九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

Die Farbenreaktionen Von Aminosäuren Mit Diphenylamin : I. Eine Neue Farbenreaktion Von Eiweiss Mit Diphenylamin

Funatsu, Masaru
Biochemical Laboratory, Department of Agriculture, Kyushu University

https://doi.org/10.5109/22614

出版情報：九州大学大学院農学研究院紀要. 9 (1), pp.93-97, 1948-03. Kyushu University
バージョン：
権利関係：

KYUSHU UNIVERSITY

Journal of the Faculty of Agriculture, Kyūshū University, Vol. 9, No. 1
March 31, 1948

DIE FARBENREAKTIONEN VON AMINOSÄUREN MIT DIPHENYLAMIN

I. EINE NEUE FARBENREAKTION VON EIWEISS MIT DIPHENYLAMIN

MASARU FUNATSU

Diphenylamin erzeugt, wie bekannt, durch die Verschmelzung mit der Oxalsäure sowie deren Salze einen Farbstoff, Diphenylaminblau (Anilinblau) (1), und ebenso leicht durch die Oxydation mit Salpetersäure einen anderen blauen Farbstoff, eine Chinoidform von N-N'-Diphenylbenzidin (2). Diese Farbenreaktionen verwendet man in den geeigneten Lösungsmitteln als empfindliche qualitative Reaktionen.

Ich fand, dass Eiweiss auch in sirupöser Phosphorsäure mit Diphenylamin hauptsächlich einen Blaufarbstoff bildet. Wenn man nämlich das Eiweiss in sirupöser Phosphorsäure mit Diphenylamin verschmiltzt und nach dem Abkühlen Alkohol tropfenweise dazu fügt, so tritt intensive Blaufärbung auf. Cystin oder Cystein sowie Serin reagieren in ganz gleicher Weise mit Diphenylamin und liefern Blaufarbe. Daraus kann man schliessen, dass diese Farbenreaktion keinesfalls auf einer Bindungskette in Eiweiss beruht, sondern auf irgendwelcher Aminosäure des Eiweisses, welche durch Erhitzen mit Phosphorsäure frei gelegt wurde. Und eben Blaufärbung dabei ist hauptsächlich auf Cystin, Cystein sowie Serin zurückzuführen.

Der Farbstoff, den Eiweiss oder Cystin sowie Serin erzeugt, unterscheidet sich von Anilinblau durch verschiedene chemische Eigenschaften. Fügt man bei der Anilinblaubildung Wasser zu dem Reaktionsgemisch, so fällt das überschüssige Diphenylamin aus, das durch Adsorption des Farbstoffes hellblau gefärbt bleibt, während bei der Farbenreaktion von Eiweiss oder Cystin dadurch die Blaufärbung vollständig verblasst und Diphenylaminnieder-

schlag nur gelb gefärbt wird. Aus diesen wässerigen Lösungen sind beide Farbstoffe mit Aether ausschüttelbar, indem sie sich mit violetter Farbe bei Anilinblau und gelber Farbe beim Eiweiss oder Cystin lösen. Durch Chromatographie lässt sie sich in ätherischen Lösungen voneinander scheiden.

Diese Farbstoffe haben auch verschiedene Stabilität gegen Temperatur. Nämlich erhitzt man bei der Anilinblau- sowie Diphenylbenzidinbildung das Reaktionsgemisch vollständig bis zur dunkelroten Farbe unter Zusatz von $SnCl_2$, so tritt nicht mehr Blaufärbung auf, sondern nur Gelbbraunfärbung durch die Zersetzungsprodukte. Jedoch bei der Farbstoffbildung des Eiweisses sowie Cystins tritt unter denselben Bedingungen immer die intensivste Färbung auf.

Oxydationsmittel, wie Salpetersäure, reagieren in Phosphorsäure mit Diphenylamin schon in der Kälte und bilden blauen Farbstoff; durch Erhitzung jedoch liefern sie gelbe Zersetzungsprodukte und werden nicht mehr blau, daher kann man sie leicht unterscheiden.

