

Zeitschrift: Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène
Herausgeber: Bundesamt für Gesundheit
Band: 42 (1951)
Heft: 5

Artikel: Die quantitative Tryptophanbestimmung im lichtelektrischen Kolorimeter
Autor: Staub, M. / Bosshardt, H.
DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-982468>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. [Mehr erfahren](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. [En savoir plus](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. [Find out more](#)

Download PDF: 22.10.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

Literatur

- ¹⁾ Schweiz. Lebensmittelbuch 4. Aufl. S. 141, Verlag Zimmermann & Co., Bern (1937).
- ²⁾ A. Windaus, Ber. **41**, 2558 (1908).
- ³⁾ J. Terrier, diese Mitt. **28**, 184 (1937).
- ⁴⁾ H. Riffart und H. Keller, Z.U.L. **68**, 114 (1934).
- ⁵⁾ H. Hadorn und R. Jungkuntz, diese Mitt. **40**, 416 (1949).
- ⁶⁾ J. Tillmans, H. Riffart und A. Kühn, Z.U.L. **60**, 361 (1930).
- ⁷⁾ Internat. Fettkommission, Fette und Seifen **48**, 536 (1941).
- ⁸⁾ H. Riffart und H. Keller, Z.U.L. **68**, 116 (1934).
- ⁹⁾ A. Grün, Analyse der Fette und Wachse, Bd. I S. 262 (1925), Verlag J. Springer, Berlin.
- ¹⁰⁾ Handbuch der Lebensmittelchemie, Bd. IV, S. 253 (1939), Verlag Julius Springer, Berlin.
- ¹¹⁾ J. H. Müller, J. Biol. Chem. **30**, 39 (1917).
- ¹²⁾ H. Hadorn und R. Jungkuntz, Z.U.L. **93**, 277 (1951).

Die quantitative Tryptophanbestimmung im lichtelektrischen Kolorimeter

Von M. Staub und H. Bosshardt

(Mitteilung aus dem kantonalen Laboratorium Zürich)

Nach der bekannten Reaktion von Adamkiewicz ¹⁾ geben Proteine mit Eisessig und Schwefelsäure beim Erhitzen eine rote bis violette Färbung. Später konnten dann Hopkins und Cole ²⁾ zeigen, dass die Reaktion nicht auf den Eisessig, sondern auf dessen Gehalt an Glyoxylsäure zurückzuführen und spezifisch für die Aminosäure Tryptophan ist. Cary ³⁾ entwickelte den Nachweis zu einer quantitativen Bestimmungsmethode, indem er die zu prüfenden Lösungen mit dem Glyoxylsäurereagens von Hopkins und Cole versetzte und sie mit Tryptophanlösungen bekannter Stärke kolorimetrisch verglich.

Wir überprüften zunächst die Behauptung, ob wirklich Glyoxylsäure und nicht Eisessig, der meist etwas Glyoxylsäure enthält, für die Farbreaktion mit Tryptophan verantwortlich sei. Nachher untersuchten wir, ob die Farbreaktion das Beer-Lambertsche Gesetz erfülle. Diese Bedingung muss erfüllt sein, wenn man eine quantitative Bestimmung im Kolorimeter durchführen will.

Versuchsteil

Darstellung von Tryptophan

Da Tryptophan im Handel sehr teuer ist, empfiehlt sich dessen Darstellung aus Casein nach der Vorschrift in Beilsteins Handbuch der organ. Chemie ⁴⁾.

Herstellung von chemisch reiner Essigsäure

Man lässt Eisessig des Handels einige Tage über Chromsäure stehen. Darauf wird abdestilliert. Das Destillat wird nochmals einige Tage über Chromsäure

und P_2O_5 stehen gelassen und erneut destilliert. Wird nun mit dieser gereinigten Essigsäure die Reaktion von *Adamkiewicz* auf Tryptophan angesetzt, erhält man keine Färbung.

NB. Die Glyoxylsäure bildet sich aus Essigsäure beim Stehen an der Luft.

Herstellung von Glyoxylsäure

Glyoxylsäure lässt sich aus Oxalsäure nach der Vorschrift in *Beilsteins* Handbuch der organ. Chemie ⁵⁾ leicht herstellen. 10 g Magnesiumpulver werden mit Wasser in einem Erlenmeyer überschichtet. Man stellt das Gefäß in Eiswasser und fügt unter Umschwenken portionenweise 250 cm³ gesättigte Oxalsäurelösung zu. Nach 1/2 Stunde filtriert man ab und fügt einige cm³ Eisessig (glyoxylsäurefrei) bei. Diese Lösung kann direkt für die Reaktionen benützt werden.

