mit Sephadex⁴ oder Stärke⁵ 80 μg Tryptophan aufgetragen. Die in Lösung genügend empfindliche Reaktion von Rhode⁶ mit *p*-Dimethylaminobenzaldehyd ist für die Bestimmung durch direkte Färbung auf Papierchromatogrammen nicht geeignet. Die übrigen kolorimetrischen Methoden^{7–10,11} weisen gegenüber den angeführten keine Vorteile auf. Auch die direkte spektrophotometrische Bestimmung im Ultraviolettlicht erweist sich als unbefriedigend. Bei den Methoden, in denen Tryptophan mittels Papierchromatographie geteilt und danach durch Reaktion in Lösung^{9–12} bestimmt wird, macht das standardmäßige Ausschneiden der Flecken Schwierigkeiten. Der große Vorteil der vollständigen Färbung der Substanzen auf chromatographischem Papier beruht auf der Separierung des Farbfleckes. Es wurden bisher zahlreiche, ungefähr gleiche Techniken der Aminosäurebestimmung mittels dieses Verfahren ausgearbeitet, keine jedoch erwies sich als vollkommen zufriedenstellend¹³, da die Bestimmungsbedingungen in ihnen nicht standardisiert sind. Auch wurde bisher keine Theorie dieser Methoden ausgearbeitet.

In der vorliegenden Arbeit wird die Tryptophanbestimmung durch Direktfärbung auf Papierchromatogrammen mit Hilfe gepufferter Ninhydrinlösung bei Ammoniumionenüberschuß und nachfolgender Spektrophotometrie der Eluate des in den Cu-Komplex überführten Farbproduktes beschrieben. Es wird die Theorie der Methode erörtert.

EXPERIMENTELLER TEIL UND ERGEBNISSE

Chemikalien. Die verwendeten Chemikalien waren Erzeugnisse der Fa. Lachema, Tryptophan wurde von der Fa. Merck, Ninhydrin für Analysatoren vom Werk SNP, Žiar nad Hronom geliefert. Die analysenreinen Lösungsmittel wurden destilliert, wobei die Siedepunktfraction zur Anwendung gelangte. Das 96%ige Äthanol wurde mit NaOH-Zusatz destilliert und mit 20% Wasser

sowie einigen Tropfen H_2SO_4 redestilliert, wobei die bei $78^\circ C$ aufgefangene Fraktion herangezogen wurde.

Zur Chromatographie diente chromatographisches Papier Whatman No 2, das mit 300 ml 0,01M-HCl je Bogen gewaschen und dann getrocknet wurde. Auf den Papieren wurde reines Tryptophan gleichzeitig mit den freien Aminosäuren der Blätter von zwölf- bis achtzehn Tage alten Bohnenengewächsen „Perlička“¹⁴ chromatographiert. Tryptophan (0,3–0,8 mg in 1 ml) wurde in 10^{-2} M Ammoniak in 10%igem Isopropanol gelöst. Die Lösungen wurden bis zu einem Volumen von 50 μ l auf kreisförmige Flecke mit einem Durchmesser von 10 mm, über 50 μ l auf in die Länge gezogene, 2–6 cm lange Flecke mit Zwischenräumen von 3 cm getropft. Die Tröpfchen wurden im Strom kalter Luft getrocknet. Die Chromatogramme wurden nach den unteren Papierrand³ hin mit 0,01M-HCl entwickelt, worauf das Lösungsmittel im Verlauf von 24 Stunden aus dem Papier verdampft wurde. Die Chromatogramme wurden in Polyäthylensäcken im Dunkeln aufbewahrt. Wie sich bei der Untersuchung der Färbungsbedingungen zeigte, hat neben der Feuchtigkeit des Papiers und der Ninhydrinkonzentration¹⁵ die Ammoniumionenkonzentration sowie die Konzentration und der pH-Wert des Puffers einen großen Einfluß auf die Färbungsintensität und die Bestimmungsfehler. Zur Färbung der Chromatogramme diente eine gepufferte äthanolische Ninhydrinlösung. Es wurde eine Reihe von Puffern überprüft. Als am geeignetsten erwiesen sich der K^+ -Succinatpuffer, von den Ammoniumsalzen Ammoniumsuccinat, die in dem verwendeten Ninhydrinlösungsmittel, dem 92%igen Äthanol, genügend löslich sind. Es wurden zahlreiche Varianten verschiedener Ammoniumsalzkonzentrationen sowie Konzentrationen und pH-Werte des Puffers überprüft. Die Optimalvariante zeigte sich beim 0,05M Puffer mit dem pH-Wert von 5,3 und 0,005M Ammoniumsuccinat.

