



Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein  
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

## ⑫ PATENTSCHRIFT A5

⑪

621 875

⑯ Gesuchsnr.: 13329/73

⑯ Inhaber:  
F. Hoffmann-La Roche & Co. Aktiengesellschaft,  
Basel

⑯ Anmeldungsdatum: 17.09.1973

⑯ Priorität(en): 18.10.1972 US 298680

⑯ Patent erteilt: 27.02.1981

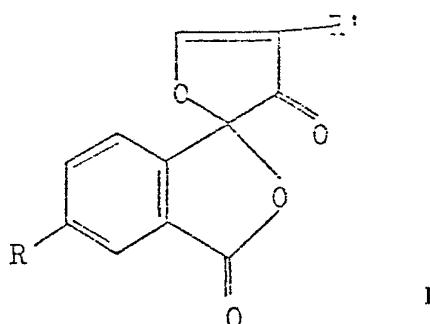
⑯ Patentschrift  
veröffentlicht: 27.02.1981⑯ Erfinder:  
Willy Leimgruber, Montclair/NJ (US)  
Manfred Weigle, North Caldwell/NJ (US)

## ⑯ Verfahren zur Bestimmung von sekundären alpha-Aminosäuren.

⑯ Es wird ein Verfahren und ein Reagens zur schnellen Bestimmung von sekundären  $\alpha$ -Aminosäuren, insbesondere von cyclischen sekundären  $\alpha$ -Aminosäuren, wie Prolin und 4-Hydroxyprolin beschrieben. Das Verfahren besteht darin, dass man die sekundäre  $\alpha$ -Aminosäure in einem wässrigen Medium bei einem pH-Wert zwischen 1 und 4 mit Chlor oder Brom bzw. einem Mittel, welches positives Chlor oder Brom liefert, behandelt. Der pH wird dann auf einen Wert zwischen 6 und 11 eingestellt und das erhaltene primäre Amin mit einer fluorogenen Verbindung der Formel

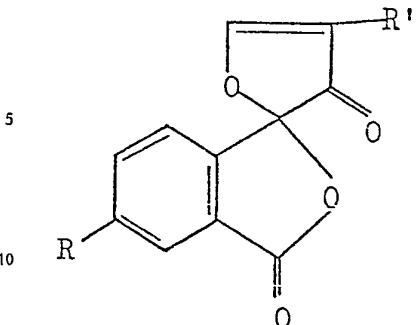
worin R Wasserstoff, Halogen, nieder-Alkyl oder nieder-Alkoxy und R' nieder-Alkyl, Aryl oder Heteroaryl bedeuten,

umgesetzt. Zur Bestimmung wird dann die Fluoreszenz des erhaltenen fluoreszierenden Konjugates gemessen. Das Reagens zur Durchführung der Bestimmung besteht aus einem Mittel, das positives Chlor oder Brom liefert und einer Verbindung der Formel I.

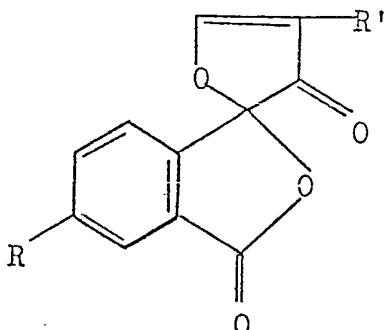


## PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Bestimmung von sekundären  $\alpha$ -Aminosäuren, dadurch gekennzeichnet, dass man
- eine sekundäre  $\alpha$ -Aminosäure in einem wässrigen Medium bei einem pH-Wert zwischen 1 und 4 mit Chlor oder Brom bzw. einem Mittel, welches positives Chlor oder Brom liefert, behandelt,
  - einen pH-Wert zwischen 6 und 11 einstellt,
  - das so erhaltene primäre Amin mit einer fluorogenen Verbindung der Formel



I



I

worin R Wasserstoff, Halogen, nieder Alkyl oder nieder Alkoxy und R' nieder Alkyl, Aryl oder Heteroaryl bedeuten, zu einem fluoreszierenden Konjugat umsetzt, und

- die Fluoreszenz misst.
2. Verfahren nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindung der Formel I 4-Phenyl-spiro[furan-2(3H),1'-phthalan]-3,3'-dion ist.
3. Verfahren nach Patentanspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Mittel, welches positives Chlor liefert, N-Chlorsuccinimid ist.
4. Verfahren nach Patentanspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Mittel, welches positives Brom liefert, N-Bromsuccinimid ist.
5. Verfahren nach Patentanspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass man als Reaktionsmittel in der Stufe a) Brom verwendet.