Ausführung

In ein Mikroreagenzglass bringt man 2–3 mg. oder 0.1–0.2 ccm der zu untersuchenden Eiweissprobe mit 0.5–1 ccm sirupöser Phosphorsäure und verschmilzt mit wenigem Diphenylamin unter Zusatz von einer kleinen Menge $SnCl_2$ auf kleiner offener Flamme bis zur roten oder dunkelroten Farbe (1–2 Min.). Fügt man der erkalteten Masse absoluten Alkohol tropfenweise hinzu, so tritt hauptsächlich eine Blau- oder Blaugrünfärbung auf. Es zeigt die Anwesenheit von Eiweiss. Bei solchem Eiweiss, dessen Tryptophangehalt in einem gewissen Grade mehr als Cystin und Serin ist, tritt eine Rotviolett- oder Rotfärbung auf. Eine Blindprobe bleibt unter denselben Bedingungen farblos.

$SnCl_2$ wirkt dabei hemmend auf die Entstehung der Huminsubstanzen, aber in Anwesenheit von überschüssiger Stärke, Zucker, Oel oder Fett wird die Farbtönung durch die Huminstoffe immer dunkler.

Diese Farbenreaktion scheint eine Dehydrierungsreaktion zu sein, daher muss man das Wasser möglichst vermeiden. Es bedeutet natürlich nicht, dass die Anwesenheit des Wassers diese Reaktion gänzlich vernichtet, sondern dass es in ersten Reaktions-

stufen hemmend wirkt und die Farbstoffbildung später auftritt. Eindampfen des Wassers durch die fortsetzende Erhitzung beschleunigt die Farbstoffbildung. Auf diese Weise kann man verdünnte, bis zu ungefähr 50 prozentige, Phosphorsäure noch verwenden.

Absoluter Alkohol ist am besten, aber statt dessen sind auch Methylalkohol und Azeton verwendbar. Andere organische Lösungsmittel sind ungeeignet. Man beachte jedoch, dass der Zusatz von überschüssigem Alkohol die einmal entwickelte Blaufarbe entfärbt und nur gelbbraune Farbe ergibt.

Die Farbenentwicklung ist sehr empfindlich und die Erfassungsgrenze für Cystin ist 0,1 γ und auch die Grenzkonzentration dafür ist 1:1,000,000. Eiweiss, welches mindestens 0,1 γ Cystin enthält, lässt sich dadurch noch gut erkennen.

Allerdings ist die Färbung nicht so stabil und verblasst mit der Zeit, wird jedoch durch Erwärmung wieder intensiver.

Farbenreaktion verschiedener Eiweisse und Eiweiss-substanzen.

Tabelle I zeigt die Färbungen der verschiedenen Eiweisse, welche bei den oben beschriebenen Reaktionen gegeben wurden.

Tabelle I.

Eiweiss	Farbe nach Erhitzen	Farbe unter Zusatz von Alkohol
Eier-albumin	rot	blau
Blut-albumin	rot	blau
Hämoglobin	rot	blauviolett
Eiweiss aus Rindfleisch	rot	violettgrün
„ „ Makrelenhecht (*Cololabis saira*)	rot	blau
„ „ Thunfisch	rot	blau
„ „ Gelbfisch	rot	blau
„ „ Walfisch	braun	grünbraun
Casein	rotbraun	grünbraun
Gelatin	rot	blau
Pepton (Terunchi)	rot	blau
Sojabonen-Eiweiss	rotbraun	blaugrün
Glicinin	rotbraun	blaugrün
Gliadin	rot	blaugrün
Edestin	rot	blau
Legumin	rotbraun	grünbraun

Also alle gewöhnlichen Eiweisse geben blaue oder bläuliche Färbung. Andere Naturstoffe als Eiweiss, wie Stärke, Dextrin und Gummi arabicum, liefern keine Farbstoffe, sondern nur die dunkelbraunen Huminsubstanzen. Da diese Farbenreaktion eigentlich auf der Aminosäure selbst, welche das Eiweiss aufbaut, zurückzuführen ist, so kann man daraus schliessen, dass die Farbe von der Art und Menge der Bestandteilen des Eiweisses abhängt.