Färbungs- und Meßverfahren. 1 Stunde vor dem Färben und während des Färbens wird bei der Temperatur von $22-26^\circ C$ mit Wasserdampf auf 80–85% relative Luftfeuchtigkeit gesättigt. Die Chromatogramme werden 60 Minuten bei $60^\circ C$ getrocknet und 60 Minuten bei $24-25^\circ C$ im Exsikkator über 10%igem Ammoniak (50 ml je 1 Chromatogramm) neutralisiert, woraus 3–4 Stunden bei $22-26^\circ C$ belüftet und dann 60 Minuten bei $60^\circ C$ getrocknet wird. Das letztere Trocknen der Chromatogramme ist absolut erforderlich, und zwar einerseits zur Beseitigung freier Ammoniakspuren, andererseits, um Verwaschung der Aminosäuren im trockenen Papier mit der zur Färbung dienenden Lösung zu vermeiden. Dann werden die Chromatogramme durch die zur Färbung bestimmte Lösung gezogen. Die Herstellung von 100 ml Lösung (Optimalvariante mit Puffer beim pH 5,3): 76 mg Ammoniumsuccinat werden in 4 ml ammoniakfreiem Wasser gelöst, es werden 85,5 ml 96%iges Äthanol, 0,5 ml Paraffinöl, 4,38 ml 0,5M Bernsteinsäure in 96%igem Äthanol, 5,62 ml 0,5M-KOH in 96%igem Äthanol und schließlich 100 mg Ninhydrin zugegeben. Das Gefäß wird mittels Polyäthylenstopfens verschlossen und das Ninhydrin durch Schütteln gelöst. Für ein 56 \times 65 cm-Chromatogramm sind 50 ml Lösung erforderlich. Das Chromatogramm wird längstens eine Minute nach der Lösungsherstellung durchgezogen, 20 Minuten¹ bei $22-26^\circ C$ frei im Raum aufgehängt und danach zur Farbentwicklung in eine Vertikalglaskammer mit einer Lichtweite von 10 mm über 14M-NaOH 14–16 Stunden bei $25 + 1^\circ C$ eingelegt. Die zur Färbung dienende Lösung wird durch Einfluß der Ammoniumionen bereits nach 5–6 Minuten braun. Das Paraffinöl verlangsamt die Verfärbung. Deshalb wird für jedes Chromatogramm eine frische Lösung hergestellt und die chromatographische Rille wird nach dem Durchziehen des Chromatogramms mit destilliertem Wasser abgespült und mit Filtrierpapier getrocknet. Die gefärbten Chromatogramme werden sofort in Polyäthylensäcken verschlossen und dauernd im Dunkeln aufbewahrt. Durch Licht, Ammoniak und atmosphärische Feuchtigkeit wird der Untergrund dunkel und die Farbintensität des Fleckens ändert sich allmählich.

