

Zeitschrift: Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène
Band: 56 (1965)
Heft: 6

Artikel: Bestimmung des -Aminostickstoffs freier Aminosäuren durch Decarboxylierung mit Ninhydrin
Autor: Schenk, P. / Scherz, R.
DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-982207>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

Download PDF: 15.10.2024

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

Summary

In the present paper a spectrophotometric method for the determination of small quantities of benzene in alcohols is described.

To determine the benzene concentration, the wave-length 254,6 nm is chosen and compared with air = 100 %. The benzene content can be read from a calibration curve.

There are impurities in alcohols, which absorb at λ 254,6 nm; they are therefore determined at λ 267,4 nm (with this wave-length benzene does practically not absorb any more) and subtracted from the gross benzene content.

The results obtained by this method are good. Measuring range: 0—100 and 0—500 microlitre/l, according to the layer-length.

Literatur

1. *H. Ley und Vanheiden*: Ber. deutsch-chem. Ges. **60**, 2341, (1927).
2. *V. Henri*: Photochimie, 1919.
3. *Padrun H. und Neumann R.*: Beiträge zur analytischen Bestimmung der chemischen Zusammensetzung des Extraktionsbenzins Fette — Seifen — Anstrichmittel, Jahrgang 56/Nr. 283, Nr. 7/463 (1954).
4. ASTM D 1017—51 detaillierte Vorschrift: Benzene and Toluene by Ultraviolet Spectrophotometry.
5. *Rosenthaler L.*: Zur Prüfung von Petroläther, Benzin und Weingeist auf Benzol. Ph. Acta H. **33**, 858—859 (1958).
6. *Wanger O.* Spektrophotometrische Messungen der Lichtdurchlässigkeit bei reinen und verunreinigten Spriten im ultravioletten Wellenbereich. Diese Mitt. **54**, 496 (1963).
Löwe Fritz: Optische Messungen, 3. Auflage. Technische Fortschrittsberichte. Fortschritte der chemischen Technologie in Einzeldarstellungen. Band 6.

Bestimmung des α -Aminostickstoffs freier Aminosäuren durch Decarboxylierung mit Ninhydrin

P. Schenk und R. Scherz

Betriebsanalytisches Laboratorium der Knorr Nahrungsmittel AG, Thayngen

Von den zahlreichen Methoden zur Bestimmung des Aminostickstoffs sind in der Lebensmittelanalytik vor allem die folgenden von Bedeutung:

1. Gasvolumetrische Bestimmung des N_2 nach Desaminierung mit HNO_2 nach *van Slyke* (1).
2. Formoltitration nach *Sørensen* (2).
3. Titration in alkoholischer Lösung nach *Martens* (3).
4. Kolorimetrische Bestimmung mit Ninhydrin nach *Yemm und Cocking* (4, 5, 6).
5. Decarboxylierung mit Ninhydrin nach *van Slyke* (7).

Jedes dieser Verfahren ist mit gewissen Unzulänglichkeiten behaftet, so daß die Resultate, die die einzelnen Methoden liefern, oft beträchtlich voneinander abweichen. Dies wird durch Tabelle 1 anhand eigener Untersuchungen illustriert.

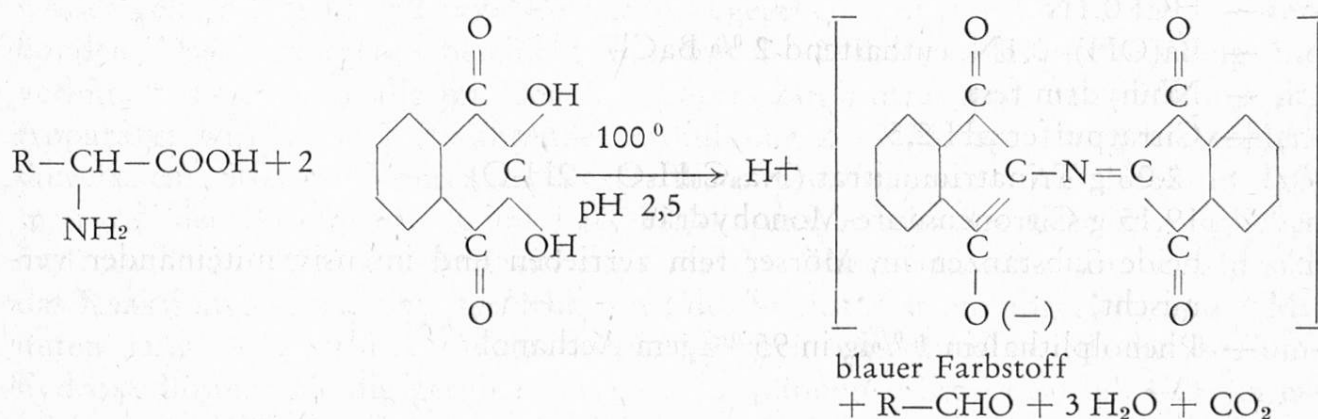
Tabelle 1. Aminostickstoffbestimmungen nach verschiedenen Methoden

