

BEITRÄGE ZUR CHEMIE UND PHYSIOLOGIE EINIGER STOFFWECHSELCHEMISCH WICHTIGER SÄUREN

3. MITTEILUNG.

EIN EINFACHER PAPIERCHROMATOGRAPHISCHER NACHWEIS FÜR ISOCITRONENSÄURE IN PFLANZENMATERIAL*

R. POHLOUDEK-FABINI, CHR. WOLLMANN UND H. WOLLMANN

*Pharmazeutisch-chemisches Institut und Zentrale Universitätsapotheke
der Universität Greifswald (Deutschland)*

Unsere lückenhaften Kenntnisse über die Verbreitung der Isocitronensäure in pflanzlichem Material sind im wesentlichen in dem Mangel an einfachen und sicheren Methoden zum Nachweis und zur Bestimmung dieser stoffwechselchemisch wichtigen Säure begründet.

Nachdem es bislang nicht gelungen war, Isocitronensäure von Citronensäure als freie Säure papierchromatographisch zu trennen, standen neben der Isolierung der Säure^{2,3} lediglich sehr zeitraubende Verteilungsverfahren an Silicagel-Säulen⁴⁻⁷, das enzymatische Verfahren von KREBS UND EGGLESTON⁸ in der Modifikation von HARGREAVES, ABRAHAMS UND VICKERY⁹ sowie eine von RANSON¹⁰ beschriebene indirekte papierchromatographische Methode zur Verfügung. Letztere beruht darauf, die Isocitronensäure durch trockenes Erhitzen im Vakuum in Isocitronensäurelaktone überzuführen und mit konzentrierter Ammoniakflüssigkeit als "Isocitronensäureamid" zu lösen. Diese Verbindung zeigt in den meisten Verteilungsmitteln weit höhere R_F -Werte als Citronen- und Isocitronensäure. Da der Nachweis in Säuregemischen durch andere Komponenten gestört werden kann, schneidet man aus einem ersten direkt gewonnenen Chromatogramm Isocitronen- und Citronensäure als gemeinsamen Fleck aus, führt die Umwandlung der Isocitronensäure in das "Amid" mit dem Eluat des Chromatogrammfleckes durch und chromatographiert erneut. Diese Arbeitsweise ist ebenso kompliziert.

Wir gingen bei unseren Versuchen zur direkten papierchromatographischen Trennung von Isocitronen- und Citronensäure als freie Säuren von der Beobachtung aus, dass die beiden Säuren in einigen Verteilungsmitteln kleine R_F -Wert-Unterschiede aufweisen (Tabelle I).

Weitere in dieser Richtung durchgeführte Untersuchungen ergaben, dass die geringe R_F -Wert-Differenz ($\text{Diff. } R_F \times 100 = 2$) bei gleichzeitig stark herabgesetzten R_F -Werten, vor allem mit dem von uns schon früher zur quantitativen Abtrennung

* 2. Mitteilung, siehe Ref.¹.

der Äpfel- von der Citronensäure benutzten Verteilungsmittel Isoamylalkohol-Chloroform-Ameisensäure 85 % (4:1:1 v/v/v), wassergesättigt, unter geeigneter papierchromatographischer Technik zur reproduzierbaren Trennung von Isocitronen- und Citronensäure in Modellgemischen und in Pflanzenextrakten ausreicht (Tabelle II).

TABELLE I

 R_F -WERTE VON ISOCITRONENSÄURE UND CITRONENSÄURE IN EINIGEN VERTEILUNGSMITTELN

Verteilungsmittel	Methode	$R_F \times 100$	
		Isocitronensäure	Citronensäure
tert.-Amylalkohol-Chloroform-Ameisensäure 90%-Wasser (80:80:30:80 v/v/v/v ¹¹)	Absteigend	24	26
tert.-Amylalkohol-Chloroform-Ameisensäure 90%-Wasser (24:136:30:80 v/v/v/v ¹¹)	Absteigend	10	11
n-Butanol-Chloroform-Ameisensäure 10% (75:25:10 v/v/v ¹²)	Rundfilter	27	26
Isoamylalkohol-Chloroform-Ameisensäure 85% (4:1:1 v/v/v) wassergesättigt ¹³)	Absteigend	12	14