6. Verfahren nach Patentanspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass in Stufe (a) der pH-Wert 2 ist.

7. Verfahren nach Patentanspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Temperatur zwischen 0° und 30 °C liegt.

8. Verfahren nach Patentanspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass in Stufe (b) der pH-Wert des wässrigen Mediums zwischen 7,5 und 9,5 liegt.

9. Verfahren nach Patentanspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass in Stufe (a), im Vergleich zur sekundären  $\alpha$ -Aminosäure, ein 100- bis 1000facher Überschuss an dem Mittel, welches positives Chlor oder Brom liefert, verwendet wird.

10. Verfahren nach Patentanspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass in Stufe (b) ein Überschuss an fluorogenem Reagenz verwendet wird.

11. Verfahren nach Patentanspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die sekundäre  $\alpha$ -Aminosäure cyclisch ist.

12. Verfahren nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die cyclische sekundäre  $\alpha$ -Aminosäure Prolin ist.

13. Verfahren nach Patentanspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass die cyclische sekundäre  $\alpha$ -Aminosäure 4-Hydroxyprolin ist.

14. Reagenz zur Durchführung des Verfahrens gemäß Patentanspruch 1 enthaltend ein Mittel, welches positives Chlor oder Brom liefert, und eine fluorogene Verbindung der Formel

worin R Wasserstoff, Halogen, nieder Alkyl oder nieder Alkoxy und R' nieder Alkyl, Aryl oder Heteroaryl bedeuten.

15. Reagenz nach Patentanspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindung der Formel I 4-Phenylspiro[furan-2-(3H),1'-phthalan]-3,3'-dion ist.

16. Reagenz nach Patentanspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, dass das Mittel, welches positives Chlor liefert, N-Chlorsuccinimid ist.

17. Reagenz nach Patentanspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, dass das Mittel, welches positives Brom liefert, N-Bromsuccinimid ist.

30 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung einer sekundären  $\alpha$ -Aminosäure durch Umwandlung in ein primäres Amin, anschliessender Reaktion mit bekannten fluorogenen Reagenzien und Messung der Fluoreszenz.

Die qualitative und quantitative Bestimmung von Aminosäuren ist heutzutage eine wichtige Methode unter denjenigen, welche dem Chemiker oder dem Biochemiker zu Verfügung stehen, um biologische Verfahren besser zu verstehen und u. a. die Kenntnisse im Bereich der Diagnose und der Behandlung von Krankheiten zu vergrössern. In vielen Laboratorien ist es üblich geworden, Analysatoren zu verwenden, welche die Untersuchung der Menge und der Verteilung von Aminosäuren in Protein oder Polypeptid enthaltenden Proben ermöglichen. Bis vor kurzem war jedoch der Forscher aufgrund der geringen Empfindlichkeit solcher Aminosäurebestimmungen gezwungen mit relativ grossen Mengen an Probe zu arbeiten.

Kürzlich wurde durch M. Weigle et al., J. Am. Chem. Soc., vol. 94, p. 5927 (1972); S. Udenfriend et al., Third Am. Peptide Symposium, 1972 und W. Leimgruber et al., Belgische Patentschrift Nr. 793 180 eine neue Art von Reagenzien (fluorogene Reagenzien) beschrieben, welche bei Raumtemperatur schnell mit primären Aminogruppen enthaltenden Verbindungen, wie z. B. Aminosäuren und Peptiden, reagieren und fluoreszierende Produkte mit einem sehr hohen Fluoreszenzgrad ergeben.

