

Die Bestimmung des freien und gebundenen Tryptophans in Pflanzen

Von Dr. HUBERT ROTH, experimentell mitbearbeitet von PH. SCHUSTER

Aus der Landwirtschaftlichen Versuchsstation Limburgerhof der I. G. Farbenindustrie A.-G.

Eingeg. 19. Dezember 1938

Tryptophan, die Muttersubstanz des Hetero-auxins (F. Kögl), dem bei Wachstumsvorgängen große Bedeutung zukommt, läßt sich nach den üblichen Methoden gut bestimmen, so lange in reinen wäßrigen Lösungen gearbeitet wird. In trübem und gefärbtem pflanzlichen Material sind aber weder colorimetrisch noch gravimetrisch brauchbare Ergebnisse zu erzielen. Das Tryptophan muß daher von störenden Substanzen getrennt werden. Adsorption kommt nicht in Betracht, da ihr eine Hydrolyse des pflanzlichen Eiweißes vorausgehen muß, die, ob sauer oder alkalisch gearbeitet wird, mit Tryptophanverlusten verbunden ist.

Nach F. Lieben¹⁾ und auch nach J. Tillmans, P. Hirsch u. F. Stoppel²⁾ sollen bei der „Xanthoproteinreaktion“ nur Tyrosin und Tryptophan zu gelben Farbstoffen nitriert werden. Diese Farbreaktion geben nicht nur die freien, sondern auch die in das Eiweiß eingebauten Aminosäuren. Die Beständigkeit des aus dem Tyrosin gebildeten Farbstoffes (o-Nitro-tyrosin) ist von Tillmans u. Mitarb. bezüglich Temperaturabhängigkeit und Salpetersäuremenge bereits untersucht³⁾. Wir überprüften das Tryptophan-Nitrierungsprodukt in gleicher Richtung und fanden, daß es sich durch gute Beständigkeit auszeichnet.

Diese Versuche veranlaßten uns, die Xanthoproteinreaktion, die schon bei direkter Nitrierung mit Salpetersäure eintritt, unter Zusatz von Schwefelsäure vorzunehmen und gleichzeitig die Konzentration der Salpetersäure zu erhöhen. Hierdurch werden alle Begleitsubstanzen zerstört, und es kommt nur die klare gelbe Lösung des Nitrierungsproduktes zur Messung. Die mit und ohne Schwefelsäurezusatz erhaltenen Nitrierungsprodukte zeigen gleiche Farbe und Reaktionen, wie sie von Tillmans, Hirsch u. Stoppel beschrieben wurden⁴⁾. Sonach beruht unsere Tryptophanbestimmung auch auf der als Xanthoproteinreaktion bezeichneten Nitrierung.

An einer größeren Anzahl eiweißaufbauender Substanzen (Glykokoll, Alanin, d-L-Phenylalanin, Cysteinchlorhydrat, Asparaginsäure, Glutaminsäure, Lysindichlorhydrat, Arginin, Asparagin, Prolin, Oxyprolin, Ornithin, Cystin, Leucin, d-L-Isoleucin, d-L-Valin, d-L-Serin, Histidin, Kreatinin, Betain, Putrescin, Glutathion, Colamin, Cholinchlorid, Harnstoff, Thioharnstoff, Guanidin, Methylamin, β-Phenyläthylamin, Histamindichlorhydrochlorid), die keine Färbung geben, wurde ferner festgestellt, daß außer Tryptophan und Tyrosin noch Dioxypheylalanin, d-L-Methionin und Tyramin die Xanthoproteinreaktion schon in der Kälte geben. Bringt man aber die Lösungen für 1 h in ein kochendes Wasserbad, so werden alle Substanzen bis auf das Tryptophan-Nitrierungsprodukt, das farbschwächer wird, vollständig entfärbt.