Von den verschiedenen Elutionslösungen entsprach am besten 70–75%iges Äthanol oder 0,005M Veronalpuffer mit dem pH-Wert 7,0 in 50%igem Äthanol (Tab. I). Zur Bestimmung diente die letztere Lösung. Die Flecke mit Tryptophan und zwei bis drei verschiedene Teile im Größen-

ausmaß der Abschnitte mit Tryptophan werden aus der reinen Papierstelle (Blindversuche) ausgeschnitten, mit einer Präzision von ± 1 mg gewogen, in ein Gefäß (Reagenzglas, Schliffkolben) eingelegt und mit der erforderlichen Menge Elutionslösung begossen¹⁶. Das Wägen der Ab-

TABELLE I

Farbstabilität des Reaktionsproduktes von Tryptophan mit Ninhydrin
10 μ g Tryptophan, 4 ml Elutionslösung. Bestimmt auf Grund der Optimalvarianten.

Elutionslösung	A. 1 000 nach der Elution, Std.			Kation mol/l	A. 1 000 nach Zugabe des Kations, min			
	0,5	12	72		0	1	3	5
70%iges Äthanol	252	250	252	Cu ²⁺ , 0,003	448	450	448	436
0,005M Veronalpuffer pH 7,0	235	236	234	Cu ²⁺ , 0,003	419	420	415	405
50%iges Äthanol				Cd ²⁺ , 0,005	385	386	380	378

TABELLE II

Bestimmung von reinem Tryptophan auf Papierchromatogrammen

Elutionslösung: 0,005M Veronalpuffer pH 7,0 in 50%igem Äthanol. Bestimmt auf Grund der Optimalvariante; es wurde der Cu-Komplex gemessen.

Chromatogramm	μ g Tryptophan/ A_p 1 000 aus Tröpfchen					Tröpfchennummer	A_p^a 1 000 je 10 μ g Tryptophan		
	1	2	3	4	5		\emptyset	$\pm A_p$	$\pm\%$
1	1,66	4,98	16,66	66,66	—	2-4	428	+ 6,7	+1,57
	182	210	724	2 860					
2	7,97	26,55	106,2	318,6	—	1-4	452	+ 3,0	+0,66
	363	1 208	4 712	14 454					
3	1,68	8,38	41,9	167,6	335,2	2-4	410	+ 8,0	+1,95
	65	342	1 753	6 784	12 881				
4	1,68	8,38	41,9	167,6	503	2-4	452	+ 3,0	+0,66
	118	377	1 888	7 633	20 606				
5	1,68	8,38	41,9	251,4	—	2-4	417	+ 3,3	+0,79
	103	377	1 743	10 573					
6	1,68	8,38	41,9	167,6	503	2-4	421	+10,3	+2,45
	89	359	1 774	6 880	18 895				
Arithmetischer Mittelwert							430	+22,1	+5,14
								-19,9	-4,63

^a A_p ist die Absorbanz, umgerechnet auf 4 ml Eluat.

schnitte ist nötig, da das Papier entlang der gesamten Fläche nicht das gleiche Gewicht auf den einzelnen Flächeneinheiten aufweist. Die Gefäße werden mit Polyäthylenstopfen verschlossen. Es muß im Dunkeln gearbeitet werden und die Eluate müssen auch im Dunkeln aufbewahrt werden. Die auf die Abschnitte entfallende Menge Elutionslösung wird nach folgenden Regeln gemessen: a) Auf die leeren Abschnitte und auf die Abschnitte mit kleinen Tryptophanmengen bis 80 mg werden 4 ml und bei allen weiteren 20 mg je 1 ml zugegeben. b) Auf die Abschnitte mit dem Farbprodukt des Tryptophans wird auf Grund der Farbintensitätsschätzung soviel Elutionslösung (4—300 ml und mehr) abgemessen, daß die Absorbanz 0,600 nicht übersteigt. Die Minimalmenge richtet sich nach a). Die Eluate werden nach dreißigminütigem Stehenlassen zur Vermeidung des Papierzerfransens durch Umkippen des Gefäßes gemischt. Das Farbprodukt wird knapp vor dem Messen in den Cu-Komplex übergeführt, der eine weit höhere Absorbanz gewährleistet (Tab. I). In die 1 cm-Küvette des Spektrophotometers SF 4 werden 0,05 ml 0,5%ige Lösung von $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ in 0,1M-HCl eingebracht und mit 3 ml Eluat übergossen. Die Lösungen mischen sich dabei von selbst und die Farbe nimmt nach 10 Sekunden Maximalintensität an. Es wird sofort, spätestens nach 1—2 Minuten, bei der Wellenlänge 509 nm gegen die Elutionslösung ohne Kupfer gemessen. Der Kupferkomplex zeigt die Maximalabsorbanz beim pH-Wert 3,0, bei höherem pH-Wert bildet er sich nicht, bei sehr niedrigem entfärbt er sich schnell. Beim optimalen pH-Wert vermindert sich die Farbintensität nach 1—2 Minuten (Tab. I).

