

## 114. Unterlagen zu einem qualitativen Nachweis von Cystein auf photographischer Grundlage

von F. H. Schwarzenbach

(12. I. 59)

### A. Grundversuch

Bringen wir einige Tropfen einer Cysteinlösung auf die lichtempfindliche Schicht einer photographischen Emulsion und belichten wir nach einer kurzen Einwirkungszeit im Dunkeln die Filmschicht auf totale Schwärzung, so heben sich nach der Entwicklung die Cysteintropfen als helle Flecken vom schwarzen Hintergrund ab (Fig. 1 und 2).

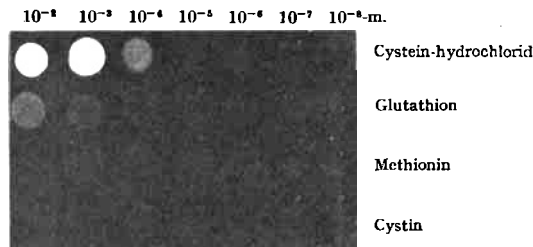


Fig. 1. Die Wirkung von Cystein-hydrochlorid, Glutathion, Methionin und Cystin im Phototest Verdünnungen von 10<sup>-2</sup>-m. bis 10<sup>-8</sup>-m. in Borax-Bernsteinsäure-Puffer nach KOLTHOFF, pH = 4,0. Einwirkung auf die Photoschicht 3 Min., Belichtung 8 Sek.

In der vorliegenden Mitteilung sind vor allem die praktischen Erfahrungen zusammengestellt, die sich bei der Auswertung dieser Reaktion zu einem photographischen Nachweisverfahren für Cystein ergaben.

### B. Der photographische Tüpfeltest für Cystein

a) *Photographische Bedingungen. Photographische Emulsion.* Die Versuche werden mit Vergrößerungspapier «Agfa-Brovira» (mittlere Härte, weiss, glänzend) durchgeführt. Die Verwendung von Vergrößerungspapier an Stelle von panchromatischen Emulsionen erlaubt es, die Experimente bei rotem Licht statt bei völliger Dunkelheit anzusetzen.

*Lichtquelle.* Für die Belichtung wird ein handelsüblicher Vergrößerungsapparat verwendet. Soll Cystein in gefärbten Extrakten nachgewiesen werden, so sind der Lichtquelle geeignete Farbfilter zur optischen Kompensation vorzuschalten (vgl. Abschnitt C, e, «Störungen durch gefärbte oder trübe Lösungen»).

*Belichtung und Entwicklung.* Die Belichtungsbedingungen sind für die verwendete Apparatur in besonderen Vorversuchen festzulegen. Die Ergebnisse von Versuchen, in denen die Belichtungszeit und die Entwicklungsbedingungen variiert wurden, sind in den Fig. 2a und 2b veranschaulicht. Die Papiere mit den aufgetropften Lösungen von Cystein-hydrochlorid (in unsern Versuchen wurde nur L-Cystein-hydrochlorid verwendet) in den Verdünnungen 10<sup>-2</sup> bis 10<sup>-8</sup>-m. werden nach dreiminütiger Einwirkung während 2, 4, 8, 16 und 32 Sek. belichtet. Die Entwicklung erfolgte mit Metol-Hydrochinon-Entwickler «Agfa», bei 20°; die Entwicklungsdauer stieg mit der Verdünnung des Entwicklers wie folgt:

Verdünnung des Entwicklers mit Wasser . . . . .	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
Entwicklungsdauer in Min. . . . .	1½	2	2½	3	5

Die Differenzierung zwischen den verschiedenen Konzentrationsstufen nimmt mit steigender Belichtungszeit vorerst zu; bei weiterer Steigerung der Belichtungsdauer verschwindet die Aufhellung bei den niedrigen Konzentrationsstufen. Ausserdem nimmt in der Konzentration von  $10^{-2}$ -m. im Zentrum des Flecks die aufhellende Wirkung ab, wobei sich jedoch am Rande ein heller Saum ausbildet.

Destilliertes Wasser (DW) bewirkt bei kurzen Belichtungszeiten eine leichte Aufhellung; bei Belichtungen von 8 Sek. und mehr verschwindet diese Aufhellung (Fig. 2a und 2b).

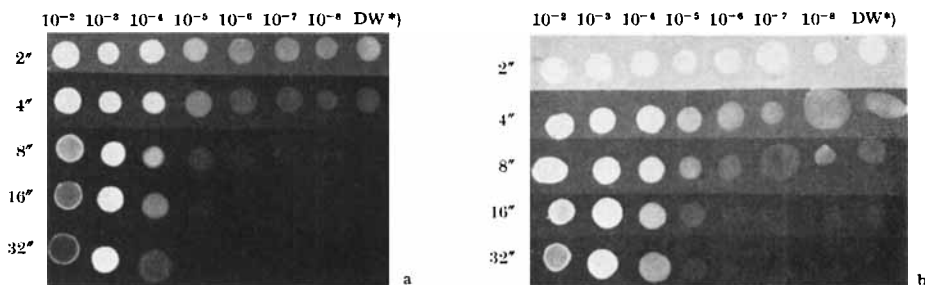


Fig. 2. Einfluss von Belichtung und Entwicklung auf die photographische Nachweisreaktion von Cystein-hydrochlorid