An einigen Substanzen, wie Cystein, Oxyprolin, β-Phenylalanin und Glutathion, war nach dem Erhitzen eine schwache Gelbfärbung festzustellen, die praktisch ohne Bedeutung sein dürfte, da die Färbung nur etwa 0,5% einer gleichen Menge Tryptophan beträgt⁵⁾. Die vorwiegend in Pflanzen vorkommenden gefärbten Substanzen (Chlorophyll, Carotinoide, Anthocyane und Flavone) werden beim Kochen mit dem Oxydationsgemisch restlos entfärbt. Der Zusatz von 50—70%ig. Schwefelsäure ist ohne Einfluß auf die Farbe. Mit steigenden Salpetersäuremengen nimmt nach

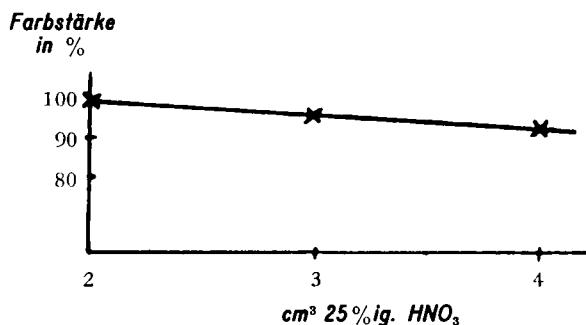


Abb. 1. Einfluß der Salpetersäuremenge auf den Farbwert des Tryptophan-Nitrierungsproduktes in 50—70%iger Schwefelsäure (5 cm³) nach 60 min Erhitzen (der Farbwert mit 2 cm³ HNO₃ ist gleich 100 gesetzt).

Abb. 1 die Farbstärke nur wenig ab⁶⁾; die prozentuale Farbabnahme ist von der Tryptophanmenge unabhängig (Tabelle 1).

Tabelle 1.
Abhängigkeit der Farbstärke des Tryptophan-Nitrierungsproduktes von der Kochzeit (100°) und der angewandten Menge Tryptophan.

Kochzeit in min	Angewandte Tryptophanmenge und die davon gefundenen Farbwerte in Prozenten			Mittelwert
	400γ	800γ	1600γ	
0	100	100	100	
50	44	45	44	44,3
60	41	42	43	42,0
70	41	41	43	41,7

Zusatzversuche von Tryptophan zu Gemüsen ergaben, daß Reaktionen, die bei der Zerstörung der Proben durch das Oxydationsgemisch stattfinden, keine Änderung des Farbwertes verursachen.

Schließlich sei noch auf den interessanten Kurvenverlauf der Abnahme der Farbstärke aufmerksam gemacht (Abb. 2). Beim Erhitzen beginnt schon in den ersten Minuten der Farbwert stark zu sinken, nach etwa 1/2 h nimmt die Farbstärke nur mehr langsam weiter ab. Vermutlich entstehen bei der Xanthoproteinreaktion aus Tryptophan zwei gefärbte Körper, von denen einer beim Kochen zersetzt

¹⁾ Biochem. Z. 145, 534 [1924].

²⁾ Ebenda 198, 379 [1928].

³⁾ Der Farbstoff wird beim Kochen wie auch mit größeren Mengen Salpetersäure zerstört.

⁴⁾ Mit $n/10$ -HNO₃ tritt noch keine Reaktion ein, wohl aber bei $n/5$ und stärkerer Salpetersäure. Es scheint sich bei Tillmans um einen Druckfehler zu handeln.

⁵⁾ Die Färbung könnte auch auf Verunreinigungen in den Präparaten zurückzuführen sein.

⁶⁾ Nehmen wir an, daß zur Zerstörung der organischen Substanz 1 cm³ 25%ige Salpetersäure verbraucht wird, so würde der Farbwert der Probelösung gegenüber der Standardlösung (beide wurden mit 3 cm³ Salpetersäure angesetzt) um etwa 3% höher liegen.

wird, während der andere gegen Hitze verhältnismäßig beständig ist.

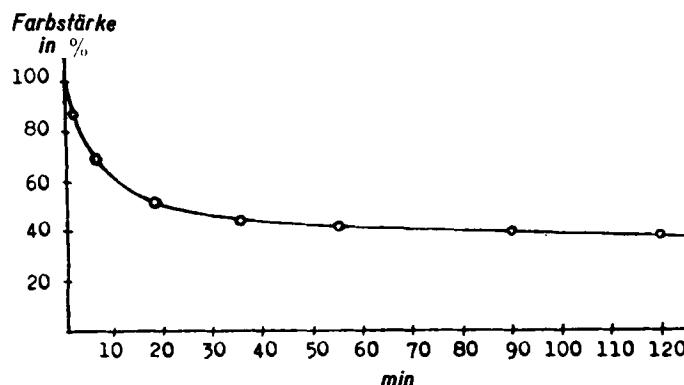


Abb. 2. Abnahme der Farbstärke des Tryptophan-Nitrierungsproduktes beim Kochen (100°) unter den unten beschriebenen Arbeitsbedingungen.

