

PAPIERCHROMATOGRAPHISCHER NACHWEIS VON AMINOSÄUREN MIT DEHYDROASCORBINSÄURE

R. POHLOUDEK-FABINI UND W. FÜRTIG

Pharmazeutisches Institut der Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Greifswald (Deutschland)

(Eingegangen den 31. Mai 1963)

In Zusammenhang mit präparativen und analytischen Arbeiten über die Dehydroascorbinsäure fanden wir in der Literatur einige Hinweise über ihre Reaktivität auf Amine und Aminosäuren. ABDERHALDEN¹ erkannte bei verschiedenen Aminosäuren nach Zusatz von Ascorbinsäurelösung schwache Farbveränderungen, die sich bei Zugabe älterer Lösungen verstärkten. Vor allem Histidin zeigte nach kurzer Zeit eine rötlich violette Färbung; aber auch Alanin oder Phenylalanin wiesen nach bestimmten Zeiten charakteristische Veränderungen auf. PECHERER² beobachtete ebenfalls bei einer Reihe von Aminosäuren nach Zusatz der von ihm dargestellten Dehydroascorbinsäure eine Farbveränderung nach Rot, die besonders beim Erhitzen auftrat.

Wir haben diese bisher kaum beachtete Reaktion aufgegriffen und versucht, sie auf das Papier zu übertragen. Die notwendige Dehydroascorbinsäure als Reinstanz wurde nach einem eigenen Verfahren aus Ascorbinsäure durch Oxydation mit Selendioxyd hergestellt³. Wir verteilten zunächst 20 Aminosäuren auf dem Papier und besprühten mit Dehydroascorbinsäurelösungen verschiedener Zusammensetzung und zum Vergleich auch mit Ninhydrinreagens. Mit Dehydroascorbinsäure erhält man nach Erwärmen auf 100° rosarote Flecke unterschiedlicher Farbtiefe, die gut begrenzt erscheinen. Nicht erkennbar waren Oxyprolin und Prolin, während Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan nur schwache Reaktionen gaben (Tabelle I).

Um die Empfindlichkeitsgrenze des Aminosäurenachweises mit Dehydroascorbinsäure kennenzulernen, wurden Verdünnungsreihen von 0.2 bis 50 µg Aminosäure papierchromatographisch verteilt und mit Dehydroascorbinsäure sichtbar gemacht (Tabelle II). Dabei zeigte sich, dass Oxyprolin und Prolin auch nachweisbar sind, sich aber nur sehr schwach anfärben, die Grenze liegt bei 25 µg. Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan können bis etwa 10 µg und alle übrigen Aminosäuren bis herab zu etwa 2 µg identifiziert werden.

Die typische Rosafärbung des Aminosäurefleckes nach dem Erwärmen setzt das Vorhandensein einer bestimmten Dehydroascorbinsäurekonzentration voraus. Papierchromatographisch verteilte Aminosäuren wurden mit Dehydroascorbinsäurelösungen verschiedener Konzentration behandelt (Tabelle III). Eine Rosafärbung tritt erst bei einer Konzentration von 0.05 % Dehydroascorbinsäure auf, während die 1 %ige Lösung sehr farbtiefe Flecke gibt. Nach unseren Erfahrungen dürfte die 0.5 %ige Dehydroascorbinsäurelösung zur Erkennung von Aminosäuren auf dem Papier ausreichend sein. Die Erhitzungszeiten (5 Min.) müssen ebenso wie die Temperaturen (100°) möglichst konstant gehalten werden, da längeres Erwärmen oder Steigerung der Temperatur die Flecke graubraun verfärben.

