

Über den Gehalt der Proteine an l-Tyrosin und die Genauigkeit der Bestimmung dieser Aminosäure.

Von

Emil Abderhalden und Dionys Fuchs.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Halle a. S.)

(Der Redaktion zugegangen am 8. Februar 1913.)

Vor kurzem haben Otto Folin und W. Denis¹⁾ eine neue Methode mitgeteilt, um den Gehalt der Eiweißstoffe und anderer tyrosinhaltiger Verbindungen an Tyrosin indirekt mittels einer Farbreaktion zu bestimmen. Sie verwenden als Reagens eine Lösung, die 10% Natriumwolframat, 2% Phosphormolybdänsäure und 10% Phosphorsäure enthält. Zu seiner Bereitung werden 100 g Natriumwolframat in 750 g Wasser gelöst und 20 g Phosphormolybdänsäure und 50 ccm 85%ige Phosphorsäure zugegeben. Das Gemisch wird 2 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Dann läßt man abkühlen und verdünnt auf 1 l. 2 ccm dieses Reagenses geben mit 1 mg Tyrosin die intensivste Färbung.

Folin und Denis haben unter Verwendung dieses Reagenses festgestellt, daß alle bisherigen Angaben über den Gehalt der Proteine — soweit sie selbst Nachprüfungen vorgenommen haben — unrichtig sind, und zwar soll der wahre Gehalt an dieser Aminosäure ein viel höherer sein. Folin und Denis stellen die von ihnen erhaltenen Werte denen gegen-

¹⁾ Otto Folin and W. Denis, Tyrosine in proteins determined by an new colorimetric method. The Journal of biological Chemistry, Vol. XII, p. 245, 1912.

über, die von anderen Autoren gewonnen worden sind. Die Unterschiede sind ganz gewaltig.

Folin und Denis diskutieren selbst die Möglichkeit, daß ihre Methode Werte ergeben könnte, die nicht nur durch den Gehalt eines bestimmten Proteins an Tyrosin bedingt sind. Sie glauben aber ausschließen zu können, daß in den Proteinen Verbindungen vorkommen, die die gleiche Färbung mit ihrem Reagens liefern. Ferner haben die genannten Forscher versucht, Tyrosin aus Schafwolle in der üblichen Weise durch Krystallisation abzuscheiden: Sie kommen zum Resultate, daß es nicht gelingt, auf diese Weise das gesamte Tyrosin zu gewinnen.

Wir haben uns nun die Frage vorgelegt, ob die von Folin und Denis vorgeschlagene kolorimetrische Methode wirklich einwandfrei gestattet, das Tyrosin in Proteinen genau zu bestimmen. Wir stellten fest, daß das Folin-Denissche Reagens auch mit Oxytryptophan unter Bildung eines zunächst grünblauen und bald tiefblau werdenden Farbstoffs reagiert. Ferner gibt Tryptophan auch eine Färbung. Sie ist zunächst grünblau, sie wird jedoch immer mehr rein blau. Folin und Denis haben somit ohne Zweifel neben Tyrosin auch das Oxytryptophan und das Tryptophan mitbestimmt. Die von ihnen angegebenen Werte für den Gehalt verschiedener Proteine an Tyrosin sind deshalb zu hoch und aus den angeführten Gründen nicht verwertbar.

Wir müssen Folin und Denis insofern beipflichten, als es oft wirklich außerordentlich schwierig ist, das Tyrosin quantitativ durch einfache Krystallisation abzutrennen. Manchmal gelingt es relativ leicht, eine Mutterlauge zu erhalten, die auch bei starker Konzentration keine Spur einer Rotfärbung mit Millons Reagens mehr gibt. In anderen Fällen gibt die Mutterlauge eine intensive Rotfärbung, ohne daß es zur Abscheidung von Tyrosin kommt, ja man kann unter Umständen das ganze Leucin mit anderen Aminosäuren abtrennen und behält dabei das Tyrosin in der Mutterlauge. Es ist einige Male geglückt, die Ursache dieser Erscheinung aufzuklären. Mehrmals kam es vor, daß die Lösungen, die in großen Schalen eingeeengt wurden, aus der Laboratoriumsluft Säuren oder

Ammoniakdämpfe aufnehmen, wodurch ohne Zweifel in manchen Fällen Tyrosin am Auskrystallisieren verhindert wurde. Wir haben deshalb begonnen, stets zur Abscheidung des Tyrosins unter vermindertem Druck einzudampfen. Die Resultate sind seitdem viel bessere. Vor allem bleiben die Lösungen farblos resp. sie behalten die leichte Gelbfärbung bei. Dampft man dagegen in offenen Schalen ein, dann erhält man fast immer dunkel gefärbte Lösungen.

