

ROCZNIKI PAŃSTWOWEGO ZAKŁADU HIGIENY

POŚWIĘCONE WSZYSTKIM DZIAŁOM HIGIENY, ZAGADNIENIOM BADANIA ARTYKUŁÓW ŻYWNOSCI
I PRZEDMIOTÓW UŻYTKU, INŻYNIERII SANITARNEJ I INNYM DZIEDZINOM POKREWNYM

ROCZNIKI PZH
1960, t. XI, nr 5

STANISŁAW KRAUZE, LECH PIEKARSKI, J. MAKSYM CZUK

OZNACZANIE ILOŚCIOWE TRYPTOFANU

Z Zakładu badania środków spożywczych A. M. w Warszawie

Ilościowemu oznaczeniu tryptofanu w białkach poświęca się dużo miejsca w piśmiennictwie fachowym. Oznaczanie tryptofanu dokonywane po hydrolizie kwaśnej czy też alkalicznej jest obciążone dużymi błędami. W celu zapobieżenia stratom stosuje się często hydrolizę w środowisku gazu obojętnego (2), a szereg autorów wykonuje ją wobec chlorku cynowego działającego stabilizująco (1, 3, 4). Oznaczenia tryptofanu jak i innych aminokwasów w białkach jest dalekie od doskonałości, a wyniki otrzymane przez różnych autorów dla tego samego materiału są często rozbieżne. Poznanie właściwych ilości tryptofanu w białkach na podstawie oznaczeń po hydrolizie jest możliwe po zapoznaniu się przede wszystkim ze zmianami ilościowymi tryptofanu zachodzącymi podczas całego procesu hydrolizy. Do ilościowego oznaczania tryptofanu wykorzystywano reakcje barwne tryptofanu z kwasem gliksalowym, aldehydem mrówkowym, aldehydem benzoesowym, wanilin aldehydem salicylowym, aldehydem p-dwumetyloaminobenzoesowym.

Aldehyd p-dwumetyloaminobenzoesowy stosowany jest obecnie najczęściej do oznaczania tryptofanu w środowisku kwasu siarkowego wprowadzonego przez *Tillmansa* i *Alta* zamiast kwasu solnego (12). Oparta na powyższym postępowaniu metoda podana przez *Spiesa* i *Chambersa* (7) została zastosowana przez tych samych autorów także do oznaczania tryptofanu w niehydrolizowanych białkach (8).

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

1. Metoda oznaczania tryptofanu

W pracy zastosowano metodę oznaczania tryptofanu podaną przez *Spiesa* i *Chambersa* (7), polegającą na utlenianiu za pomocą azotynu sodowego, produktu kondensacji tryptofanu z aldehydem p-dwumetyloaminobenzoesowym i następnie na pomiarze gęstości optycznej otrzymanego roztworu barwy niebieskofioletowej.

1.1. Odczynniki

Aldehyd p-dwumetyloaminobenzoesowy. Do badania używano stale świeżo (6) przygotowanego roztworu aldehydu p-dwumetyloaminobenzoesowego w 2-n H_2SO_4 . 100 ml roztworu zawierało ściśle 3 g aldehydu. Azotyn sodowy. Świeżo przygotowany dokładnie 0,04⁰/o-owy roztwór wodny.

$19nH_2SO_4$

Tryptofan. W badaniach posługiwano się L-tryptofanem.

1.2. Sprawdzenie przebiegu reakcji tryptofanu z aldehydem p-dwumetyloaminobenzoesowym i azotynem sodowym w zależności od czasu.

