

Welchen Anteil haben Tyrosin und Tryptophan an dem Farbeffekt bei den beiden Phasen der Xanthoproteinsäurereaktion?

Von
Carl Th. Mörner.

(Der Redaktion zugegangen am 27. Juni 1919.)

Als bei der Xanthoproteinsäurereaktion koloristisch wirksame Proteinstoffkomponenten hat man Tyrosin (seit lange bekannt) und Tryptophan (von Abderhalden und Kempe¹⁾ hervorgehoben) in Betracht zu ziehen, während Phenylalanin und alle übrigen bisher bekannten Proteinstoffbausteine hierbei ohne Einfluß sind. Daß, ceteris paribus, die Farbe bei der ersten, sauren Phase (im folgenden als „Phase a“ bezeichnet) schwächer und mehr reingelb als bei der späteren, alkalischen (im folgenden als „Phase b“ bezeichnet) mit ihrer mehr ins Orange gehenden Farbe erscheint, ist gleichfalls zur Genüge von den unzähligen Gelegenheiten her bekannt, wo die Xanthoproteinsäurereaktion an diesem oder jenem Proteinstoff ausgeführt worden ist. Wie Tyrosin und Tryptophan — je für sich und miteinander verglichen — sich rücksichtlich der Qualität und Quantität der Färbung bei den zwei Phasen der Xanthoproteinsäurereaktion verhalten, dürfte dagegen zuvor nicht Gegenstand einer Untersuchung gewesen sein, weshalb eine solche nun angestellt worden ist.

Von den beiden Stoffen wurden farblose, sorgfältig umkristallisierte Präparate verwendet, die vom Verf. aus Fibrin bzw. Kasein hergestellt worden waren; mit Hilfe von N/20 Salpetersäure wurden vollständig klare Lösungen, 1,0 g in 1 Liter enthaltend, bereitet. Die bei sämtlichen Versuchen angewandte Salpetersäure (spez. Gew. 1,12 = 20%ig) war chlorfrei und, durch vom Verf. ausgeführte Umdestillierung, von jeder Spur nichtflüchtiger Stoffe (Schwefelsäure usw.)

¹⁾ Diese Zeitschr. Bd. 52, S. 207—218 (1907).

befreit. Die Erwärmung der Reaktionsmischungen ging in ausgewählten, gleichgroßen Probierröhren (17×150 mm) vor sich, die eine gewisse Zeit hindurch in ein völlig kochendes, geräumiges Wasserbad niedergetaucht gehalten wurden; durch Anbringung in einem geeigneten Gestell konnten mehrere Probierröhren gleichzeitig in das Wasserbad niedergesenkt und herausgenommen werden, um sogleich danach rasch auf 15° mittelst Eintauchens in kaltes Wasser abgekühlt zu werden. Zur kolorimetrischen Untersuchung wurde ein Instrument von A. Krüss (Opt. Institut, Hamburg) verwendet. Wenn, wie es zu vereinzelt Malen der Fall war, die 100 Teilstriche (je 1 mm) umfassende Skala des Instruments nicht ausreichte, wurde direkte Messung der über den 100 mm-Strich liegenden Partie mittelst Millimetermaßstabes vorgenommen. Bei Werten, die unter dem Teilstrich 10 lagen, wurde, durch „Schätzung“, Ablesung in $\frac{1}{10}$ mm ausgeführt. Die im folgenden angegebenen Zahlenwerte stellen stets Mittel aus mindestens zwei Ablesungen dar.

Nachdem — mit Rücksicht teils auf die Kapazität der beiden Flüssigkeitsgefäße des Kolorimeters¹⁾, teils auf die für die Beobachtung überhaupt geeignete Latitude der Farbenstärke — festgestellt worden war, daß eine für die Versuche zweckmäßige Menge von Tyrosin bzw. Tryptophan 0,005 g war, welche Menge daher konstant zur Anwendung kam, wurden, in großer Anzahl, Versuchsreihen mit wechselnder Menge von Salpetersäure (0,5—5,0 ccm)²⁾ in der Reaktionsmischung (diese

¹⁾ Für die Arbeit geeignete Flüssigkeitsmenge: ca. 100 ccm.

