

# Identifizierung von Aminosäuren und Prüfung auf Reinheit. 6. Mitteilung über Anwendung der Papierchromatographie auf lebensmittelchemische Probleme

Autor(en): **Sulser, H. / Keskin, H.**

Objektyp: **Article**

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

Band (Jahr): **45 (1954)**

Heft 4

PDF erstellt am: **13.09.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-984027>

## **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.

# Identifizierung von Aminosäuren und Prüfung auf Reinheit

## 6. Mitteilung über Anwendung der Papierchromatographie auf lebensmittelchemische Probleme

Von *H. Sulser* und *H. Keskin*

(Laboratorium des Eidg. Gesundheitsamtes, Bern)

### A. Problemstellung

Die Erkenntnis von der Lebenswichtigkeit gewisser Aminosäuren und von der physiologischen Bedeutung anderer (z.B. der Glutaminsäure) hat es mit sich gebracht, dass Eiweisshydrolysate, gereinigte Aminosäurengemische und schliesslich reine Aminosäuren immer mehr als Lebensmittelzusätze Verwendung finden. Je nach dem Verwendungszweck kommt der Reinheit dieser Substanzen eine beträchtliche Bedeutung zu. Daraus ergibt sich auch die Notwendigkeit, einfache, in der Praxis leicht ausführbare Methoden zur Identifizierung solcher Präparate und Prüfung auf ihre Reinheit zur Verfügung zu haben.

Im allgemeinen wird zur Identifizierung einer Substanz und gleichzeitig zur Prüfung auf Reinheit der Schmelzpunkt herangezogen. Das Präparat muss so lange gereinigt werden, bis diese Grösse konstant bleibt. Um die Identifizierung noch sicherer zu gestalten, führt man einen Mischschmelzpunkt mit der vermuteten Substanz aus.

Nun ist aber die Bestimmung des Schmelzpunktes gerade zur Identifizierung der Aminosäuren wenig geeignet, da sie in der Regel über 200° schmelzen, sich aber auch zwischen 200 und 300° zersetzen und dementsprechend keinen richtigen Schmelzpunkt zeigen. Deshalb streuen eventuelle Angaben in der Literatur für manche Säuren beträchtlich <sup>1)2)3)</sup>. Der Schmelzpunkt in verschlossenen Röhrchen kann von dem in offenen verschieden sein. Immerhin ist es unter Benutzung von Testsubstanzen mittels Mischschmelzpunkt und eventuell auf dem heizbaren Mikroskop nach *Kofler* in gewissen Fällen möglich, die Identität einer Aminosäure festzustellen.

Auch durch Messung anderer physikalischer Konstanten wie Löslichkeit, pH, spezifische Drehung kann unter bestimmten Voraussetzungen das erwähnte Ziel erreicht werden. Diese Methoden sind aber aus verschiedenen Gründen unsicher und ungenau.

In den meisten Fällen müssen daher die üblichen chemischen Methoden herangezogen werden. Zur Identifizierung ist die Ausführung eines Trennungsganges mit anschliessenden Nachweisreaktionen bzw. Herstellung von Derivaten notwendig. Vom Derivat kann der Schmelzpunkt oder eine andere physikalische Grösse zuverlässiger bestimmt werden. Zur Reinheitsprüfung werden üblicher-

weise quantitative Analysen und Aufstellung von Bilanzen herangezogen. Beispielsweise bestimmt man einerseits den Gesamtstickstoff, andererseits den Amino- oder Carboxylstickstoff und bildet die Stickstoffbilanz. Diese Bestimmungen erfordern aber oftmals einen erheblichen Zeitaufwand und Spezialapparaturen. Hier kann nun in der Praxis die Papierchromatographie wertvolle Dienste leisten.