TABELLE II

PAPIERCHROMATOGRAPHISCHE TRENNUNG VON ISOCITRONENSÄURE UND CITRONENSÄURE IM VERTEILUNGSMITTEL ISOAMYLALKOHOL-CHLOROFORM-AMEISENSÄURE 85% (4:1:1 v/v/v), WASSERGESÄTTIGT (Mittelwerte aus 20 Versuchen)

Verfahren	Absteigend mit Front ca. 40 cm	Absteigend ohne Front	Durchlaufend, Laufzeit: 6 Tage	
Ermittelte Größen	$R_F \times 100$	$R_{\text{Weinsäure}} \times 100$	" R_F " $\times 100$ berechnet	Wanderungsstrecke, Weinsäure = 15 cm
Spalte	1	2	3	4
Weinsäure	8	100	8.0	15 cm
Phosphorsäure	8	105	8.4	15.8 cm
Isocitronensäure	12	163	13.0	24.5 cm
Citronensäure	14	183	14.6	27.5 cm
Äpfelsäure	23	D	D	D

" R_F " = Aus Spalte 2 berechnete theoretische Wanderungsweite der Lösungsmittelfront (Durchschnitt 202 cm).

D = Die Säure wandert meist in den Durchlauf des Chromatogramms.

Nach unseren Versuchsbedingungen wandert die Weinsäure als Bezugssubstanz während 6 Tagen zwischen 15 und 20 cm, was einem Abstand der Mittelpunkte des Isocitronensäure- und des Citronensäureflecks von 3 bis 4 cm entspricht. Damit ist eine einwandfreie Trennung im Bereich der papierchromatographischen Möglichkeiten (etwa 40-400 μg) gegeben. Eine Verwechslung mit anderen nichtflüchtigen Säuren kommt bei unserem Verfahren kaum in Betracht, da die in ihrer Wanderungsweite am nächsten liegenden Säuren von allgemeiner Verbreitung (Phosphor- und

Äpfelsäure) sehr weit abgetrennt werden (Tabelle II). Zur Erhärtung der Ergebnisse kann jedes Chromatogramm mehrfach wiederholt werden, wobei man die Doppel zur Ausführung von Farbreaktionen, die von Isocitronen- und Citronensäure in gleicher Weise gegeben werden, benutzt.

Dazu empfehlen sich Farbreaktionen, z.B. nach BUCH, MONTGOMERY UND PORTER¹⁴. Man besprüht mit einer frisch bereiteten Mischung von Essigsäureanhydrid und wasserfreiem Pyridin (1:9 v/v) und stellt nach 3 Minuten im Tageslicht orange-farbene Flecke fest, oder besprüht auf einem anderen Chromatogramm nach SCHREIER UND HACK¹⁵ mit einer 4%igen Lösung von *p*-Dimethylaminobenzaldehyd in