Ein viel interessanterer Grund für das Ausbleiben der Auskrystallisation ganz erheblicher Tyrosinmengen ist die offenbar salzartige Verbindung von Tyrosin mit basischen Bausteinen der Proteine. Emil Fischer und der eine von uns (A.) haben eine solche Verbindung zwischen Tyrosin und Lysin beobachtet. Der eine von uns (A.) hatte wiederholt Gelegenheit festzustellen, daß Tyrosin aus stark eingengten Mutterlaugen nicht auskrystallisierte, trotzdem Millons Reagens eine tiefrote Färbung ergab. Wurde dann das Gemisch stark verdünnt und die Lösung mit Phosphorwolframsäure gefällt, dann ließ sich aus dem Filtrat der Fällung das Tyrosin ohne weiteres auskrystallisieren. Ja oft genügt ein vollständiges Einengen der tyrosinreichen Mutterlauge und ein wiederholtes Abdampfen mit Alkohol, um das Tyrosin nun leicht durch Weglösen der übrigen Aminosäuren mit kaltem Wasser zurückzubehalten.

Ausgehend von diesen Erfahrungen haben wir es unternommen, zu prüfen, ob es möglich ist, der Gelatine zugesetztes Tyrosin wieder zu gewinnen. Wir nahmen tyrosinfreie Gelatine und lösten diese in der fünffachen Menge 25%iger Schwefelsäure, gaben eine bestimmte Menge reines Tyrosin hinzu und kochten nun 20 Stunden am Rückflußkühler. Nun wurde die Schwefelsäure quantitativ mit Baryt entfernt. Der Baryumsulfatniederschlag wurde solange mit Wasser ausgekocht, bis das Kochwasser mit einer 1%igen wässrigen Lösung von Triketohydrindenhydrat (Ninhydrin) keine Violettblaufärbung mehr gab. Es zeigte sich, daß diese Reaktion noch lange positiv blieb, nachdem das Millonsche Reagens keine Färbung mehr ergeben hatte. In Zukunft wird man das Auskochen solcher Niederschläge besser mit Ninhydrin als mit Millons Reagens kontrollieren.

Alle Filtrate wurden vereinigt und bei 45° unter vermindertem Druck eingengt. Von Zeit zu Zeit prüften wir wieder, ob auch die Lösung wirklich frei von Schwefelsäure und Baryt war. Es gelang auf diese einfache Weise, wiederholt bis 90% des zugesetzten Tyrosins in völlig reinem Zustande zu gewinnen. In andern Fällen dagegen betrug die Ausbeute nur 60—70%. Besonders ungünstig wurden die Ausbeuten immer, wenn zum Einengen nicht das Vakuum benutzt wurde. Schließlich haben wir die Versuche, wie folgt, durchgeführt. Nach erfolgter Hydrolyse mit Schwefelsäure wurde das Hydrolysat so lange mit Wasser verdünnt, bis es noch 2,5% Schwefelsäure enthielt. Jetzt fällten wir mit einer 10%igen Lösung von Phosphorwolframsäure. Der Zusatz erfolgte sehr vorsichtig unter beständigem Rühren. Jeder Überschuß des Fällungsmittels wurde vermieden. Vom Niederschlag wurde abgenutscht. Den Filtrerrückstand wuschen wir mit kaltem Wasser gründlich aus. Er wurde dann noch mehrmals in der Reibschale mit Wasser durchgerieben und wieder auf die Nutsche gebracht. Die gesamten Filtrate wurden vereinigt und mit Baryt von der vorhandenen Phosphorwolframsäure befreit. Auch dieser Niederschlag wurde gründlich gewaschen. Wieder wurden alle Filtrate vereinigt und nun der überschüssige Baryt genau mit Schwefelsäure entfernt. Den Baryumsulfatniederschlag wuschen wir solange mit heißem Wasser aus, bis das abfließende Waschwasser keine Spur einer Violettfärbung beim Kochen mit Ninhydrin mehr gab.