Während es zur Identifizierung einer Substanz mittels des Schmelzpunktes oder einer andern physikalischen Grösse wie auch für die Herstellung von Derivaten oder Ausführung von Nachweisreaktionen notwendig ist, dass ein Präparat möglichst rein sei, bleibt der chromatographische Rf-Wert meist unabhängig von anwesenden Begleitstoffen, falls sie keine grobe Störung der Entwicklung verursachen, wie es etwa bei Anwesenheit von mehrwertigen anorganischen Kationen oft der Fall ist. Infolge des chromatographischen Trennungsvorganges auf dem Papier besteht die Möglichkeit, eine Verbindung in einem Gemisch anderer Stoffe mittels der Farbreaktion und des Rf-Wertes zu identifizieren. Der Nachweis kann noch erheblich sicherer gestaltet werden, wenn man eine Probe der vermuteten Substanz mitlaufen lässt bzw. sie vor der Chromatographie zusetzt und sieht, ob beide Flecken dieselbe Position einnehmen, etwa in Analogie zur Ausführung eines Mischschmelzpunktes. Hier sei auf die 5. Mitteilung<sup>4)</sup>, z. B. Chromatogramm 6, hingewiesen. Da die Methode ausserdem sehr empfindlich ist, gibt sie noch zuverlässige Resultate mit Mengen, die in anderer Art nicht mehr erfasst werden können.

Umgekehrt erweist sich die chromatographische Methode auch geeignet, Art und Menge von Begleitstoffen (Verunreinigungen) festzustellen bzw. zu bestimmen, und um sich ein Bild über den Reinheitsgrad eines Präparates zu machen, wieder vorausgesetzt, dass die Verunreinigungen keine erheblichen Störungen hervorrufen und mit dem verwendeten Farbreagens sichtbar werden. Die Papierchromatographie ist besonders geeignet, um eine Substanz auf ihre Einheitlichkeit zu prüfen, und es lassen sich so oft Beimischungen feststellen, welche andern Methoden entgehen, gerade wenn es sich um eine kleine Menge in einem grösseren Überschuss einer Hauptkomponente handelt. So konnten z. B. papierchromatographisch noch 0,02 % Saccharose in Raffinose aufgefunden werden. Ferner stellte man bei der Untersuchung von rohem Rübenzucker einen Gehalt von durchschnittlich 0,28 % Raffinose fest. Dadurch konnten öfters festgestellte Widersprüche der gemessenen Polarisation eine Erklärung finden<sup>5)</sup>. Auch bei synthetischen Arbeiten aller Art ist es vorteilhaft, die Reinheit der Präparate im Papierchromatogramm prüfen zu können<sup>6)7)</sup>. Auch *Clegg*<sup>8)</sup> erwähnt die Reinheitsprüfung mit dieser Methode.

Zum Sichtbarmachen bedient man sich im Fall der Aminosäuren in erster Linie des Ninhydrins. Alle  $\alpha$ -Aminosäuren, mit einziger Ausnahme der  $\alpha$ -Aminobuttersäure, ferner Peptide, Amine, Aminalkohole und andere stickstoffhaltige Verbindungen ergeben eine positive Reaktion. Die Farbe der Flecken ist sofort nach der Entwicklung, je nach der Aminosäure, violett, blau, grün oder rotbraun und geht dann einheitlich in violett über. Die Beobachtung dieser Farbschattie-



rungen erlaubt damit eine rasche Orientierung in Bezug auf die Art der Säuren. Die Iminosäuren Prolin und Oxyprolin ergeben leuchtend gelbe bzw. orange Flecken. Das Reagens erfasst also eine grosse Gruppe von stickstoffhaltigen Verbindungen und erscheint daher zur Reinheitsprüfung in Bezug auf solche Beimengungen als sehr geeignet. Erweist sich eine Aminosäure dabei als einheitlich, so ist aber trotzdem nicht gesagt, dass sie 100%ig rein sei. Es müssen je nach dem Zweck, den man verfolgt, noch andere Reaktionen zum Sichtbarmachen von Fremdstoffen herangezogen werden.

Zum Ausfindigmachen eines geeigneten Lösungsmittels für die Papierchromatographie der Aminosäuren, das gleichzeitig auch zur Abtrennung und Bestimmung des Äthanolamins in Phosphatidhydrolysaten, vgl. 5. Mitteilung <sup>4)</sup> geeignet sein sollte, führten wir zahlreiche Versuche aus. Phenol, Collidin, Butanol-Eisessig u. a., welche oft verwendet werden, befriedigten nicht recht. Schliesslich gelang es, in einer Mischung von n-Butanol-Äthanol-Wasser von bestimmter Zusammensetzung (vgl. nächster Abschnitt) eine Entwicklungsflüssigkeit zu finden, welche allen Anforderungen genügte. Der Literatur ist zu entnehmen, dass sie in der Papierchromatographie noch nicht verwendet wurde. Sie besitzt folgende Vorteile:

1. Die Aminosäuren, wie auch das Äthanolamin, wandern ohne Streifen- oder Schwanzbildung. Die Flecken sind meist kompakt und rund, nur in wenigen Fällen oval oder länglich. Demgegenüber treten beispielsweise mit Phenol als Entwickler folgende Deformationen der Flecken <sup>9)</sup> auf:

*Tabelle 1*

Aminosäure	Form der Flecken
Asparagin- und Glutaminsäure	meist hufeisenförmig, Enden nach oben gekrümmt
Tyrosin, Lysin, Histidin Leucin, Norleucin, Phenylalanin, Norvalin u. a.	meist langgezogen, schmal weit ausgezogen, verwaschen

2. Die Rf-Werte für die verschiedenen Aminosäuren streuen genügend, um auch bei relativ kurzer Laufzeit (Zylindermethode) ausreichende Trennungen zu gewährleisten. Speziell wichtig für unsere Probleme ist die gute Trennung von Serin und Äthanolamin (5. Mitteilung).
3. Die Wanderungsgeschwindigkeit erweist sich grösser als beispielsweise bei Phenol und Collidin. Das Lösungsmittel lässt sich nach dem Entwickeln auch viel leichter aus dem Papier entfernen als diese.

4. Die Mischung kann sofort und ohne besondere Reinigung aus den im Handel erhältlichen Lösungsmitteln hergestellt werden.
5. Die Möglichkeit besteht, das Ninhydrin direkt in der Entwicklungsflüssigkeit aufzulösen.

Im Folgenden beschreiben wir einige Resultate bei der Anwendung zur Chromatographie und Reinheitsprüfung von Aminosäurepräparaten.

## B. Ausführung der Papierchromatogramme

*Tabelle 2*

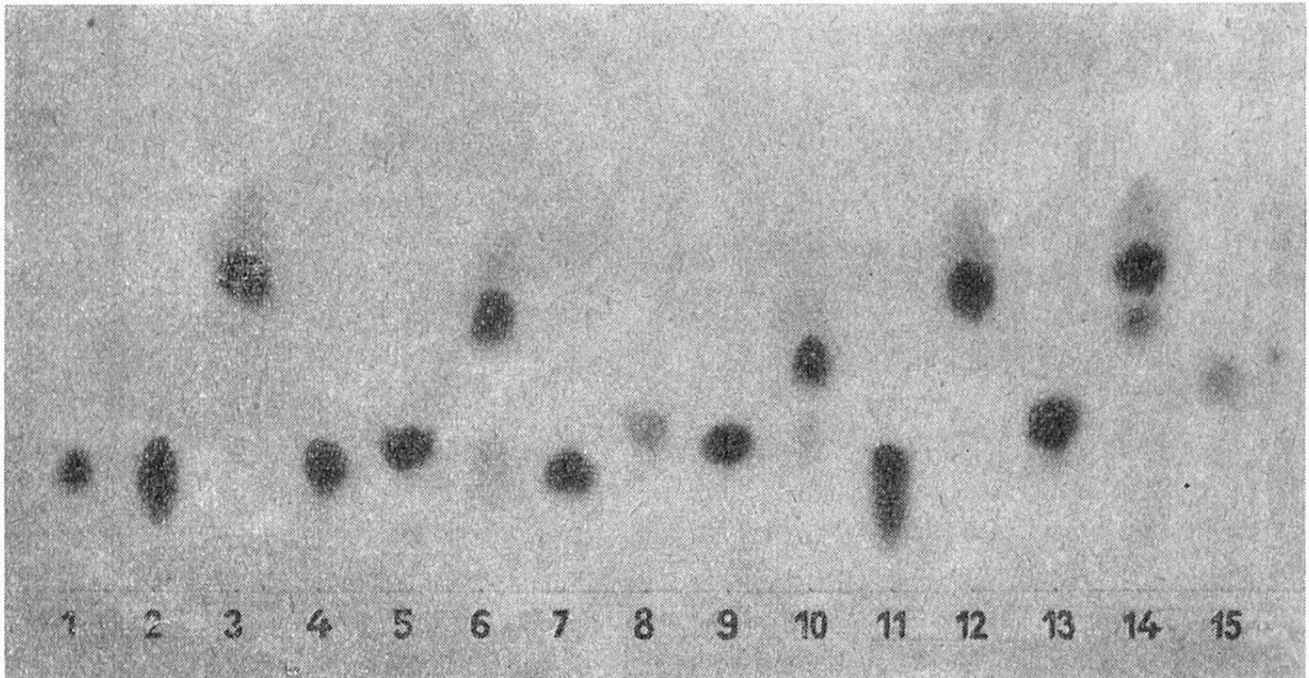
Reihenfolge	Art des Vorgehens	Ausführung
a	Vorbereitung der Proben	Herstellung von ca. 1%igen wässrigen Lösungen
b	Ausführungsform der Papierchromatographie	aufsteigendes Lösungsmittel (Zylindermethode)
c	Papiermaterial	Whatman Nr. 1
d	Substanzmenge	je 20—30 $\gamma$ Aminosäure in 2—3 $\mu$ l *)
e	Lösungsmittel	n-Butanol-Äthanol (abs.)-Wasser = 80 — 25,5 — 60 Vol.‰: 48,4 — 15,4 — 36,2
f	Entwicklungszeit	5—6 Stunden
g	Steighöhe	ca. 20 cm
h	Trocknen der Papiere	ca. 40 Minuten bei Zimmertemperatur
i	Reagens zum Sichtbarmachen **)	Ninhydrin in Äthylalkohol (0,2 ‰)
k	Sichtbarmachen	Besprühen, 5 Minuten in Trockenschrank (80—90° C)
l	Haltbarkeit der Chromatogramme	1—2 Tage, beste Kontraste nach ca. 6 Stunden

