

is difficult to reproduce bands clearly on a photograph even though these can be seen unmistakably in the original gels.

The first G-100 group does not resolve at all in paper electrophoresis but forms a broad diffuse zone around the starting line. This is probably due to the low ionic strength of the buffer in the electrophoresis. In disc electrophoresis this group indicates two components of low mobility. Large amounts of the globulins remain at the start, probably because these molecules are too large to migrate into the gel, and the ionic strength in the gel is too low, in spite of the relatively high pH, to keep them in solution.

The other groups separate much better in electrophoresis than the first one. Taking into account the overlappings and mobilities of the different groups and fractions, it can be considered that the above mentioned 10 Sephadex groups of different molecular sizes include in all at least 8 paper electrophoretic fractions and 25 fractions separable by disc electrophoresis. The real number of components obtainable with this method lies somewhere between 22 and 43. Disc electrophoretic analyses, however, do not include those globulins which have their iso-electric points above pH 9.0.

A comparison of the Sephadex groups with the fractions obtained by Quensel and Djurtoft will be made.

Acknowledgement. The disc electrophoreses were performed by Mr. J. Mikola, M.Sc., whose assistance is gratefully acknowledged.

1. Quensel, O. *Dissertation*, Almqvist & Wiksell, Uppsala 1942.
2. Djurtoft, R. *Dissertation*, Dansk Videnskabs Forlag, København 1961.
3. Enari, T.-M., Nummi, M. and Mikola, J. *5th Intern. Congr. Biochem.* Moscow 1961. *In press.*
4. Enari, T.-M., Nummi, M., Mikola, J. and Mäkinen, V. *Finska Kemistsamfundets Medd.* **71** (1962) 44.
5. Porath, J. *Biochim. Biophys. Acta* **39** (1960) 193.
6. Lowry, O. H., Rosebrough, W. J., Farr, A. and Randall, R. J. *J. Biol. Chem.* **193** (1951) 265.
7. Nummi, M. and Enari, T.-M. *Brauwissenschaft* **15** (1962) 203.
8. Chang, L. O., Srb, A. M. and Stewart, F. C. *Nature* **193** (1962) 756.

Received January 8, 1963.

Acta Chem. Scand. **17** (1963) No. 2

Dünnschicht-chromatographische Bestimmung der Ascorbinsäure in Kartoffelknollen

HANS HASSELQUIST und MAIRE JAARMA

Institutionen för organisk kemi och biokemi, Universitetet i Stockholm, Schweden

Herrn Professor Dr. Hans von Euler zum 90. Geburtstag gewidmet

In der Literatur finden sich divergierende Angaben über den Einfluss ionisierender Strahlung auf den Ascorbinsäuregehalt in Kartoffelknollen. Einige Forscher, z.B.^{1,2} fanden bei Bestrahlung mit 10 000 rad oder mehr eine Verminderung der Ascorbinsäurekonzentration. Schwimmer und Mitarbeitern³ haben jedoch eine Stunde nach der Bestrahlung eine Erhöhung im Ascorbinsäuregehalt von Kartoffelknollen gefunden.

Die Bestimmung von Ascorbinsäure in biologischem Material ist schwierig. Die meisten Untersuchungen bedienen sich der Reduktion von 2,6-Dichlorphenol-indophenol. Die unspezifische Reduktion, durch reduzierende Zucker, Sulfhydrylverbindungen etc., muss erst eliminiert werden; das pH muss genau bestimmt sein, in ungepufferten Lösungen kann Ascorbinsäure zerstört werden; Puffersubstanzen können jedoch die Geschwindigkeit beeinflussen mit der die Farbintensität des 2,6-Dichlorphenol-indophenol abklingt^{4,5}. Um solche Fehlerquellen zu vermeiden muss man sich also eine Eichkurve bekannter Ascorbinsäurekonzentrationen unter genau denselben Verhältnissen wie sie in der Probe vorhanden sind, herstellen.