Reaktionsversuche mit Tryptophan und Glyoxylsäure

Nach der Vorschrift des Handbuches der Lebensmittelchemie II S. 605 wird 1 cm³ Proteinlösung mit 1 cm³ konz. Glyoxylsäure und 2 cm³ konz. Schwefelsäure durchgeschüttelt und mit 1 Tropfen 1 %iger Ferrichloridlösung versetzt, wobei eine blauviolette Färbung entsteht. Wir haben nun zunächst untersucht, bei welchen Konzentrationen der einzelnen Reaktionspartner und unter welchen Bedingungen das Maximum der Farbintensität erreicht wird. Es hat sich gezeigt, dass bei einem Verhältnis von 1 Vol. Glyoxylsäure zu 4 Vol. Schwefelsäure dieses Maximum erreicht wird, wobei es ohne Einfluss auf die Reaktion ist, ob forensische oder gewöhnliche reine Schwefelsäure verwendet wird. Von Einfluss sind ferner das Verhältnis zwischen der zu untersuchenden Lösung und der gesamten Reagenzmenge, sowie die Reihenfolge der Zugabe. Alle Versuche wurden mit folgendem Ansatz durchgeführt:

1 Vol. Eiweisslösung (bzw. Tryptophanlösung) + 2 Vol. Glyoxylsäure +
8 Vol. konz. Schwefelsäure.

Tryptophan ist in kaltem Wasser wenig löslich, leicht hingegen in siedendem Wasser und bleibt auch nach dem Erkalten in Lösung. Die optische Aktivität ist ohne Einfluss auf die Reaktion. Die Farbstärke, im lichtelektrischen Kolorimeter gemessen, erreicht nach 15 Minuten ihr Maximum und bleibt während 24 Stunden konstant.

Quantitative Versuche

Testversuche mit einer reinen Tryptophanlösung im lichtelektrischen Kolorimeter (System Lumetron Modell 400-A) zeigten die merkwürdige Erscheinung, dass die Reaktionsfarbe das eine Mal rotviolett, ein anderes Mal aber blauviolett wurde. Mit frischer Glyoxylsäure erhält man besser reproduzierbare Werte als mit älterer. Auch die Art und Weise, wie man die Schwefelsäure zufließen lässt, ist von einem gewissen Einfluss. Nach zahlreichen Versuchen fanden wir zufällig, dass ein Zusatz von Industriesprit sowohl das Alter der Glyoxylsäure, sowie auch den Einfluss der Schwefelsäurezugabe weitgehend auszuschalten vermag. Folgende Arbeitsvorschrift erwies sich deshalb als zweckmässig:

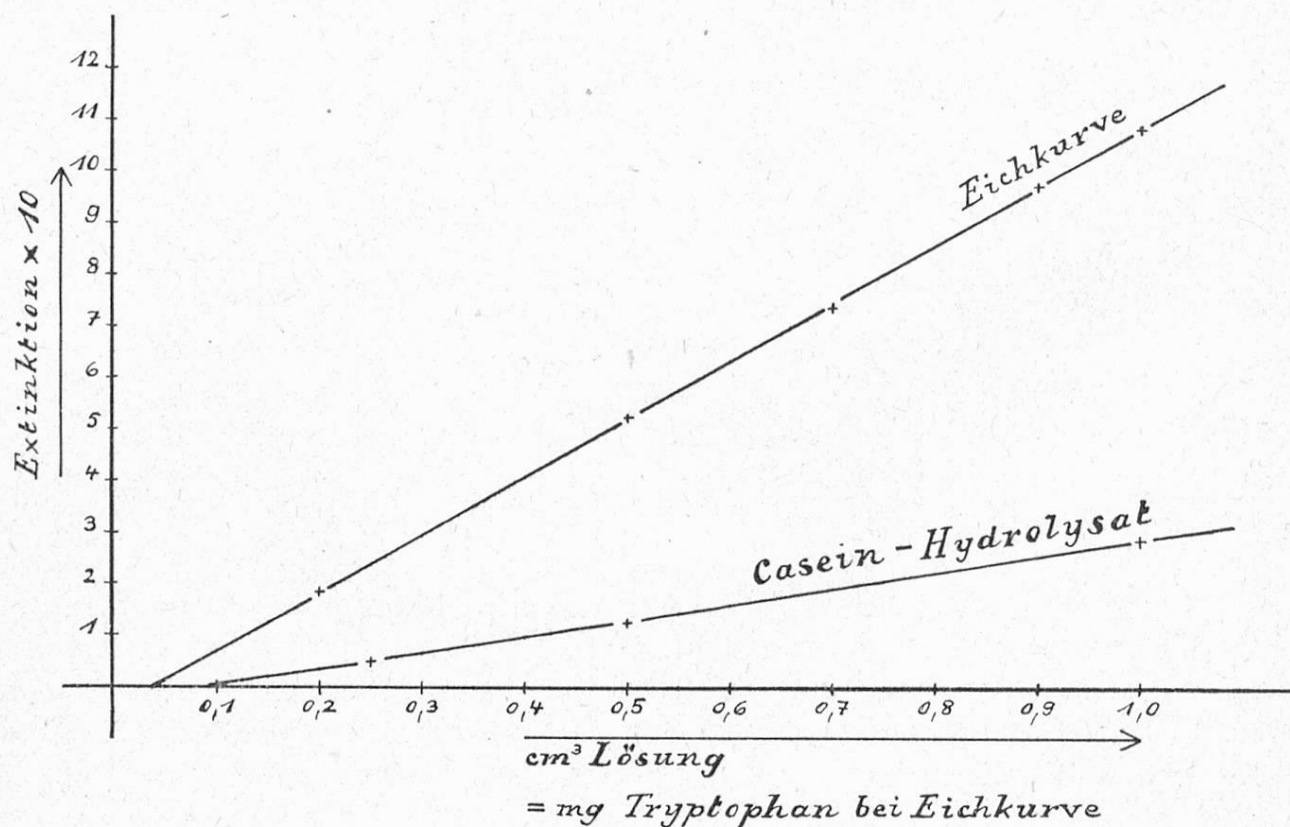
1 cm³ wässrige Tryptophanlösung wird mit 0,5 cm³ 95 %igem Industriesprit und 2 cm³ Glyoxylsäure in einem Schüttelzylinder gut durchgemischt. Hierauf lässt man vorsichtig 8 cm³ konz. Schwefelsäure der Wandung entlang zufließen, kühlt während 20 Minuten auf 20° ab und bestimmt die Extinktion im Lumetron (Rotfilter 650). Die Extinktion soll zwischen 1,5 und etwa 11 liegen. (Die Skala des Lumetrons gibt den zehnfachen Wert der Extinktion an.)