Probe		Total-N nach Kjeldahl	Amino-N nach Methode				
			1	2	3	4	5
Würze	A	4,30	2,67	3,64	—	2,66	2,81
	B	—	—	—	2,73	—	2,66
Hefeextrakt		7,91	4,18	4,56	—	3,44	3,49
Fleischextrakt	A	9,48	1,18	3,22	—	1,03	0,54
	B	—	—	—	1,52	—	0,32
Bouillon		—	—	—	1,51	—	1,34

Die Werte in der Tabelle bedeuten % N, bezogen auf das Ausgangsmaterial (Feuchtgewicht).

So ergibt die Formoltitration durchwegs höhere Werte. Starke Schwankungen zeigen die einzelnen Methoden bei Fleischextrakt; der Grund dafür dürfte im relativ hohen Gehalt an Dipeptiden (Carnosin, Anserin) liegen, die je nach der gewählten Methode unterschiedlich miterfaßt werden. Auch auf Ammoniak sprechen die einzelnen Verfahren ungleich an. Die beträchtlichen Differenzen lassen sich aber nur zum Teil theoretisch erklären.

Die Decarboxylierungsreaktion mit Ninhydrin besitzt den anderen Bestimmungsverfahren gegenüber den Vorzug, daß sie für α -Aminosäuren spezifisch ist und stöchiometrisch verläuft, indem eine dem α -Aminostickstoff äquivalente Menge CO_2 freigesetzt wird (8). Schematisch verläuft die Reaktion nach folgender Bruttogleichung:



In der Literatur finden sich zahlreiche Angaben über Reaktionszwischenstufen und Theorien zum Reaktionsmechanismus (9, 10). *Mc Caldin* (11) hat dazu eine ausführliche Zusammenstellung publiziert, bei der auch neueste Auffassungen berücksichtigt wurden.

Während die α -Aminogruppe frei oder alkyliert vorliegen kann (z. B. im Falle des Prolins und Sarkosins), muß die Carboxylgruppe frei sein. Folgende Verbindungen reagieren deshalb nicht:

- β -Aminosäuren (z. B. β -Alanin)
- Aminosäureester
- Peptide (sofern keine freien α -Aminogruppen vorliegen, wie z. B. bei Glutathion).
- Ammoniak
- Amine
- Amide

Abweichend werden bei Asparaginsäure zwei Moleküle CO_2 abgespalten, da der primär entstehende Malonaldehyd weiter zerfällt.

Angesichts dieser grundsätzlichen Vorzüge der geschilderten Methode schien uns eine neue Überprüfung durch Vergleichsuntersuchungen an Proben mit bekanntem Aminosäuregehalt wünschenswert. Nachfolgend werden Resultate mitgeteilt, die mit einer modifizierten Methode nach *van Slyke* erhalten wurden.

Experimenteller Teil

Wir änderten die Originalmethode von *van Slyke* (7) dahingehend ab, daß wir das freigesetzte CO_2 nicht durch Vakuum, sondern durch einen Stickstoffstrom austrieben. Diese Anordnung ist in der Handhabung einfacher und hat den Vorteil, daß man unter vollständigem Luft- CO_2 -Ausschluß titrieren kann. Die $\text{Ba}(\text{OH})_2$ -Lösung behält auf diese Weise ihren Titer über längere Zeit und muß nicht jeden Tag frisch eingestellt werden.

