

## Enzymatische Analyse

Von Dr. H. STETTER, Chemisches Institut der Universität Bonn

Bei der Analyse von Naturprodukten benutzt man bereits in ausgedehntem Maße Fermente als Hilfsmittel. Die Literatur aber ist weit verstreut. Hier sei daher zunächst\*) eine zusammenfassende Übersicht gegeben, in der die wichtigsten Methoden: Ausnutzung der Spezifität der Fermente, ihrer hemmenden bzw. aktivierenden Wirkung oder ihre Benutzung als Indikatoren – gezeigt werden.

Unter enzymatischer Analyse sollen alle Nachweis- und Bestimmungsmethoden verstanden werden, bei denen Fermentpräparate zur Durchführung der eigentlichen analytischen Operationen benötigt werden.

Hierunter fallen nicht die Methoden, bei denen zwar Fermente wirksam sind, diese jedoch an lebende Organismen gebunden sind, wie dies z. B. bei den heute so wichtigen mikrobiologischen Analysenmethoden der Fall ist. Ferner gehört hierher nicht die Anwendung von Fermenten zum Aufschluß des Analysenmaterials, wozu Proteinasen und Amylasen vielfache Anwendung gefunden haben. Als nicht hierher gehörig werden auch alle Fermentbestimmungsmethoden betrachtet, die in der klinischen Diagnostik zum Nachweis von krankhaften Veränderungen im Organismus dienen. Auch die Anwendung von Fermenten zur Konstitutionsaufklärung organischer Verbindungen gehört nicht zur eigentlichen enzymatischen Analyse.

Überblickt man das so abgegrenzte Gebiet, so kann man 3 grundsätzlich verschiedene Gruppen von Methoden der enzymatischen Analyse unterscheiden.

Die 1. Gruppe umfaßt alle Methoden, bei denen die hohe Spezifität der Fermente im Hinblick auf ihre Substrate die Grundlage der Analyse bildet. Nur Verbindungen, die Substrate von Fermenten darstellen, sind diesen Bestimmungsmethoden zugänglich. Das Prinzip dieser Methoden ist immer das gleiche. Der zu untersuchende Stoff wird der Wirkung des für die Spaltung gerade dieser Verbindung spezifischen Fermentes unterworfen. Die Analyse erfolgt dann durch Bestimmung der entstandenen Spaltprodukte. Diese größte Gruppe von Bestimmungsmethoden soll als substratspezifische enzymatische Analyse bezeichnet werden.

Zur 2. Gruppe der enzymatischen Analysenmethoden gehören alle Methoden, bei denen der zu untersuchende Stoff die Fermentwirkung beeinflusst, entweder hemmt oder aktiviert. Die Analyse erfolgt durch Messung der Größe dieser Beeinflussung. Die Methoden dieser 2. Gruppe sollen als enzymatische Effektoranalyse bezeichnet werden.

Die 3. Gruppe von Analysenmethoden umfaßt alle Methoden, bei denen die Fermente die Rolle von Indikatoren übernehmen. Diese Methoden spielen vor allem in der Lebensmittelchemie eine wichtige Rolle.

Das in der Literatur vorhandene Material ist außerordentlich umfangreich und umfaßt bis heute fast 700 veröffentlichte Analysenmethoden. Im Rahmen dieses Aufsatzes kann deshalb nur eine kurze Übersicht über die wichtigsten Methoden der enzymatischen Analyse gegeben werden, ohne daß Vollständigkeit angestrebt wird.

### Substratspezifische enzymatische Analyse

Der Wert dieser Methoden beruht in erster Linie darauf, daß es mit ihnen gelingt, aus einem Gemisch vieler Stoffe eine ganz bestimmte Verbindung analytisch zu erfassen, ohne daß eine

vorherige Abtrennung notwendig ist. Voraussetzung ist, daß man über ein genügend spezifisches Fermentpräparat verfügt, das in diesem Stoffgemisch nur diese einzige Verbindung angreift. Es ist leicht einzusehen, daß der Wert dieser Methoden mit der Spezifität des betr. Fermentes steigt. Da aber die Spezifität der Fermente fast in allen Fällen mit zunehmender Reinigung steigt, ist eine weitgehende Reinigung der Fermentpräparate zu fordern. Leider ist dieser Forderung in vielen Fällen nicht genügend Rechnung getragen worden.