Bei grösseren Konzentrationen setzt man weniger als 1 cm³ der Prüflösung an, wobei mit Wasser auf 1 cm³ aufgefüllt wird. Als «blank test» verwendet man die oben beschriebene Mischung mit dem einzigen Unterschied, dass an Stelle der 2 cm³ Glyoxylsäure 2 cm³ Wasser genommen werden. Auf diese Weise werden allfällige Eigenfärbungen kompensiert.

Verwendet wurde eine wässrige l-Tryptophanlösung, die in 100 cm³ 100 mg Tryptophan enthält.

Tryptophanlösung in cm ³	Extinktion		Mittelwert
	1. Bestimmung	2. Bestimmung	
1,0	10,60	11,00	10,80
0,9	9,70	9,70	9,70
0,7	7,45	7,20	7,32
0,5	5,40	5,03	5,21
0,2	1,80	1,85	1,83

Aus diesen Mittelwerten erhält man die in untenstehender Figur aufgezeichnete Eichkurve. Der Ausgleich der Eichlinie erfolgte nach der Methode, die von unserer wissenschaftlichen Assistentin Frl. S. Dannacher ausgearbeitet wurde (Publikation in Vorbereitung).



Die Kurve zeigt, dass im Bereiche der Extinktion ($\times 10$) von 1,8—11 das Beer-Lambertsche Gesetz gut erfüllt wird.

Bestimmung von Tryptophan in Proteinen

Da bei der sauren Hydrolyse Tryptophan zerstört wird, muss alkalisch aufgeschlossen werden. 5 g Casein nach *Hammarsten* werden mit 80 cm³ Natronlauge (30 %ig) über Nacht stehen gelassen. Dann kocht man am Rückfluss 15 Minuten lang. Die Lösung wird mit Wasser auf 100 cm³ eingestellt und davon 10 cm³ mit 10 cm³ Salzsäure (30 %ig) versetzt. 1 cm³ dieser Lösung = 0,025 g hydrolysiertes Casein wird mit den Reagenzien versetzt und im Lumetron gegen die neutralisierte Caseinlösung als Blanktest gemessen:

Extinktion: 3,10; 3,05; 2,85

Es zeigte sich, dass erst nach 15 Minuten Kochdauer die Hydrolyse praktisch beendet ist. Wird weiter während 10 Minuten gekocht, so wird weder weiteres Tryptophan in Freiheit gesetzt, noch zerstört. Nach der Methode *Dannacher* (loc. cit.) ist es erforderlich, noch weitere Punkte zu bestimmen:

1 cm ³ Caseinhydrolysat	Extinktion = 2,85
0,5 cm ³ »	» = 1,26
0,25 cm ³ »	» = 0,50

Die mit diesen Punkten erhaltene Kurve ist in der Figur als untere Kurve dargestellt.