Arbeitsvorschrift

Reagentien:

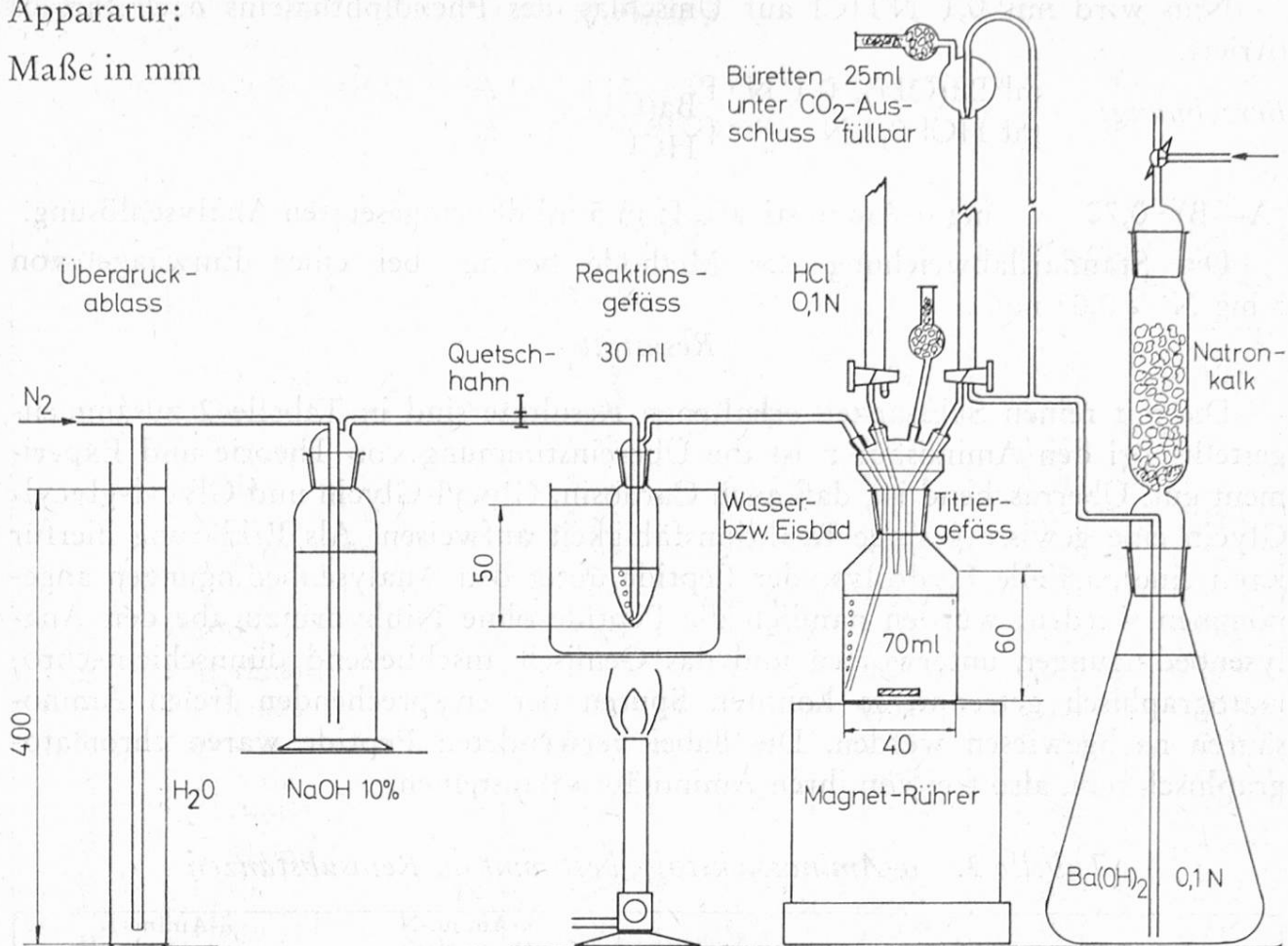
- HCl 0,1N
- $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 0,1N, enthaltend 2 % BaCl_2
- Ninhydrin fest
- Citratpuffer pH 2,5
 2,06 g Trinatriumcitrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
 19,15 g Citronensäure-Monohydrat
 beide Substanzen im Mörser fein zerrieben und intensiv miteinander vermischt.
- Phenolphthalein 1 %ig in 95 %igem Aethanol