a) Entwicklung in Metol-Hydrochinon-Entwickler «Agfa»; Verdünnung 1:4; Entwicklungsdauer 2 Min. bei 20°. b) Entwicklung in Metol-Hydrochinon-Entwickler «Agfa»; Verdünnung 1:32; Entwicklungsdauer 5 Min. bei 20°. Lösungen von Cystein-hydrochlorid  $10^{-2}$ – $10^{-8}$ -m. in Borax-Bernsteinsäure-Puffer, pH = 4,0. Belichtungszeiten abgestuft 2, 4, 8, 16 und 32 Sek.

\*) DW = destilliertes Wasser.

Auf Grund dieser Beobachtungsreihe wählten wir für die Versuche eine Belichtung, die knapp über der Minimaldosis für vollständige Schwärzung der unbehandelten Teile des Papiers liegt. Durch Abblendung der Lichtquelle fixierten wir die dazu notwendige Belichtungszeit auf 8 Sek.

Verdünnen wir den Entwickler unter gleichzeitiger Verlängerung der Entwicklungsdauer, so gelingt es, die Empfindlichkeit der Reaktion zu steigern. Besonders auffällig ist die Erhöhung der Sensibilität bei verlängerten Belichtungszeiten (Fig. 2a und b; 16'' und 32''); gleichzeitig wird die auslöschende Wirkung der hohen Cysteinkonzentration vermindert.

Für unsere Versuche verwendeten wir bei unveränderter apparativer Anordnung eine Belichtungszeit von 8 Sek.; die Entwicklung erfolgte in Metol-Hydrochinon-Entwickler «Agfa» 1:2 während  $1\frac{1}{2}$  Min. bei 20°.

*Fixierung und Trocknung der Papiere.* Die belichteten Papiere werden über destilliertes Wasser in saures Fixierbad («Fixyl») übergeführt und nach halbständiger Fixierung über Nacht gewässert. Die Trocknung erfolgt auf der Hochglanzpresse.

b) *Versuchsbedingungen für die Tüpfelreaktion.* Die Tüpfelreaktion ist bei rotem Licht in der Dunkelkammer auszuführen. Die klare, auf pH 3,0–4,0 gepufferte Lösung (s. folgenden Abschnitt) wird mit einer Pipette auf die lichtempfindliche Schicht getropft (Tropfen von 0,04 ml). Da sich die aufhellende Wirkung des Cysteins bei längerer Dauer der Einwirkung steigert, lässt man den Tropfen zunächst mindestens 1 Min. auf der Filmschicht liegen. Dann belichtet man das Photopapier, ohne den Tropfen von der Schicht zu entfernen.

In unseren Versuchen hat es sich bewährt, die Cysteinlösungen drei Min. einwirken zu lassen. Trocknet der Tropfen ein, so bleibt die Reaktion erhalten.

c) *Wahl des Puffers.* Die aufhellende Wirkung des Cysteins in der Photoreaktion hängt in ausgeprägtem Masse von der Wasserstoffionenkonzentration der Lösung ab. Im alkalischen Bereich geben selbst konzentrierte Cysteinlösungen nur schwache Flecken; im sauren Bereich (bis pH 2,4 untersucht) steigt mit fallendem pH die Aufhellung ständig an (Fig. 3).

<sup>1)</sup> Documenta Geigy, Basel 1955, p. 101.

Puffer, die Chlorionen oder Glycocoll enthalten, sind zu vermeiden, da diese beiden Komponenten in der Konzentration 0,1-m. selbst eine schwache Aufhellung im Phototest bewirken und daher den Nachweis niedriger Cysteinkonzentrationen stören. Für die Versuche eignen sich Citratpuffer nach McILVAINE (pH = 3,0)<sup>1)</sup> und Borax-Bernsteinsäure-Puffer nach KOLTHOFF (pH = 4,0).

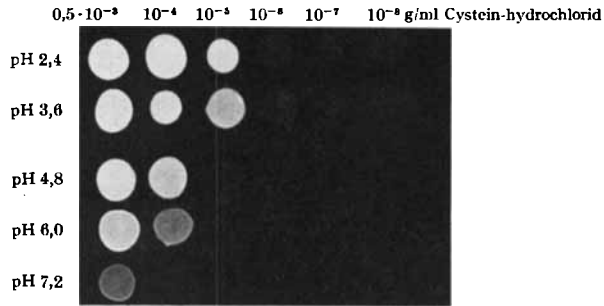


Fig. 3. Beeinflussung der Photoreaktion auf Cystein durch die Wasserstoffionenkonzentration der Lösung

Fünf Parallelen einer Verdünnungsreihe von Cystein-hydrochlorid werden mit Pufferlösungen der Wasserstoffionenkonzentrationen pH 2,4, 3,6, 4,8, 6,0 und 7,2 versetzt (Citratpuffer nach McILVAINE). Endkonzentration des Cystein-hydrochlorids in den Verdünnungsreihen 0,5 g/ml bis 5 µg/ml, Verdünnungsfaktor q = 0,1.