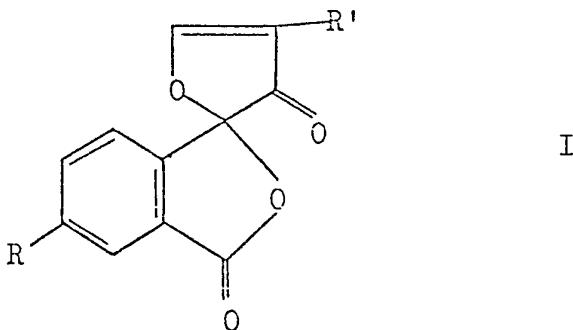
55 Diese Reagenzien ermöglichen die Bestimmung von Mengen an primären Aminogruppen enthaltenden Verbindungen, welche unterhalb eines Mikromoles liegen.

Die in den oben genannten Literaturstellen beschriebene Bestimmungsmethode hat jedoch den Nachteil, dass sekundäre Aminosäuren wie z. B. Prolin und 4-Hydroxyprolin, welche den in der Natur vorkommenden Aminosäuren angehören, nicht bestimmt werden können, weil die fluorogenen Reagenzien nicht direkt mit sekundären Aminosäuren reagieren. Dies beschränkt diese Methode auf die Verwendung für die Bestimmung von primären Aminosäuren.

60 Es war nun der Zweck der vorliegenden Erfindung eine Methode zu schaffen, welche eine schnelle Bestimmung von sekundären Aminosäuren, insbesondere von cyclischen sekun-

dären  $\alpha$ -Aminosäuren wie Prolin und 4-Hydroxyprolin, ermöglicht. Erfindungsgemäß wird eine sekundäre  $\alpha$ -Aminosäure unter sehr milden Bedingungen, z. B. bei Raumtemperatur, in ein primäres Amin überführt, wobei Reagenzien verwendet werden, welche im Überschuss vorhanden sein können und mit der anschliessenden Reaktion zwischen dem entstandenen primären Amin und den fluorogenen Reagenzien oder mit der Bestimmung der gebildeten fluoreszierenden Verbindungen nicht interferieren.

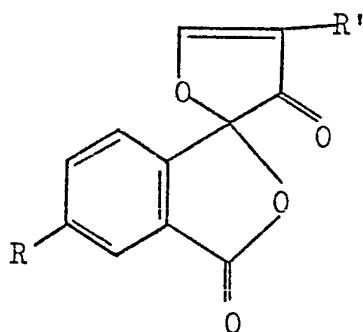
Es hat sich gezeigt, dass sich eine sekundäre  $\alpha$ -Aminosäure mit Hilfe einer durch ein positives Chlor oder Brom lieferndes Mittel verursachten Oxydation-Decarboxylierung-Hydrolyse-Sequenz in ein primäres Amin überführen lässt, wobei anschliessend das erhaltene primäre Amin mit einer fluorogenen Verbindung der Formel



worin R Wasserstoff, Halogen, nieder-Alkyl oder nieder-Alkoxy und R' nieder-Alkyl, Aryl oder Heteroaryl bedeuten, umgesetzt und die gebildete fluoreszierende Verbindung bestimmt werden kann.

Das erfundungsgemässen Verfahren zur Bestimmung von sekundären  $\alpha$ -Aminosäuren ist dadurch gekennzeichnet, dass man (a) diese sekundäre  $\alpha$ -Aminosäure in einem wässrigen Medium bei einem pH-Wert zwischen 1 und 4 mit Chlor oder Brom oder einem Mittel, welches positives Chlor oder Brom liefert, behandelt,

(b) einen pH-Wert zwischen 6 und 11 einstellt,  
(c) das so erhaltene, primäre Amin mit einer fluorogenen Verbindung der Formel



worin R Wasserstoff, Halogen, nieder Alkyl oder nieder Alkoxy und R' nieder Alkyl, Aryl oder Heteroaryl bedeuten, zu einem fluoreszierenden Jtongugat umsetzt, und

d) die Fluoreszenz misst.

Die Erfindung bezieht sich auch auf ein Reagenz zur Durchführung der obigen Methode, enthaltend ein Mittel, welches positives Brom oder Chlor liefert, und eine fluorogene Verbindung der Formel I.