Aus den soeben beschriebenen Versuchen ergaben sich die Bedingungen für die Tryptophanbestimmung in pflanzlichem Material. Die Ergebnisse an einigen bisher untersuchten Proben sind in Tabelle 2-4 gebracht.

Tabelle 2. Tryptophanbestimmung in Frischsubstanz.

Probe	Gesamt-N %	Tryptophan %	Tryptophan-N %	Tryptophan-N vom Gesamt-N %
Blumenkohl	0,38	0,045	0,0062	1,62
Spinat	0,37	0,054	0,0074	2,00
Kartoffeln (Wurzel)	0,39	0	0	0
Kartoffeln (Kraut)	0,39	0,053	0,0073	1,82
Kartoffeln (Knollen)	0,34	0,046	0,0063	1,83
Gras (reif, 5. Schnitt)	0,36	0,097	0,0132	3,71
Sudangras (schnittreif)	0,20	0,067	0,0092	4,56
Rotrüben (ohne Blätter)	0,23	0,038	0,0052	2,26
Roggenpflänzchen (30-35 cm lang)	0,52	0,081	0,0111	2,14
Sojabohnen (Samen)	4,80	0,550	0,0750	1,56
Buschbohnen (Samen)	4,54	0,370	0,0500	1,11
Weizen (Körner)	2,26	0,200	0,0274	1,21
Mais (Körner)	1,53	0,110	0,0151	0,99
Tabakblätter (grüne Geizentabakblätter)	0,45	0,100	0,0138	3,06

Tabelle 3. Tryptophanbestimmung in Trockensubstanz.

Probe	Gesamt-N %	Tryptophan %	Tryptophan-N %	Tryptophan-N vom Gesamt-N %
Gras*	3,0	0,76	0,104	3,47
Spinat*	5,02	0,75	0,103	2,06
Salat*	3,54	0,83	0,113	3,20
Rotkraut*	2,60	0,25	0,034	1,26
Trockenhefe	9,65	0,85	0,116	1,21
Gliadin aus Roggen	14,00	0,64	0,088	0,63
Edestin (Präp. Elberfeld)	15,28	2,47	0,339	2,22
Seiden-Pepton-Witte	14,07	4,50	0,615	4,28

* Bei 60° getrocknet.

Tabelle 4.
Bestimmung von freiem und gebundenem Tryptophan in Frischsubstanz
(Trichloressigsäure-Fällung).

Probe	Gesamt-Tryptophan %	Freies Tryptophan %	Gebundenes Tryptophan %	Summe der % von freiem u. gebundenem Tryptophan (ber.)
Blumenkohl	0,040	0,019	0,022	0,041
Spinat	0,050	0,003	0,046	0,049
Spinat	0,051	—	0,045	—
Sojabohne (Samen) ..	0,550	0,032	0,500	0,532

Mit dem Verfahren, das für die Gesamttryptophanbestimmung beschrieben wird, können auch freies und gebundenes Tryptophan für sich bestimmt werden. Dazu wird z. B. in Gemüsebrei die Trennung mit Trichloressigsäure durchgeführt und im Niederschlag wie im Filtrat das Tryptophan bestimmt. Wie aus Tabelle 4 ersichtlich, entspricht das in beiden Anteilen gefundene Tryptophan dem in einem anderen Teil der Probe gefundenen Gesamttryptophan.

Diese Versuche ermöglichen nicht nur das Verhältnis des freien zu gebundenem Tryptophan festzustellen, sondern sie zeigen auch, daß mit der von uns modifizierten Xanthoproteinreaktion tatsächlich das gesamte Tryptophan bestimmt wird.

Die Bestimmung des Gesamt-Tryptophans.

Sie ist am genauesten, wenn eine Tryptophanmenge (0,5 bis 5 mg) zur Messung kommt, die 0,1—0,3 g Trockensubstanz der Probe entspricht. Für die Untersuchung z. B. von Keimpflanzen genügt demnach etwa 1 g Frischsubstanz.

Steht genügend Substanz zur Verfügung, so wird man, um einen guten Durchschnitt zu erhalten, die Xanthoproteinreaktion zweckmäßig in einer größeren Probe ausführen. Für die Bestimmung selbst entnimmt man aliquote Teile davon, die obigen Angaben entsprechen.