\* 20—30 mg der Aminosäuren wurden in 2—3 ml Wasser aufgelöst.

\*\* Kann auch direkt in der Entwicklungsflüssigkeit aufgelöst werden.

## C. Resultate

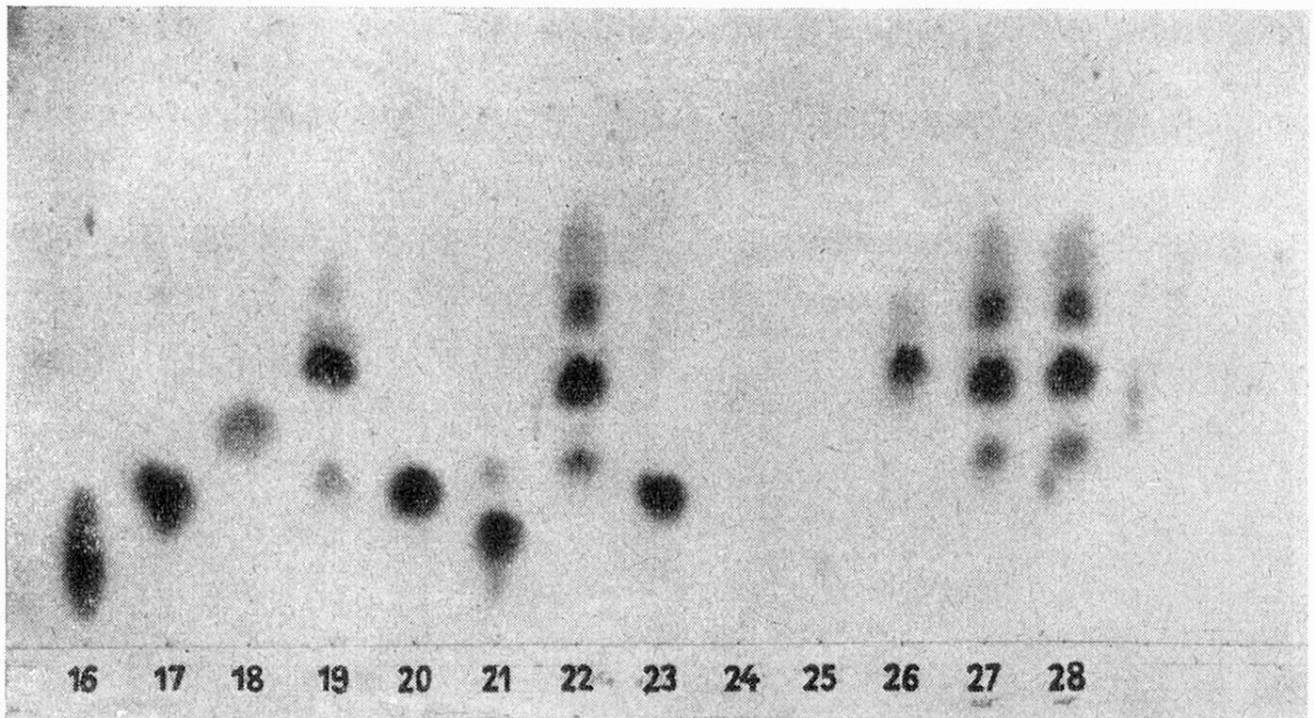
### 1. Untersuchung verschiedener Aminosäurepräparate des Handels auf Einheitlichkeit