Badanie miało na celu ustalenie najkorzystniejszego czasu reakcji tryptofanu z aldehydem i utleniania azotynem sodowym. Do badania użyto roztworów zawierających w 1 ml po 50, 100 i 150 μg tryptofanu. Do szeregu probówek reakcyjnych dodano po 1 ml roztworu aldehydu p-dwumetyloaminobezoesowego i 10 ml $19nH_2SO_4$. Po 3 minutach dodano 1 ml roztworu tryptofanu ciągle mieszając i chłodząc w ciągu 5 minut, licząc od chwili wiania do probówek roztworu aldehydu. Następnie probówki zamykano korkami i umieszczono w cieplarni w temp. 25° . Probówki wstawiane do cieplarki podzielone były na 5 grup. Jedną grupę wyjęto z cieplarki po 1 godzinie, drugą po 2 godzinach, trzecią po 3 godzinach, czwartą po 4 godzinach, a piątą po 5 godzinach. Do wszystkich probówek dodawano potem po 0,1 ml 0,04%-owego roztworu azotynu sodowego, mieszano i odstawiano do ciemnego miejsca. W obrębie każdej grupy probówki podzielono na 3 części w ten sposób, że jedna część podlegała utlenianiu azotynem sodowym w ciągu $\frac{1}{2}$ godziny, druga w ciągu 1 godziny, a trzecia w ciągu 2 godzin. Po upływie określonego wyżej czasu otrzymane barwne roztwory badano w fotokolorymetrze oznaczając ich gęstość optyczną. Roztwór porównawczy był przygotowany w identyczny sposób jak analizowany, tylko bez tryptofanu.

Na podstawie przeprowadzonych badań ustalono, że najkorzystniejsze wyniki były, jeżeli czas między dodaniem tryptofanu a dodaniem azotynu sodowego (przechowany w cieplarni) wynosił 4 godziny, a okres od dodania azotynu do momentu badania w kolorymetrze $\frac{1}{2}$ godziny.

1.3. Wykreślenie krzywej wzorcowej dla czystych roztworów tryptofanu.

Za podstawę do wykreślenia krzywej wzorcowej roztwory o zawartości 40, 60, 80, 100, 120, 140 i 160 μg tryptofanu. Otrzymana krzywa wzorcowa przedstawiona jest na ryc. 1.

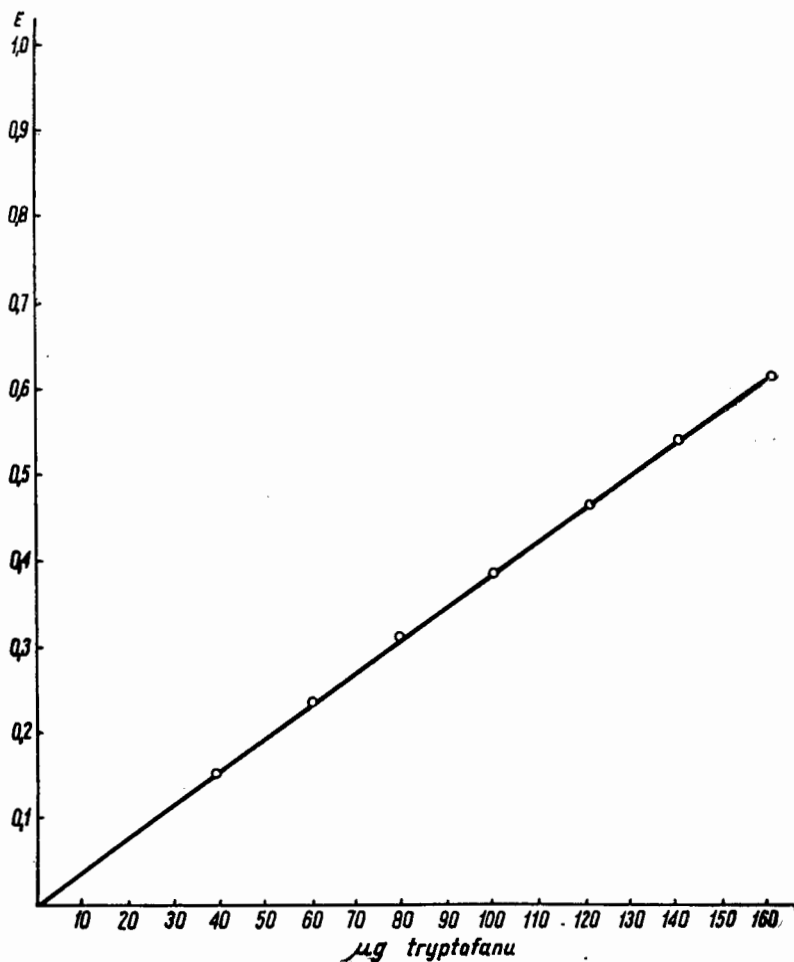
2. Badanie trwałości tryptofanu

Badanie stabilności miało na celu sprawdzenie, jakie zmiany ilościowe zachodzą w roztworach tryptofanu w czasie ich przechowywania.*