Die Berechnung des Tryptophangehaltes in Casein nach dem neuen Ausgleichs- und Vergleichsverfahren ergibt 1,16 % $\pm$ 0,01 %. Nach der üblichen Methode erhält man für die oben erwähnten 3 Umsetzungen folgende Werte:

1,18 % Tryptophan
1,20 % »
1,28 % »

Nach dem Handbuch der Lebensmittelchemie Band III S. 424 beträgt der Höchstgehalt des Caseins an Tryptophan 1,7 %.

Anmerkung: Von Ansatz zu Ansatz wurden kleine Unterschiede im Extinktionswert beobachtet, sei es, dass das verwendete Casein nicht ganz homogen war, sei es, dass die Hydrolyse nicht immer gleichmässig verläuft. Ferner müssen die Prüflösungen im Lumetron vollständig frei von Luftbläschen sein. Es können auch kleine Stromschwankungen im Apparat auftreten. Deshalb empfiehlt es sich, jeweils mehrere Parallelversuche anzusetzen.

Werden andere Proteine auf den Gehalt an Tryptophan geprüft, so muss von Fall zu Fall ermittelt werden, wie lange die Hydrolyse zu dauern hat. Auf alle Fälle ist die Hydrolyse in alkalischem Milieu durchzuführen.

Ergänzende Versuche

a) Verhalten einer reinen Tryptophanlösung beim Kochen in Alkali:

10 cm³ der Tryptophanstammlösung werden mit 10 cm³ 30 %iger Natronlauge am Rückfluss aufgekocht. 1 cm³ (= 0,5 mg Tryptophan) gibt eine Extink-

tion von 5,20 (Tryptophan unbehandelt 5,21). Dieser Versuch wiederholt, aber 15 Minuten lang mit Lauge gekocht: $E = 5,5$. Somit wird Tryptophan bei der von uns angewandten Proteinhydrolyse nicht zerstört.

b) Prüfung der Spezifität der Glyoxylsäurereaktion:

Die Aminosäuren Glutaminsäure, Tyrosin, Histidin und Phenylalanin geben die Reaktion nicht. Gelatine, die kein Tryptophan enthalten soll, gibt weder direkt noch nach der Hydrolyse eine Reaktion.

c) Qualitativer Tryptophannachweis in Casein ohne vorangehende Hydrolyse:

Etwas Casein wird in 1 cm³ Wasser aufgeschwemmt und mit 2 cm³ Glyoxylsäure und 8 cm³ konz. Schwefelsäure versetzt. Nach dem Umschütteln tritt eine intensive Blauviolettfröbung auf. Das Tryptophan wird durch die starke Schwefelsäure z.T. in Freiheit gesetzt.

d) Störende Stoffe:

Indol und Skatol geben z.T. Fröbungen, z.T. Niederschläge. Aus einer Lösung, die Tryptophan, Indol und Skatol enthält, können die beiden letzteren Stoffe nach dem Ansäuern mit Äther quantitativ entfernt werden. Tryptophan ist in Äther unlöslich. Äther stört die Farbreaktion nicht. Mit Schwefelsäure verkohlbare Stoffe können weitgehend kompensiert werden, wenn als Blanktest die Prüflösung ohne Glyoxylsäure verwendet wird.

Zusammenfassung

Es wird gezeigt, dass die bei der Reaktion von Tryptophan und Glyoxylsäure entstehende Blauviolettfröbung das Beer-Lambertsche Gesetz erfüllt und deshalb für quantitative Bestimmungen benutzt werden kann. Die kolorimetrischen Bestimmungen wurden im lichtelektrischen Kolorimeter System Lumetron vorgenommen. Für die Ausgleichung der Eichkurve benutzten wir eine neue, noch nicht veröffentlichte Methode. In Proteinen kann Tryptophan nach alkalischer Hydrolyse ebenfalls auf diese Weise quantitativ bestimmt werden.

Résumé

On démontre que la coloration bleu-violet qui se produit lors de la réaction du tryptophane et de l'acide glyoxylique suit la loi de Beer-Lambert et peut par conséquent être utilisée pour un dosage. Les mesures colorimétriques ont été faites avec un colorimètre système Lumétron. La correction de la courbe d'étalonnage a été faite d'après une méthode nouvelle qui n'est pas encore publiée. On peut doser de la même manière le tryptophane dans les protéines après hydrolyse alcaline.

Literatur

- ¹⁾ Adamkiewicz, Pflügers Archiv f. d. ges. Physiol. **9**, 156 (1874).
- ²⁾ Hopkins und Cole, Proc. of the Royal Soc. **68**, 21 (1901).
- ³⁾ Cary, J. of Biochem. **78**, 377 (1928).
- ⁴⁾ Beilsteins Handbuch der organ. Chemie, Band **22**, 546 (4. Aufl. 1935).
- ⁵⁾ Beilsteins Handbuch der organ. Chemie, Band **3**, 595 (1921).