Chromatogramm 1

Nr.	Aminosäure	Einheitlichkeit	Rf-Werte	Farbton
1	l-Asparagin	einheitlich	0,20	braungelb
2	l(+)-Glutaminsäure	einheitlich	0,25 — 0,16	purpur
3	l(-)-Leucin	einheitlich	0,53	purpur
4	l-Histidin	einheitlich	0,22	braun
5	D(-)-Alanin	einheitlich	0,25	purpur
6	l-Phenylalanin	einheitlich	0,46	graubraun
7	Glycocoll	einheitlich	0,20	rosarot
8	l-Prolin	einheitlich	0,27	gelb
9	d-Alanin	einheitlich	0,25	purpur
10	l(-)-Tryptophan	einheitlich	0,39	gelbbraun
11	d-Arginin	einheitlich	0,25 — 0,12	blaurot
12	d(+)-Leucin	einheitlich	0,51	purpur
13	DL-Alanin	einheitlich	0,29	purpur
14	l-Leucin	2 Flecken	0,54	purpur
15	DL-Prolin	einheitlich	0,35	gelb





Chromatogramm 2

Nr.	Aminosäure	Einheitlichkeit	Rf-Werte	Farbton
16	d-Lysin-dihydrochlorid	einheitlich	0,23 — 0,08	purpur
17	Glycocoll, altes Präparat	einheitlich	0,24	rosarot
18	Äthanolaminchlorid	einheitlich	0,34	braunviolett
19	dl-Methionin, altes Pröp.	2 Flecken	0,43 — 0,26	purpur
20	dl-Serin	einheitlich	0,24	braunrot
21	l-Asparaginsäure	einheitlich	0,17	blau
22	d-Valin, altes Präparat	3 Flecken	0,29; 0,41; 0,53	purpur
23	dl-Serin	einheitlich	0,24	braunrot
24	Protamin-sulfat	—	—	—
25	Edestin	—	—	—
26	l-Tryptophan	einheitlich	0,43	gelbbraun
27	d-Valin, altes Präparat	3 Flecken	0,29; 0,41; 0,52	purpur
28	d-Valin, altes Präparat	3 Flecken	0,29; 0,41; 0,52	purpur

In Chromatogramm 1 und 2 erweisen sich die meisten Präparate als einheitlich. Ausnahmen bilden dl-Methionin, l-Leucin und vor allem *d-Valin* (Nr. 22, 27, 28), welches sich papierchromatographisch in 3 deutlich verschiedene Komponenten aufspalten lässt.

Bei diesem Präparat handelt es sich um ein Handelsprodukt, das nach Mitteilung der Lieferfirma 1938 hergestellt worden war und noch die alte Bezeichnung d-Valin trägt. Es liegt aber das natürliche Isomere vor, das man jetzt in der Form L(+)-Valin schreibt. Die Darstellung erfolgte noch aus natürlichem Material in einer uns nicht näher bekannten Weise, während man in den letzten



