Über die Bestimmung von Purin-5'-Nucleotiden mit Carbazol

Autor(en): **Solms, J.**

Objekttyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **55 (1964)**

Heft 2

PDF erstellt am: **25.05.2024**

Persistenter Link: https://doi.org/10.5169/seals-982384

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.
Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.
Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Ein Dienst der *ETH-Bibliothek*
ETH Zürich, Rämistrasse 101, 8092 Zürich, Schweiz, www.library.ethz.ch

http://www.e-periodica.ch

MITTEILUNGEN
AUS DEM GEBIETE DER
LEBENSMITTELUNTERSUCHUNG UND HYGIENE
VERÖFFENTLICHT VOM EIDG. GESUNDHEITSAMT IN BERN
Offizielles Organ der Schweizerischen Gesellschaft für analytische und angewandte Chemie

TRAVAUX DE CHIMIE ALIMENTAIRE
ET D'HYGIÈNE
PUBLIÉS PAR LE SERVICE FÉDÉRAL DE L'HYGIÈNE PUBLIQUE À BERNE
Organe officiel de la Société suisse de chimie analytique et appliquée

ABONNEMENT:
Schweiz Fr. 19.— per Jahrgang (Ausland Fr. 24.—) Preis einzelner Hefte Fr. 3.50 (Ausland Fr. 4.50)
Suisse fr. 19.— par année (étranger fr. 24.—) Prix des fascicules fr. 3.50 (étranger fr. 4.50)

BAND – VOL. 55 1964 HEFT – FASC. 2

Über die Bestimmung von Purin-5'-Nucleotiden mit Carbazol

Von *J. Solms*

(Forschungslaboratorien für Nestlé-Produkte, Vevey)

1. Einführung

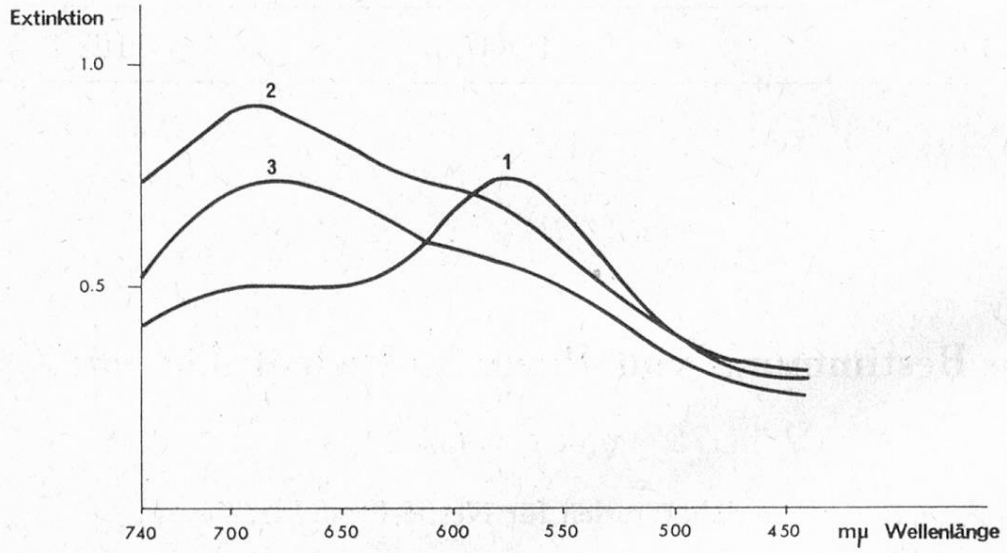
Purin-5'-Nucleotide sind von steigender Bedeutung als Geschmacksträger in Lebensmitteln (1, 13). 5'-IMP ist ein wichtiger Bestandteil in Fisch und Fleisch (2, 3, 4), 5'-GMP ein solcher in Speisepilzen (3, 5). Der Nachweis dieser Verbindungen bereitet analytisch keine Schwierigkeiten, benötigt aber meistens zur genauen Abklärung der Struktur, insbesondere der Stellung der Phosphatgruppe, eine Kombination von Kolonnenchromatographie, UV-Spektrophotometrie und Papier-

---

In der vorliegenden Arbeit werden die folgenden Abkürzungen verwendet:

5'-AMP	Adenosin-5'-phosphorsäure	5'-UMP	Uridin-5'-phosphorsäure
2'3'-AMP	Adenosin-2'3'-phosphorsäure	2'3'-UMP	Uridin-2'3'-phosphorsäure
5'-IMP	Inosin-5'-phosphorsäure	5'-CMP	Cytidin-5'-phosphorsäure
5'-GMP	Guanosin-5'-phosphorsäure	2'3'-CMP	Cytidin-2'3'-phosphorsäure
2'3'-GMP	Guanosin-2'3'-phosphorsäure	5'-XMP	Xanthosin-5'-phosphorsäure

elektrophorese (6, 7). Im folgenden soll eine einfache kolorimetrische Nachweismethode beschrieben werden, welche die analytische Arbeit bedeutend vereinfacht. Sie stützt sich auf die bekannte Reaktion von Pentose-5'-Phosphaten mit Carbazol (8). Es wird gezeigt, daß diese Methode für eine spezifische, quantitative Bestimmung von Purin-5'-Nucleotiden angewendet werden kann. Ähnlich den bekannten Nachweismethoden für Hexosen, Pentosen, Uronsäuren usw. (9, 10, 11, 12) beruht die Reaktion auf einer Dehydratation des Nucleotid-Zuckers in konzentrierter Schwefelsäure in Gegenwart von Carbazol. Es wird angenommen, daß sich dabei eine Intermediärverbindung mit Furfurol-Struktur bildet, die mit Carbazol zu einem Farbstoff reagiert. Dabei bilden Purin-5'-Nucleotide einen Farbstoff mit einem Absorptionsmaximum bei 685 mμ. Es werden die optimalen Reaktionsbedingungen ermittelt. Es ist bekannt, daß SH-Verbindungen wie Glutathion und Cystein die Reaktion stören (8).



Figur 1

Spektren der Carbazolreaktion von 5'-AMP

1 H_2SO_4 konz. Merck; 5'AMP 0,96 μMol
2 H_2SO_4 konz. Merck + 0,5 % $FeSO_4$; 5'AMP 0,96 μMol
3 H_2SO_4 konz., rauchend, Siegfried; 5'AMP 0,96 μMol

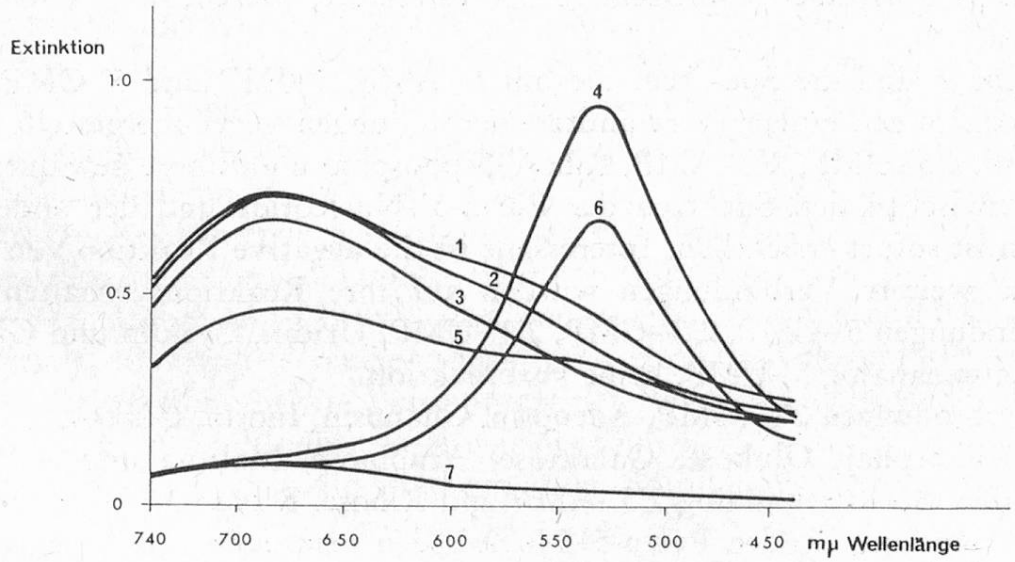
2. Experimenteller Teil

Für die Versuche wurden die folgenden Reagenzien verwendet: Carbazol sublimiert der Fa. FLUKA AG., Buchs; Nucleotide, Nucleoside und Zucker der Firmen FLUKA AG., California Corporation for Biochemical Research, Los Angeles, Calif., und Sigma Chemical Corp., St. Louis, Mo.; Ribonucleinsäure der Fa. C. F. Boehringer und Söhne, Mannheim; Ribonuclease, purum, der Fa. FLUKA AG.; Phosphodiesterase der Fa. Worthington Biochemical Co., Freehold, N. J.; konz.