**C. Störungen der photographischen Nachweisreaktion auf Cystein**

a) *Störungen durch Oxydationsmittel.* Prüfen wir Cysteinlösungen, denen man Oxydationsmittel zugesetzt hat, im Phototest, so tritt eine Auslöschung der aufhellenden Wirkung auf. Für den Versuch in Fig. 4 z. B. wurde eine Mischung von 1,0 ml einer wässrigen Lösung von 10<sup>-4</sup> g/ml Cystein-hydrochlorid mit 0,5 ml 3-proz. Wasserstoffperoxyd und 1,0 ml Borax-Bernsteinsäure-Puffer aufgetropft. Der Zusatz des Oxydationsmittels bewirkt eine deutliche Abschwächung der aufhellenden Wirkung.

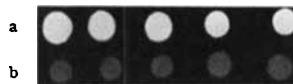


Fig. 4. Oxydation des Cysteins mit 3-proz. Wasserstoffperoxyd

1,0 ml einer Lösung von Cystein-hydrochlorid (10<sup>-4</sup> g/ml) + 1,0 ml Borax-Bernsteinsäure-Puffer pH = 4,0 werden mit 0,5 ml 3-proz. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> versetzt und aufgetropft (Reihe b); in der Kontrolle wird an Stelle des Wasserstoffperoxydes destilliertes Wasser zugesetzt (Reihe a). Belichtung 8 Sek. nach dreiminütiger Einwirkung der Lösungen. Die cysteinbedingte Aufhellung wird durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> abgeschwächt.

In neutraler Lösung ist Cystein autoxydabel. Bewahren wir eine wässrige Verdünnungsreihe von Cystein-hydrochlorid in unverschlossenen Reagenzgläsern bei +1° einige Wochen im Kühlraum auf und prüfen wir die Lösungen in Intervallen von einigen Tagen, so fällt bei zunehmender Lagerungsdauer die Aktivität im Phototest ständig ab (Fig. 5).

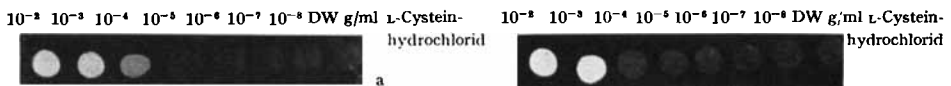


Fig. 5. Lagerungsversuch mit einer Verdünnungsreihe von Cystein-hydrochlorid

Eine frisch hergestellte Verdünnungsreihe von Cystein-hydrochlorid in Wasser wird 3 Wochen bei +1° aufbewahrt und von Zeit zu Zeit im Phototest geprüft. Verdünnungsreihe 10<sup>-2</sup> g/ml bis 10<sup>-8</sup> g/ml. a) Test nach 13 Tagen. b) Test nach 17 Tagen. Einwirkung 1 Min., Belichtung 8 Sek.

b) *Störungen durch Zusatz von Alkali.* Alkalische Lösungen wirken in doppelter Weise störend auf die photographische Cysteinreaktion ein:

1. In alkalischem Milieu wird die Oxydation von Cystein beschleunigt.

2. Dunkeleinwirkung von Alkali begünstigt bei der nachherigen photographischen Entwicklung die Schwärzung der lichtempfindlichen Schicht. Dieser Effekt lässt sich bei einer vorzeitigen Unterbrechung der photographischen Entwicklung durch eine raschere Schwärzung der alkalischen Tropfen im Vergleich zu den übrigen Partien des Photopapiers erkennen (Fig. 6, I und II).



Fig. 6. Aufhebung der photographischen Reaktion von Cystein durch Zusatz von Natronlauge oder Silbernitratlösung. Einfluss eines vorzeitigen Unterbruchs der Entwicklung

- I
- a) 1,0 ml Cysteinlösung (Cystein-hydrochlorid  $10^{-4}$  g/ml) + 1,0 ml NaOH 0,1-n.
  - b) 1,0 ml Cysteinlösung + 1,0 ml  $H_2O$  dest. (Kontrolle).
  - c) 1,0 ml Cysteinlösung + 1,0 ml  $AgNO_3$  0,05-m.
- Belichtung 8 Sek., Entwicklung  $1\frac{1}{2}$  Min., unverkürzt.
- II
- a) 1,0 ml Cysteinlösung (Cystein-hydrochlorid  $10^{-4}$  g/ml) + 0,5 ml NaOH 0,1-n.
  - b) 1,0 ml Cysteinlösung + 0,5 ml  $H_2O$  dest. (Kontrolle).
  - c) 1,0 ml Cysteinlösung + 0,5 ml  $AgNO_3$  0,05-m.
- Belichtung 8 Sek., Entwicklung auf 50 Sek. verkürzt.

c) *Störungen durch Alkalichloride.* Alkalichloride an und für sich bewirken in hoher Konzentration eine leichte Aufhellung im Phototest. Die Prüfung zweier Verdünnungsreihen von Natriumchlorid und Kaliumchlorid von 1-m. bis  $10^{-5}$ -m. in Borax-Bernsteinsäure-Puffer pH = 4,0 zeigte, dass sich die aufhellende Wirkung auf die Konzentration 1,0-m. beschränkt (Fig. 7).