2.1. Badanie stabilności w roztworze rozcieńczonego H_2SO_4

0,1 g tryptofanu rozpuszczono w wodzie w kolbce miarowej pojemności 25 ml dodając 0,46 ml $19nH_2SO_4$ i uzupełniono wodą do kreski. Roztwór przechowywano w ciągu 192 godzin w temperaturze pokojowej. Z roztworu tego pobierano po 0, 24, 49 i 192 godzinach od chwili przygotowania po 1 ml, przenoszono do kolbki pojemności 25 ml i uzupełniono wodą do kreski. Z tak przygotowanego drugiego roztworu pobierano natychmiast po przygotowaniu po 1 ml i oznaczono zawartości tryptofanu. Przeprowadzone czterokrotnie w ciągu 192 godzin badania nie wykazały zmian ilościowych w roztworach tryptofanu.

* w roztworach tych tryptofan znajdował się w toku pracy..



Ryc. 1.

2.2. Badanie stabilności w roztworze 15,8n H₂SO₄.

Rozpuszczono tryptofan w roztworze złożonym z 2 ml wody i 10 ml 19-n H₂SO₄ tak, że roztwór zawierał 40 μg tryptofanu w 1 ml. Oznaczenia tryptofanu przeprowadzono po 0; 1,5 i 3 godzinach licząc od momentu przygotowania roztworu. Straty tryptofanu w czasie badania przedstawia tabela I.

Tabela I

Czas badania po godz.	Straty tryptofanu w procentach
0	1,75
1 ¹ / ₂	10,00
3	12,50

2.3. Badanie stabilności w roztworze o pH 6,8.

W celu sprawdzenia stabilności tryptofanu w roztworze otrzymanym po zobojętnieniu roztworu alkalicznego, w którym ogrzewano tryptofan, przeprowadzono następujące badania: 0,25 ml roztworu tryptofanu, przygotowanego jak w punkcie 2.1., przenoszono do kolbki miarowej pojemności 25 ml z zawartością 1 ml 10-n wodorotlenku sodowego, zobojętniano 19-n H_2SO_4 i uzupełniono wodą do kreski. Z kolbki pobierano do badania po 1 ml roztworu oznaczając w nim tryptofan. Przeprowadzając badania w ciągu 24 godzin (0, 2, 3 i 24 godziny), nie stwierdzono zmian ilościowych w badanym roztworze tryptofanu.

3. Zmiany ilościowe tryptofanu wolnego zachodzące podczas hydrolizy alkalicznej

Badania przeprowadzono w ten sposób, że roztwory o znanych zawartościach tryptofanu ogrzewano w różnym czasie w temperaturze $100^\circ C$ w ampulkach z ługiem, z ługiem i kazeiną oraz ługiem, kazeiną i chlorkiem cynawym. Z ampulek usuwano powietrze, a następnie wprowadzono azot i zatapiano. Po zatopieniu ampulki ogrzewano, po skończonym ogrzewaniu chłodzono, otwierano, przenoszono ilościowo do kolbek miarowych pojemności 25 ml, zobojętniano 19-n H_2SO_4 i uzupełniano wodą do kreski, otrzymując roztwór o pH 6,8.

Po przesączeniu roztworu, do oznaczania tryptofanu pobierano z przesącazu po 1 ml.

Ogrzewanie wykonano w ciągu $1/2$, 12, 24 i 30 godzin w omówiony już sposób z ampulkami o następującej zawartości:

- a) 1 ml roztworu tryptofanu (1 mg), 0,1 ml wody, 1 ml 10-n NaOH
- b) 1 ml roztworu tryptofanu (1 mg), 0,1 kazeiny, 1 ml 10-n NaOH.

Oprócz oznaczania tryptofanu po ogrzewaniu oznaczono tryptofan także w ampulkach o zawartościach jak w p. 3a i 3b bez ogrzewania.

Wyniki otrzymane po 30-godzinym ogrzewaniu nie wykazały dużej różnicy w stosunku do wyników 24-godzinnego ogrzewania; odzysk tryptofanu był niższy o 0,5%. Wyniki badań przeprowadzonych w powyższy sposób i podanych jako odzysk tryptofanu dodanego do badania przedstawia tabela II.