Die Methode gestattet die Verwendung des Fleckens an den Chromatogrammen mit 5—250 μg Tryptophan. Bei diesem weiten Konzentrationsbereich ist es angezeigt, die Eichkurve auf Grund der umgerechneten Absorbanzen A_p , die auf das niedrigste verwendete Volumen der Elutionslösung (4 ml) bezogen wurden, zu konstruieren. Die A_p -Werte werden durch Multiplizieren der Absorbanzen A mit dem Koeffizienten $x = \text{ml Eluat}/4$ gewonnen. Aus den A_p -Werten der Blindabschnitte wird die Neigung ihrer Eichkurve berechnet:

$$\text{tg } \alpha = \frac{\sum A_p \text{ der Blindabschnitte}}{\sum \text{mg der Abschnitte}} .$$

Die Gewichte der Abschnitte mit den Aminosäuren werden mit dem $\text{tg } \alpha$ -Wert multipliziert und der gewonnene A_p -Wert wird von dem des Eluats aus den Abschnitten mit Tryptophan subtrahiert, wodurch der A_p -Wert des Tryptophans als solchen gewonnen wird. Die Eichkurve ist, entsprechend $A_p = 0,15$ bis 10,0 (Tab. II), bei der Optimalvariante im Bereich von 6—250 μg Tryptophan linear. Die Ergebnisse sind als arithmetische Mittelwerte dreier Bestimmungen (Fleckenanzahl der untersuchten Proben je ein Chromatogramm) mit den Absolutabweichungen angeführt. Als Präzisionskriterium sind die Fehler der Aminosäurebestimmungen am automatischen Analysator genommen (3%).

Bei der Zusammenstellung der Standardkurve für jedes Chromatogramm betragen die Abweichungen vom arithmetischen Mittelwert dreier Wiederholungen maximal $\pm 3\%$. Durch Konstruktion der Standardkurve für eine beliebige Anzahl von Analysen auf verschiedenen Chromatogrammen betragen die Abweichungen $\pm 5\%$ (Tab. II). Die Bestimmungen werden während zweier Monate an verschiedenen Tagen wiederholt. Bei Änderung der Amoniumsuccinatkonzentration, der Konzentration und des pH-Wertes des Puffers der zur Färbung dienenden Lösung wird der Bestim-

mungsfehler erhöht und die Absorbanz vermindert. Zur Überprüfung der Methode wurde der Gehalt an freiem Tryptophan in Blättern von zwölf bis achtzehn Tage alten Buschbohnenpflanzen bestimmt. Auf den Papieren wurden stets drei Flecke des Standards und drei der Probe chromatographiert. Bei der Optimalvariante waren die Bestimmungsfehler die gleichen wie bei den Standardsubstanzen, bei den nicht-optimalen Varianten erhöhten sie sich wieder (Tab. III).