Die vorliegende Arbeit ist ein Versuch die Diskrepanz der Ergebnisse verschiedener Forscher bezüglich des Ascorbinsäuregehaltes in gamma-bestrahlten Kartoffeln aufzuklären. Wir haben deshalb Parallelbestimmungen der Ascorbinsäure mit zwei verschiedenen Methoden ausgeführt: 1) durch spektrophotometrische Bestimmung der Reduktion von 2,6-Dichlorphenol-indophenol (Modifikation der Methode nach Ponting^{6,7}) vgl. Sereno und Mitarbeitern⁸; 2) mit Dünnschicht-Chromatographie.

Die Vorteile der Dünnschicht-Chromatographie brauchen kaum genannt zu werden. Die Methode ist schnell, weshalb eine Oxydation der Ascorbinsäure vermieden wird. Die Ascorbinsäure kann noch in Mengen von 0,2 μ g bestimmt werden.

Durch passende Auswahl von Lösungsmitteln und Nachweisflüssigkeiten können störende Faktoren des Pflanzenmaterials eliminiert werden. Ponting⁶ ist der Ansicht, dass nur Metaphosphorsäure und Oxalsäure zur Extraktion der Ascorbinsäure aus Pflanzenmaterial geeignet sind, alle anderen Extraktionsmittel geben Verluste. Oxalsäure hat im Vergleich mit Metaphosphorsäure gewisse Vorteile: die Lösung ist stabil, Oxalsäure ist billiger und man erhält beim Gefriertrocknen gut pulverisierte Substanzen, während die entsprechenden Metaphosphorsäure-Extrakte schwierig zu bearbeitende und ausser dem hygroskopische Substanzen geben.

Experimenteller Teil. Es wurden für diese Versuche Kartoffeln der Sorte King Edward verwendet. Die Gammabestahlung wurde teils mit einer Dosenintensität von 1400 rad/Std. (vgl. Schwimmer³) gegeben, teils mit einer Intensität von 128 rad/Sek. Im ersten Fall war die Strahlungsquelle ein Cs-Präparat von 1000 curie ¹³⁷Cs. Im letzteren Fall wurde die Bestahlung in einer Hot-Pot-Zelle (2500 curie ⁶⁰Co) ausgeführt. Die Kartoffeln wurden 1, 2 bzw. 3 Monate nach der Ernte bestrahlt. In der Zwischenzeit wurden die Knollen bei einer Temperatur von +5°C– +6°C aufbewahrt. Die Ascorbinsäurebestimmungen wurden in sämtlichen Fällen eine Stunde nach beendeter Bestahlung ausgeführt.

Bereitung der Extrakte. 0,5 % bzw. 1 % Oxalsäure wurde als Extraktionsmittel verwendet. Die Kartoffeln wurden im Turmix-Apparat unter Zusatz von Oxalsäurelösung bei gleichzeitiger Zufuhr von Kohlendioxid zerkleinert. Die Suspension wurde zentrifugiert und filtriert und das Filtrat anschliessend gefriertrocknet. Die getrockneten Proben wurden quantitativ mit Methanol in Messkölbchen übergeführt. Ein Aliquot dieser Proben wurde im Vakuum eingedampft und danach zur dünn-schicht-chromatographischen Bestimmung verwendet. Die Parallelbestimmungen (spektrophotometrische Messung der Reduktion von 2,6-Dichlorphenol-indophenol) wurden in einer Lösung die zu gleichen Teilen aus 0,5 % Oxalsäure und Methanol besteht, ausgeführt. Wir versuchten dieselben Messungen auch in ungepufferte 0,5 % Oxalsäure ohne Methanol auszuführen (vgl.³), konnten aber dabei keine stabilen Ascorbinsäurewerte erhalten.

Aufbringen der Trennschicht auf die Trägerscheibe. 30 g Kieselgel G "Merck" wurden 30 Sek lang mit 40 ml Wasser ausgerührt, wonach noch 20 ml Wasser unter ständigen Rühren zugefügt wurden. Die homogene Masse wurde schnell in den Dünn-schicht-Streicher ("De-

saga", Heidelberg) mit einer eingestellte Schichtdicke von 0,25 mm übergeführt und die Masse auf 5 Scheiben von 200 × 200 mm ausgestrichen. Dies nahm anderthalb Minuten in Anspruch. Die Trennschichten wurden danach 5 Min bei Zimmertemperatur und dann eine halbe Stunde im Wärmeschrank bei 110°C getrocknet. Nach halbstündigem aufbewahren bei Zimmertemperatur waren die Scheiben fertig zur Anwendung.