Schwefelsäure, rein und konz. rauchende Schwefelsäure, rein, der Fa. Siegfried AG., Zofingen; konz. Schwefelsäure, rein, und Ferrosulfat der Fa. Merck AG., Darmstadt.

Für die Farbreaktion wurden in Vorversuchen die optimalen Reaktionsbedingungen ermittelt, indem die Konzentration an Schwefelsäure verschiedener Provenienz, Wasser und Alkohol in der Reaktionsmischung, die Erhitzungszeit und der Einfluß von allfälligen Zusätzen ($FeSO_4$) auf die Reaktion untersucht wurden. Aus der ganzen Versuchsserie ergaben die folgenden Bedingungen gute Resultate:

5 cm^3 Schwefelsäurereagenz (150 cm^3 konz. rauchende Schwefelsäure der Fa. Siegfried und 50 cm^3 dest. Wasser werden gemischt und gekühlt) wird in ein Reagensglas pipettiert und in Eiswasser gekühlt. Nun wird 1 cm^3 Testlösung (enthaltend 0,20–1,00 µMol Testsubstanz in wäßriger Lösung) langsam auf die Säure überschichtet. Sodann wird 1 cm^3 einer 0,1 proz. aethanolischen Carbazol-Lösung (täglich frisch herzustellen) zugegeben. Die Mischung wird rasch und gut geschüttelt und während genau 5 Minuten in einem heftig siedenden Wasserbad erhitzt. Sodann wird während 3 Minuten in Eiswasser gekühlt und sofort gemessen im Bereich von 440–740 mµ. Die Messung erfolgt gegen einen Nullwert, der kein Carbazol enthält, sonst aber gleich behandelt worden ist wie der Meßwert. Für die Messungen wurden ein Beckmann DB Spektrophotometer mit Registrierzusatz, sowie ein Beckmann DU Spektrophotometer verwendet.



Figur 2

Spektren der Carbazolreaktion

1 5'-AMP 0,96 µMol
2 5'-GMP 1,01 µMol
3 5'-IMP 0,88 µMol
4 Ribose ca. 1,0 µMol
5 Ribose-5-Phosphat ca. 1,0 µMol
6 2'3'-AMP ca. 1,0 µMol
7 5'-UMP ca. 1,0 µMol

Ähnliche Resultate ergibt die Verwendung eines modifizierten Schwefelsäure-reagenz' folgender Zusammensetzung: 1,0 g $FeSO_4 \cdot 7\,H_2O$ werden in 50 cm^3 Wasser gelöst und mit 150 cm^3 konz. reiner Schwefelsäure der Fa. Merck versetzt und gekühlt. Dieses Reagenz ergibt leicht verschobene Maxima und höhere Werte der Extinktionskurven. Es muß jeden Tag frisch hergestellt werden, kann aber trotzdem sehr gut verwendet werden.

Für den Ribonucleinsäureabbau mit Ribonuclease wurden 6 cm^3 einer 6prozentigen Ribonucleinsäurelösung mit 1 cm^3 Trispuffer (pH 7,5) und 15 cm^3 einer Enzymlösung, enthaltend 200 γ Enzym, versetzt und unter Rühren bei 45 ° C während 45 Stunden inkubiert. Dabei wurden etwa 30 % Mononucleotide freigesetzt.

Für den Ribonucleinsäureabbau mit Phosphodiesterase wurden 1,0 mg Enzym in 15 cm^3 Trispuffer (pH 8,5) gelöst und mit 6 cm^3 einer 6prozentigen Ribonucleinsäurelösung versetzt. Die Mischung wurde unter Rühren bei 38 ° C während 92 Stunden inkubiert und ergab etwa 50 % freie Mononucleotide.