Przeprowadzono także badania ogrzewając tryptofan wobec chlorku cynawego działającego stabilizująco. Ogrzewanie tryptofanu z chlorkiem cynawym wykonano z ampulkami o następującej zawartości:

- c) 1 ml roztworu tryptofanu (1 mg), 0,1 g krystalicznego chlorku cynawego, 1 ml 10-n NaOH
- d) 0,9 ml roztworu tryptofanu (1 mg), 0,1 kazeiny 0,1 g krystalicznego chlorku cynawego, 1 ml 10-n NaOH.

Ampułki, które w czasie ogrzewania posiadały dodatek chlorku cynawego, dzielono na dwa szeregi (zarówno ampulki podane w punkcie c, jak i d). Jeden szereg opracowano tak jak ampulki poprzednie, natomiast zawartość drugiego szeregu ampulek przenoszono ilościowo do kolbek miarowych pojemności 25 ml, dodawano 19-n H_2SO_4 do zobojętnienia oraz 1 g Ag_2SO_4 , uzupełniano wodą do kreski, mieszano i po $1/2$ godzinie sączono. Siarczan srebrowy dodawano celem strącenia chlor-

Tabela II

Rodzaj postępowania	Odzysk tryptofanu w procentach
tryptofan z NaOH z kazeiną bez ogrzewania	100,0
tryptofan z NaOH z kazeiną ogrzewany 1/2 godz.	97,5
tryptofan z NaOH bez ogrzewania	100,0
tryptofan z NaOH ogrzewany 1/2 godz.	97,4
tryptofan z NaOH ogrzewany 12 godz.	84,0
tryptofan z NaOH i kazeiną ogrzewany 12 godz.	84,0
tryptofan z NaOH ogrzewany 24 godz.	78,8
tryptofan z NaOH z kazeiną ogrzewany 24 godz.	75,0

ków (9). Z przesączu pobierano po 1 ml roztworu do badania. Wyniki badań, przeprowadzonych w powyższy sposób i podanych jako odzysk tryptofanu dodanego do badanych prób przedstawia tabela III.

Tabela III

Rodzaj ogrzewania tryptofanu w ciągu 24 godz.	Odzysk tryptofanu w procentach
z NaOH i $\text{SnCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	20,0
z NaOH kazeiną i $\text{SnCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	19,7
z NaOH i $\text{SnCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ po ogrzewaniu strącono chlorki	96,0
z NaOH kazeiną i $\text{SnCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ po ogrzewaniu strącono chlorki	81,0

4. Oznaczanie tryptofanu w hydrolizowanej kazeinie

4.1. Wykonanie hydrolizy kazeiny

Hydrolizę kazeiny wykonano w temp. 100° w ciągu 1/2, 12, 24 i 30 godzin wodorotlenkiem sodowym. Hydrolizę przeprowadzano w ten sposób, że z ampulek, w których znajdowało się po 0,1 g kazeiny (kazeina o zawartości 14,3% azotu), 1 ml 10-n NaOH i 1 ml wody, wyciągano po-

wietrze, wprowadzono azot i zatapiało. Dalsze postępowanie aż do pobierania roztworu do badania jak w p. 3.

We wszystkich przypadkach oprócz hydrolizy samej kazeiny przeprowadzono w tych samych warunkach także hydrolizę kazeiny z dodanym tryptofanem. Miało to na celu sprawdzenie odzysku tryptofanu poddanego temu samemu procesowi co kazeina. W celu zmniejszenia strat tryptofanu powstających podczas hydrolizy przeprowadzono ją w obecności 0,1 g $\text{SnCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ w ciągu 24 godzin w temp. 100° .

Roztwór otrzymany po hydrolizie przenoszono ilościowo do kolbki miarowej pojemności 25 ml, zobojętniano 19-n H_2SO_4 , dodawano 1 g Ag_2SO_4 celem strącenia chlorków, uzupełniano wodą do kreski, wstrząsano i po $\frac{1}{2}$ godzinie sączono. Do oznaczania tryptofanu pobierano po 1 ml roztworu.