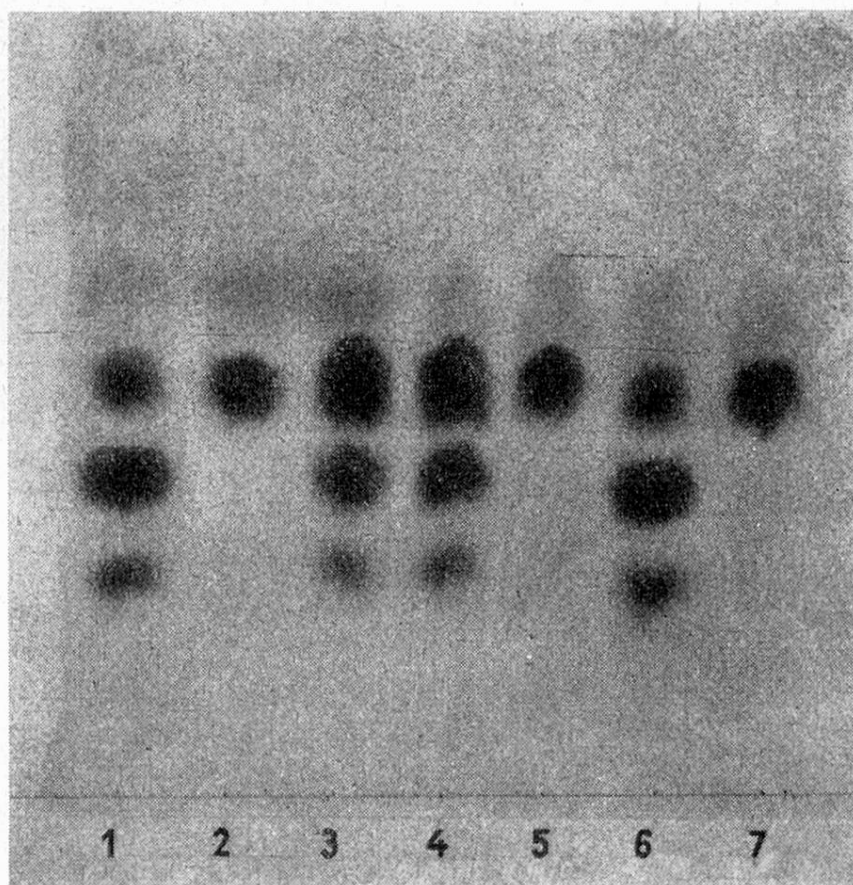
Jahren dazu übergegangen ist, dieses Isomere aus dem synthetisierten racemischen Valin zu gewinnen. Die Firma stellte uns ein nach der neuen Methode erhaltenes Präparat zur Verfügung, und es zeigte tatsächlich die erwähnte Aufspaltung nicht mehr. Offenbar konnten bei der alten Darstellungsweise gewisse Neben- bzw. Zersetzungsprodukte nicht ganz entfernt werden.

Wir gehen nun auf einige Versuche ein, welche wir angestellt haben, um uns über die Natur der 3 Flecken beim «d»-Valin Klarheit zu verschaffen.

## 2. Untersuchung eines unreinen Valinpräparates

Zunächst vermuteten wir, dass es sich beim mittleren, stärksten Fleck (Chromatogramm 2, Nr. 22, 27, 28) um das reine L(+)-Valin handle, die beiden übrigen von einer Beimengung anderer Aminosäuren herrührten. Wir dachten an Leucin und Isoleucin, welche ähnliche Rf-Werte aufweisen.

Wir fertigten uns Chromatogramm 3 an, welches zeigt, dass Leucin und Isoleucin fast den gleichen Rf-Wert haben wie der oberste Fleck beim «d»-Valin. Wir können auch feststellen, dass das L(+)-Valin (mittlerer Fleck) sich gut vom Leucin bzw. Isoleucin abtrennt, obschon es sich bei diesen Verbindungen um benachbarte Glieder einer homologen Reihe handelt und nur aufsteigend nach der Zylindermethode entwickelt wurde.