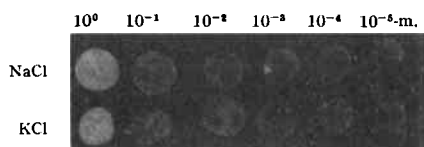


Fig. 7. Die Wirkung von Alkalichloriden in der Photoreaktion

Verdünnungsreihen von Natrium- und Kaliumchlorid 1,0-m. bis  $10^{-5}$ -m. in Borax-Bernsteinsäure-Puffer nach KOLTHOFF, pH = 4,0.

d) *Störung durch Silberionen.* Bei dem benutzten pH stört  $AgNO_3$ , weil es Cystein fällt. Bei einem Überschuss von Silbernitrat fällt Cystein quantitativ aus, so dass die aufhellende Wirkung im Phototest ausbleibt.

e) *Störungen bei gefärbten oder trüben Lösungen.* Bei trüben oder gefärbten Lösungen ist der photographische Test auf Cystein gestört, indem ein Teil des einstrahlenden Lichtes bei der Belichtung der aufgetragenen Tropfen verschluckt wird. Als Folge dieser partiellen Absorption gelangt weniger Licht auf die photographische Emulsion, so dass sich der Fleck bei der Belichtung ganz unabhängig von evtl. vorhandenem Cystein weniger stark als die umgebende Kontrollfläche schwärzt. Dadurch bewirken Farbstofflösungen eine unspezifische Aufhellung. Störungen durch teilweise Lichtabsorption sind bei allen gefärbten Lösungen zu erwarten, die Licht im Empfindlichkeitsbereich der verwendeten photographischen Emulsion absorbieren.

Fig. 8 zeigt die optisch bedingte, aufhellende Wirkung einer gelben (sauren) und einer blauen (basischen) Lösung des Indikators Nitrazingelb. Beide Farbtöne zeigen die gleiche aufhellende Wirkung.

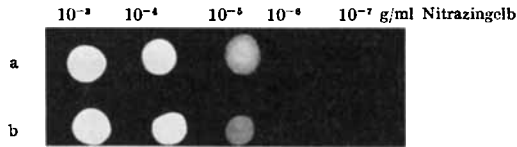


Fig. 8. *Aufhellende Wirkung von Farbstoffen in der Photoreaktion*

Nitrazingelb, Verdünnungsreihe  $10^{-3}$  g/ml– $10^{-7}$  g/ml. Verdünnungsfaktor  $q = 0,1$ .

a) Saure Lösung, gelb gefärbt. b) Alkalische Lösung, blau gefärbt.

Bei klaren Farbstofflösungen lässt sich in günstigen Fällen der aufhellende Effekt durch Ausfilterung der absorbierten Wellenbereiche aus dem Spektrum der Lichtquelle aufheben. Ein Beispiel für die optische Kompensation einer farbstoffbedingten, unspezifischen Aufhellung gibt Versuch Fig. 9 mit Bilirubin in alkalischer Lösung als Farbstoff; durch Vorschaltung der blaugelben Filter SCHOTT BG 17 oder BG 19 wird die aufhellende Wirkung des Bilirubins deutlich abgeschwächt, während die cysteinbedingte Aufhellung unbeeinflusst bleibt.

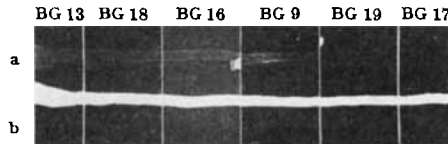


Fig. 9. *Abschwächung einer farbstoffbedingten Aufhellung durch Verwendung geeigneter Farbfilter bei der Belichtung*

Auf eine photographische Schicht sind nebeneinander Streifen einer alkalischen Bilirubinlösung  $1,6 \cdot 10^{-5}$  g/ml (a) und einer Lösung von Cystein-hydrochlorid ( $10^{-3}$  g/ml, ungepuffert) aufgetragen worden (b). Die Belichtung des Filmes erfolgt durch Farbfilter, die zwischen Lichtquelle und photographische Schicht eingeschaltet sind (Belichtung 8 Sek.). Bei Zwischenschaltung der Farbfilter SCHOTT BG 17 und BG 19 erscheint die aufhellende Wirkung der Bilirubinlösung deutlich abgeschwächt, während die Cysteinwirkung unbeeinflusst bleibt.

Bei trüben Lösungen kann die Aufhellung, die oft sehr ausgeprägt ist, durch die Vorschaltung optischer Filter nicht abgeschwächt werden.