TABELLE III

Bestimmung von freiem Tryptophan in Blättern von Buschbohnenpflanzen

Tröpfchen auf die Chromatogramme 50–800 μ l. Chromatographiert wurde mit Standardsubstanzen auf den Chromatogrammen (Tab. II). Es kam die optimale Bestimmungsvariante zur Anwendung.

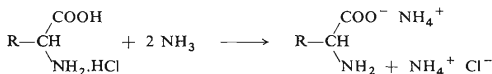
Chromatogramm ^a	Probe der Blätter	gefunden Tryptophan, mg % im Rohmaterial					
		Tröpfchen			arithmetischer Mittelwert	\pm Abweichungen	
		1	2	3		absolut	%
1	1	15,23	15,85	15,38	15,49	+0,36 -0,26	+2,32 -1,68
2	2	13,21	12,70	12,87	12,93	+0,28 -0,23	+2,17 -1,78
3	3	10,28	10,71	10,68	10,56	+0,15 -0,27	+1,42 -2,56
4	3	10,56	10,36	10,25	10,39	+0,17 -0,14	-1,64 -1,35
6	3	10,53	10,19	—	10,36	\pm 0,17	\pm 1,64

^a Die Nummern der Chromatogramme entsprechen denen in Tabelle II.

DISKUSSION

Es wird von dem wahrscheinlichsten Schema der Reaktion des Ninhydrins mit Aminosäuren, bei der die Streckerische Reaktion verläuft, ausgegangen. Das freie Ammoniak reagiert mit einem Ninhydrinmolekül und einem Hydrindantinmolekül zur Enol- und Ketoform des Diketohydrindilen-diketohydrindamins. Die Enolform des Produktes gibt mit dem Ammoniumion ein intensiv blauvioletttes Salz¹⁷, zu dessen Entstehen zwei Ammoniumionen erforderlich sind. Werden der zur Färbung dienenden Lösung keine Kationen zugegeben, beispielsweise¹⁸, können das atmosphärische Ammoniak sowie die Kationen aus dem Papier und dem Extrakt des biologischen Materials unterschiedliche Farbintensität des Produktes der Aminosäure mit Ninhydrin verursachen. Den Lösungen werden daher Kupfer(II)-¹⁹ oder Cadmium(II)-Kationen²⁰ zugegeben. Als Verfahrensgrundlage der Färbung der Aminosäuren mit Ninhydrin in Lösungen unter Hydrindantinzugabe^{21,22} oder bei älteren Arbeiten

unter Zugabe reduzierender Substanzen^{23,24} ist die quantitative Umsetzung des aus der Aminosäure in Freiheit gesetzten Ammoniaks bei Ninhydrin- und Hydrindantinüberschuß anzusehen. Dieses Prinzip kann zum Färben auf Chromatogrammen nicht herangezogen werden, da die Ammoniakspuren im Papier Nachdunkeln des Untergrunds verursachen. Die Grundlage der vorgeschlagenen Methode beruht auf der quantitativen Umsetzung des in der Reaktion der Aminosäure mit Ninhydrin entstandenen Hydrindantins in Gegenwart eines Überschusses von Ninhydrin und Ammoniumionen. Bei der Optimalfeuchtigkeit des Papiers und beim optimalen pH-Wert des Puffers bleibt der Untergrund des Papiers hell. Für je eine Flächeneinheit muß das Vielfache an Reagentien mit Bezug auf die Aminosäuremaximalkonzentration inmitten des Fleckens des relativ größten Tröpfchens bereitgestellt werden. In 1%iger Lösung ist der Ninhydrinmolüberschuß ausreichend¹⁵. Zur Erhöhung der Ammoniumionenkonzentration erwies sich als sehr vorteilhaft die Entwicklung von Chromatogrammen mit 0,01M-HCl, wobei sich Tryptophanhydrochlorid bildet, das bei der Neutralisierung mit gasförmigem Ammoniak die Ammoniumionen bindet;