4.2 Wyniki oznaczania tryptofanu w kazeinie po hydrolizie.

Wyniki oznaczania podane w poniższej tabeli obliczone są z krzywej wzorcowej tryptofanu na podstawie oznaczenia tryptofanu po hydrolizie kazeiny i skorygowane przez uwzględnienie odzysku tryptofanu poddanego ogrzewaniu razem z kazeiną.

Tabela IV

Rodzaj hydrolizy	Czas hydrolizy	Ilość tryptofanu w kazeinie
Kazeina + NaOH	$\frac{1}{2}$ godz.	1,16%
Kazeina + NaOH	12 godz.	1,23%
Kazeina + NaOH	24 godz.	1,58%
Kazeina + NaOH	30 godz.	1,29%
Kazeina + NaOH + SnCl_2 /chlorki wy- strącane Ag_2SO_4	24 godz.	1,66%

4.3 Oznaczanie tryptofanu w hydrolizatach kazeiny

Przeprowadzano hydrolizę kazeiny w ciągu 24 godzin, jak opisano w punkcie 4.1, z dodatkiem chlorku cynawego, lecz bez dodatku tryptofanu.

Ampułki po hydrolizie podzielono na dwie grupy. Zawartość obu grup ampulek przeniesiono ilościowo do kolbek miarowych pojemności 25 ml i zobojętniono 19-n H_2SO_4 . Do jednej grupy kolbek dodano po 1 ml roztworu zawierającego 9,0; 1,0; 1,5; 2,5 mg tryptofanu, następnie dodano po 1 g Ag_2SO_4 , uzupełniono wodą do kreski i po 30 minutach sączono. Do drugiej grupy kolbek dodano po 1 g Ag_2SO_4 , uzupełniono wodą do kreski, po 30 min. sączono i po 15 ml przesączów przenoszono do kolbek miarowych pojemności 25 ml, dodawano po 1 ml roztworu tryptofanu i uzupełniano do kreski wodą.

Do badania z jednej jak i drugiej grupy pobierano po 1 ml. Odzysk tryptofanu dodanego do hydrolizatów kazeiny wynosił w obu przypad-

kach 92,5%. Zawartość tryptofanu w hydrolizatach kazeiny skorygowana przez uwzględnienie odzysku tryptofanu wynosiła 1,28%.

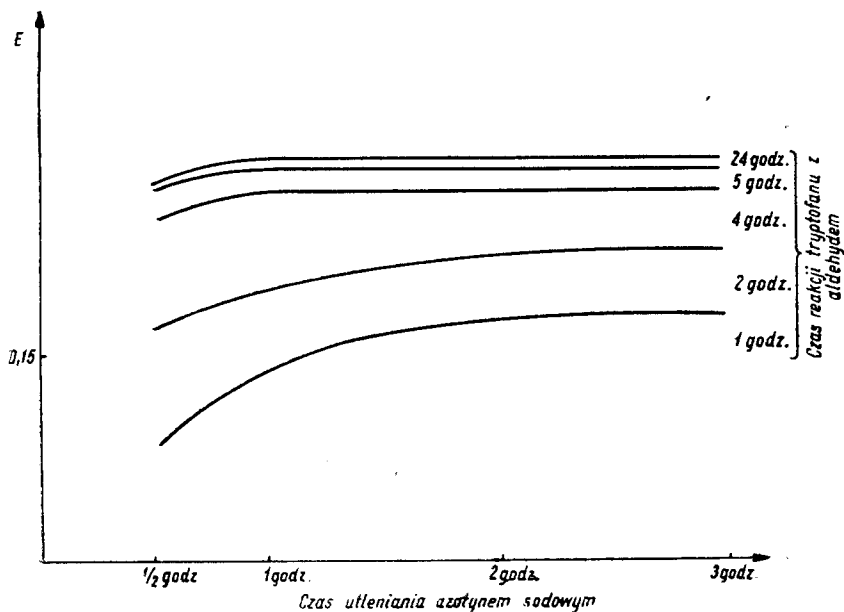
5. Oznaczanie tryptofanu w niehydrolizowanej kazeinie

Oznaczanie tryptofanu w kazeinie niehydrolizowanej przy użyciu aldehydu p-dwumetyloaminobenzoesowego w środowisku kwasu siarkowego opisali *Spies* i *Chambers* (8). W celu ustalenia optymalnych warunków przebiegu reakcji dla oznaczania tryptofanu w niehydrolizowanej kazeinie, przeprowadzono oznaczanie ekstynkcji otrzymanych barwnych roztworów w zależności od czasu przebiegu reakcji tryptofanu z aldehydem p-dwumetyloaminobenzoesowym oraz od czasu utleniania azotynem sodowym. Odczynniki oraz metodę oznaczania stosowano jak w p. 1.