#### D. Nachweis von Cysteinflecken in Filterpapier mit Hilfe des Phototests

Die photographische Reaktion lässt sich in verschiedener Weise für den Nachweis von Cystein in Filterpapier modifizieren. Diese Modifikationen eignen sich für die Untersuchung von Chromatogrammen und Elektropherogrammen.

a) *Abklatschverfahren*. Das Abklatschverfahren bietet den grossen Vorteil, Cysteinflecken in Filterpapier genau zu lokalisieren. Sein Nachteil besteht in der geringen Empfindlichkeit.

Filterpapierausschnitte, die Cysteinflecken enthalten (Tropfen von 0,04 ml einer wässrigen Cysteinlösung  $10^{-3}$  g/ml), werden trocken auf ein Vergrösserungspapier aufgelegt. Mit einer Gummwalze, die von mehreren Lagen feuchtem Filterpapier umwickelt ist, wird der Ausschnitt durch langsames, einmaliges Abrollen der Walze angedrückt. Das auf diese Weise befeuchtete und auf die Photoschicht gepresste Filterpapierstück wird nach drei Min. abgezogen. Belichtung und Entwicklung erfolgen wie beim früher beschriebenen Tüpfeltest.

Unter Verlängerung der Belichtungszeit ist es möglich, die Photoschicht direkt durch das aufgelegte, befeuchtete Filterpapierstück zu belichten.

Das Abklatschverfahren erfordert einige Geschicklichkeit. Ist die Walze zu nass, so werden die Flecken verwaschen; doch tritt eine stärkere Aufhellung ein. Bei ungenügender Befeuchtung erscheinen oft blinde Stellen auf der belichteten Photoschicht.

Fig. 10a und b zeigen die Lokalisation von Cysteineflecken in Filterpapier mit Hilfe des Abklatschverfahrens. Drei Tropfen (0,04–0,05 ml) einer Cysteinlösung  $10^{-3}$  g/ml wurden auf ein Filterpapier aufgetropft. Diese Papiere wurden an der Luft getrocknet; der Nachweis erfolgte 2–15 Tage nach dem Auftrag der Lösung. Die beiden Aufnahmen zeigen die Unterschiede bei Verwendung einer stark befeuchteten (Fig. 10b) und einer mässig befeuchteten Filterpapierwalze (Fig. 10a). Bei dem in Fig. 10b dargestellten Versuch erfolgte die Belichtung durch das aufgelegte Filterpapier hindurch.

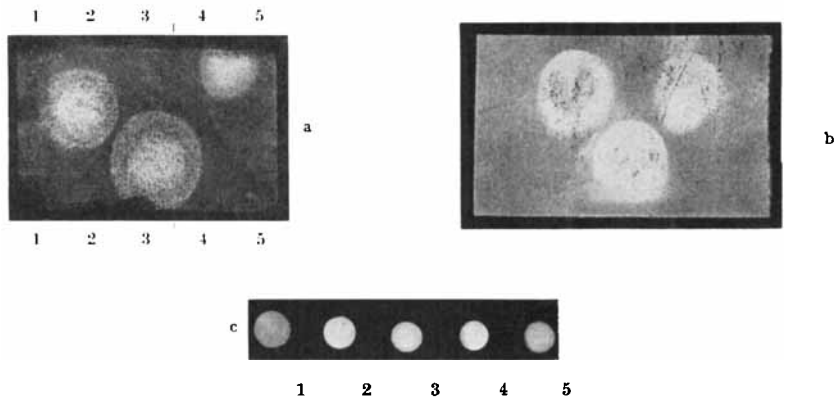


Fig. 10. Nachweis von Cysteineflecken in Filterpapier nach dem Abklatschverfahren

- a) Abklatschen und Belichtung getrennt. Drei Tropfen (je 0,04 ml) einer wässrigen Lösung von Cystein-hydrochlorid  $10^{-5}$  g/ml werden auf Filterpapier aufgetropft und 48 Std. bei Zimmertemperatur getrocknet. Nachweis durch Abklatschen auf Vergrößerungspapier Agfa-Brovira. Einwirkungszeit 1 Min., Belichtung 8 Sek. (Zahlen 1–5 s. Text, S. 1138).
- b) Abklatschen mit Belichtung durch aufgelegtes Filterpapier hindurch. Drei Tropfen (je 0,04 ml) einer wässrigen Lösung von Cystein-hydrochlorid  $10^{-3}$  g/ml werden auf Filterpapier aufgetropft und während 16 Tagen bei Zimmertemperatur getrocknet. Einwirkung auf Photoschicht 1 Min. Belichtung durch Filterpapier hindurch 15 Sek. (Einzelheiten s. Text).
- c) Elutionsverfahren. Nachweis von Cystein in Filterpapier durch Photoreaktion mit einem Eluat (Erklärung s. Text, S. 1138).

b) *Elutionsverfahren*. Bei eindimensionalen Papierchromatogrammen oder Elektropherogrammen werden die Streifen quer zur Fliessrichtung der aufgetrennten Lösungen in Abschnitte passender Breite unterteilt. Man schneidet die Abschnitte mit einer Schere so zu, dass sie in einer Spitze auslaufen, und hängt den Teilstreifen mit der Spitze nach unten frei an einen mit destilliertem Wasser getränkten Block aus gefaltetem Filterpapier. Die nach einiger Zeit an der Spitze des Teilstreifens austretenden Tropfen werden auf Photopapier aufgefangen und den Bedingungen des Tüpfeltests entsprechend im Phototest geprüft.