Ausser den oben beschriebenen drei Aminosäuren gibt es noch einige andere, die durch diese Reaktion die Farbe bilden. Solche natürlichen Aminosäuren sind in Tabelle II ersichtlich.

Die meisten von den übrigen Aminosäuren liefern keine Farbstoffe sondern nur die Zersetzungsprodukte.

Tablelle II.

Aminosäure	Farbe nach Erhitzung	Farbe unter Zusatz von Alkohol
Serin	rot	blau
Cystein (Cystin)	rot	blau
Lanthionin	rot	blau
Methionin	rot	gelb
Glutaminsäure	rotbraun	grün
Tyrosin	rotbraun	rotbraum
Prolin	rotbraun	rotviolett
Oxyprolin	rotbraun	rotviolett
Tryptophan	rotbraun	rot

Uber die Farbenreaktionen einzelner Aminosäuren will ich in der zweiten Mitteilung dieser Untersuchung eingehend berichten.

Aus oben gegebenen zwei Tabellen (I und II) kann man leicht verstehen, dass die Verschiedenheit der Reaktionsfarbe des Eiweisses auf die der Bestandteile beruht. Und weiter kann man sagen, dass die Farbe des Eiweisses eine gemischte Farbe der einzelnen Aminosäuren darstellt. Z. B. Glutathion, das Cystin und Glutaminsäure als Baustein enthält, liefert die gemischte Farbe von Blau und Grün. Grünbraune Farbe bei dem Eiweiss des Walfisches scheint auf seinem wenigen Cystingehalt zu beruhen. Ferner gibt, wie bei der Hefe, Eiweiss, von höherem Tryptophange

halt rötlichen Farbton. Da die Farbenreaktion des Cystins und Serins am empfindlichsten ist, so ergibt das meiste Eiweiss immer bläuliche Farbe.

In Eiweiss-Substanzen lässt sich diese Methode auch direkt ausführen und durch bläuliche Farbe das Eiweiss darin erkennen. Tabelle III zeigt die Farbe verschiedener Eiweiss-Substanzen.

Tabelle III.

Substanzen	Farbe nach Erhitzen	Farbe unter Zusatz von Alkohol
Koaguliertes Eier-Albumin	rot	blau
Haar	dunkelrot	blau
Wolle	dunkelrot	blau
Seide	dunkelrot	blau
Hefe	rot	rotviolett
Presskuchen des Herings	rot	blau
Pulver des Kürbissamens	dunkelrot	dunkelblau
Maispulver	rotviolett	blau
Sojabohnenpulver	rot	blaugrün
Kleie	dunkelviolett	dunkelblau

Zusammenfassung

1. Eiweiss reagiert auch wie Oxalsäure mit Diphenylamin in sirupöser Phosphorsäure und bildet hauptsächlich bläulichen Farbstoff.

2. Diese Färbung beruht auf einigen Aminosäuren, vor allen Cystin und Serin.

3. Aus diesem Grunde wird eine neue Methode der empfindlichen qualitativen Farbenreaktion von Eiweiss ausgeführt, die man als Nachweiss von Eiweiss verwenden kann.

Zum Schluss danke ich herzlich Herrn Professor Yasuyoshi Oshima für seine freundliche Leitung und gleichzeitig Herrn Yoshiteru Semba für seine höchst wertvolle Mithilfe in der ersten Stufe dieser Untersuchung.

Literatur

1. P. Karrer: Lehrbuch der organischen Chemie, (1941), 639.
   F. Feigl und O. Freden: Mikrochemie, **18**, 272, (1935).
2. H. Wieland: Ber. **46**, 3296 (1913); **52**, 886, (1919).
3. F. Feigl: Qualitative Analyse mit Hilfe von Tüpfelreaktionen (1938), 329, 437.
   J. Tillmans und W. Sutthoff: Z. Analyt. Chem., **50**, 473 (1911).
   J. M. Koltoff and G. E. Noponen: J. Am. Chem. Soc. **55**, 1448 (1933).