Über den Abbau von sekundären Aminosäuren durch die Behandlung mit verschiedenen N-Bromimiden gibt es bereits Hinweise in der Literatur (Schönberg et al., J. Chem. Soc. (London) 1951, p. 2504). In dieser Publikation wird gezeigt, dass die

Behandlung von verschiedenen cyclischen sekundären  $\alpha$ -Aminosäuren mit N-Bromimiden zur Bildung von Aldehyden führt. In der für diese Umsetzung vorgeschlagenen chemischen Gleichung wurde die Bildung eines primären Amins als Nebenprodukt postuliert, ohne dass jedoch dieser Punkt diskutiert oder experimentell bestätigt wurde.

Die Herstellung der Verbindungen der Formel I wird in der Belgischen Patentschrift Nr. 793 180 beschrieben.

Die Bezeichnung «nieder Alkyl» umfasst einen monovalenten, gesättigten geradkettigen oder verzweigten Kohlenwasserstoffsubstituenten, der bis zu 8 Kohlenstoffatome enthält. Der Ausdruck «nieder Alkoxy» umfasst eine derartige niedere Alkylgruppe, die über einen Äthersauerstoff an das Molekül gebunden ist. Der Ausdruck «Aryl bzw. Heteroaryl» bezieht sich auf Ringsysteme, die mit einem oder mehreren der folgenden Substituenten substituiert sein können: Halogen (Fluor, Chlor, Brom oder Jod), nieder Alkyl, nieder Alkoxy, Nitro, Cyan usw. Als Beispiele für solche Gruppen können genannt werden: Phenyl, Naphthyl, Furyl, Thienyl, Pyrrolyl, Imidazolyl, Pyridyl, Pyrimidinyl, Indolyl, Chinolyl, Oxazolyl, Isoxazolyl usw. Eine besonders bevorzugte Verbindung der Formel I ist diejenige, worin R Wasserstoff und R' Phenyl ist, d. h. 4-Phenyl-spiro[furan-2(3H),1'-phthalan]-3,3'-dion.

Im ersten Teil der erfundungsgemässen Bestimmungsme-  
25 thode wird eine sekundäre  $\alpha$ -Aminosäure zu einem primären Amin abgebaut. Dieser Abbau erfolgt durch Halogenierung (Oxydation) mit Chlor oder Brom bzw. mit Hilfe eines Mittels, welches positives Chlor oder Brom liefert. Geeignete Halogenierungsmittel sind die betreffenden Halogene selbst, d. h.  
30 Chlor und Brom, N-Chlor- oder N-Bromimide und N-Chlor- oder N-Bromamide. Als Beispiele für die letztgenannten Reagenzien können N-Chlorsuccinimid, N-Bromsuccinimid, N-Bromacetamid, N-Bromphthalamid erwähnt werden.

Die Halogenierung wird in einem pH-Bereich von 1 bis 4, 35 vorzugsweise bei einem pH-Wert von 2 durchgeführt. Auf diese Weise erfolgt die Reaktion mit äusserster Schnelligkeit unter milden Bedingungen. Es wird bevorzugt, die Reaktion bei einer Temperatur zwischen 0° und 30 °C durchzuführen, wobei Zimmertemperatur ganz besonders bevorzugt wird. Dies hat zur Folge, dass das erfundungsgemässen Verfahren sich sehr gut für die automatische Bestimmung von Aminosäuren eignet.

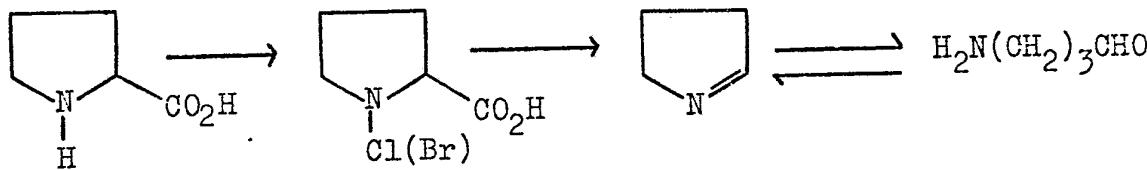
Für die Halogenierung von cyclischen sekundären  $\alpha$ -Aminosäuren, wie Prolin oder 4-Hydroxyprolin werden mit Vorteil N-Chlorsuccinimid oder N-Bromsuccinimid als Chlor oder 45 Brom lieferndes Mittel verwendet. Für die Halogenierung von acyclischen sekundären  $\alpha$ -Aminosäuren wie Sarcosin (N-Methylglycin) wird mit Vorteil das Halogen selbst verwendet, wobei Brom besonders bevorzugt ist.