²⁾ Tryptophan gibt, im Gegensatz zu Tyrosin, bei Erwärmung während bis zu 5 Minuten, keine Färbung, wenn der Salpetersäurezusatz so gering wie 0,5 ccm ist (wohl aber bei Zusatz von 1,0 ccm). Ein anderer Unterschied besteht darin, daß — während nach Abkühlung sämtliche Tyrosinreaktionsflüssigkeiten klar bleiben — die Tryptophanreaktionsflüssigkeiten dabei Opaleszenz aufweisen, deren Stärke mit zunehmendem Salpetersäurezusatz abnimmt, am stärksten also bei 1,0 ccm Salpetersäure, bei 2,5 ccm Salpetersäure nur noch spurenweise vorhanden (nach dem Verdünnen der Mischung mit Wasser bis zu 100 ccm nicht mehr wahrnehmbar); bei 5,0 ccm Salpetersäure ist Opaleszenz überhaupt nicht beobachtet worden.

konstant = 10 ccm) und mit wechselnder Zeitdauer (1—5 Min.) der Erwärmung ausgeführt. Auf Grund der so gewonnenen Erfahrung wurde folgende allgemeine Versuchsanordnung festgesetzt:

5 ccm der Tyrosin- bzw. Tryptophanlösung (entsprechend 0,005 g Substanz) werden in Probierröhre mit 2,5 ccm Salpetersäure (entsprechend ca. 5% HNO_3 in fertiger Mischung) und 2,5 ccm Wasser versetzt. Nach Umrühren Erwärmung während 3 Minuten in Wasserbad, danach sofort Abkühlung auf 15°. Zur Kolorimetrie der „Phase a“ wird die erhaltene Reaktionsmischung nur mit Wasser auf 100 ccm verdünnt. Zur Kolorimetrie der „Phase b“ wird eine andere solche, mit ca. 75 ccm Wasser verdünnte Reaktionsmischung mit 10 ccm Ammoniak (10% ig) versetzt, worauf bis zu 100 ccm mit Wasser nachgefüllt wird.

Große Unterschiede bezüglich des gesamten koloristischen Effekts aufweisend, lassen sich die vier auf genannte Weisen erhaltenen Flüssigkeiten klar und deutlich in dieser Reihenfolge ordnen:

- | | | |
|--|---|---|
| <ol style="list-style-type: none"> 1. Tyrosin, Phase a 2. Tryptophan, Phase a 3. Tryptophan, Phase b 4. Tyrosin, Phase b | } | (mit stetig zunehmender Farbenstärke von 1 zu 4). |
|--|---|---|

Sofort fällt es auch in die Augen, daß es sich hier nicht lediglich um einen Unterschied in der Stärke der Farbe (Quantität) handelt, sondern daß auch verschiedene Farbenqualitäten vertreten sind. Während die Farbenqualität für Tyrosin, Phase a, deutlich genug als zitronengelb¹⁾ bezeichnet werden kann, weisen Tryptophan, Phase a, und Tyrosin, Phase b, eine Farbenqualität auf, die, für beide im selben Grade, nach Orange hin abweicht, und Tryptophan, Phase b, eine noch etwas mehr nach Orange hin liegende Farbenqualität. Ein näheres Studium dieser Verhältnisse hat gezeigt, daß hinreichende Übereinstimmung bezüglich der Farbenqualität herrscht:

¹⁾ Nach P. Baumanns Terminologie (Neue Farbentondekarte, System Prase. Aue i. S., 1912).

- Zwischen Tyrosin, Phase a, und einer wässrigen Lösung von Kaliumchromat (K_2CrO_4),
- „ { Tryptophan, Phase a } und einer wässrigen Lösung von Kaliumdichromat ($K_2Cr_2O_7$),
 { Tyrosin, Phase b }
- „ Tryptophan, Phase b, und einer wässrigen Lösung von Kaliumdichromat, gleichzeitig enthaltend eine geringe Menge Kaliumpermanganat (auf 1 Äquivalent $K_2Cr_2O_7$ $\frac{1}{100}$ Äquivalent $KMnO_4$).

Unter solchen Verhältnissen hat es sich als möglich erwiesen, nicht nur die Farbenqualität der betr. Reaktionsflüssigkeiten anzugeben, sondern auch ein mittelst kolorimetrischer Untersuchung in Zahlen ausgedrücktes Maß ihrer Stärke zu erhalten — alles durch Anwendung besonders zubereiteter Standardlösungen. Hierzu als geeignet befundene Standardlösungen sind:

Standardlös. Nr. 1 = N/50 K_2CrO_4

(bestimmt für Tyrosin, Phase a),

Standardlös. Nr. 2 = N/50 $K_2Cr_2O_7$

(bestimmt für Tryptophan, Phase a, und Tyrosin, Phase b),

Standardlös. Nr. 3 = N/50 $K_2Cr_2O_7$ + N/5000 $KMnO_4$.