Bestimmung

Die Konzentration der Analysenlösung soll so gewählt werden, daß bei Verwendung von 5 ml (etwa 3—7 mg Amino-N entsprechend) ca. 5—10 ml 0,1 N $\text{Ba}(\text{OH})_2$ -Lösung verbraucht werden. 5 ml der zu untersuchenden Lösung werden in das Reaktionsgefäß pipettiert, eine Spatelspitze (100 mg) Puffer pH 2,5 zugesetzt und während 2—3 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt,

Apparatur:

Maße in mm



um etwa praeformiertes CO₂ auszutreiben. Nun wird das Reaktionsgefäß in Eiswasser gekühlt, dann 250 mg Ninhydrin zugegeben und mit der Apparatur verbunden. Das Titriergefäß beschickt man mit 1—2 Tropfen Indikatorlösung und verbindet dieses ebenfalls mit der Apparatur. Zur Entfernung von CO₂ aus der Apparatur wird unter fortwährender Eiskühlung 2—3 Minuten lang mit kohlenstoffsaurem Stickstoff durchgespült (1 Blase pro Sekunde). Anschließend läßt man aus der Bürette ca. 20 ml Ba(OH)₂-Lösung in das Titriergefäß einfließen und taucht das Reaktionsgefäß in ein siedendes Wasserbad ganz ein. Sobald sich das Reaktionsgemisch blau verfärbt, wird der Stickstoffstrom abgestellt und 7 Minuten lang weitererhitzt. Während der ganzen Operation wird die Bariumhydroxydlösung ständig gerührt, um eine vollständige Absorption des CO₂ zu erreichen. Schließlich wird noch 2 Minuten lang Stickstoff durch die Apparatur geleitet (1 Blase pro Sekunde), um das restliche Kohlendioxyd quantitativ in die Vorlage zu spülen.

Die vollständige Absorption des Kohlendioxyds kann kontrolliert werden, indem man an der Bariumhydroxyd-Bürette einen hängenden Tropfen anbringt: dieser darf sich während der ganzen Bestimmung nicht trüben. Hat sich während der Reaktion im Titriergefäß Schaum gebildet, so zerstört man diesen durch Zusatz von einigen Tropfen Amylalkohol.

Nun wird mit 0,1 N HCl auf Umschlag des Phenolphthaleins nach farblos titriert.

$$\begin{array}{l} \text{Berechnung:} \quad \text{ml Ba(OH)}_2 \text{ 0,1 N} \cdot f_{\text{Ba(OH)}_2} = A \\ \quad \quad \quad \text{ml HCl 0,1 N} \quad \cdot f_{\text{HCl}} = B \end{array}$$

$(A - B) \cdot 0,70 =$ mg α -Aminostickstoff in 5 ml der eingesetzten Analysenlösung.

Die Standardabweichung der Methode beträgt bei einer Einwaage von 5 mg N \pm 0,07 mg.

Resultate

Die mit reinen Substanzen erhaltenen Resultate sind in Tabelle 2 zusammengestellt. Bei den Aminosäuren ist die Übereinstimmung von Theorie und Experiment gut. Überraschend ist, daß auch Carnosin, Glycyl-Glycin und Glycyl-glycyl-Glycin eine gewisse geringe Reaktionsfähigkeit aufweisen. Als Erklärung hierfür kann eine partielle Hydrolyse der Peptide unter den Analysenbedingungen angenommen werden; wurden nämlich die Peptide ohne Ninhydrinzugabe den Analysenbedingungen unterworfen und das Gemisch anschließend dünn-schicht-chromatographisch getrennt, so konnten Spuren der entsprechenden freien Aminosäuren nachgewiesen werden. Die dabei verwendeten Peptide waren chromatographisch rein, also frei von ihren Aminosäure-Bausteinen.

Tabelle 2. α -Aminostickstoff, bestimmt an Reinsubstanzen

Verbindung	α -Amino-N theoretisch %	α -Amino-N experimentell %
Glutaminsäure	9,52	9,50
Leucin	10,68	10,51
Histidin	9,03	9,13
Prolin	12,17	12,01
β -Alanin	0	0,21
Asparaginsäure	10,52	10,41
Carnosin	0	1,19
Glycyl-Glycin	0	0,18
Glycyl-glycyl-Glycin	0	0,14
Harnstoff	0	0,13
Kreatinin	0	0

Zur weiteren Prüfung der Decarboxylierungsmethode haben wir schließlich Vergleichsanalysen mit Hilfe quantitativer Aminosäurebestimmungen* durchgeführt. In der Tabelle 3 sind die Resultate einander gegenüber gestellt.