Applizierung von Probesubstanzen. Die Probelösungen wurden mit der Mikropipette (der Standardausrüstung) in Mengen von 1 µl aufgebracht. Die Entfernung zwischen den einzelnen Flecken war 10 mm und vom Rande der Scheibe 35 mm. 3 Min nach dem die letzte Probe aufgebracht war wurde die Dünn-schicht-Scheibe in die Chromatographierflüssigkeit getaucht.

Vergleichslösung. 10 mg L-Ascorbinsäure/10 ml Methanol (Standardlösung). Gleich vor der Applizierung wurde die Standardlösung mit Methanol verdünnt. Folgende Ascorbinsäurekonzentrationen kamen zur Anwendung: 1 µg/µl, 0,8 µg/µl, 0,6 µg/µl, 0,4 µg/µl, 0,2 µg/µl, 0,1 µg/µl. Um dieselbe Fleckengrösse zu erhalten wurde immer nur 1 µl appliziert.

Chromatographierflüssigkeit. 2 g Oxalsäure in 20 ml Methanol gelöst: 60 ml Chloroform und Spuren von Kaliumcyanid.

Chromatographierzeit. In 35 Min war die Lösungsfront 9–10 cm gewandert. Die Dünn-schicht-Scheibe wurde danach 2 Min bei Zimmertemperatur getrocknet; das Chloroform war dabei zum grössten Teil verdunstet. Auf die noch nicht methanolfreie Schicht wurde Sprühflüssigkeit aufgesprüht.

Entwickler. Als Entwickler (Sprühflüssigkeit) wurde Phosphomolybdänsäure (5 g/100 ml 96 % Ethanol) verwendet. 2 Min nach Besprühung wurden die Ascorbinsäureflecken bei Zimmertemperatur auf den Scheiben als blaue Flecken auf schwachgelbem Hintergrund sichtbar. Übrige reduzierende Substanzen, SH-Gruppen und dergleichen traten erst nach 2 Std. hervor. Letztere Substanzen konnten schnell durch Erwärmen der Scheibe auf 110°C während 15 Min sichtbar gemacht werden. Bei Aufbewahrung im Dunkeln sind die Chromatogramme mindestens einen Monat haltbar.

Bestimmung der Ascorbinsäure in Kartoffel-extrakten. Die semiquantitative Bestimmung der Ascorbinsäure in Kartoffel-extrakten wurde mittels einer Vergleichsmethode ausgeführt. Die geringste sichtbare Menge von Ascorbinsäure war bei diesem Verfahren 0,2 µg.

Die Vorteile dieser Methode waren: 1) keine Vorreinigung der Kartoffel-extrakte; 2) kurze Chromatographierzeit (35 Min) und Trock-

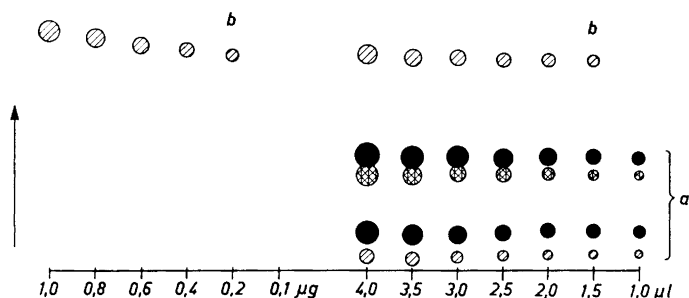


Abb. 1. Dünnschicht-Chromatogram von reiner Ascorbinsäure (links) und von Kartoffeln mit zugesetzter Ascorbinsäure, 10 $\mu\text{g}/100$ g Kartoffeln (rechts). Entwickler: Phosphomolybdänsäure. a: die Flecken treten erst nach 25 Std. bei 20°C hervor; b: visuell identische Konzentration, 0,2 μg Ascorbinsäure.

nungszeit der Scheibe (2 Min) und damit Verminderung der Oxydationsgefahr; 3) Stabilität der entwickelten Flecken, weshalb man mehrere verschiedene Chromatogramme auch noch nach längerer Zeit vergleichen kann.