TABELLE I

FARBREAKTIONEN EINIGER AMINOSÄUREN MIT DEHYDROASCORBINSÄURE
IM VERGLEICH MIT NINHYDRIN

| Nr. | Aminosäure | Sprühreagens | | | Ninhydrin |
|-----|-------------------------|---------------|---------------|---------------|-----------------|
| | | A | B | C | |
| 1 | Alanin | rosa rot | rosa-rot | rosa-rot | violett |
| 2 | Asparagin | rosa-rot | rosa-rot | rosa-rot | violett |
| 3 | Asparaginsäure | rosa-rot | rosa-rot | rosa-rot | violett |
| 4 | Cystin | bräunlich-rot | bräunlich-rot | bräunlich-rot | violett |
| 5 | Glutaminsäure | rosa-rot | rosa-rot | rosa-rot | violett |
| 6 | Glykokoll | rosa-rot | rosa-rot | rosa-rot | violett |
| 7 | Histidin | violett-rot | violett-rot | violett-rot | violett |
| 8 | <i>d,l</i> -Homocystein | rosa-rot | rosa-rot | rosa-rot | violett |
| 9 | Lysin | rosa-rot | rosa-rot | rosa-rot | violett |
| 10 | Leucin | rosa-rot | rosa-rot | rosa-rot | violett |
| 11 | Isoleucin | rosa-rot | rosa-rot | rosa-rot | violett |
| 12 | <i>d,l</i> -Methionin | rosa-rot | rosa-rot | rosa-rot | violett |
| 13 | Oxyprolin | — | — | — | schwach gelb |
| 14 | Phenylalanin | schwach rosa | schwach rosa | schwach rosa | violett |
| 15 | Prolin | — | — | — | schwach gelb |
| 16 | Serin | rosa | rosa | rosa | violett |
| 17 | Threonin | rosa-rot | rosa-rot | rosa-rot | violett |
| 18 | Tyrosin | schwach rosa | schwach rosa | schwach rosa | — |
| 19 | Tryptophan | schwach rosa | schwach rosa | schwach rosa | schwach violett |
| 20 | Valin | rosa-rot | rosa-rot | rosa-rot | violett |

TABELLE II

EMPFINDLICHKEITSGRENZEN DES AMINOSÄURENACHWEISES MITTELS DEHYDROASCORBINSÄURE

| Nr. | Aminosäure | Erkennbar ab µg | Farbton |
|-----|-------------------------|--------------------|--------------------------|
| 1 | Alanin | 2 | rosa |
| 2 | Asparagin | 3 | rosa |
| 3 | Asparaginsäure | 2 | rosa |
| 4 | Cystin | 2 | bräunlich-rot |
| 5 | Glutaminsäure | 1 | rosa-rot |
| 6 | Glykokoll | 2 | rosa-rot |
| 7 | Histidin | 2 | violett-rot |
| 8 | <i>d,l</i> -Homocystein | 3 | rosa |
| 9 | Lysin | 3 | rosa |
| 10 | Leucin | 2 | rosa |
| 11 | Isoleucin | 3 | rosa |
| 12 | <i>d,l</i> -Methionin | 2 | rosa |
| 13 | Oxyprolin | 25 | schwach violett- blau |
| 14 | Phenylalanin | 10 | schwach rosa |
| 15 | Prolin | 25 | schwach gelb |
| 16 | Serin | 2 | rosa |
| 17 | Threonin | 3 | rosa |
| 18 | Tyrosin | 10 | schwach rosa |
| 19 | Tryptophan | 10 | schwach rosa |
| 20 | Valin | 2 | rosa |

TABELLE III

FARBILDUNG IN ABHÄNGIGKEIT VON DER DEHYDROASCORBINSÄUREKONZENTRATION

| Dehydroascorbin- säurelösung (%) | Farbton | Dehydroascorbin- säurelösung (%) | Farbton |
|-------------------------------------|------------------------|-------------------------------------|--------------|
| 0.001 | schwach bräunlich-gelb | 0.05 | schwach rosa |
| 0.002 | schwach bräunlich-gelb | 0.1 | rosa |
| 0.005 | schwach bräunlich-gelb | 0.2 | rosa |
| 0.01 | schwach bräunlich-gelb | 0.5 | rosa |
| 0.02 | schwach bräunlich-gelb | 1.0 | rot |