Die Elutionsmethode für den photographischen Nachweis von Cystein ist sehr empfindlich und dem Abklatschverfahren immer dann vorzuziehen, wenn kleine Substanzmengen nachzuweisen sind.

Die verwendeten Filterpapiere (für Auftrennung und für die Herstellung des Filterpapierblocks) sind in Vorversuchen auf ihren Gehalt an aufhellenden Substanzen zu prüfen.

Fig. 10c zeigt das Ergebnis eines Versuches zum Nachweis von Cysteineflecken in Filterpapier nach der Elutionsmethode. Drei Tropfen (0,04–0,05 ml) einer Cysteinlösung von  $10^{-4}$  g/ml wurden in der Art der Fig. 10a und b auf ein Filterpapier aufgetropft und an der Luft während 10 Tagen vollständig getrocknet. Das Filterpapier wurde nach dem Schema der Fig. 10a in die Streifen 1–5 zerschnitten, die wie oben beschrieben eluiert wurden. Die Tropfen 1–5 der Fig. 10c entsprechen diesen fünf Eluat.

### E. Versuche zur Abgrenzung der Spezifität der photographischen Nachweisreaktion für Cystein

a) *Aminosäuren*. Um die Spezifität der Reaktion abzutasten, untersuchten wir vorerst die unten aufgeführten Aminosäuren im Phototest. Dazu wurden sie je nach ihrer Löslichkeit in der Konzentration von  $10^{-2}$  g/ml,  $10^{-3}$  g/ml oder  $10^{-4}$  g/ml in Borax-Bernsteinsäure-Puffer pH 4,0 nach KOLTHOFF gelöst und diese Lösungen in geometrischer Progression mit dem Verdünnungsfaktor  $q = 0,1$  bis zum Ausbleiben der Photoreaktion verdünnt.

Es erwiesen sich nur zwei Aminosäuren als wirksam: L-Cystein-hydrochlorid: Aufhellung bis  $10^{-5}$  g/ml, und Glutathion (vermutlich oxydierte Form): schwache Aufhellung bis  $10^{-4}$  g/ml.

Alle übrigen waren unwirksam: L(-)-Cystin (Anfangskonzentration  $10^{-4}$  g/ml), Glycocoll, L(-)-Dihydroxy-phenylalanin (Anfangskonzentration  $10^{-3}$  g/ml), L(-)-Methionin, L(+)-Alanin, L(-)-Glutamin, L(+)-Arginin, L(-)-Asparagin, L(+)-Valin, L(-)-Tryptophan, L(-)-Prolin, L(-)-Histidin, L(-)-Phenylalanin, Sarkosin (Anfangskonzentration  $10^{-2}$  g/ml).

Unter den geprüften Aminosäuren besitzt also nur Cystein-hydrochlorid eine stark aufhellende Wirkung im Phototest. Schwächer aufhellend wirkt Glutathion, während die beiden schwefelhaltigen Aminosäuren Cystin und Methionin, die keine freie SH-Gruppe aufweisen, negativ reagieren. Fig. 1 gibt das Ergebnis einer vergleichenden Versuchsreihe mit diesen 4 Aminosäuren in den Konzentrationen  $10^{-2}$ -m. bis  $10^{-8}$ -m. wieder, das dieses Verhalten bestätigt.

Glycocoll weist im Konzentrationsbereich von  $10^{-3}$  bis  $10^{-8}$  g/ml keine aufhellende Wirkung auf; dagegen reagiert diese Aminosäure in der Konzentration von  $6 \cdot 10^{-3}$  g/ml schwach positiv.

b) *Weitere Substanzen*. Stark aufhellend wirkt im Phototest Natriumthiosulfat (SH-Gruppe), während Natriumrhodanid (S=CNH) weniger aktiv ist (Fig. 11); Alkalichloride zeigen in hoher Konzentration eine schwach positive Reaktion (Fig. 7).

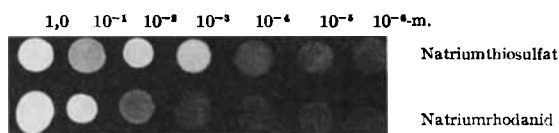


Fig. 11. Die Wirkung von Natriumthiosulfat und Natriumrhodanid im Phototest Verdünnungsreihen 1,0-m. bis  $10^{-8}$ -m. in Borax-Bernsteinsäure-Puffer nach KOLTHOFF, pH = 4,0. Verdünnungsfaktor  $q = 0,1$ . Einwirkung auf die lichtempfindliche Schicht während 3 Min., Belichtung 8 Sek.