Die Halogenierungsreaktion wird mit Vorzug in einem wässrigen Milieu durchgeführt. Dies weil bei einer Aminosäurebestimmung die sekundären  $\alpha$ -Aminosäuren von einer Chromatographiesäule normalerweise in wässriger Lösung eluiert werden. Weiter sind die Mittel, welche aktives Chlor oder Brom liefern, genügend wasserlöslich, um die Herstellung von Vorratslösungen zur Reaktion mit Aminosäuren zu ermöglichen. Um einen maximalen Abbau der sekundären  $\alpha$ -Aminosäure zu erreichen, wird es bevorzugt, das Mittel, welches aktives Chlor oder Brom liefert, im Überschuss zu verwenden. Besonders geeignet ist ein 100- bis 1000facher Überschuss. Es wurde überraschend festgestellt, dass ein derartiger Überschuss mit der anschliessenden Reaktion und Fluoreszenzmessung nicht interferiert.

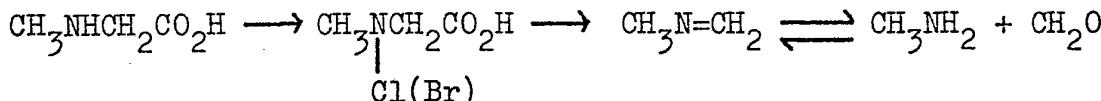
In der Oxydation-Decarboxylierung-Hydrolyse-Sequenz wird angenommen, dass die erste Stufe die N-Halogenierung der sekundären  $\alpha$ -Aminosäure ist, und anschliessend Kohlendioxyd und das Halogen freigesetzt werden, wobei ein Imin erhalten wird. Die wässrige Hydrolyse des Imins zum freien primären Amin erfolgt zweckmässigerweise in einem neutralen

oder alkalischen Milieu. Es ist dementsprechend notwendig, um eine optimale Menge an freiem primären Amin in Lösung zu erhalten, den pH-Wert zwischen 6 und 11, vorzugsweise zwischen 7,5 und 9,5 einzustellen.

Der angenommene Reaktionsverlauf wird nachstehend am Beispiel von Prolin erläutert.



In diesem Falle ist ersichtlich, dass das Imin  $\Delta^1$ -Pyrrolin ist und in Anwesenheit von Wasser mit dem entsprechenden  $\alpha$ -Aminoaldehyd im Gleichgewicht steht. Im Falle einer acyclischen Aminosäure ergibt die Reaktion des erhaltenen Imins



Es ist zu bemerken, dass die oben erwähnten Reaktionen auch mit primären  $\alpha$ -Aminosäuren erfolgen. In diesem Falle wird jedoch Ammoniak gebildet. Ammoniak reagiert mit den fluorogenen Verbindungen der Formel I unter Bildung von Reaktionsprodukten, die, im Vergleich zu denjenigen welche mit primären Aminen erhalten werden, einen sehr niedrigen Fluoreszenzgrad aufweisen. Aus diesem Grund können mit der erfundungsgemässen Methode sekundäre  $\alpha$ -Aminosäuren auch in Gegenwart von primären  $\alpha$ -Aminosäuren bestimmt werden und dies ohne wirkliche Störung durch die Letzteren.