Unter Einhaltung der beschriebenen Versuchsbedingungen ist die Dehydroascorbinsäure jedenfalls recht gut zur Identifizierung von Aminosäuren auf dem Papier geeignet. Wie am Beispiel eines Originalchromatogramms zu ersehen ist, kann man Glykokoll nach papierchromatographischer Verteilung im Bereich von 1 bis 50 μg deutlich sichtbar machen (Fig. 1).

Einer quantitativen Auswertung der Chromatogramme stehen zunächst Hemmnisse im Wege. Die rosa Farbverbindungen lassen sich zwar mit Wasser aus dem Papier herauslösen, sind aber sehr instabil und liefern demzufolge keine befriedigend reproduzierbaren Werte. Auch das zur Stabilisierung der Ninhydrinflecke verwendete Kupferreagens nach KAWERAU UND WIELAND⁴ führte zu keinem sichtbaren Erfolg.

Die Farbreaktion dürfte ähnlich verlaufen, wie die Umsetzung zwischen Ninhydrin und Aminosäuren; Alanin spaltete neben Ammoniak noch Kohlendioxyd und Acetaldehyd ab². Untersuchungen über den möglichen Reaktionsablauf zwischen Dehydroascorbinsäure und Aminosäuren sind im Gange.

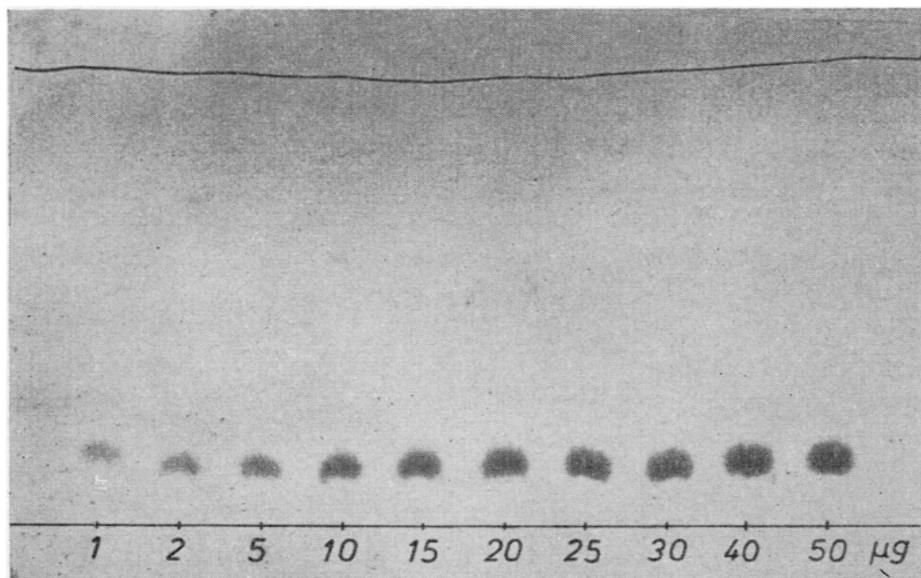


Fig. 1. Glykokollnachweis mit Dehydroascorbinsäure.

VERSUCHSTEIL

1. Nachweis der Aminosäuren mit Dehydroascorbinsäure

(a) *Sprühreagentien*. Reagenzlösung A: 0.1 g Dehydroascorbinsäure wurden in 5 ml etwa 60° warmem Wasser gelöst und mit Butanol zu 100 ml aufgefüllt.

Reagenslösung B: 0.5 g Dehydroascorbinsäure wurden wie bei A gelöst.

Reagenslösung C: 0.5 g Dehydroascorbinsäure wurden in 5 ml etwa 60° warmem Wasser gelöst, mit 10 ml Essigsäure gemischt und schliesslich mit Butanol zu 100 ml aufgefüllt.