Auf Grund dieser ersten Versuche lässt sich vermuten, dass für die aufhellende Wirkung im Phototest eine freie Sulfhydrylgruppe in der Molkel notwendig ist. Experimente sind im Gange, um diese Vermutung durch Untersuchung weiterer Thiolverbindungen zu prüfen.

### F. Empfindlichkeit des photographischen Nachweisverfahrens für Cystein

Die Empfindlichkeit des photographischen Tüpfeltests wurde mit Hilfe von Cystein-hydrochlorid in Borax-Bernsteinsäure-Puffer pH = 4,0 untersucht. Die Bestimmung der aufhellenden Wirkung erfolgte durch visuellen Vergleich mit den Aufhellungsstufen eines Eichstreifens. Dieser Eichstreifen wurde durch Verdünnung einer Ausgangslösung von Cystein-hydrochlorid  $10^{-4}$  g/ml mit dem Verdünnungsfaktor  $q = 0,5$  hergestellt (Fig. 12). Stufen 1–6, Verdünnungsreihe von Cystein-hydrochlorid in Borax-Bernsteinsäure-Puffer pH = 4,0; Stufe 7, Kontrolle mit Pufferlösung ohne Cysteinzusatz.



Fig. 12. Standardreihe zur Beurteilung von Aufhellungen

Die Stufen sind nach abnehmender Aufhellung fortlaufend von 1–7 bezeichnet. Herstellung der Standardreihe: Eine Ausgangslösung von Cystein-hydrochlorid  $10^{-4}$  g/ml wird fortlaufend mit dem Verdünnungsfaktor  $q = 1/2$  verdünnt (pH = 4,0). Einwirkung 3 Min., Belichtung 8 Sek.

Als Mass für die Aktivität eines Stoffes im Phototest wird die als Grenzkonzentration bezeichnete Konzentration der Verdünnungsstufe gewählt, die bei Ausmittlung von fünf parallelen Versuchen im Mittel eine Aufhellung der Stufe 5 ergibt. Diese Stufe lässt sich, wie Versuche mit verschiedenen Versuchspersonen zeigten, noch sicher gegen die Stufe 7 abgrenzen.

Versuche mit verschiedenen Präparaten von Cystein-hydrochlorid zeigten, dass eine mittlere Aufhellung, die der Stufe 5 entspricht, bei einer Verdünnung von ca.  $6 \mu\text{g}/\text{ml}$  (d. h.  $4 \cdot 10^{-5}\text{-m.}$ ) erreicht wird (Fig. 12), was bei der verwendeten Tropfengrösse von 0,04 ml einer nachweisbaren Mindestmenge von 0,24  $\mu\text{g}$  entspricht.

Vergleicht man in entsprechender Weise die Aktivitäten anderer aufhellender Stoffe im Phototest, so ergeben sich folgende Grenzkonzentrationen:

Cystein-hydrochlorid . . . . .	$4 \cdot 10^{-5}\text{-m.}$	Glutathion . . . . .	$1 \cdot 10^{-8}\text{-m.}$
Natriumthiosulfat . . . . .	$5 \cdot 10^{-5}\text{-m.}$	Natriumrhodanid . . . . .	$2 \cdot 10^{-8}\text{-m.}$

### G. Die Wirkungsweise des Cysteins

Einer Anregung von Prof. Dr. H. AMMANN an der E. T. H. Zürich folgend, prüften wir die Frage, ob Cystein die primäre lichtabhängige Reduktion des Silberions stört oder ob es die Reifung der Silberkristalle während der photographischen Entwicklung beeinflusst.

Zu diesem Zwecke setzten wir identische Verdünnungsreihen von Cystein-hydrochlorid ( $10^{-2}$  bis  $10^{-8}\text{-m.}$  DW und Puffer) in Citratpuffern nach McILVAINE mit pH 7,2, 6,0, 4,8, 3,6 und 2,4 an, indem wir jeweils die Cysteinlösungen in einem ersten Versuch *vor* der Belichtung, in einem zweiten Versuch *nach* der Belichtung auftröpfen. Wirkt Cystein auf die primäre lichtabhängige Reduktion des Silberions ein, so ist zu erwarten, dass die nach der Belichtung aufgetropfte Cysteinlösung keine Aufhellung mehr bewirkt. Beeinflusst dagegen Cystein den Reifungsprozess während der photographischen Entwicklung, so wird auch bei vorausgehender Exposition eine Aufhellung auftreten (Fig. 13a und 13b).

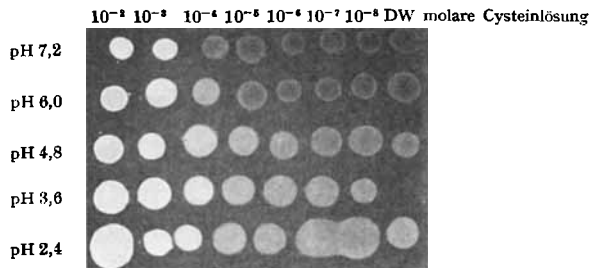


Fig. 13a. Auswirkung des Auftropfens der Cysteinlösung im Phototest vor bzw. nach der Belichtung Cystein-hydrochlorid  $10^{-2}$ – $10^{-8}\text{-m.}$  in Citrat-Puffer nach McILVAINE pH 7,2, 6,0, 4,8, 3,6 und 2,4. Einwirkungsdauer 3 Min., Belichtung 8 Sek. a) Auftropfen der Cysteinlösung *vor* der Belichtung.