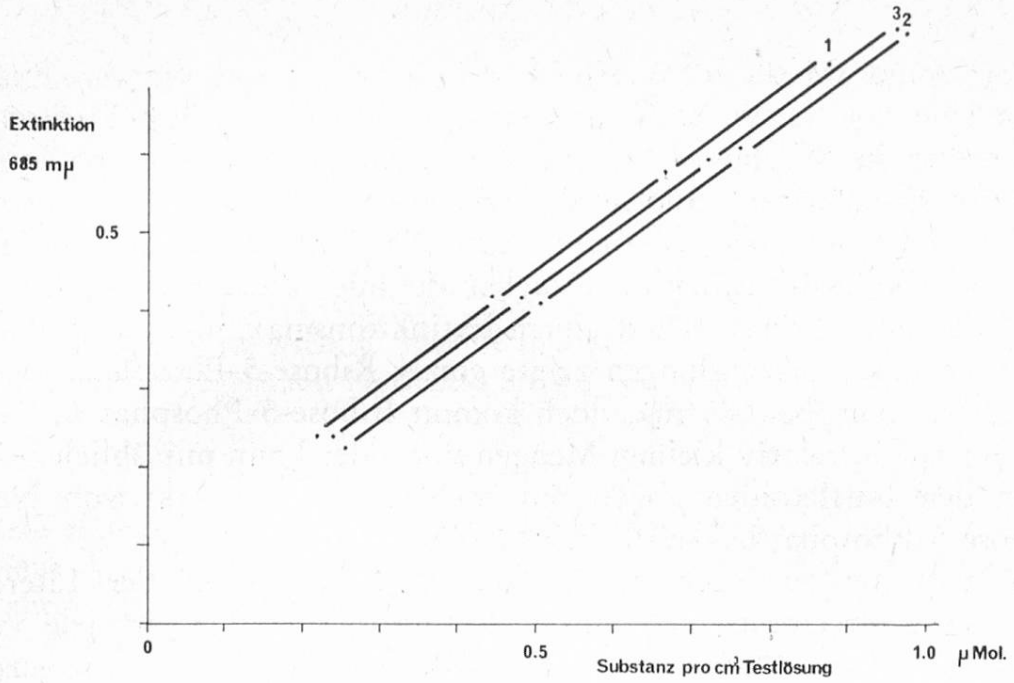
3. Ergebnisse

In Figur 1 sind die Spektren für 5'-AMP dargestellt, die bei Verwendung von Schwefelsäure verschiedener Provenienz, aber unter sonst optimalen Reaktionsbedingungen, erhalten wurden. Für die folgenden Versuche wurde vor allem 75prozentige rauchende Schwefelsäure, Siegfried, verwendet; doch kann, wo diese nicht erhältlich ist, auch 75prozentige Schwefelsäure, Merck, mit $FeSO_4$ verwendet werden.

In Figur 2 sind die Spektren, die mit 5'-AMP, 5'-IMP und 5'-GMP erhalten wurden, denjenigen einiger verwandter Verbindungen gegenübergestellt. Als Beispiele wurden 5'-UMP, 2'3'-AMP, Ribose-5-phosphat und Ribose gewählt. Der Unterschied zwischen den Spektren der Purin-5'-Nucleotide und der anderen Verbindungen ist sofort ersichtlich. Interessant ist die negative Reaktion von 5'-UMP. Zahlreiche weitere Verbindungen wurden auf ihre Reaktionsverhalten geprüft. Die Verbindungen 5'-CMP, 2'3'-CMP, 2'3'-UMP, Uridin, Cytidin und Glucuronolacton zeigten, analog 5'-UMP, keine Farbreaktion.

Die Verbindungen 2'3'-GMP, Adenosin, Guanosin, Inosin, Glukose-1-Phosphat, Glukose-6-Phosphat, Glukose, Galaktose, Arabinose, Maltose und Ribonucleinsäure ergaben Spektren analog 2'3'-AMP und Ribose. Ribose-5-phosphat ergab als einzige Verbindung ein den Purin-5'-Nucleotiden verwandtes Spektrum. 5'-XMP, das ebenfalls in die Gruppe der Geschmacksträger gehört (1), war nicht erhältlich und konnte daher nicht geprüft werden. Auf Grund seiner Struktur muß aber angenommen werden, daß es ebenfalls die Purin-5'-Nucleotid-Reaktion zeigt.

Extinktions-Konzentrations-Kurven wurden von 5'-AMP, 5'-IMP und 5'-GMP aufgenommen und sind in Figur 3 dargestellt. Sie zeigen, daß eine kolorimetrische Bestimmung dieser Nucleotide im Konzentrationsbereich von 0,1–0,75 μMol Substanz pro cm^3 Ausgangslösung möglich ist.



Figur 3

Konzentrations-Extinktions-Geraden, gemessen bei 685 mμ.