Ninhydrinreagens nach CRAMER⁵: 0.2 g Ninhydrin wurden in 95 ml Butanol gelöst und mit 5 ml 2 N Essigsäure vermischt.

(b) *Arbeitsweise.* Jeweils 10 mg der Aminosäuren wurden in 5 ml Wasser gelöst; Cystin und Tyrosin wurden in einer Mischung aus 3 ml Wasser und 2 ml Äthanol und 1 Tropfen 25 %iger Salzsäure gelöst.

Auf 4 verschiedenen Papierbogen 23.5 × 28 cm (Schleicher & Schüll 2043 bM) wurden jeweils 10 µl (= 20 µg) der Aminosäurelösungen aufgetragen und an der Luft getrocknet. Nach 12stündiger Sättigungszeit wurde mit dem Gemisch Butanol-Essigsäure-Wasser (4:1:1) (V/V/V) aufsteigend nach der Zylindermethode chromatographiert. Die getrockneten Chromatogramme, d.h. die 4 Proben von jeder Aminosäure, wurden mit den Reagenslösungen A bis C bzw. mit dem Ninhydrinreagens besprüht. Die mit Reagenslösung A bis C behandelten Chromatogramme wurden in einem auf 100° vorgeheizten Trockenschrank 5 Min. getrocknet, die mit Ninhydrinreagens behandelten 5 Min. bei 70° getrocknet (Tabelle I).

2. Empfindlichkeit des Aminosäurenachweises mit Dehydroascorbinsäure

Verdünnungsreihen von 0.2, 0.5, 1, 2, 3, 5, 10, 25 und 50 µg der geprüften Aminosäuren (Tab. I) wurden unter gleichen Versuchsbedingungen (1b) chromatographiert, anschliessend mit Reagenslösung A (1a) besprüht und 5 Min. bei 100° getrocknet (Tab. II).

3. Ermittlung der Dehydroascorbinsäurekonzentration zum Nachweis der Aminosäuren

Auf verschiedenen Papierbogen 23.5 × 28 cm (Schleicher & Schüll 2043 bM) wurden jeweils 25 µg der Aminosäuren (Alanin, Asparagin, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Glykokoll, Lysin, Leucin, *d,l*-Methionin, Serin und Valin) nebeneinander aufgetragen und nach 12stündiger Sättigungszeit mit dem Gemisch Butanol-Essigsäure-Wasser (4:1:1) (V/V/V) aufsteigend nach der Zylindermethode chromatographiert. Nach dem Trocknen wurde mit Dehydroascorbinsäurelösungen verschiedener Konzentrationen besprüht und 5 Min. bei 100° getrocknet (Tabelle III).

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird über eine Farbreaktion zum papierchromatographischen Nachweis von Aminosäuren mit Dehydroascorbinsäure berichtet. Aminosäuremengen bis herab zu 2 µg sind als rosarote Flecke erkennbar.

SUMMARY

A colour reaction is described for the detection of amino acids on paper chromatograms by means of dehydroascorbic acid. Amounts of amino acids down to 2 µg appear as pink-red spots.

LITERATUR

- ¹ E. ABDERHALDEN, *Fermentforschung*, 15 (1936) 285.
- ² B. PECHERER, *J. Am. Chem. Soc.*, 73 (1951) 3827.
- ³ R. POHLOUDEK-FABINI UND W. FÜRTIG, *Arch. Pharm.*, 292 (1959) 350.
- ⁴ E. KAWERAU UND T. WIELAND, *Nature*, 168 (1951) 77; zitiert nach I. HAIS UND K. MACEK, *Handbuch der Papierchromatographie*, Band I, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1958.
- ⁵ F. CRAMER, *Papierchromatographie*, 3. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr., 3, 1954, S. 55.