* Diese wurden mit einem Beckman/Spinco Aminosäure-Analysator Modell 120B nach Stein und Moore (12, 13) gemacht. Für die Durchführung dieser Untersuchungen danken wir den Herren Dr. H. Sulser und R. Weber vom Knorr Forschungs-Institut Zürich bestens.

Tabelle 3

α -Aminostickstoff, bestimmt nach van Slyke und errechnet aus dem Aminosäuregehalt

Methode		Testgemisch (Reinsubstanzen)		Würze	Rindfleisch- extrakt	Rindfleisch- extrakt Hydrolysat
		eingesetzt	gefunden			
Quantitative Aminosäure-Analyse	Asparaginsäure	9,08	9,10	0,090	0,004	0,105
	Glutaminsäure	20,46	20,12	0,326	0,017	0,450
	Threonin	3,34	3,26	0,020	0,009	0,042
	Serin	5,78	5,80	0,051	0,017	0,044
	Prolin	7,86	7,47	0,055	0,008	0,115
	Glycin	5,25	4,71	0,088	0,039	0,449
	Alanin	10,35	10,76	0,071	0,136	0,274
	Valin	3,48	3,48	0,031	0,013	0,062
	Methionin	0	0	0,003	0,003	0,016
	Isoleucin	2,31	2,26	0,022	0,008	0,039
	Leucin	3,54	3,60	0,026	0,013	0,012
	Tyrosin	0	0	0,009	0,004	0,009
	Phenylalanin	2,33	2,31	0,015	0,004	0,023
	β -Alanin	0	0	0	0,007	0,378
	Lysin	5,82	5,78	0,036	0,023	0,202
	Histidin	4,88	4,77	0,028	0,022	1,044
	1-CH ₃ -Histidin	0	0	0	0	0,146
	Arginin	15,52	15,70	0,116	0,041	0,275
	Gesamt-Aminosäure- Stickstoff	100,00	99,12	0,987	0,368	3,685
	Umgerechnet in: α -Aminosäure- Stickstoff (Asparaginsäure-N doppelt)	90,75	90,37	0,960	0,310	2,379
van Slyke modifi- ziert	α -Aminosäure- Stickstoff	90,75	91,61	1,01	0,34	2,57

Die Werte bedeuten:

beim Testgemisch % N, bezogen auf eingewogenen Gesamt-Aminosäure N;

bei Würze, Rindfleischextrakt und Rindfleischextrakt-Hydrolysat % N, bezogen auf Einwaage.

Diese Analysen bestätigen die Zuverlässigkeit der Decarboxylierungsmethode nach der beschriebenen Arbeitsvorschrift. Die Übereinstimmung des aus den einzelnen Aminosäuren berechneten Gesamt-Aminosäure-Stickstoffs mit dem gefundenen α -Aminostickstoff ist bei Würze als gut zu bezeichnen (vgl. die zwei untersten Reihen in Tabelle 3). Besonders befriedigend ist auch die Übereinstimmung bei Fleischextrakt, wenn man mit den nach den übrigen Methoden erhaltenen Werten vergleicht (Tabelle 1). Damit wird nahegelegt, daß die Decarboxylierungsmethode nach *van Slyke* auch bei Produkten, die reich an Di- und höheren Peptiden sind, brauchbare Werte liefert.

Die große Diskrepanz zwischen α -Aminosäure-Stickstoff und Gesamt-Aminosäure-Stickstoff im Hydrolysat des Fleischextraktes ist auf den hohen Gehalt an Histidin, 1-Methyl-Histidin und β -Alanin zurückzuführen, welche Hydrolyse-Produkte der Dipeptide Carnosin und Anserin sind. In diesem Zusammenhang ist es von Interesse, darauf hinzuweisen, daß in einigen Ländern der Aminostickstoff-Gehalt als Qualitätsmerkmal für gewisse Produkte betrachtet wird. Unserer Ansicht nach ist unter Aminostickstoff immer α -Aminosäure-Stickstoff als Maß der freien Aminosäuren verstanden worden, und präziserweise müßte also bei solchen Angaben der letztere verlangt werden.