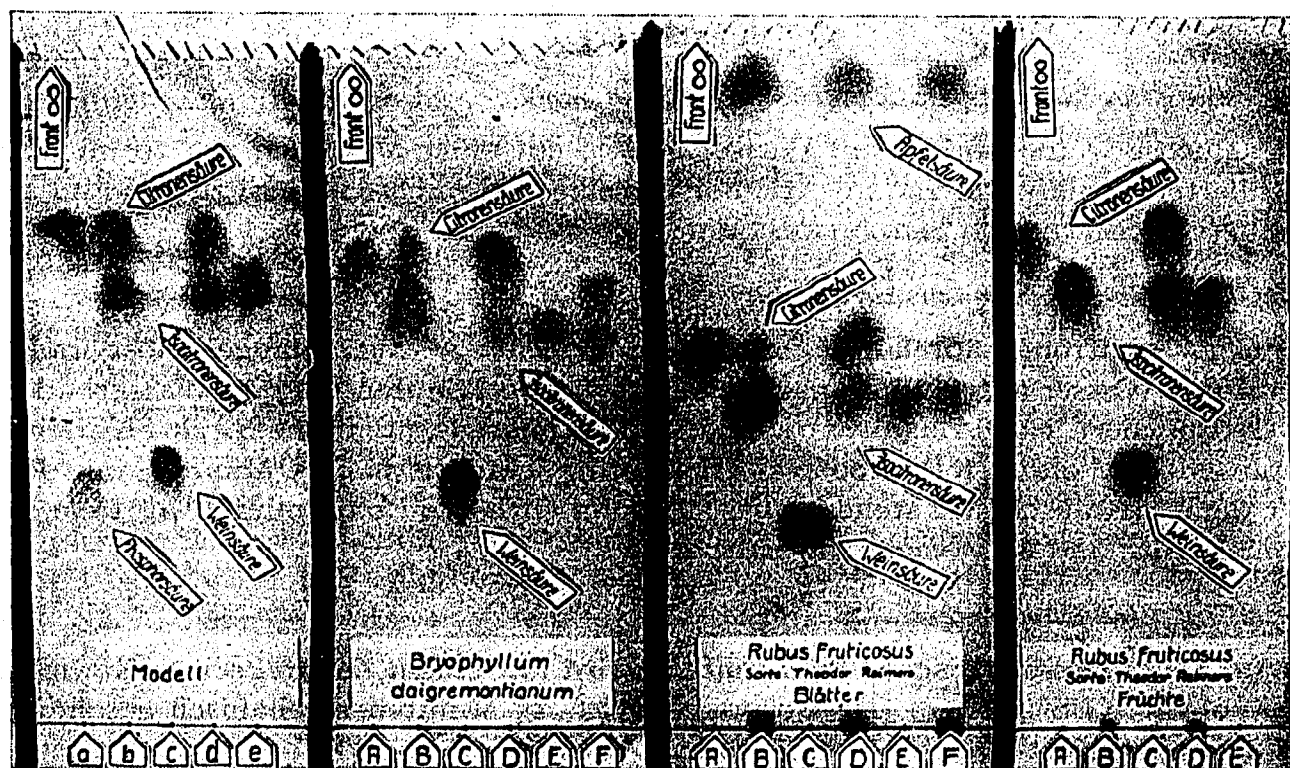


Fig. 1. Papierchromatographischer Nachweis von Isocitronensäure. a = Phosphorsäure + Citronensäure; b = Isocitronensäure + Citronensäure; c = Weinsäure; d = Isocitronensäure + Citronensäure; e = Isocitronensäure; A = Citronensäure; B = Pflanzenextrakt + Isocitronensäure; C = Weinsäure; D = Pflanzenextrakt + Citronensäure; E = Isocitronensäure; F = Pflanzenextrakt.

Essigsäureanhydrid mit Zusatz einer kleinen Menge Natriumacetat, erhitzt das Chromatogramm 2 Minuten bei 140° und erhält im Tageslicht weinrote Flecke.

Die beschriebene papierchromatographische Methode wurde von uns zum Nachweis von Isocitronensäure in verschiedenen Pflanzenextrakten angewandt. Einige Originalchromatogramme sind in der Fig. 1 wiedergegeben. Danach kommt in den Blättern von *Bryophyllum daigremontianum* Berger sowohl Isocitronen- als auch Citronensäure vor. Erstere wurde in dieser Pflanze von PUCHER UND VICKERY¹⁶ nachgewiesen. Grosse Mengen Isocitronensäure, aber keine Citronensäure in der gleichen Grössenordnung, fanden wir in den Früchten von *Rubus fruticosus* L.

Literatur S. 529/530.

(Sorte Theodor Reimers). Aus Brombeeren wurde die Isocitronensäure bereits von NELSON² isoliert. Im Gegensatz zu früheren Angaben⁸, nach denen in den Blättern von Pflanzen der Gattung *Rubus* keine bemerkenswerten Mengen an Isocitronensäure vorkommen sollen, konnten wir in den Blättern der Brombeer-Gartensorte "Theodor Reimers" mehr Isocitronen- als Citronensäure finden. In den Blättern einiger Wildarten der Gattung *Rubus* war Isocitronensäure allerdings papierchromatographisch nicht nachweisbar.