Es soll nun die Bestimmung mit 10 g eines Gemüsebreies von etwa 10% Trockensubstanz beschrieben werden. Zu dem in ein großes Reagensglas oder in ein Erlenmeyerkölbchen eingewogenen Brei läßt man aus einer Bürette unter vorsichtigem Schütteln 40 cm³ des Oxydationsgemisches (100 cm³ 70%ige Schwefelsäure, reinst, und 60 cm³ 25%ige Salpetersäure, reinst) in feinem Strahl zufließen. Es ist wichtig, daß die Reaktion langsam beginnt; man läßt die Lösung daher zuerst 10 min bei Raumtemperatur stehen, dann bringt man sie in ein siedendes Wasserbad (1 h) und schwenkt sie von Zeit zu Zeit um. Nach dem Abkühlen wird durch ein befeuchtetes Blaubandfilter (Schleicher und Schüll Nr. 589^a) in einen Meßkolben von 50 cm³ Inhalt filtriert und mit 70%iger Schwefelsäure so lange nachgewaschen, bis die Flüssigkeit bei Marke 50 steht. In einem Teil der Lösung wird nun im *Pulfrich*-Stufenphotometer unter Benutzung des Filters S 43 und einer 3-cm-Küvette das Tryptophan durch Extinktionsmessung bestimmt.

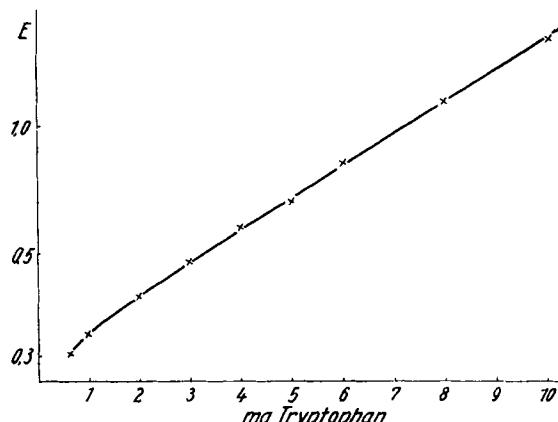


Abb. 3. Eichkurve des Tryptophan-Nitrierungsproduktes nach 60 min Erhitzen bei 100°. Küvette 3 cm³, Filter S 43, 50 cm³ Lösung.

Zur Berechnung des Tryptophans verwendet man die Eichkurve in Abb. 3. Aus der auf der Photometertrömmel abgelesenen Extinktion (Ordinate) ergibt sich die entsprechende Menge Tryptophan (in mg) auf der Abszisse. Die Eichkurve gilt nur für die beschriebenen Arbeitsbedingungen. Da sie gleichzeitig die Abnahme des Farbwertes enthält, ermöglicht sie auf der Abszisse die absoluten Tryptophanmengen abzulesen.

Da der Zusatz der Schwefelsäure (in den Grenzen von 50 bis 70%) keinen Einfluß auf den Farbwert hat, so könnte in gleicher Weise auch mit Trockensubstanz (Proteine usw.) gearbeitet werden. Um aber eine zu heftige Reaktion des Oxydationsgemisches mit trockener Substanz zu vermeiden, die zu Tryptophanverlusten führen könnte, schlemmt man die Probe vorher in 9 cm³ Wasser auf und führt die Bestimmung wie beschrieben durch.

Die Bestimmung des gebundenen und freien Tryptophans.

Zur Trennung der beiden Anteile werden 10 g des fein zerkleinerten Pflanzenbrei mit 50 cm³ 5%iger Trichloressigsäurelösung in der Kälte versetzt, gut durchgemischt und nach 1/2 h zentrifugiert. Den Rückstand wäscht man im Zentrifugenglas 2 mal mit 50 cm³ 1%iger Trichloressigsäure aus und spült ihn mit 8 cm³ Wasser quantitativ in ein Erlenmeyerkölbchen, in dem nun das gebundene gleich dem Gesamttryptophan bestimmt wird.

In der abgegossenen Trichloressigsäurelösung, die das freie Tryptophan enthält, kann es z. B. in Blumenkohl, der nach Tabelle 4 0,019% enthält, nach Einengen der Lösung auf 10 cm³ (Vakuum 100°) wie oben bestimmt werden.