1 5'-IMP 2 5'-GMP 3 5'AMP

Die Bestimmungsmethode gestattet eine quantitative Ermittlung von Purin-5'-Nucleotiden nach einer Vorreinigung wie z. B. Adsorption an Aktivkohle, Ionenaustauscher-Chromatographie oder Papierelektrophorese, erlaubt aber auch eine direkte Bestimmung an gewissen Mischungen. In einer Handelsmischung enthaltend 92 % Na-Glutamat und 7,25 % einer Mischung von 5'-IMP und 5'-GMP konnte durch direkte Kolorimetrie ein totaler Purin-5'-Nucleotidgehalt von 7,50 % ermittelt werden. In einem Rohextrakt aus roten Blutkörperchen, der 2,35 % 5'-IMP neben 66,5 % Asche, 16 % Eiweiß und anderen Nucleosiden enthielt, konnte ein Gesamtgehalt an Purin-5'-Nucleotiden durch direkte Kolorimetrie von 2,60 % ermittelt werden. Eine direkte Bestimmung der Purin-5'-Nucleotide in Nahrungsmitteln wie z. B. in Bouillonmassen, ist nicht möglich.

Schließlich eignet sich die Methode zum Studium des enzymatischen Ribonucleinsäureabbaues durch Phosphodiesterase. Dieses Enzym setzt bekanntlich 5'-Nucleotide aus Ribonucleinsäure frei, während beim Abbau mit Säure und Base oder mit dem Enzym Ribonuclease 2'3'-Nucleotide freigesetzt werden. In Figur 4 ist das Spektrum einer Reaktionslösung von Ribonucleinsäure vor und nach dem Abbau mit 5'-Phosphodiesterase dargestellt. Der Anstieg des Spektrums bei 685 mμ zeigt die Freisetzung von Purin-5'-Nucleotiden an. Bei einem Abbau mit Säure oder Ribonuclease wurde keine Veränderung im Spektrum während der Farbreaktion festgestellt.

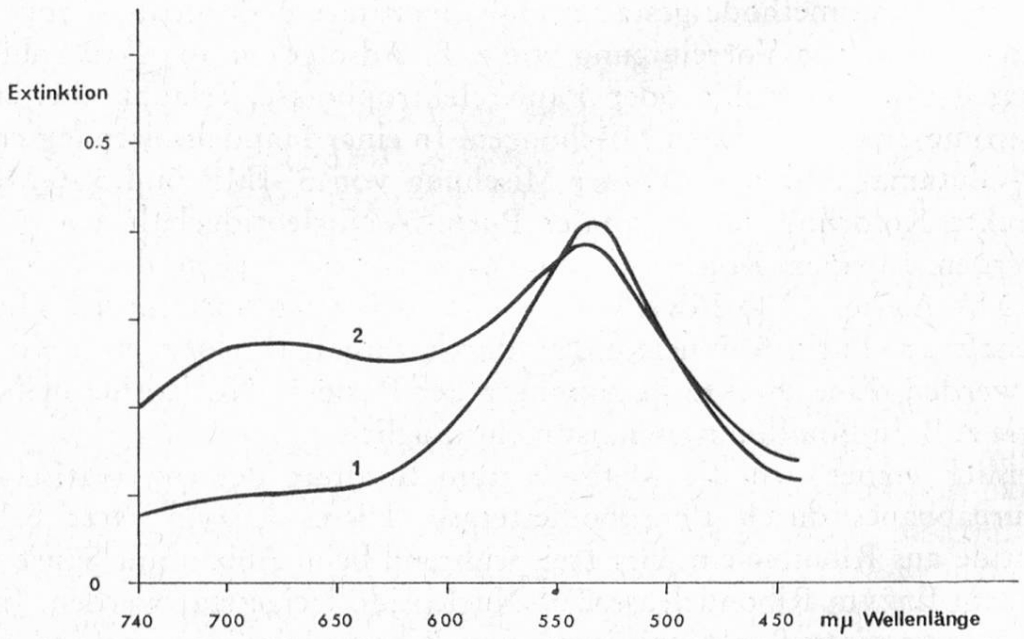
4. Diskussion

Die vorliegende Methode gestattet bei Einhaltung der optimalen Reaktionsbedingungen eine qualitative und quantitative Bestimmung von Purin-5'-Nucleotiden, entweder in Mischung mit anderen Verbindungen, oder nach einmaliger Vorreinigung. Die Purin-5'-Nucleotide ergeben einen Farbstoff mit einem Extinktionsmaximum bei 685 mμ, während Purin-2'3'-Nucleotide, Pyrimidin-2'3'-Nucleotide, Pyrimidin-5'-Nucleotide, Nucleoside und Zucker entweder gar nicht reagieren oder einen Farbstoff mit einem Extinktionsmaximum bei 530 mμ bilden. Von allen geprüften Verbindungen zeigte einzig Ribose-5-Phosphat eine Reaktion mit einem Maximum bei 685 mμ, doch kommt Ribose-5-Phosphat in vielen Nahrungsmitteln nur in relativ kleinen Mengen vor, oder kann mit üblichen Methoden leicht von den Nucleotiden abgetrennt werden. Als Artefakt von Nucleotiden spielt Ribose-5-Phosphat jedenfalls keine Rolle.