Über quantitative Untersuchungen an den Blättern solcher *Rubus*-Wildarten, die Isocitronensäure in erheblichen Mengen führen, wird zu gegebener Zeit noch zu berichten sein.

VERSUCHSTEIL

Herstellung von Schweppe's Reagens¹⁷

20 g Glucose werden in 200 ml Wasser gelöst, mit einer Mischung aus 20 ml frisch destilliertem Anilin und 200 ml Äthanol versetzt und mit *n*-Butanol zu 1000 ml aufgefüllt (vgl. SMITH UND SPRIESTERSBACH¹⁸).

Herstellung der Isocitronensäurelösung

50 mg *dl*-Isocitronensäurelaktone werden in 1.5 ml 1 N Natronlauge gelöst und zu 5.0 ml mit Wasser aufgefüllt. Anschliessend wird 60 Minuten lang im Wasserbad bei 40° hydrolysiert. Nach Zugabe von 0.5 ml 1 N Ameisensäure und 1.0 g des Kationenaustauschers Wofatit KPS 200 p.a. (H⁺-Form) schüttelt man 5 Minuten und lässt über dem Austauschharz stehen. Diese Lösung enthält in 0.01 ml 100 µg freie Isocitronensäure und ist wochenlang haltbar.

Herstellung der Pflanzenextrakte

(a) Der Presssaft frischer Pflanzenteile wird mit einem Zehntel seines Gewichtes mit Wofatit KPS 200 p.a. (H⁺-Form) versetzt, 15 Minuten mechanisch geschüttelt und abzentrifugiert. Diese Lösung ist nicht haltbar.

(b) Einige Gramm frisches Pflanzenmaterial werden im Mörser mit 0.5 ml 4 N Schwefelsäure zerkleinert und mit etwa 10 g wasserfreiem Natriumsulfat zur Trockne verrieben und im Soxhlet-Apparat 2 bis 3 Stunden mit Aceton extrahiert (bis der Ablauf farblos ist). Das auf 10 ml vorsichtig eingeeengte Extrakt ist monatelang haltbar. Wegen der grösseren Verdünnung muss unter Umständen streifenförmig aufgetragen werden.

Papierchromatographische Technik

Auf Filtrierbogen Schleicher & Schüll 2043b mg1 (ungewaschen) 18 × 58 cm (Faserichtung parallel zur Schmalseite) werden auf einer Startlinie, 12 cm von der Schmalseite entfernt, Lösungen von Citronen- und Isocitronensäure als Testsubstanz, von Weinsäure als Bezugsubstanz und das zu untersuchende Pflanzenextrakt (ev. mit wechselweisem Zusatz von Reinsubstanz) mehrfach aufgetragen. Die gegenüberliegende Schmalseite wird mit 1 cm tiefen sägeförmigen Einschnitten versehen. Man hängt

die Bogen zur Sättigung mit dem einphasigen Verteilungsmittel in eine Kammer für absteigende Chromatographie. Auf dem Boden der Kammer befinden sich drei Glasschalen mit je 10 ml des Flüssigkeitsgemisches Isoamylalkohol-Chloroform-Ameisensäure 85% (4:1:1 v/v/v), wassergesättigt, das 12 Stunden vor der Verwendung frisch herzustellen ist. Die Wände der Kammer sind zur besseren Sättigung mit drei mit dem Lösungsmittelgemisch getränkten Filtrierpapierstreifen von 3 cm Breite senkrecht ausgekleidet; sie ragen an ihrem unteren Ende in die Bodenschalen hinein. Sättigungszeit mindestens 16 Stunden. Danach wird das gleiche Verteilungsmittel in die Rinnen gefüllt und 6 Tage absteigend unter Abtropfen des Verteilungsmittels vom gezähnten unteren Rand des Papierbogens chromatographiert. Die Kammern können bis zu 3 × hintereinander benutzt werden. Danach empfiehlt sich eine gründliche Reinigung, da der zunehmende Gehalt der Atmosphäre an Isoamylformiat die Trennung nachteilig beeinflusst. Nach beendeter Chromatographie werden die Bogen über Nacht bei Zimmertemperatur getrocknet, mit Schweppe's-Reagens besprüht und sofort bei 125° im Trockenschrank etwa 5 bis 10 Minuten (je nach Kapazität des Trockenschrankes) erhitzt. Die Säuren erscheinen als nahezu unbegrenzt haltbare braune Flecke aufweissem Grund.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird über ein papierchromatographisches Verfahren berichtet, das den Nachweis der Isocitronensäure neben Citronensäure als freie Säuren in Modellgemischen und in Pflanzenextrakten gestattet. Die Trennung erfolgt im Durchlaufchromatogramm (Papier: Schleicher & Schüll 2043b mgl, 18 × 58 cm) mit dem einphasigen Verteilungsmittel Isoamylalkohol-Chloroform-Ameisensäure 85% (4:1:1 v/v/v) wassergesättigt.