Mit dem Molekül des bei der Reaktion des Tryptophans mit Ninhydrin in Freiheit gesetzten Ammoniaks befindet sich in der Stelle der Aminosäure das Dreifache der Ammoniumionen. Durch Zugabe von 0,005M Diammoniumsuccinat wird die Optimalgrenze der Bedingungen erreicht, die zur quantitativen Umsetzung des Hydrindantins im weiten Bereich der Tryptophankonzentration im Tröpfchen erforderlich ist. Dieses Prinzip kann zur Färbung der Aminosäure in Lösungen nicht herangezogen werden, da in ihnen die Ammoniumionen mit Ninhydrin unter Verfärbung reagieren. Bei Reaktionen auf Papierchromatogrammen ist die Standardisierung des Ammoniumionengehaltes im Reaktionsmedium vorteilhafter als dessen Beseitigung. Bei direkter Färbung der Substanzen auf den Papierchromatogrammen muß maximale Farbtintensität der Flecken und Minimalfärbung des Papieruntergrunds erreicht werden. Zur Gewinnung reproduzierbarer Ergebnisse müssen sämtliche Bedingungen, u.zw. die Papierfeuchtigkeit und Konzentration der Reagentien je Flächeneinheit¹⁵ sowie auch der Typ, die Konzentration und der pH-Wert des Puffers standardisiert werden. In den bisherigen Arbeiten wurden bei diesen Methoden keine Puffer verwendet, wodurch sich einer der Fehler- und Mißtrauensfaktoren ergibt¹³.

LITERATUR

1. Rao N. A., Wadhvani T. K.: Indian Inst. Sci. 37, 130, A (1955).
2. Gaitonde M. K., Dovoy T.: Biochem. J. 117, 907 (1970).
3. Schäder J.: Pharmazie 18, 6 (1964).
4. Slump P., Schreuder H. A. W.: Anal. Biochem. 27, 132 (1969).
5. Oeschlegel F. J., Jr., Schroeder J. R., Stahmann M. A.: Anal. Biochem. 34, 331 (1970).
6. Rhode N.: Z. Physiol. Chem. 44, 161 (1905).
7. Spies J. R., Clambers D. C.: Anal. Chem. 20, 30 (1948).
8. Spies J. R.: Anal. Chem. 22, 1447 (1950).
9. Poljanovskij O. L., Kretovič V. L.: Dokl. Akad. Nauk UdSSR 112, 1086 (1957).
10. Koštif J., Valenta G.: Rostlinná výroba 9, 961 (1963).
11. Horák V.: Sborník Vysoké školy zemědělské, Prag, A, 1/68, 11 (1968).
12. Leslie J.: Anal. Biochem. 18, 566 (1967).
13. Hais I. M., Macek K.: *Papírová chromatografie*. Academia, Prag 1954.
14. Šteff M., Trčka I.: diese Zeitschrift 36, 3323 (1971).
15. Šteff M., Tulach J., Sovová A.: diese Zeitschrift 25, 435 (1960).
16. Šteff M.: *Dissertation*. Landwirtschaftliche Hochschule, Prag 1963.
17. Čičibabin A. E.: *Osnovnyje Načala Organičeskoj Chimii*, I. Teil, S. 674. Moskau-Leningrad 1953.
18. Keil B.: diese Zeitschrift 19, 1006 (1954).
19. Fischer F. G., Dörfel H.: Biochem. Z. 324, 544 (1953).
20. Mortreuil G., Khouvine I.: Bull. Chim. Biol. 36, 425 (1954).
21. Moore S., Stein W. H.: J. Biol. Chem. 211, 907 (1954).
22. Connel G. E., Dixon G. H., Hanes C. S.: Can. J. Biochem., Physiol. 33, 416 (1955).
23. Moore S., Stein W. H.: J. Biol. Chem. 176, 367 (1948).
24. Paschina T. S.: Biochimija 19, 702 (1954).

Übersetzt von K. Grundfest.