Nicht minder wichtig sind die Analysenmethoden, die zur Bestimmung der fermentativen Spaltprodukte angewandt werden, ist doch durch deren Empfindlichkeit und Genauigkeit wesentlich die Empfindlichkeit und Genauigkeit der ganzen Methode begrenzt.

### Esterasen

Die Spezifität der Lipasen, der eigentlich fettspaltenden Fermente ist verhältnismäßig gering. Bedingung für die Spaltung ist in den meisten Fällen nur das Vorhandensein einer Carbon-ester-Gruppe. Diese geringe Spezifität ist der Grund, weshalb die Lipasen nur vereinzelt Anwendung in der enzymatischen Analyse gefunden haben.

Hier sei nur eine Methode von F. E. Kelsey<sup>1)</sup> erwähnt, mit der es möglich ist, in Lipoiden Glycerinester getrennt fermentativ zu bestimmen. Als Fermente werden die Rizinuslipase und die Pancreaslipase angewandt. Die Rizinuslipase besitzt die Eigenschaft, die Fettsäureester des Glycerins quantitativ zu spalten, während die Ester des Cholesterins unangegriffen bleiben. Die Pancreaslipase spaltet dagegen sowohl Glycerin- als auch Cholesterinester der Fettsäuren. Aus der Differenz der Messungen von 2 Spaltungsansätzen mit Pancreaslipase und Ricinuslipase errechnet sich dann der Gehalt an Cholesterinestern.

Wichtiger als die Lipasen sind die Phosphatasen in dieser Gruppe von Bestimmungsmethoden. Die Phosphatasen, die zur Spaltung von Phosphorsäureestern in sehr spezifischer Weise befähigt sind, wobei sich die Spezifität auf die Estergruppierung der Monophosphorsäureester erstreckt, haben vor allem eine wichtige Anwendung zur Bestimmung des Vitamin B<sub>1</sub> und der Co-Carboxylase gefunden. Nachdem K. Lohmann und P. Schuster<sup>2)</sup> 1937 die Co-Carboxylase als Pyrophosphorsäureester des Vitamin B<sub>1</sub> identifizierten und es ihnen gelang, durch enzymatische Hydrolyse mit Phosphatasen die Co-Carboxylase in freies Vitamin B<sub>1</sub> zu überführen, war im Prinzip die Methode gegeben, um enzymatisch eine Bestimmung von Vitamin B<sub>1</sub> und Co-Carboxylase in gemeinsamen Vorkommen durchzuführen.

Da die Co-Carboxylase ebenfalls Vitaminwirksamkeit besitzt, andererseits aber die chemischen Methoden der Vitamin B<sub>1</sub>-Bestimmung – von denen die Thiochrommethode die wichtigste ist – im biologischen Material nur das freie Vitamin erfassen, bietet die enzymatische Hydrolyse mit Phosphatasen vor

\*) Demnächst ausführlich als Buch (etwa 200 Seiten mit 8 Abbildungen und 580 Literaturhinweisen) im Verlag Chemie, GmbH, Weinheim-Bergstr. Preis Ganzleinen etwa DM 18.—

<sup>1)</sup> J. biol. Chemistry 130, 187–202 [1939].

<sup>2)</sup> Biochem. Z. 294, 188 [1937].

der eigentlichen Vitaminbestimmung die Möglichkeit, auch chemisch die Summe von Vitamin B<sub>1</sub> und Co-Carboxylase zu erfassen. Als Phosphatasen für die enzymatische Hydrolyse wurden Phosphatasen der verschiedensten Vorkommen vorgeschlagen, so z. B. die Hefephosphatase<sup>3)</sup>, die Phosphatase der Taka-diastase<sup>4)</sup>, die Nierenphosphatase<sup>5)</sup> und andere.

Vor biologischen Methoden haben diese Methoden den Vorzug, daß sie sehr viel weniger Zeit erfordern. Es werden über 90% des biologisch bestimmbaren Vitamins gefunden<sup>6)</sup>.