In der nächsten Stufe der erfundungsgemässen Methode wird das durch die Oxydation-Decarboxylierung-Hydrolyse-Sequenz gebildete primäre Amin mit der fluorogenen Verbindung der Formel I, vorzugsweise mit 4-Phenylspiro[furan-2(3H),1'-phthalan]-3,3'-dione, umgesetzt. Wie in der am Anfang der Beschreibung erwähnten Literatur beschrieben, wird die Reaktion von primären Aminen mit den Verbindungen der Formel I zur Bildung von fluoreszierenden Produkten, vorzugsweise in einem schwach alkalischen Milieu durchgeführt. In diesem Zusammenhang ist zu bemerken, dass in der bereits erwähnten Oxydation-Decarboxylierung-Hydrolyse-Sequenz der pH-Wert schon zwischen 6 und 11, vorzugsweise zwischen 7,5 und 9,5 gehalten wird, so dass keine oder nur eine geringe Einstellung des pH-Wertes notwendig ist. In der letzten Stufe wird die Fluoreszenz des Reaktionsproduktes des primären Amins mit einem Überschuss an einer Verbindung der Formel I – wie in der Literatur beschrieben – gemessen.

Es wurde überraschend festgestellt, dass die Intensität der Fluoreszenz dieser Reaktionsprodukte von der Konzentration der ursprünglich vorhandenen sekundären  $\alpha$ -Aminosäure linear abhängig ist, und dass die erfundungsgemässen Methode die qualitative und quantitative Bestimmung von sehr kleinen Mengen an sekundären  $\alpha$ -Aminosäuren ermöglicht. So konnte zum Beispiel, durch die erwähnte Oxydation-Decarboxylierung-Hydrolyse-Methode, die anschliessende Reaktion mit einer fluorogenen Verbindung der Formel I und Fluoreszenzmessung, Prolin in Konzentrationen zwischen 0,1 und 1,0 nanomol qualitativ und quantitativ bestimmt werden. Die Empfindlichkeit liegt somit in der Größenordnung derjenigen, welche bei den in der Literatur beschriebenen Bestimmungen von primären Aminen festgestellt wurde.

Es wurde überraschenderweise gefunden, dass weder Nebenprodukte (z. B. Aldehyde) noch ein Überschuss an Reagenzien auf die Messung der Fluoreszenz einwirken.

Es ist ebenfalls zu bemerken, dass die erfundungsgemässen

mit Wasser zwei verschiedene Verbindungen, einen Aldehyd und ein Amin. Dies wird nachstehend am Beispiel von Sarcosin, wo Methylamin und Formaldehyd gebildet werden, illustriert.

Methode auch zur Bestimmung von sekundären  $\alpha$ -Aminosäuren, in papierchromatographischen oder dünnsschichtchromatographischen Systemen verwendet werden kann. Bei einer solchen Technik wird nicht – wie bereits beschrieben – völlig in Lösung operiert, sondern es werden die verschiedenen Reagenzien nacheinander auf das papier- oder dünnsschichtchromatographische System, vorzugsweise als ein Spray, appliziert. Nach der Reaktion mit dem fluorogenen Reagenz wird das Papier- oder Dünnsschichtchromatogramm unter einer Fluoreszenzlichtquelle überprüft.

Die erfundungsgemäss Methode ist auch geeignet zur Verwendung bei der automatischen Analyse von Mischungen, welche sowohl primäre als sekundäre  $\alpha$ -Aminosäuren enthalten. Die Aminosäuren werden in einer chromatographischen Kolonne getrennt, wobei ein kontinuierlich ausfliessender Probenstrom erhalten wird, worin die verschiedenen Aminosäuren in einer bekannten Reihenfolge und mit einem fixierten Zeitabstand zum Vorschein kommen. Dieser Probenstrom wird kontinuierlich zur Bildung von fluoreszierenden Produkten reagieren gelassen und die entstehende Fluoreszenz wird gemessen.

So werden z. B. in einer Ausführungsform der erfundungsgemässen Methode die primären  $\alpha$ -Aminosäuren in dem aus der chromatographischen Kolonne ausfliessenden Eluat – wie in der Literatur beschrieben – nach Einstellung des pH-Wertes kontinuierlich mit den fluorogenen Verbindungen der Formel I umgesetzt. Der Teil des ausfliessenden Eluats, welcher die sekundären  $\alpha$ -Aminosäuren, insbesondere Prolin und 4-Hydroxyprolin enthält, kann – vorzugsweise automatisch – abgezweigt und unter sauren Bedingungen mit einem Mittel, welches aktives Chlor oder Brom liefert, behandelt werden. Anschliessend wird der abgezweigte Probenstrom wieder in den Hauptstrom geleitet, der pH-Wert eingestellt und die Reaktion mit dem fluorogenen Reagenz der Formel I durchgeführt. Die auf diese Weise entstandene Fluoreszenz wird kontinuierlich mit Hilfe eines Fluoreszenzphotometers, gemessen.