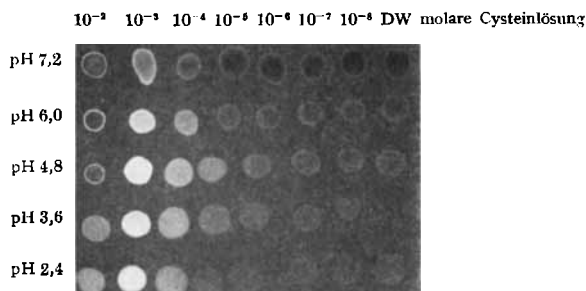


Fig. 13b. Auftropfen der Cysteinlösung *nach* der Belichtung



Die Versuche zeigen, dass sich bei der photographischen Cysteinreaktion verschiedene Vorgänge überlagern. Die Einwirkung von Cystein *nach* der Belichtung bewirkt für sich allein bereits eine Aufhellung im Phototest, wobei die Wirkung sowohl von der Wasserstoffionenkonzentration wie auch von der Konzentration des Cysteins abhängig ist (Fig. 13b). Bei Zugabe von 3-proz.  $H_2O_2$  fällt diese aufhellende Wirkung weg (Fig. 14).



Fig. 14. *Oxydation des Cysteins mit 3-proz. Wasserstoffperoxyd*

1,0 ml einer Lösung von Cystein-hydrochlorid ( $10^{-4}$  g/ml) + 1,0 ml Borax-Bernsteinsäure-Puffer pH = 4,0 werden mit 0,5 ml 3-proz.  $H_2O_2$  versetzt und *nach* Belichtung aufgetropft (Reihe b); in der Kontrolle (Reihe a) wird an Stelle des Wasserstoffperoxydes destilliertes Wasser zugesetzt. Belichtung 8 Sek., Einwirkung der Lösungen 3 Min. *Die cysteinbedingte Reifungshemmung der belichteten photographischen Emulsion fällt bei Zusatz von  $H_2O_2$  weg.*

Tragen wir die Cysteinlösung *vor* der Belichtung auf, so verstärkt sich der aufhellende Effekt. Daraus ist zu schliessen, dass auch die photochemische Primärreaktion durch Cystein gestört wird (Fig. 13a).

Eigenartig ist die Entstehung dunklerer Flecken mit hellem Saum, die bei der Prüfung konzentrierter Cysteinlösungen ( $10^{-2}$ -m.) bei zwei Versuchsanordnungen auftraten: Bei pH 4,0 tritt Saumbildung ein, wenn die Belichtung über die Minimaldosis für totale Schwärzung hinaus verlängert wird (Fig. 2a); eine entsprechende Reaktion ergibt sich aber auch, wenn Cystein in neutraler Lösung *nach* der Belichtung des Photopapiers aufgetropft wird; bei sauren Cysteinlösungen ist in diesem Fall die Auslöschung weniger stark ausgeprägt (Fig. 13b). Eine Erklärung für diese eigenartige Erscheinung vermag ich nicht zu geben.

Die Arbeit wurde mit Unterstützung durch den *Schweizerischen Nationalfonds für wissenschaftliche Forschung* ausgeführt.

Herrn Prof. Dr. H. AMMANN, E. T. H. Zürich, verdanke ich wertvolle Anregungen zur Ausgestaltung der Arbeit.

Frl. E. SCHNEGG danke ich für die gewissenhafte Mithilfe bei der Durchführung der Versuche.

### *Zusammenfassung*

1. Es wird eine qualitative Nachweisreaktion für Cystein auf photographischer Basis beschrieben. Die Methode wertet die Beobachtung aus, dass sich Tropfen einer Cysteinlösung, die auf eine Filmschicht einwirken, nach Belichtung und photographischer Entwicklung als helle Flecken vom geschwärzten Hintergrund abheben.

2. Das Verfahren eignet sich zum Nachweis von Cystein in Lösung oder zur Lokalisation von Cysteinflecken in Filterpapier (Chromatogramme, Elektropherogramme). Cystein lässt sich mit Hilfe des photographischen Tests im besonderen von den schwefelhaltigen Aminosäuren Cystin und Methionin unterscheiden.

3. Die Nachweisgrenze für Cystein in Lösung von pH 4,0 liegt für Tropfen von 0,04 ml bei einer Konzentration von 6 mg/l, d. h. bei einer absoluten Menge von 0,24  $\mu$ g.

4. Der Chemismus der photographischen Nachweisreaktion ist noch ungeklärt. Es scheint eine freie SH-Gruppe notwendig zu sein.

Theodor-Kocher-Institut, Universität Bern