Über die Leistungsfähigkeit der biologischen Methoden hinaus ermöglichen die enzymatischen Methoden außerdem die getrennte Bestimmung von Vitamin B<sub>1</sub> und Co-Carboxylase in gemeinsamen Vorkommen. Man führt zu diesem Zwecke die Vitamin-Bestimmung einmal ohne und einmal nach enzymatischer Hydrolyse mit Phosphatasen durch. Aus der Differenz der Werte errechnet sich der Gehalt an Co-Carboxylase<sup>7)</sup>. Da weder die chemische Methode noch die biologischen Methoden jede für sich eine derartige getrennte Bestimmung ermöglichen, liegt hier eine deutliche Überlegenheit der enzymatischen Methode vor.

Eine weitere Anwendung haben die Phosphatasen zur Bestimmung des Anteiles von  $\alpha$  und  $\beta$ -Glycerophosphat in Isomerengemischen gefunden.

A. Schöffner und E. Bauer<sup>8)</sup> nehmen die verschiedene Spaltungsgeschwindigkeit der beiden Isomeren als Grundlage ihres Bestimmungsverfahrens. Es werden zuerst Spaltungskurven für bekannte Isomerengemische aufgestellt. Aus den entsprechenden Spaltungskurven des zu untersuchenden Gemisches läßt sich durch graphische Interpolation die Zusammensetzung des Gemisches finden. Diese Methode beansprucht grundsätzliches Interesse, weil Möglichkeiten aufgezeigt werden, die Spezifität des Fermentes durch Auswertung der Kinetik noch weiter zu steigern.

### Carbohydrasen

Diese für die Glykosid-Bindung spezifischen Fermente haben infolge ihrer hohen Spezifität ausgedehnte Anwendung in der Kohlehydrat-Analyse gefunden. Da wir es bei den natürlichen Vorkommen von Kohlehydraten fast immer mit Gemischen der verschiedensten Kohlehydrate zu tun haben, hat hier die enzymatische Analyse infolge ihres hohen spezifischen Auswahlvermögens eine große Überlegenheit vor den rein chemischen Bestimmungsmethoden. Die Zahl der vorgeschlagenen Methoden ist außerordentlich groß.

### Glykosidasen

Zum Nachweis und zur Bestimmung von Glykosiden haben die Glykosidasen ausgedehnte Anwendung gefunden. Die Glykoside, die bekanntlich aus einem Kohlehydrat und einem Aglukon bestehen, werden durch die Glykosidasen der verschiedensten Herkunft in spezifischer Weise in Kohlehydrat und Alkohol oder Phenol gespalten. Es wurde in den meisten Fällen der Enzymkomplex des Mandelemulsins, der im wesentlichen  $\beta$ -Glukosidasen enthält, für die enzymatische Analyse herangezogen.

Das Prinzip der Methoden beruht darauf, daß man die zu untersuchende glykosid-haltige Lösung der Wirkung des Süßmandelemulsins unterwirft und aus der Drehungsänderung des polarisierten Lichtes oder aus der Zunahme an Reduktionsvermögen auf vorhandene Glykoside schließt. Diese Methode hat in der Hand von E. Bourquelot<sup>9)</sup> zur Entdeckung vieler bis dahin unbekannter Glukoside in Pflanzen geführt. Bourquelot führte eine für jedes Glukosid charakteristische Größe ein, den sog. enzymolytischen Reduktionskoeffizienten. Es ist dies die Glukose-Menge, deren Betrag in 100 cm<sup>3</sup> Flüssigkeit bei einem bekannten Glukosid einem Rückgang der Drehung um 1° entspricht. Es läßt sich durch Berechnung dieses Koeffizienten feststellen, ob das in einem Organ nachgewiesene Glukosid ein bekanntes ist oder nicht.

<sup>3)</sup> H. G. K. Westenbrink u. A. F. Willebrands, Z. Vitaminforsch. 14, 291 [1944].