Bezüglich der Standardlösung Nr. 1 ist ein sehr bedeutungsvoller Umstand zu beachten. In kolorimetrischer Hinsicht vollkommen unanwendbar sind K_2CrO_4 -Lösungen, die mit gewöhnlichem (mehr oder weniger CO_2 haltigem) destilliertem Wasser zubereitet sind. Sie weisen durchgehends abnorm hohen kolorimetrischen Wert auf, verglichen mit einer Lösung von demselben K_2CrO_4 -Gehalt, die mit gut ausgekochtem Wasser oder mit (ausgekochtem oder nichtausgekochtem) Wasser, dem etwas Lauge hinzugesetzt worden, zubereitet ist. Eine größere Anzahl früher ausgeführter kolorimetrischer Reihen mußte als wertlos verworfen werden, nachdem diese Fehlerquelle entdeckt worden war. Darnach ist Standardlösung Nr. 1 der Sicherheit wegen stets unter Zusatz von etwas Natronlauge (5 ccm Normallösung in 1 Liter) bereitet worden.

Bei der Zubereitung der Standardlösungen ist von einer entsprechenden (mit ausgekochtem Wasser hergestellten) N/10-Lösung, enthaltend 6,477 g K_2CrO_4 bzw. 4,907 g $K_2Cr_2O_7$ in 1 Liter, ausgegangen worden.

Standardlösung Nr. 3, enthaltend von $KMnO_4$ 20 ccm N/100 in 1 Liter, ist, im Gegensatz zu den anderen, mehr haltbaren Lösungen, ex tempore, d. h. nur für den Tagesbedarf bereitet worden.

Durch besondere Versuche wurde ferner Gewißheit darüber erhalten, daß die Reaktionsflüssigkeiten selbst sich nicht im Laufe der Zeit, welche die kolorimetrische Untersuchung erfordert, spontan hinsichtlich der Farbenqualität oder Farbenstärke verändern; erst nach einem oder einigen Tagen machte sich der Beginn einer Abnahme der Farbenstärke bemerkbar.

Da bei vorbereitenden Versuchen beobachtet worden war, daß nicht gleichmäßige Proportionalität zwischen den kolorimetrischen Werten, die für eine und dieselbe Reaktionsflüssigkeit in höheren und niedrigeren Schichten herrscht, so wurden in jedem Falle Beobachtungen mit drei verschiedenen Schichthöhen (100, 50 und 25 mm) ausgeführt.

Tabelle 1.

	Reaktionsflüssigkeit mm	Standardlösung Nr. 1 mm
Tyrosin, Phase a	100 entsprechen:	3,3
	50 "	1,5
	25 "	0,6
	Reaktionsflüssigkeit mm	Standardlösung Nr. 2 mm
Tryptophan Phase a	100 entsprechen:	6,6
	50 "	3,7
	25 "	2,1
	Reaktionsflüssigkeit mm	Standardlösung Nr. 3 mm
Tryptophan Phase b	100 entsprechen:	13
	50 "	7,3
	25 "	4,4
	Reaktionsflüssigkeit mm	Standardlösung Nr. 2 mm
Tyrosin Phase b	100 entsprechen:	135
	50 "	49
	25 "	21

In Tabelle 1 findet man also in gewissem Sinne absolute Werte für den kolorimetrischen Effekt der verschiedenen Reaktionsflüssigkeiten (bei bestimmter Schichthöhe), und aus ihnen bereits ist ersichtlich, wie dieser Effekt sich ganz verschiedenartig für die verschiedenen Substanzen bzw. Reaktionsphasen stellt. Da indessen die angeführten Zahlenwerte nur in 2 von den 4 Fällen sich auf eine und dieselbe Standardlösung (Nr. 2) beziehen, in den 2 übrigen dagegen auf je ihre besondere Standardlösung (Nr. 1 und 3), so ist ein wirklich übersichtlicher Vergleich des Ganzen in diesem Stadium nicht möglich. Einen solchen zu bewerkstelligen stößt auch auf Schwierigkeiten, ja, ein genauer Vergleich ist in Anbetracht der Unmöglichkeit, mit voller Präzision kolorimetrisch die Stärke von Farben abweichender Qualität zu vergleichen, ganz einfach unausführbar. An dem vorliegenden Untersuchungsmaterial sind jedoch die Verschiedenheiten der Farbenqualität nicht so weitgehend, daß eine approximative Transponierung von Zahlenwerten, die sich auf die beiden äußeren Glieder der Reihe (Standardlösungen Nr. 1 und 3) beziehen, in die entsprechenden Zahlenwerte für das dazwischenliegende Glied (Standardlösung Nr. 2) ausgeschlossen ist, zumal nachdem unter nahezu täglichen Beobachtungen während ein paar Monaten gute Übung in der Handhabung der fraglichen Beobachtungen erlangt worden ist. Demgemäß sind die in Tabelle 1 angegebenen Werte für Tyrosin, Phase a, ausgedrückt in mm der Standardlösung Nr. 1, und für Tryptophan, Phase b, ausgedrückt in mm der Standardlösung Nr. 3, durch direkten kolorimetrischen Vergleich, in mm der Standardlösung Nr. 2 transponiert worden¹⁾. Durch Einfügung der so festgestellten, neuen Zahlenwerte in Tabelle 1 wird nachstehende, einem approximativen, übersichtlichen Vergleich besser dienliche Tabelle (Tab. 2) erhalten.