Unserer Mitarbeiterin, Fräulein *H. Ohrenberg*, möchten wir an dieser Stelle für die Durchführung der zahlreichen Analysen bestens danken.

Zusammenfassung

Verglichen mit einigen in der Lebensmittelanalytik gebräuchlichen Methoden zur Bestimmung von Aminosäuren liefert die Decarboxylierungsmethode, wie gezeigt wird, die verlässlichsten Resultate. Es wird eine einfache Apparatur zur Bestimmung des α -Aminosäurestickstoffs durch Decarboxylierung mit Ninhydrin nach *Van Slyke* beschrieben.

Résumé

En comparant quelques méthodes usuelles pour la détermination des acides aminés, nous constatons que la méthode de la décarboxylation donne les résultats les plus sûrs. Un appareil simple pour déterminer l'azote des acides aminés en position α par décarboxylation en présence de ninhydrine selon la méthode de *van Slyke* est décrit.

Summary

Compared with some other methods used in the food analysis for the determination of amino acids, the decarboxylation method is shown to give the most reliable results. A simple apparatus to determine α -amino acid-nitrogen by decarboxylation with ninhydrine, according to the *van Slyke* method, is described.

Literatur

1. *van Slyke D. D.*: Proceed. Amer. Soc. Biol. Chem. (1909), J. biol. Chem. **7**, 34 (1910).
2. *Sørensen S. P. L.*: Biochem. Z. **7**, 45 (1909).

3. *Martens*: Bull. Soc. Chim. Biol. **9**, 454 (1927).
4. *Cocking E. C. and Yemm E. W.*: Biochem. J. **58**, xii (1954).
5. *Yemm E. W. and Cocking E. C.*: Analyst **80**, 209 (1955).
6. *Kalant H.*: Analyt. Chem. **28**, 265 (1956).
7. *van Slyke D. D. et al.*: J. biol. Chem. **141**, 671 (1941).
8. *van Slyke D. D. et al.*: J. biol. Chem. **141**, 627 (1941).
9. *Mason M. F.*: Biochem. J. **32**, 719 (1938).
10. *Hine J.*: Reaktivität und Mechanismus in der org. Chemie, Georg Thieme Verlag Stuttgart 1960, S. 279.
11. *Mc Caldin D. J.*: Chem. Rev. **60**, 39 (1960).
12. *Moore S., Spackman D. H. and Stein W. H.*: Analyt. Chem. **30**, 1185 (1958).
13. *Spackman D. H., Stein W. H. and Moore S.*: Analyt. Chem. **30**, 1190 (1958).

* Zitiert in Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1953, 4. Aufl. S. 688, 692.

UV-Spektrophotometrische Theobromin-Bestimmung in Kakao und Schokolade

Von *H. Hadorn* und *K. Zürcher*

Laboratorium des Verbandes schweiz. Konsumvereine (VSK) Basel

1. Einleitung

Die Theobromin-Bestimmung, oder genauer die Gesamt-Alkaloid-Bestimmung (Theobromin und Coffein), leistet wertvolle Dienste zur Berechnung der fettfreien Kakaomasse in kompliziert zusammengesetzten Kakao- und Schokoladenerzeugnissen. Es ist die einzige direkte Methode zur Berechnung der fettfreien Kakaomasse. Für die Theobromin-Bestimmung sind bereits zahlreiche, meistens recht umständliche und zeitraubende Methoden vorgeschlagen worden. Auf Grund eigener Untersuchungen (1, 2, 3) darf die von *Pritzker* und *Jungkunz* (4) ausgearbeitete und von uns etwas modifizierte Perforationsmethode als recht genau angesehen werden.

Eine einfachere, für Routineuntersuchungen rasch durchführbare spektrophotometrische Methode wäre jedoch sehr erwünscht. Da Theobromin und Coffein im Ultraviolett charakteristische, stark ausgeprägte Absorptionsbanden mit einem Maximum bei 272 nm aufweisen, sollte die UV-spektrophotometrische Bestimmung im Prinzip möglich sein.

Nach der Methode *Pritzker* und *Jungkunz* (4) wird die Kakaomasse oder die Schokolade zunächst mit Wasser und Magnesiumoxid gekocht und dann filtriert. Das meistens schwach opalisierende, gelblich gefärbte Filtrat enthält die Alkaloide