<sup>4)</sup> E. B. Brown, J. G. Hamm u. H. E. Harrison, J. biol. Chemistry 151, 153–61 [1943]; G. W. Schiller, Cereal Chem. 21, 544–48 [1944].

<sup>5)</sup> D. I. Hennessy u. L. R. Cerecedo, J. Amer. Chem. Soc. 61, 179–83 [1939].

<sup>6)</sup> M. Swaminathan, Indian J. Med. Res. 30, 263–272 [1942].

<sup>7)</sup> B. Alexander, J. biol. Chemistry 151, 455–65 [1943].

<sup>8)</sup> Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 232, 64–65 [1935].

<sup>9)</sup> J. Pharm. Chim. (6) 23, 369–75 [1906]; Arch. Pharm. 245, 172–180 [1907].

In neuester Zeit gibt L. Rosenthaler<sup>10)</sup> eine bemerkenswerte Verbesserung dieses Glykosid-Nachweises in Pflanzen. An die Hydrolyse mit Süßmandelemulsin schließt sich eine Behandlung mit einem Ferment-Präparat, das aus der zu untersuchenden Pflanze selbst gewonnen wird. Auf solche Weise werden auch solche Glykoside erkannt, die durch Süßmandelemulsin nicht gespalten werden.

Im Gegensatz zu diesen Verfahren, bei denen das verhältnismäßig unspezifische Süßmandelemulsin benutzt wird, wurde von R. Gootz und H. Tunger<sup>11)</sup> ein Verfahren zum Lactose-Nachweis in Harn veröffentlicht, bei dem reine  $\beta$ -Galaktosidase-Präparate benutzt werden. Die Fermentpräparate werden aus Luzernesamen gewonnen, die nach Untersuchungen von B. Helferich und K. Hill<sup>12)</sup> fast ausschließlich  $\beta$ -Galaktosidase enthalten. Der Nachweis erfolgt in der Weise, daß der Zucker vor und nach der Hydrolyse mit dem Fermentpräparat nach Bertrand bestimmt wird.

Methoden, mit denen es möglich ist, Maltose und Trehalose mit Hilfe von Maltase<sup>13)</sup> und Trehalase<sup>14)</sup> nach dem gleichen Prinzip wie die Glykoside zu bestimmen, können hier nur erwähnt werden.

### $\beta$ -(h)-Fruktosidase

Dieses in Pflanzen und Mikroorganismen vorkommende Ferment greift ausschließlich Zucker und Glykoside an, die Fruktose in der  $\beta$ -Form mit der furanoiden Struktur enthalten. Das wichtigste Substrat ist der Rohrzucker, der durch das Ferment in Glucose und Fruktose gespalten wird. Infolge ihrer hervorragenden Spezifität hat die  $\beta$ -(h)-Fruktosidase weitgehende Anwendung in der Rohrzuckeranalyse gefunden. Außer dem Rohrzucker unterliegen von den natürlich vorkommenden Zuckern nur die Trisaccharide Raffinose, Gentianose und Stachyose dem Angriff des Fermentes unter Abspaltung von Fruktose. Infolge der Seltenheit dieser Zucker in der Natur wird die enzymatische Rohrzuckeranalyse hierdurch nur gering eingeschränkt. Als Fermentpräparate für die Rohrzuckeranalyse werden ausschließlich mehr oder weniger gereinigte Invertasepräparate aus Hefe benutzt.

Bereits 1881 wurde von Kjeldahl<sup>15)</sup> das 1. Verfahren zur Bestimmung von Rohrzucker mit Hefeinvertase veröffentlicht. Die eigentliche Bestimmung erfolgt durch Messung der Drehung des polarisierten Lichtes vor und nach der enzymatischen Hydrolyse. In gleicher Weise kann auch die Differenz im Reduktionsvermögen bestimmt werden. Beide Werte ermöglichen die Berechnung des Rohrzuckergehaltes und geben übereinstimmende Werte. Vor der Säurehydrolyse hat die enzymatische Hydrolyse den klaren Vorteil, daß sie für Rohrzucker spezifisch ist und keine anderen Kohlehydrate mit Ausnahme der oben erwähnten Trisaccharide miterfaßt. Dieses Verfahren von Kjeldahl bildete die Grundlage aller später veröffentlichten enzymatischen Bestimmungsmethoden für Rohrzucker.