Behufs weiterer Kontrollierung sind auch Versuche angestellt worden, kolorimetrisch sämtliche 4 Reaktionsflüssig-

¹⁾ Dabei ist Standardlösung Nr. 1, 3,3 mm, als 2,3 mm der Standardlösung Nr. 2 usw., Standardlösung Nr. 3, 13 mm, als 23 mm der Standardlösung Nr. 2 usw. befunden worden.

keiten direkt — d. h. ohne Vermittlung der Standardlösungen Nr. 1 und 3 — mittelst der Standardlösung Nr. 2 als einzigen gemeinsamen Vergleichsobjekts zu schätzen. Die aus derartigen Reihen hervorgehenden, mit den auf erstgenanntem Wege erhaltenen nahe zusammenfallenden Mittelwerte sind in Tabelle 2 in Klammern angegeben.

Tabelle 2.

	Reaktionsflüssigkeit mm	Standardlösung Nr. 2. mm
Tyrosin, Phase a	100 entsprechen:	2,3 (2,3)
	50 „	1,2 (1,3)
	25 „	0,4 (0,6)
Tryptophan, Phase a	100 „	6,6 (6,5)
	50 „	3,7 (3,8)
	25 „	2,1 (2,1)
Tryptophan, Phase b	100 „	23 (24)
	50 „	8,7 (8,6)
	25 „	4,5 (4,5)
Tyrosin, Phase b	100 „	135 (133)
	50 „	49 (50)
	25 „	21 (22)

Um noch eine weitere Verifizierung der angeführten Werte zu erhalten, wurden Reaktionsflüssigkeiten bearbeitet, die in der Weise hergestellt waren, daß, anstatt 0,005 g entweder Tyrosin oder Tryptophan je für sich, eine Mischung der beiden Substanzen, 0,0025 g von jeder, nach im übrigen gleichartigem Verfahren behandelt wurde. Als gemeinsame Standardlösung wurde Nr. 2 verwendet. In der nachstehenden Tabelle sind in Klammern die Werte angegeben, die aus den entsprechenden Werten der Tabelle 2 für Tyrosin und Tryptophan berechnet werden (die Werte für Phase a und b je für sich addiert und danach die Summe halbiert).

Tabelle 3.

	Reaktionsflüssigkeit mm	Standardlösung Nr. 2 mm
Phase a	100 entsprechen:	4,1 (4,4)
	50 "	2,2 (2,4)
	25 "	1,2 (1,3)
Phase b	100 "	85 (79)
	50 "	30 (29)
	25 "	12 (12)

Es zeigt sich, daß die Übereinstimmung zwischen den gefundenen und den berechneten Werten im ganzen genommen genügend ist.

Bei der hier befolgten Versuchsanordnung wird, auf Grund der in Tabelle 2 angeführten Detailwerte, als Durchschnittsresultat folgendes Verhältnis bezüglich des koloristischen Effekts (der des Tyrosins in Phase a als Einheit gesetzt) erhalten:

$$\begin{aligned}
 &\text{für Tyrosin in Phase a} = 1, \\
 &\text{" Tryptophan " " " } = 3, \\
 &\text{" Tryptophan " " b } = 9, \\
 &\text{" Tyrosin " " " } = 45.
 \end{aligned}$$

Oder anders ausgedrückt:

In Phase a wirkt Tryptophan 3mal so kräftig als Tyrosin, in Phase b hat dagegen Tyrosin eine 5mal so kräftige Wirkung als Tryptophan.

Tryptophan wirkt in Phase b nur 3mal so kräftig als in Phase a, während Tyrosin in Phase b eine 45mal so kräftige Wirkung als in Phase a ausübt.

Die Rolle, die dem Tyrosin und dem Tryptophan bei den beiden Phasen der Xanthoproteinsäurereaktion zukommt, ist demnach in allerhöchstem Grade verschiedenartig! Durch die hier mitgeteilte Untersuchung ist es ermöglicht worden — mit dem Grade von Approximation, wie er unter den vorliegenden Verhältnissen erreichbar ist — zahlenmäßig die aufgestellte Frage zu beantworten, welcher Anteil dem einen und dem anderen der beiden Stoffe bei der genannten Farbenreaktion zukommt.