Wenn man die vorliegenden Spektren mit denjenigen der Literatur vergleicht (8), so fallen Unterschiede in den Extinktionsmaxima für viele Verbindungen auf. Diese Unterschiede können, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wird, auf die Zusammensetzung der verwendeten Schwefelsäure zurückgeführt werden.

Die Herstellung von frischen Standardkurven ist daher in jedem Falle zu empfehlen.

Für die Mitarbeit an der vorliegenden Arbeit danken wir Frl. *J. Remund* und den Herren *K. Fleury* und *J. P. Corbaz.*



Figur 4

Spektren der Carbazolreaktion einer Ribonukleinsäure-Abbaulösung

1 Ausgangslösung 2 Lösung nach partiellem Abbau mit Phosphodiesterase

Zusammenfassung

Mit der Carbazol-Reaktion können bei einer Wellenlänge von 685 mμ 5'-AMP, 5'-IMP und 5'-GMP spezifisch und quantitativ in Konzentrationen von 0,1—0,75 μMol pro cm^3 Lösung bestimmt werden. Pyrimidin-Nucleotide zeigen keine Reaktion; 2'3'- Nucleotide, Nucleoside und Zucker ergeben ein Reaktionsspektrum mit einer maximalen Extinktion bei 530 mμ. Einzig Ribose-5-Phosphat zeigt ein den Purin-5'-Nucleotiden verwandtes Reaktionsverhalten; doch kann diese Verbindung leicht von den Nucleotiden abgetrennt werden. Die Zusammensetzung der verwendeten Schwefelsäure und die genaue Einhaltung der Reaktionsbedingungen sind wichtig. Die Methode eignet sich zur spezifischen Bestimmung von Geschmacksträgern mit Nucleotid-Struktur in Nahrungsmitteln.

Résumé

Le présent travail décrit une méthode spectrophotométrique qui permet la détermination spécifique de l'adénosine-5'-phosphate, de l'inosine-5'-phosphate et du guanosine-5'-phosphate après réaction avec le Carbazole. L'utilisation de cette méthode pour la détermination de certains composés d'arome dans les aliments a été discutée.

Summary

A spectrophotometric method for the specific determination of adenosine-5'-phosphate, inosine-5'-phosphate and guanosine-5'-phosphate is described. The method ist based on the Carbazole-reaction. The application of this reaction for the determination of flavor-nucleotides in food is discussed.

Literatur

1. *Kuninaka A.:* J. Agr. Chem. Soc. Japan **34**, 489 (1960).
2. *Fujita T.* et al.: Bull. Jap. Soc. Fisheries **25**, 147, 312 (1959); **26**, 907 (1960).
3. *Nakajima N., Ichikawa K., Kamada M.* und *Fujita E.:* Agric. Biol. Chem. **25**, A 66 (1961).
4. *Batzer O. F., Santoro A. T.* und *Landmann W. A.: J.* Agric. Food Chem. **10**, 94 (1962).
5. *Kiruma S.:* Japans Food Industry, Asahi Evening News, Tokio, 1962, p. 21.
6. *Chargaff E.* und *Davidson J. N.:* The Nucleic Acids, Academic Press Inc., New York, 1955/1960.
7. *Markham R.* in *Paech K.* und *Tracey M. V.:* Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, Springer Verlag, Berlin, 1955, Vol. 4, p. 246.
8. *Dische Z.* und *Landsberg E.:* Biochim. Biophys. Acta **24**, 193 (1957).
9. *Dische Z.:* J. biol. Chem. **167**, 189 (1947).
10. *Holzman G., MacAllister R. V.* und *Niemann C.:* J. Biol. Chem. **171**, 27 (1947).
11. *Dische Z.:* J. biol. Chem. **183**, 489 (1950).
12. *Stutz E.* und *Deuel H.:* Helv. Chim. Acta **39**, 2126 (1956).
13. *Titus D. S.* und *Klis J. B.:* Food Processing **24**, 128 (1963).