Aus der großen Zahl der Bestimmungsmethoden soll nur ein Verfahren von E. Bourquelot<sup>16)</sup> erwähnt werden. Er benutzt die Hefeinvertase zur Bestimmung von Rohrzucker in Pflanzen neben Glykosiden. Dazu behandelt man den Pflanzenextrakt zuerst mit Hefeinvertase, bestimmt die Rohrzuckermenge und zerstört das Ferment durch Erhitzen. Darauf setzt man Mandelemulsin zu und ermittelt wie oben beschrieben den Glykosidgehalt. Eine neue Modifikation wird von W. Z. Hassid<sup>17)</sup> angegeben. Den meisten neuen Verfahren liegt die von H. S. Paine und R. T. Balch<sup>18)</sup> ermittelte Inversionskonstante von 131,17 + 0,073 c (c = g Rohrzucker in 100 cm<sup>3</sup>) zu Grunde.

Es stellte sich schon früh heraus, daß die Wahl der Hefe zur Herstellung der Fermentlösung von ausschlaggebender Bedeutung ist. So konnte Bourquelot<sup>19)</sup> bereits feststellen, daß Ferment-

<sup>10)</sup> Pharmac. Acta Helv. 18, 241–42 [1942].

<sup>11)</sup> Hoppe-Seylers Z. physiol. Chemie 217, 28–32 [1933].

<sup>12)</sup> Ber. Math.-Physik. Kl. Sächs. Akad. Wiss. 86, 115–28 [1934].

<sup>13)</sup> N. Narasimkamurty u. M. Sreenivaraya, Biochemical J. 24, 1734–36 [1930].

<sup>14)</sup> P. Harang, J. Pharm. et Chim. (6) 23, 16–20 [1906].

<sup>15)</sup> Meddel. Carlsberg Laboratoriet 3, Heft 339, 189 [1881].

<sup>16)</sup> J. Pharm. et Chim. (6) 14, 461 [1901]; Arch. Pharm. 245, 164–71 [1907].

<sup>17)</sup> Ind. Engng. Chem., Analyt. Ed. 8, 138 [1936].

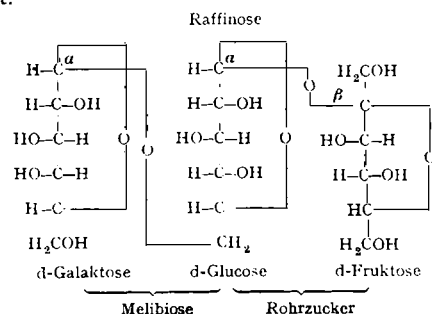
<sup>18)</sup> J. Amer. Chem. Soc. 49, 1019 [1927].

<sup>19)</sup> J. Pharm. et Chim. (7) 6, 246–53 [1913].

präparate aus frischer Bäckerhefe sehr spezifisch sind und weder  $\alpha$ - noch  $\beta$ -Glykoside spalten. Verwendet man dagegen untergärige Bierhefe, so wird auch Spaltung von Glykosiden beobachtet.

Die wichtigste Anwendung hat die enzymatische Rohrzuckerbestimmung in den Melassen der Zuckerfabriken gefunden. Hier ist die enzymatische Bestimmung allen übrigen Verfahren deutlich überlegen und wird in einigen Ländern heute fast ausschließlich angewandt.

Da in der Melasse neben optisch aktiven Stickstoffverbindungen beträchtliche Mengen Raffinose vorhanden sind, war es von größtem Interesse, Rohrzucker neben Raffinose bestimmen zu können. Hier nun bildet eine Beobachtung von A. Bau<sup>20)</sup> die Grundlage für eine getrennte Bestimmung der beiden Zucker. Er hat festgestellt, daß Rohrzucker von Enzympräparaten aus obergäriger Bierhefe völlig invertiert wird, während Raffinose in Melibiose und Fruktose gespalten wird. Verwendet man dagegen Invertase aus untergäriger Bierhefe, die Galaktosidase enthält, so wird auch die Melibiose weiter zu Glucose und d-Galaktose hydrolysiert.