In anderen Proben, wie z. B. Spinat (Tabelle 4), in dem verhältnismäßig wenig freies Tryptophan gefunden wurde, muß mit

einer größeren Probe gearbeitet werden. In einem Meßkolben (200 cm³) werden 100 g Pflanzenbrei mit 10%iger Trichloressigsäure bis zur Marke versetzt. Nach gutem Durchschütteln wird nach 1/2 h zentrifugiert. Von der überstehenden Flüssigkeit werden 100 cm³, die freies Tryptophan aus 50 g Frischsubstanz enthalten, im Vakuum bei 100° auf 10 cm³ eingeengt und das Tryptophan, wie beschrieben, bestimmt. Da beim Einengen die Konzentration der Trichloressigsäure auf 50% steigt, wurden Kontrollen mit reinen Tryptophanlösungen durchgeführt, es konnte dabei festgestellt werden, daß Trichloressigsäremengen bis zu 50% keinen Einfluß auf die Bestimmung haben.

Zusammenfassung.

Bei Versuchen, das Tryptophan in pflanzlichem Material nach einigen in der Literatur empfohlenen Verfahren zu bestimmen, konnten wir feststellen, daß diese zwar für die wäßrigen und farblosen Lösungen benutzt werden können, sich aber für gefärbtes Pflanzenmaterial nicht eignen.

Es wurde eine colorimetrische Bestimmungsmethode für frisches wie auch für trockenes Pflanzenmaterial ausgearbeitet, die auf der „Xanthoproteinreaktion“ beruht.

Die Arbeitsbedingungen wurden so gewählt, daß alle bisher untersuchten Substanzen, die die Bestimmung beeinflussen könnten, gleichzeitig zerstört werden, also auch die gelb gefärbten Nitrierungsprodukte, die aus Tyrosin, Dioxyphenylalanin, d-L-Methionin und Tyramin entstehen. Dies wird erreicht, wenn die Xanthoproteinreaktion mit einem Oxydationsgemisch (Schwefelsäure + Salpetersäure) in der Hitze durchgeführt wird. Dabei hellt sich der aus dem Tryptophan gebildete Farbstoff auf; da aber die Farbstärke, die zu Beginn verhältnismäßig rasch abnimmt, später annähernd unverändert bleibt, läßt sich das Tryptophan mit einer Genauigkeit von ± 5% bestimmen.

Wenn die Arbeitsvorschrift eingehalten wird, nimmt die Farbstärke entsprechend der Tryptophanmenge gleichmäßig ab, und die absolute Tryptophanmenge kann an einer einmal mit Hilfe der Extinktion aufgestellten Eichkurve direkt in Milligramm abgelesen werden.

Außer dem Gesamttryptophan kann auch das freie und das gebundene Tryptophan nach vorheriger Trennung der beiden Anteile bestimmt werden.

[A. 1.]

Die Abtrennung und Reindarstellung des Samariums aus Gemischen der seltenen Erden durch Reduktion zu Samarium(II)-chlorid

Von Dozent Dr.-Ing. ALFRED BRÜKL, Inst. f. physikal. Chemie der Universität Freiburg

Eingeg. 15. September 1938

Zur Gewinnung von reinen Samariumverbindungen geht man üblicherweise von den schwer kristallisierenden Endlaugen der Ammon- oder Magnesium-Doppelnitrate aus, die bei der Darstellung der Ceriterden Lanthan bis Neodym anfallen. Diese enthalten neben etwas Neodym als Hauptbestandteile Samarium und Gadolinium, ferner Europium und die bei der Natriumsulfatfällung mitgegangenen Yttererden. Urbain u. Lacombe¹⁾ erleichterten die Reinigung des Samariums durch Einführung des mit den seltenen Erdammon- oder Magnesiumnitraten isomorphen Wismutdoppelnitrates, dessen Löslichkeit zwischen den Samarium- und Gadoliniumverbindungen liegt. Durch diese Einschiebung wurden die in ihrer Löslichkeit so ähnlichen Elemente auseinander gedrängt, und man konnte nun nach zahlreichen fraktionierten Kristallisationen eine technisch durchführbare Abtrennung des Samariums erzielen.