Nun wurde bei 40° unter vermindertem Druck eingengt. Die ausfallenden Krystalle wurden abfiltriert. Wir gewannen eine größere Anzahl von Krystallfraktionen. Es wurde solange fraktioniert, bis die Mutterlauge mit Millons Reagens keine Färbung mehr gab. Sämtliche Fraktionen wurden dann vereinigt und in heißem Wasser gelöst. Nach Zugabe von Tierkohle wurde gekocht, bis eine abfiltrierte Probe absolut klar war. Die Tierkohle wurde nach erfolgtem Abfiltrieren so lange mit Wasser ausgekocht, bis das Kochwasser mit Ninhydrin nicht mehr reagierte.

Die erhaltenen Resultate sind in folgender Übersicht zusammengestellt:

Versuch	Zugesetzt zu 100 g Gelatine g Tyrosin	Ausbeute an Roh- tyrosin g	Ausbeute an analysen- reinem Tyrosin g
I.	1,0	2,4	0,95
II.	1,5	3,5	1,42
III.	1,0	4,8	0,98
IV.	0,5	2,5	0,49
V.	2,0	5,5	1,89
VI.	1,0	2,8	0,96
VII.	1,0	4,6	0,99

Die Ausbeute an Rohtyrosin bedeutet jene Krystallmassen, die sich beim Einengen abschieden und mit Millons Reagens reagierten. Man konnte meist zunächst ca. 60% an reinem Tyrosin gewinnen. Dann folgten Krystallfraktionen, die wenig Tyrosin und viele andere Aminosäuren, wie Leucin enthielten. Das reine Tyrosin, dessen Ausbeute angegeben ist, wurde jedesmal in der Gesamtheit pulverisiert und dann eine Probe zur Analyse genommen.

Analysenresultate: C- und N-Bestimmung:

I.	4,820 mg Substanz:	2,64 mg H ₂ O und	10,48 mg CO ₂
II.	4,028 »	2,22 »	8,78 »
III.	3,144 »	1,72 »	6,88 »
IV.	3,415 »	1,83 »	7,45 »
V.	4,474 »	2,52 »	9,78 »
VI.	4,430 »	2,33 »	9,65 »
VII.	0,1443 g	0,0777 g	0,3161 g

N-Bestimmung:

I.	2,58 mg Substanz:	0,179 ccm N (714 mm, 17°)
II.	2,898 »	0,203 » (709 » 19°)
III.	4,15 »	0,288 » (710 » 19°)
IV.	3,14 »	0,220 » (716 » 18°)
V.	3,65 »	0,249 » (716 » 16°)
VI.	6,12 »	0,418 » (716 » 17°)
VII.	0,1625 g	10,5 » (770 » 18°)

Berechnet für Tyrosin: $C_9H_{13}NO_3$:	59,64%	C, 6,12%	H, 7,74%	N
Gefunden: I.	59,30%	> 6,13%	> 7,67%	>
II.	59,45%	> 6,16%	> 7,62%	>
III.	59,68%	> 6,12%	> 7,58%	>
IV.	59,50%	> 6,00%	> 7,74%	>
V.	59,62%	> 6,30%	> 7,59%	>
VI.	59,41%	> 5,89%	> 7,57%	>
VII.	59,74%	> 6,02%	> 7,56%	>

Aus den vorliegenden Daten geht hervor, daß man unter Innehaltung der gegebenen Vorschriften bei exaktem Arbeiten dem Leim zugesetztes Tyrosin in guter Ausbeute wieder gewinnen kann. Unsere Erfahrungen zeigen, daß es wohl möglich ist, das Tyrosin durch einfache Krystallisation so abzutrennen, daß die Mutterlauge auch nach starker Konzentration keine Reaktion mit Millons Reagens mehr gibt. Im Gegensatz zu Folin und Denis glauben wir, daß es möglich ist, auf dem beschriebenen Wege und oft auch ohne die Fällung mit Phosphorwolframsäure das gesamte Tyrosin zu gewinnen. Dagegen stimmen wir Folin und Denis und ferner auch Osborne darin vollkommen zu, daß die meisten bisher veröffentlichten Tyrosinbestimmungen nicht mit der erforderlichen Sorgfalt ausgeführt sind. Die Bestimmung des Gehaltes eines Proteins an Tyrosin erfordert viel Aufmerksamkeit und von Fall zu Fall besondere Maßnahmen, um Verluste durch das in Lösung bleibende Tyrosin zu verhindern. Die kolorimetrische Methode von Folin und Denis vermag die Bestimmung des Tyrosins durch Krystallisation nicht zu ersetzen, weil sie auch andere Aminosäuren nachweist und infolgedessen zu hohe Werte liefert.