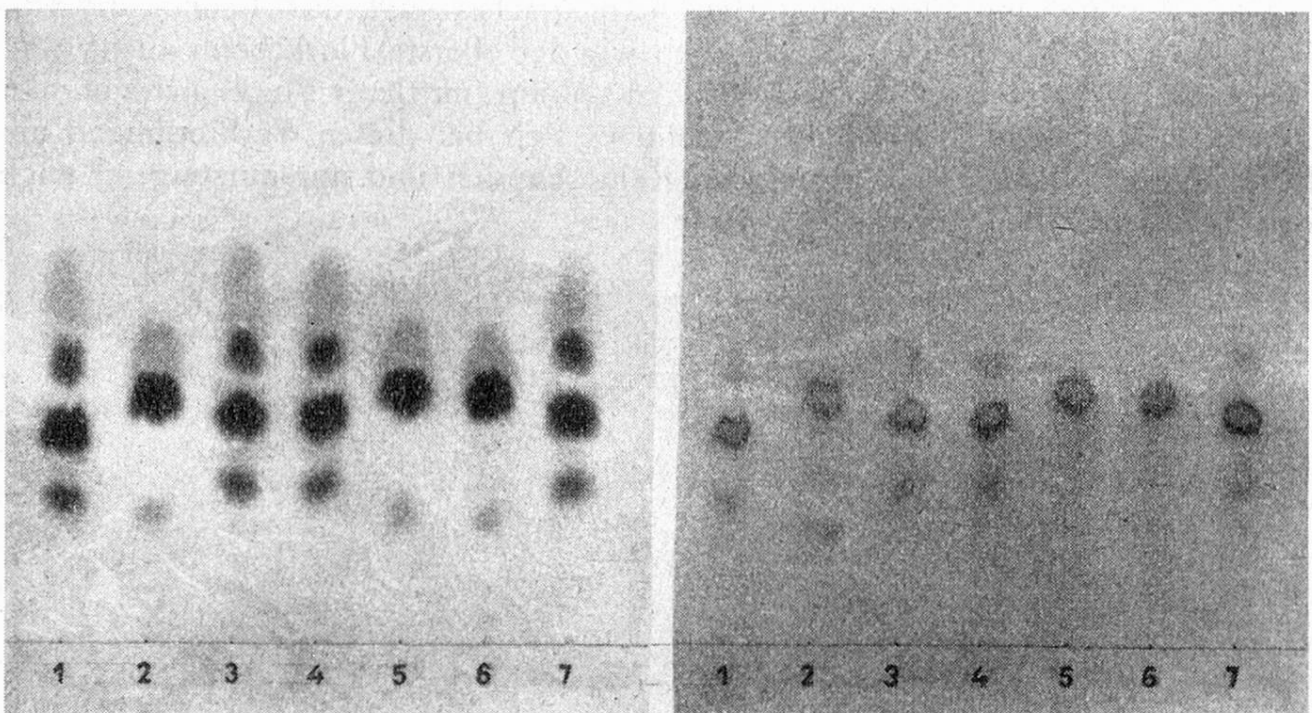


Chromatogramm 3



Nr.	Probe
1	«d»-Valin, unrein
2	d-Isoleucin
3	d-Isoleucin, l-Leucin, «d»-Valin, unrein
4	d-Isoleucin, l-Leucin, «d»-Valin, unrein
5	l-Leucin
6	«d»-Valin, unrein
7	d-Isoleucin

Liegt also eine Verunreinigung mit Aminosäuren vor? Die folgenden beiden Chromatogramme lassen darauf schliessen, dass dies nicht der Fall ist.



Chromatogramm 4

Chromatogramm 5

Nr.	Probe
1	«d»-Valin, unrein
2	DL-Norvalin
3	«d»-Valin, unrein
4	«d»-Valin, unrein
5	DL-Norvalin
6	DL-Norvalin
7	«d»-Valin, unrein

Bei Chromatogramm 4 und 5 handelt es sich um den gleichen Versuch, wobei jedoch bei 4 die Aufnahme sofort nach der Entwicklung, bei 5 einen Monat später erfolgte. Auf Chromatogramm 5 ist beim Valin nur noch der mittlere Fleck erhalten geblieben, allerdings im Verlauf der Zeit verblasst, im Aussehen aber ähnlich dem Norvalin. Die beiden zusätzlichen Flecken beim Valin sind fast ganz verschwunden und zeigen auch die charakteristische Ringbildung nicht wie die Aminosäuren. Dieses abweichende Verhalten lässt den Schluss zu, dass es sich bei den Verunreinigungen nicht um Aminosäuren, sondern wahrscheinlich um andersartige Stoffe handelt.

Wir erhielten dann, wie schon erwähnt, von der gleichen Firma ein Präparat von L(+)-Valin, hergestellt nach dem neuen Verfahren. Davon fertigten wir ein weiteres Chromatogramm an, Seite an Seite mit den andern Aminosäuren. Das neue Präparat erwies sich dabei als ziemlich einheitlich, immerhin war auch ein kleiner Nebenfleck erkennbar, der bei andern Aminosäuren fehlte.

Um wenn möglich einige Mikroreaktionen ausführen zu können, gingen wir an die Isolierung der beiden unbekanntem Valin-Begleitstoffe, indem grössere Mengen chromatographiert und dann eluiert wurden. Man erhielt zwei Flüssigkeiten von intensiv fischartigem Geruch, welcher bei Zusatz von verdünnter Salzsäure sofort verschwand. Nach dem Eindampfen konnte ein farbloses Salz festgestellt werden, das offensichtlich durch Neutralisieren einer flüssigen Base, vermutlich einem Amin, entstanden war.