Spektrophotometrie. 2,6-Dichlorphenol-indophenol (Tillmans Reagenz) 0,0025 M Lösung in Ethanol. 0,1 ml von diesem Reagenz entsprechen 10^{-5} Mol Ascorbinsäure. Probelösungen in 0,5 % Oxalsäure : Methanol: 1:1.

Eichkurven wurden durch Messung bekannter Mengen Ascorbinsäure in derselben Lösung erhalten. 0,2 ml Tillmans Reagenz wurden in eine Beckman-Kuvette (10 mm Schichtdicke) eingepipettiert, die Kuvette in Messposition gebracht und danach 3 ml Probelösung aus einer

Pipette mit abgebrochener Spitze innerhalb von 2 Sek unter Umrühren zugeführt. Die Abnahme der Farbe des Tillmans-Reagenzes wurde während 60 Sek verfolgt. Dieselbe Messung wurde nach 30 Min Einwirkung von Formaldehyd ⁴ wiederholt.

Ergebnisse. Die Ergebnisse sind nur als vorläufig zu betrachten. Abb. 1 zeigt verschiedene Mengen L-Ascorbinsäure auf einer Dünnschicht-Scheibe chromatographiert; Entwickler: Phosphomolybdänsäure. Bei der Analyse von Kartoffelextrakten erhielten wir mit der spektrophotometrischen Methode niedrigere Ascorbinsäurewerte als mit der Dünnschichtmethode.

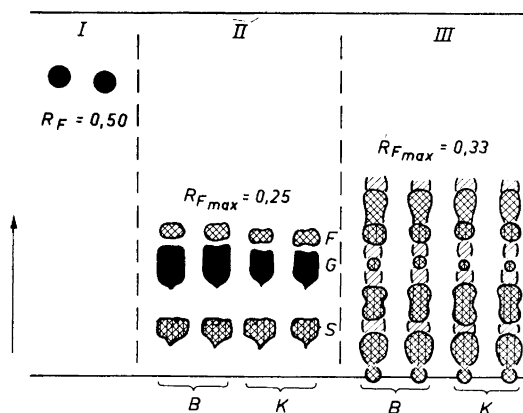


Abb. 2. Ascorbinsäure wird nur mit Phosphomolybdänsäure sichtbar. Entwicklern: I Phosphomolybdänsäure, II Anilinphtalat, III Ninhydrin. B: bestrahlte Kartoffeln; K: unbestrahlte Kartoffeln.

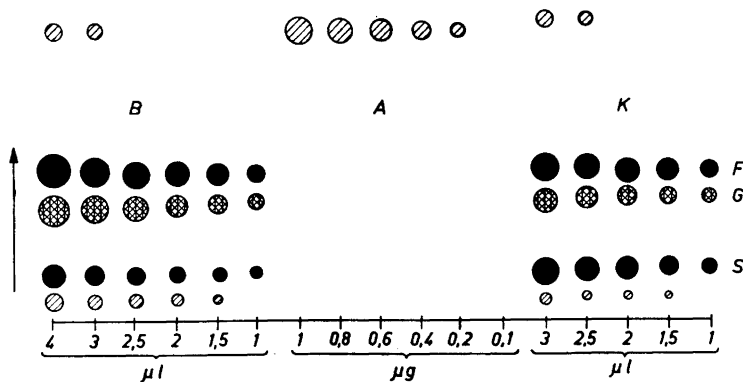


Abb. 3. Vergleich zwischen bestrahlten und unbestrahlten Kartoffeln. B: bestrahlte Kartoffeln
A: Ascorbinsäure; K: unbestrahlte Kartoffeln.