5.1 Przebieg reakcji w zależności od czasu.

Do badania rozpuszczono 0,1 g kazeiny w wodzie w kolbce miarowej o pojemności 25 ml, otrzymując opalizujący roztwór. Przebieg badania przedstawiał się następująco: Do probówek dodawano po 1 ml roztworu aldehydu p-dwumetyloaminobenzoesowego, 10 ml 19- H_2SO_4 i 1 ml roztworu kazeiny. (Sposób przeprowadzenia reakcji jak w p. 1.2). Po tym odstawiono do cieplarki w temp. 25° na okres 1, 2, 4, 5 i 24 godziny, a następnie dodawano po 0,1 ml 0,04%-owego roztworu $NaNO_2$ i odstawiono w ciemnym miejscu na przeciąg 1/2; 1 i 2 godzin. Doświadczenie było tak przeprowadzone, że dla każdego czasu reakcji tryptofanu z aldehydem p-dwumetyloaminobenzoesowym stosowano wszystkie czasy utleniania (1/2, 1 i 2 godziny).

Wyniki badań przedstawiono na ryc. 2.



Ryc. 2.

Z przeprowadzonych badań wynika, że maksymalna gęstość optyczna badanych roztworów przypada dla czasu reakcji tryptofanu z aldehydem 24 godz. i czasu utleniania 1 godz.

5.2 Wykonanie oznaczenia

Próbki kazeiny po 0,1 g rozpuszczano w wodzie w kolbkach miarowych pojemności 25 ml. Do poszczególnych kolbek dodawano następnie po 1 ml roztworów o zawartości 0; 1 0; 1,5; 2,5 mg tryptofanu, uzupełniając wodą do kreski. Z tak przygotowanych roztworów pobierano po 1 ml do oznaczania tryptofanu. Badania przeprowadzono w czasie 24; 5 i 4 godziny o jednogodzinnym czasie utleniania. Ilość tryptofanu w niehydroлизованей kazeinie obliczona dla powyższych przypadków na podstawie odzysku tryptofanu dodanego wynosiła 1,16%.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Czynniki takie jak czas, obecność stabilizatora i produktów hydrolizy białka wpływają w sposób istotny na ilość tryptofanu oznaczanego po hydrolizie.

Przeprowadzone w toku pracy badania mające na celu stwierdzenia wpływu czasu ogrzewania tryptofanu w warunkach hydrolizy alkalicznej przy zachowaniu stałej temperatury wykazały, że ilość wykrytego tryptofanu zmniejszała się w miarę zwiększenia czasu. Rozpuszczając tryptofan w ługu bez ogrzewania nie stwierdzono zmian ilościowych w stosunku do roztworu wzorcowego tryptofanu.

Już $\frac{1}{2}$ -godzinne ogrzewanie w temperaturze 100° z NaOH w atmosferze azotu daje odzysk tryptofanu 97,4%. Po 12-godzinnym ogrzewaniu odzysk wynosi 84,0%, a 24-godzinnym 78,8%. Ogrzewanie o sześć godzin (dłuższe (30 godz.) nie wywołało już większych dalszych zmian ilościowych. Otrzymany odzysk w tym przypadku był o 0,5% niższy.

Te same doświadczenie wykonano z tryptofanem w obecności kazeiny, stwierdzając w miarę wzrostu czasu ogrzewania ujemny wpływ kazeiny. Nie stwierdzono różnic między ogrzewaniem z wodorotlenkiem sodowym samego tryptofanu i tryptofanu z kazeiną w czasie $\frac{1}{2}$ i 12 godzin. Wpływ ten jednak był już wyraźny przy ogrzewaniu 24-godzinnym, dając odzysk o 3,8% niższy.