Nach dieser Arbeitsweise konnte Isocitronensäure in verschiedenen Pflanzenextrakten identifiziert werden.

SUMMARY

A paper-chromatographic method is described for the detection of isocitric acid in the presence of citric acid, both as free acids, in synthetic mixtures and plant extracts. The separation is carried out by the descending technique, allowing the solvent to flow off the paper. Schleicher & Schüll paper 2043b mgl 18 × 58 cm, and the monophasic solvent isoamyl alcohol-chloroform-85% formic acid (4:1:1 v/v/v), saturated with water, were used.

With this method, isocitric acid could be identified in various plant extracts.

LITERATUR

- ¹ R. POHLOUDEK-FABINI, H. WOLLMANN UND P. MÜNCHOW, *Planta medica*, 7 (1959) 24.
- ² E. K. NELSON, *J. Am. Chem. Soc.*, 47 (1925) 568.
- ³ G. W. FUCHER, M. D. ABRAHAMS UND H. B. VICKERY, *J. Biol. Chem.*, 172 (1948) 579.
- ⁴ C. E. FROHMANN, J. M. ORTEN UND A. H. SMITH, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 277.
- ⁵ R. E. STUTZ UND R. H. BURRIS, *Plant. Physiol.*, 26 (1951) 226.
- ⁶ W. A. BULEN, J. E. VARNER UND R. C. BURRELL, *Anal. Chem.*, 24 (1952) 187.

- ⁷ V. ZBINOVSKY UND R. H. BURRIS, *Anal. Chem.*, 26 (1954) 208.
- ⁸ H. A. KREBS UND L. V. EGGLESTON, *Biochem. J.*, 38 (1944) 426; zit. nach J. WOLF in K. PAECH UND M. V. TRACEY, *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse*, Bd. II, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1955, S. 520 und 521.
- ⁹ CH. A. HARGREAVES, M. D. ABRAHAMS UND H. B. VICKERY, *Anal. Chem.*, 23 (1951) 467.
- ¹⁰ S. L. RANSON, in K. PAECH UND M. V. TRACEY, *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse*, Bd. II, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1955, S. 556.
- ¹¹ L. E. BENTLEY, *Ph. D. Thesis, London, May 1953*, zit. nach S. L. RANSON, in K. PAECH UND M. V. TRACEY, *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse*, Bd. II, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1955, S. 546.
- ¹² R. W. SCOTT, *Anal. Chem.*, 27 (1955) 367.
- ¹³ R. POHLOUDEK-FABINI UND H. WOLLMANN, unveröffentlicht.
- ¹⁴ M. L. BUCH, R. MONTGOMERY UND W. L. PORTER, *Anal. Chem.*, 24 (1952) 489.
- ¹⁵ K. SCHREIER UND W. HACK, *Naturwiss.*, 43 (1956) 178.
- ¹⁶ G. W. PUCHER UND H. B. VICKERY, *J. Biol. Chem.*, 145 (1942) 525.
- ¹⁷ H. SCHWEPPE, *Dissertation*, Münster 1954.
- ¹⁸ F. SMITH UND D. SPRIESTERSBACH, *Nature*, 174 (1954) 466.

Eingegangen den 9. Januar 1959