Ausserdem zeigte die spektrophotometrische Methode eine grössere Variationsbreite. Bei der Dünnschichtmethode werden die Störungen durch andere reduzierende Substanzen dadurch eliminiert, dass die Chromatographierungsflüssigkeit die Ascorbinsäure gut von diesen trennt (Abb. 2). Da unsere dünnschicht-chromatographische Methode semiquantitativ ist, können wir bisher nur bestrahlte mit unbestrahlten Kartoffeln vergleichen (Abb. 3).

Bei der untersuchten Kartoffelsorte haben wir bei Gammabestahlung mit 14 000 rad keine Erhöhung der freien Ascorbinsäure 1 Std. nach der Bestrahlung gefunden. Wurden die Kartoffeln mit der niedrigeren Dosenintensität (1400 rad/Std.) bestrahlt (vgl. Schwimmer³), so fanden wir sogar eine um 10 % niedrigeren Ascorbinsäuregehalt 1 Std. nach beendeter Bestrahlung als in entsprechenden unbestrahlten Kartoffeln.

Diskussion. Die vorliegende Untersuchung zeigt, dass es möglich ist mittels Dünnschicht-Chromatographie Ascorbinsäure in biologischem Material (in Kartoffelnollen zumindest) von den die Ascorbinsäurebestimmung störenden anderen Substanzen zu trennen. Damit ist die dünnschicht-chromatographische Bestimmung der Ascorbinsäure der mit anderen Methoden überlegen. Dass bei der Bestimmung von Ascorbinsäure in Pflanzenmaterial grösste Vorsicht geboten ist wenn man sich der 2,6-Dichlorphenol-indophenol-Methode bedient, ist bereits von Lugg⁴ hervorgehoben worden.

Die von uns gefundenen Diskrepanzen gegenüber den Resultaten anderer³ könn-

ten sich einmal dadurch erklären lassen dass verschiedene Kartoffelsorten chemisch und physiologisch unterschiedlich auf Bestrahlung reagieren; zum anderen konnte gezeigt werden^{9,10}, dass Bestrahlung den Gehalt an reduzierenden Substanzen in Kartoffeln erhöht, was zu fehlerhaften Resultaten mit der spektrophotometrischen Methode führen kann. Dies ist besonders der Fall, wenn man die unspezifische Reduktion nicht mittels z.B. Formaldehyd eliminiert.

Es muss jedoch hervorgehoben werden, dass die dünnschicht-chromatographische Methode bisher nur semiquantitative Resultate liefert; ferner können wir nicht mit Sicherheit sagen, weshalb die oben zitierten Forscher kurz nach der Bestrahlung erhöhte Ascorbinsäurewerte fanden. Fernerhin haben wir noch keine Bestimmungen der Dehydroascorbinsäure ausgeführt. Diese Probleme hoffen wir in naher Zukunft lösen zu können.

Die vorliegende Untersuchung wurde mit Unterstützung von *Fonden för främjande av forsknings- och försöksverksamheten på jordbrukets område* durchgeführt.

1. Cotter, D. J. und Sawyer, R. I. *Am. Potato J.* **38** (1961) 58.
2. Salkova, E. J. *Dokl. Akad. Nauk SSSR* **114** (1957) 757.
3. Schwimmer, S., Weston, W. J. und Makower, R. U. *Arch. Biochem. Biophys.* **75** (1958) 425.
4. Lugg, J. W. H. *Austral. J. Exptl. Biol. Med. Sci.* **20** (1942) 273.

5. Evelyn, K. A., Malloy, H. T. und Rosen, C. *J. Biol. Chem.* **126** (1938) 645.
6. Ponting, J. D. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* **15** (1943) 389.
7. Loeffler, H. J. und Ponting, J. D. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* **14** (1942) 846.
8. Sereno, M. N., Highlands, M. E., Cunningham, C. E. und Getchell, J. S. *Maine Agr. Expt. Sta. Bull. No.* **563** (1957).
9. Jaarna, M. *Arkiv Kemi* **13** (1958) 97.
10. Schwimmer, S., Burr, H. K., Harrington, W. O. und Weston, W. J. *Am. Potato J.* **34** (1957) 31.

Eingegangen am 21. Januar 1963.