Zastosowano następnie dodawanie przed ogrzewaniem do tryptofanu i do tryptofanu z kazeiną chlorku cynawego jako stabilizatora polecanego przez szereg autorów. Oznaczenie jednak tryptofanu po tym postępowaniu było niekorzystne, gdyż zaznaczał się wyraźny przeszkadzający wpływ chlorków, które następnie usuwano za pomocą Ag_2SO_4 zgodnie z zaleceniem *Spiesa* i *Chambersa* (9). Odzysk w tym przypadku wynosił 96,0% dla samego tryptofanu, a 81,0% dla tryptofanu z kazeiną. Jak z powyższego widać, odzysk tryptofanu, ogrzewanego z NaOH bez kazeiny jak również z kazeiną, przy zastosowaniu chlorku cynawego jest większy niż poprzednio. Szczególnie duży wzrost odzysku daje się zauważyć dla samego tryptofanu, natomiast dla tryptofanu z kazeiną wzrost ten jest znacznie mniejszy.

Spieß i *Chambers* (7) podają dla oznaczeń tryptofanu kilka sposobów postępowania analitycznego, opartych na tej samej reakcji z aldehydem p-dwumetyloaminobenzoowym w kwasie siarkowym i utlenianiu azotynem sodowym.

W pracy naszej wykonaliśmy badania mające na celu ustalenie najkorzystniejszego czasu zarówno reakcji z aldehydem, jak i utlenienia azotynem sodowym stwierdzając najlepsze warunki przy 4 godzinach reakcji z aldehydem i $\frac{1}{2}$ -godzinnym utlenianiu azotynem sodowym. Przedłużenie tych okresów nie wpłynęło już korzystnie na przebieg oznaczenia.

Bardzo ważne było określenie warunków, w jakich należy przeprowadzać hydrolizę kazeiny, aby otrzymać najbardziej realne wyniki oznaczenia tryptofanu.

Na podstawie przeprowadzonych badań należy stwierdzić, że tryptofan ulega najmniejszym stratom w czasie hydrolizy wykonanej wobec chlorku cynawego i następnym wytrącaniu chlorków siarczanem srebrowym.

W zależności od sposobu przeprowadzenia hydrolizy kazeiny otrzymano różne wyniki oznaczenia tryptofanu metodą podaną przez *Spiesa* i *Chambersa*; najwyższe wyniki uzyskano po 24-godzinnej hydrolizie. Przeprowadzenie hydrolizy w czasie krótszym ($\frac{1}{2}$ i 12 godzin) jak i dłuższym (30 godzin) dało wyniki niższe od poprzednich.

Bardzo często oznaczenie tryptofanu przeprowadzane jest w niehydrolizowanym białku. Metoda ta jest znacznie mniej kłopotliwa przez pominięcie całego procesu hydrolizy, którego wykonanie nastęrcza często duże trudności. Ustalając najkorzystniejszy przebieg reakcji, w tym przypadku stwierdzono, że 24-godzinny czas reakcji tryptofanu z aldehydem p-dwumetyloaminobenzaesowym w temperaturze 25° i jednogodziny czas utlenienia azotynem sodowym dawały roztwory o największej gęstości optycznej, 5 i 4 godziny reakcji i 1 godzina utleniania dawały wyniki niższe. Przedłużenie utleniania do 3 godzin w przypadku 1 i 2-godzinnej reakcji z aldehydem dawało zwiększenie gęstości optycznej, natomiast przedłużając czas utleniania poza 1 godzinę przy 4, 5 i 24 godzinach reakcji, nie otrzymano podwyższenia ekstynkcji otrzymanych roztworów. Ze względu na to, że wartości ekstynkcji dla 5 i 24 godzin reakcji leżały bardzo blisko siebie nie przeprowadzono badań w czasach pośrednich. Oznaczenie tryptofanu w kazeinie bez hydrolizy wykonano dla czasów reakcji z aldehydem 4; 5 i 24 godziny przy 1-godzinnym utlenianiu we wszystkich przypadkach. Badania przeprowadzono z czystą kazeiną oraz kazeiną z dodanym tryptofanem. Obliczona na podstawie odzysku tryptofanu ilość tryptofanu w kazeinie wynosi 1 16 $\frac{3}{4}$ %.