Samarium war das erste Element der seltenen Erden, an dem Matignon²⁾ zeigen konnte, daß bei manchen Erden auch beständige zweiwertige Verbindungen gebildet werden. In der Folgezeit fand man noch beim Europium und Ytterbium dieselbe Fähigkeit, die für die Reindarstellung dieser Elemente große Bedeutung erlangt hat. Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, daß Samarium in der zweiwertigen Oxydationsstufe den Erdalkalien sehr nahestehende Verbindungen besitzt, die jedoch äußerst unbeständig sind. Diese Eigenschaft ließ die Verwendung des Valenzwechsels für präparative Zwecke beinahe aussichtslos erscheinen. Tatsächlich findet man im Schrifttum nur eine einzige kurze Angabe³⁾, die vorschlägt, im Erdchloridgemisch das Samarium durch Wasserstoff bei heller Rotglut zu reduzieren, hierauf die Chloride in Wasser aufzulösen, wobei das Samarium(II)-chlorid unter Wasserstoffentwicklung in basisches III-Chlorid übergeht. Letzteres zerfällt in das lösliche Chlorid und unlösliche Hydroxyd, das durch Filtration von den begleitenden Erden getrennt

werden kann. Auf diese Weise wird ein Drittel des vorhandenen Samariums abgeschieden, doch steht die erzielte Reinheit in keinem Verhältnis zu der schwierigen Reduktion, so daß Selwood der fraktionierten Kristallisation weiter den Vorzug gibt.

Vor längerer Zeit hatte ich Versuche unternommen, um zu sehen, wieweit die Unterschiede in den durch Noddack u. Brükl⁴⁾ bestimmten Reduktions- und Abscheidungspotentialen der seltenen Erden für eine Trennung nutzbar gemacht werden können. Zur Orientierung wurden unter den verschiedensten Bedingungen Mischchloride (10% Sm, 64% Gd, Spur Eu, Rest Yttererden) der Elektrolyse an Quecksilberkathoden unterworfen, wobei in sehr geringer Ausbeute Erdamalgame gebildet wurden. Entgegen der erwarteten Anreicherung der mit dem kleinsten Abscheidungspotential ausgestatteten Yttererden wurde das schwieriger abzuscheidende Samarium als Hauptbestandteil (95%) aufgefunden. Übereinstimmend mit den Erfahrungen von Hopkins u. Mitarb. war aus wäßrigen Lösungen auf elektrolytischem Wege eine für präparative Zwecke zufriedenstellende Amalgambildung nicht zu erreichen.

Nun wurde der von den amerikanischen Forschern⁵⁾ mit Erfolg angewandte Umsatz von Amalgamen mit seltenen Erdchloriden in absolutalkoholischer Lösung auf seine Verwendbarkeit geprüft. Schon bei der Reindarstellung des Europiums⁶⁾ wurde die Beobachtung gemacht, daß sich bei der Elektrolyse in Gegenwart von Strontiumsulfat unter ungünstigen Bedingungen an der Quecksilberkathode Strontiumamalgame bildeten, die ihrerseits mit den seltenen Erdchloriden in Reaktion traten. Diese mit Mischchloriden erhaltenen Umsetzungsprodukte wurden z. T. in das Strontiumsulfat eingebaut; die Ergebnisse waren jedoch so unübersichtlich und schwer reproduzierbar, daß sie für präparative Zwecke nicht in Betracht kamen. Hingegen bedienten sich Holleck u. Noddack⁷⁾ dieser Reaktion, um mit Hilfe von reinen Sulfaten den Nachweis der Existenz zweiwertiger Erdverbindungen zu erbringen.

¹⁾ G. Urbain u. H. Lacombe, C. R. hebdo. Séances Acad. Sci. 187, 792 [1903]; siehe ferner W. Prandtl, Z. anorg. allg. Chem. 288, 321 [1938].

²⁾ C. Matignon u. E. Cazes, C. R. hebdo. Séances Acad. Sci. 142, 83 [1906].

³⁾ P. W. Selwood, J. Amer. chem. Soc. 57, 1145 [1935].

⁴⁾ W. Noddack u. A. Brükl, diese Ztschr. 50, 362 [1937].

⁵⁾ D. H. West u. B. S. Hopkins, J. Amer. chem. Soc. 57, 2185 [1935].

⁶⁾ A. Brükl, diese Ztschr. 49, 159 [1936].

⁷⁾ L. Holleck u. W. Noddack, ebenda 50, 819 [1937].