Man kann ohne weiteres auch sekundäre  $\alpha$ -Aminosäuren in Gegenwart von primären  $\alpha$ -Aminosäuren bestimmen. In diesem Fall werden die primären  $\alpha$ -Aminosäuren bei einem ersten Durchströmen der chromatographischen Kolonne und des Fluorometers in üblicher Weise bestimmt, während die sekundären  $\alpha$ -Aminosäuren bei diesem ersten Durchströmen nicht erfasst werden. Anschliessend wird die Kolonne ein zweites Mal durchflossen (als Alternative kann ein vom ersten Durchgang abgezweigter Strom verwendet werden) und das Eluat oder ein Teil davon wird kontinuierlich unter sauren Bedingungen mit

einem Mittel, welches aktives Chlor oder Brom liefert, behandelt. Anschliessend wird der pH-Wert eingestellt und die Reaktion mit dem fluorogenen Reagenz der Formel I durchgeföhrt. Die entstandene Fluoreszenz wird kontinuierlich gemessen. In dieser Methode werden – wie bereits erwähnt – die in dem zweiten Durchgang oder in dem abgezweigten Strom vorhandene primären  $\alpha$ -Aminosäuren zu Ammoniak abgebaut, während die sekundären  $\alpha$ -Aminosäuren, wie z. B. Prolin und 4-Hydroxyprolin, zu primären Aminen abgebaut werden, deren Reaktionsprodukte mit Verbindungen der Formel I fluorometrisch gemessen werden können.

Mit Hilfe einer der oben beschriebenen oder für den Fachmann naheliegenden Methode können sehr kleine Mengen in der Natur vorkommender primäre und sekundäre  $\alpha$ -Aminosäuren qualitativ und quantitativ bestimmt werden.

#### Beispiel 1

Zu einer 1 ml Probe von Prolin (0,4 bis 4,0 nmol/ml) in einem Puffer von pH-Wert 2 werden, in einem Abstand von 10 Sekunden, die folgenden Lösungen nacheinander zugegeben.

- (a) 1 ml wässriges N-Chlorsuccinimid ( $4 \times 10^{-4}$  M);
- (b) 1 ml einer 2%igen Natriumbicarbonatlösung; und
- (c) 1 ml einer Lösung von 4-Phenylspiro[furan-2(3H),1'-phthalan]-3,3'-dion ( $2 \times 10^{-3}$  M) in Aceton.

Die Fluoreszenz wird zwei Minuten nach Zugabe des letzten Reagenzes gemessen (Anregung 390 nm, Fluoreszenzstrahlung, 475 nm). Man erhält die nachstehend aufgeführten Ergebnisse, wobei die Fluoreszenz in arbiträren, in Bezug auf die Blindprobe korrigierten Einheiten angegeben ist (100 entspricht der Fluoreszenz, welche man mit 10 nmol/ml Prolin erhält). Die mit «Konzentration von Prolin» bezeichnete Kolonne entspricht dem Viertel der Konzentration von Prolin in der Probe (Korrektur wegen der Zugabe von 3 ml Reagenzien).