Oznaczając tryptofan w niehydrolizowanej kazeinie należy przeprowadzać reakcję z aldehydem w ciągu 5 godzin, a utlenianie w ciągu 1 godziny. Chociaż 24-godzinny czas reakcji dawał nieznacznie wyższą ekstynkcję, to jednak ze względu na wygodę oznaczania można stosować czas krótszy, gdyż uzyskany wynik zawartości tryptofanu nie różni się w tym przypadku istotnie od wyniku otrzymanego po 24 godzinach. Badając natomiast warunki oznaczania tryptofanu wolnego, stwierdzono najkorzystniejszy czas reakcji z aldehydem 4 godziny, a czas utleniania $\frac{1}{2}$ godziny.

Na podstawie przeprowadzonych własnych badań stwierdzono, że tryptofan w kazeinie należy oznaczać po 24-godzinnej hydrolizie przeprowadzanej wobec chlorku cynowego jako stabilizatora. Obliczanie ilości tryptofanu w białkach powinno być wykonane po uwzględnieniu odzysku dodanego do materiału badanego przed hydrolizą, stosując współczyn-

nik odzysku otrzymany na drodze doświadczalnej. Jak wynika z naszej pracy, współczynnik ten dla tryptofanu po hydrolizie kazeiny w ciągu 24 godzin w temperaturze 100^owobec chlorku cynawego wynosi 1,23, co było uwzględnione przy podawaniu ostatecznych wyników.

Wyniki innych autorów oznaczających tryptofan w kazeinie są bardzo rozbieżne i tak np. dla kazeiny hydrolizowanej wynoszą między innymi 1,17, 124, 2,25%, a dla niehydrolizowanej najczęściej 1,17% (6, 8, 9).

С. Краузе, Л. Пекарски, Я. Максимчук

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТРИПТОФАНА

Содержание

Исследовано влияние температуры и времени при щелочном гидролизе на количество определенного триптофана, констатирух потери триптофана пропорционально к времени нагревания. Кроме того подвергали гидролизу казеин при температуре 100^o в продолжении 12, 24 и 30 часов. Количество найденного триптофана было самое большое после 24-часового гидролиза и равнялось 1,66%, между тем количество триптофана определенного в не гидролизованной казеине методом Spiess и Chambersa равнялось 1,16%.

Кроме того проделаны были исследования, целью которых была стабилизация триптофана во время щегочного гидролиза при употреблении хлористого олова.

S. Krauze, L. Piekarski, J. Maksymczuk

QUANTITATIVE DETERMINATION OF TRYPTOPHANE

Summary

The influence of temperature and time on the amount of estimated tryptophane was investigated in conditions of alkaline hydrolysis. The loss of tryptophane was found to be proportional to the time of heating. Besides that casein was hydrolyzed at the temperature of 100^oC during 12, 24 and 30 hours. The quantity of estimated tryptophane was the highest after 24 hours hydrolysis and amounted to 1.66%, and the quantity of tryptophane estimated in casein not hydrolyzed by means of Spiess and Chambers' method amounted to 1.16%.

Additional studies were carried out for the purpose of stabilization of tryptophane during the course of alkaline hydrolysis while employing stannic chloride.

PIŚMIENNICTWO

1. Brand E., Kassel B.: J. Biol. Chem., 131, 489, 1939. — 2. Brüggemann J., Drepper K., Drepper G.: Hoppe Seyler's Z.: Physiol. Chem., 289, 211, 1952. — 3. Drère A.: Bull. Soc. Chim. Biol. 38, 243 (1956). — 4. Lugg J. W. H.: Biol. J., 31, 1422, 1937. — 5. Lugg J. W. H.: Biol. J., 32, 775, 1938. — 6. Reindel F., Bienfeld W.: Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., 305, 123, 1956. — 7. Spiess J. R., Chambers D. C.: Anal. Chem., 20, 30, 1948. — 8. Spiess J. R., Chambers D. C.: Anal. Chem., 21, 1249. — 9. Spiess J. R., Chambers D. C.: Anal. Chem., 22, 1447, 1950. — 10. Staub M., Bosshardt H.: Mitteilungen, 42, 458, 1951.
11. Sullivan M. X., Hess W. C.: J. Biol. Chem., 1955, 441, 1944. — 12. Tillmans J., Alt A.: Bioch. Z., 164, 135, 1925.

Adres autora: PZH, ul. Chocimska 24.