Man führte die Tüpfelreaktion auf primäre aliphatische Amine nach *Feigl*<sup>10)</sup> durch Schmelzen mit Fluoresceinchlorid aus. Es zeigte sich eine deutliche grüngelbe Fluoreszenz, welche im UV intensiv gelb erschien, was nach *Feigl* typisch für primäre aliphatische Amine ist. Pyrrolderivate geben z.B. im UV eine blaue Fluoreszenz.

Das Auftreten von Aminen liesse sich leicht erklären, denn verschiedene Aminosäuren verlieren beim vorsichtigen Erhitzen Kohlendioxyd und gehen in Amine über. Es erscheint möglich, dass das Valin im Verlauf der Darstellung teilweise zu Isobutylamin dekarboxyliert wird. Wir beschafften uns daher Isobutylamin (Kp 68—70° C) und auch n-Butylamin (Kp 77° C) und chromatographierten diese flüssigen Basen, deren Geruch sehr ähnlich dem der Fraktionen war, welche wir aus dem unreinen Valinpräparat erhalten hatten, Seite an Seite mit «d»-Valin. Das Ergebnis des Versuches liess es aber ausgeschlossen erscheinen, dass Isobutylamin oder n-Butylamin als Verunreinigungen im «d»-Valinpräparat vorhanden waren. Infolge der relativ grossen Flüchtigkeit können diese Basen gar nicht in normaler Weise entwickelt und als eng umgrenzte Flecken sichtbar gemacht werden. Man müsste das Verhalten der höheren Amine überprüfen, um das Problem abklären zu können.

## Zusammenfassung

Es werden kurz die physikalischen und chemischen Methoden besprochen, welche zur Identifizierung von Aminosäuren und Prüfung derselben auf Einheitlichkeit herangezogen werden können. Unter ihnen nimmt die Papierchromatographie in der Praxis einen wichtigen Platz ein. Es besteht bei dieser Methode nicht nur die Möglichkeit, eine Verbindung in einem Gemisch anderer Stoffe zu identifizieren, sondern auch die, unter Umständen Art und Menge der Verunreinigungen festzustellen. Als neues Lösungsmittel zur Chromatographie von Aminosäuren, Aminoalkoholen und verwandter Verbindungen hat sich eine Butanol-Äthanol-Wasser-Mischung (80 - 25,5 - 60) als geeignet erwiesen. Es wurde auf diese Weise eine ganze Serie von Aminosäurepräparaten des Handels auf Einheitlichkeit geprüft und u.a. ein älteres Valinpräparat in 3 Komponenten zerlegt. Versuche zur Identifizierung derselben werden besprochen.

## Résumé

Brève revue des méthodes physiques et chimiques d'identification des acides aminés. Parmi ces méthodes la chromatographie sur papier joue un rôle important car elle permet non seulement d'identifier les acides aminés mais encore d'en déterminer et doser les impuretés. Les auteurs ont utilisé cette méthode pour examiner la pureté d'un grand nombre d'acides aminés du commerce; c'est ainsi qu'ils ont trouvé, par exemple, 3 composants dans une ancienne préparation de valine. Un nouveau mélange de dissolvants (butanol-éthanol-eau = 80 : 25,5 : 60) a été mis au point et a rendu d'excellents services pour la chromatographie des acides aminés, des amino-alcools et des substances analogues.

## Summary

Examination of the purity of various amino acid preparations, available on the market, by means of paper chromatography, using a new solvent mixture (butanol-ethanol-water = 80 : 25,5 : 60), which gives very good results with amino acids, amino alcohols and similar substances.

## Literatur

- 1) Handbook of Chemistry and Physics (1947) S. 1428.
- 2) Taschenbuch für Chemiker und Physiker (1949) S. 350.
- 3) D. M. Greenberg, Aminoacids and Proteins (1951) S. 29.
- 4) H. Sulser, diese Mitt. 45, 274 (1954).
- 5) H. C. S. De Whalley, N. Albon, D. Gross, Analyst 76, 287 (1951).
- 6) E. Shaw, J. Biol. Chem. 185, 439 (1950).
- 7) F. Weygand und Mitarbeiter, Experientia 6, 184 (1950).
- 8) D. L. Clegg, Analyt. Chemistry 22, 48 (1950).
- 9) K. Heyns und Mitarbeiter, Z. physiol. Chemie 287, 1, 8 (1951).
- 10) F. Feigl, Qualitative Analysis by Spot Tests (1947) S. 373.