Konzentration von Prolin (nmol/ml)	Relative Fluoreszenz
0,1	1,2
0,2	2,0
0,4	4,0
0,6	6,2
0,8	7,8
1,0	10,0

#### Beispiel 2

In Analogie zu Beispiel 1 werden, unter Verwendung von 1 ml Proben, welche 4,0 bis 40,0 nmol/ml Prolin enthalten, die folgenden Daten erhalten:

Konzentration von Prolin (nmol/ml)	Relative Fluoreszenz
1,0	10
2,0	21
4,0	40
5,0	48
6,0	58
8,0	80
10,0	100

#### Beispiel 3

In Analogie zu Beispiel 1, jedoch unter Verwendung von 1 ml Proben, welche 4,0 bis 40,0 nmol/ml 4-Hydroxyprolin enthalten, werden die folgenden Daten erhalten:

Konzentration von 4-Hydroxyprolin (nmol/ml)	Relative Fluoreszenz
5	4
2,0	9
3,0	13
4,0	17
5,0	21
6,0	26
7,0	31
8,0	35
9,0	39
10,0	43

#### Beispiel 4

In Analogie zu Beispiel 1, jedoch unter Verwendung von 1 ml Proben, welche 4,0 bis 40,0 nmol/ml Sarcosin enthalten und 20 1 ml  $2 \times 10^{-3}$  M Bromwasser anstatt N-Chlorsuccinimid, werden die folgenden Daten erhalten:

Konzentration von Sarcosin (nmol/ml)	Relative Fluoreszenz
1,0	5
2,0	8
3,0	12
4,0	17
5,0	19
6,0	24
7,0	29
8,0	34
9,0	39
10,0	42

#### Beispiel 5

Die in Beispiel 1 bis 4 beschriebenen Bestimmungen können wiederholt werden, indem man das 4-Phenylspiro[furan-2(3H),1'-phthalan]-3,3'-dion durch die folgenden Verbindungen der Formel I ersetzt:

R	R'
Wasserstoff	2-Methoxyphenyl
Wasserstoff	3-Methoxyphenyl
Wasserstoff	4-Methoxyphenyl
Wasserstoff	2,4-Dimethoxyphenyl
Wasserstoff	2,5-Dimethoxyphenyl
Wasserstoff	3,5-Dimethoxyphenyl
Wasserstoff	3,4,5-Trimethoxyphenyl
Wasserstoff	2,4,5-Trimethoxyphenyl
Wasserstoff	3,4-Methylendioxyphenyl
Wasserstoff	3-Chlorphenyl
Wasserstoff	4-Chlorphenyl
Wasserstoff	4-Bromphenyl
Wasserstoff	3-Indolyl
Wasserstoff	2-Naphthyl
Wasserstoff	1-Naphthyl
Methyl	n-Propyl
Butyl	Phenyl
Methoxy	Phenyl
Chlor	Phenyl

## Beispiel 6

Verschiedene Mengen (2,5 bis 10,0  $\mu$ l) einer Lösung von Prolin (100 Picomole/ $\mu$ l) in 0,01 M HCl (oder in einem Puffer vom pH-Wert 2) werden bei 60 °C über eine Kolonne (2,7 mm  $\times$  50 cm) enthaltend Durrum DC-4A-Harz mit 0,2 M Citratpuffer vom pH-Wert 3,28 eluiert. Der Durchfluss ist 7 cc/Stunde. Dem Eluat wird eine Lösung von  $10^{-4}$  Mol N-Chlorsuccinimid in 0,025 Mol HCl kontinuierlich zugegeben (Durchfluss 6 cc/Stunde). Nach Durchströmen einer kleinen Mischspule wird dieser Mischung einen 0,1 M Boratpuffer vom pH-Wert 9,7 zugesetzt (Durchfluss 20 cc/Stunde). Nach Durchlaufen einer kleinen Mischspule wird die Mischung (pH-Wert 8,5) mit

einer Lösung von 150 mg/l 4-Phenylspiro[furan-2(3H),1'-phthalan]-3,3'-dion in Aceton (Durchfluss 20 cc/Stunde) behandelt. Nach Durchlaufen einer kleinen Mischspule wird die Lösung durch eine Durchflussküvette zur kontinuierlichen Messung der Fluoreszenz geführt (Anregung 390 nm, Fluoreszenzstrahlung 475 nm).

Die gesamte Fluoreszenz, welche mit einer bestimmten Probe erhalten wird, ist direkt zur gesamten Menge an Prolin in dieser Probe proportional.

Die oben erwähnte Methode kann mit Proben, welche 4-Hydroxyprolin enthalten, wiederholt werden.