Adducts of Nickel(II) Diethyldi- thiophosphate with Secondary Ami- nes and Heterocyclic Diimines

CHR. KLIXBÜLL JØRGENSEN,

*Cyanamid European Research Institute,
Cologny (Geneva), Switzerland*

The low-spin purple compound $\text{Ni dtp}_2 = \text{Ni}(\text{S}_2\text{P}(\text{OC}_2\text{H}_5)_2)_2$ forms an addition compound with two molecules of pyridine. The resultant high-spin pale green $\text{Ni dtp}_2\text{py}_2$ was first prepared by W. Conrad Fernelius¹. Mixed dtp^- complexes containing other ligands on the residual places are not well known though ethanol solvates of Co dtp_2 have been detected². Portions of 0.01 M Ni dtp_2 solutions in 1,2-dichloroethane were mixed with various amines in the same solvent. Incidentally, these amines form weak charge-transfer complexes with the solvent³. In the case of aniline, diphenylamine and acetonitrile, the purple colour was not much changed, whereas ethanolamine, diethanolamine, triethanolamine, ethylenediamine, trimethylenediamine and gaseous ammonia produced very pale blue-greenish colours. In the case of the diamines and NH_3 , these colours soon turned pale violet, as characteristic of the high-spin complexes, and precipitates of decomposition products occurred after a few hours.

However, most secondary amines gave very strong yellow or orange colours. A characteristic example is di(butyl)amine which is a quite mediocre ligand, as are most other secondary amines, in aqueous

and alcoholic solution for metallic cations. A solution 0.5 M $(\text{C}_4\text{H}_9)_2\text{NH}$ forms nearly quantitatively the yellow complex with the spectrum given in Table 1. If only 0.1 M $(\text{C}_4\text{H}_9)_2\text{NH}$ is present at 25°C, about equal amounts of the yellow adduct and of Ni dtp_2 occur, *i.e.* the formation constant is roughly 10 litre/mole. When the yellow solutions at higher amine concentration are heated, they turn reversibly purplish grey, showing that the complex is formed under evolution of heat. The occurrence of purple-yellow colour shifts in nickel(II) complexes usually correspond to high-spin — low-spin equilibria^{4,5}. Yet this is hardly the case here since already the purple, original compound is low-spin. The writer believes that the yellow adduct has a distorted 5-coordination comparable to that of mixed nickel(II) arsine-halides^{6,7}. The high intensities, compared to the low intensity of bands¹ of $\text{Ni dtp}_2\text{py}_2$ is a strong argument against any approximately regular octahedral coordination. The absence of any absorption band in the region between 8000 and 13 000 cm^{-1} further on indicates low-spin behaviour.

As seen of Table 1, di(isobutyl) amine shows nearly the same behaviour as di(butyl)amine though the yellow colour is slightly less intense. Diethylamine and di(cyclo-hexyl)amine show yellow-brown colours changing to bright yellow with a great excess of amine. Piperidine, $(\text{CH}_2)_5\text{NH}$, slowly decomposes the complex, forming first a lemon-yellow colour and then nearly colourless crystals. It is seen of Table 1 that this decomposition is slower in more dilute piperidine, and that the yellow adduct must have a remarkably high formation constant (above 200) since it persists at very low concentrations of free amine. In the brownish violet mixtures with unreacted Ni dtp_2 , the bands at 685 $\text{m}\mu$ ($\epsilon = 75$) and 523 $\text{m}\mu$ ($\epsilon = 91$) influences the position of the maxima of the actual mixture, and the half-widths increase. Di(benzyl)amine does not form the yellow adduct as readily as the aliphatic secondary amines. Tertiary amines at 1 molar concentration only seem to give some 20 % of the yellow form. This should not be due to impurities of secondary amines since all the amines and diimines used here are Fluka puriss.

There was not found any sign of interaction between Ni dtp_2 and bromide ions deriving from $\text{N}(\text{C}_4\text{H}_9)_4^+\text{Br}^-$ such as would have been expected of a square-pyramidal NiS_4Br chromophore^{8,12}. Krebs, Weber