Die neueren Verfahren<sup>21)</sup> bestimmen den Rohrzucker neben Raffinose, indem ein Teil der zu untersuchenden Probe mit einem Enzymauszug aus obergäriger Hefe und ein weiterer Teil in der gleichen Weise mit einem Enzymauszug aus untergäriger Hefe behandelt wird. Aus den gemessenen Polarisationswerten nach der enzymatischen Hydrolyse und dem Wert für die direkte Polarisation errechnet sich dann sowohl der Rohrzucker- als auch der Raffinose-Gehalt.

## Amylasen

Man unterscheidet 2 Gruppen von Amylasen, die  $\alpha$ - und die  $\beta$ -Amylasen. Diese Fermente besitzen eine hohe Spezifität für Stärke und sind deshalb in besonderer Weise zur Stärkebestimmung geeignet. Unter der Wirkung der Amylasen wird die Stärke bis zur Maltose-Stufe abgebaut. Nebenher entstehen sog. Grenzdextrine und geringe Mengen Glucose. Die Hauptschwierigkeit besteht darin, daß das Verhältnis, in dem die 3 Spaltprodukte zueinander stehen, nicht konstant ist, sondern von der Natur des Fermentes und der Art der zu untersuchenden Stärke abhängig ist.

Der großen Zahl der veröffentlichten Stärkebestimmungsmethoden entspricht leider nicht der wirklich erreichte Fortschritt. Der Grund liegt in erster Linie darin, daß bis heute nur in vereinzelt Fällen reine Amylase-Präparate für die enzymatische Bestimmung benutzt worden sind.

Die älteste Angabe über eine enzymatische Stärkeanalyse und damit die älteste Veröffentlichung über eine enzymatische Analyse überhaupt wurde 1862 durch von Dragendorff<sup>22)</sup> gegeben. v. Dragendorff schließt die stärkehaltige Substanz mit alkoholischer Kalilauge auf und bestimmt dann das Gewicht des Rückstandes vor und nach der enzymatischen Hydrolyse mit einem Malzauszug. Aus der Gewichts-differenz wird der Stärkegehalt ermittelt. Dieses Verfahren ermöglicht nur eine Schätzung der vorhandenen Stärke und wurde in späteren Jahren fast völlig verlassen.

1885 veröffentlichte M. Märker<sup>23)</sup> ein Verfahren zur Bestimmung von Stärke in Getreide, das verbessert<sup>24)</sup> in der Folgezeit das am meisten benutzte Verfahren wurde und als Grundlage für eine große Anzahl von Stärkebestimmungsmethoden diente.

<sup>20)</sup> Z. Spiritus-Ind. 18, 372 [1895].

<sup>21)</sup> K. Zabłinski u. A. Wolf, Z. Wirtschaftsgruppe Zuckerind. 92, 160–77 [1942].

<sup>22)</sup> Pharm. Z. Rußland 1862, 41–46.

<sup>23)</sup> Generalvers. Verein Stärkeinteressenten u. Spiritusfabrikanten Berlin 1885.

<sup>24)</sup> M. Märker u. M. Delbrück, Handb. Spiritusfabrikation 1908, S. 165.

Das Untersuchungsmaterial wird mit kochendem Wasser verkleistert. Nach dem Abkühlen setzt man einen Malzextrakt zu, läßt 2 h bei 65° einwirken und kocht wieder  $\frac{1}{2}$  h. Darauf erfolgt erneut enzymatische Hydrolyse. Dann wird abfiltriert und die Hydrolyse der in Lösung befindlichen Maltose und Dextrine mit verdünnter Salzsäure zu Ende geführt. Die Bestimmung der gebildeten Glucose kann dann nach einer der bekannten Bestimmungsmethoden erfolgen. Ein Nachteil der nachträglichen Säurehydrolyse ist es, daß der Vorteil, den die Spezifität des Fermentes bietet, z. T. wieder aufgehoben wird, da lösliche Disaccharide und Glykoside ja in das Ergebnis der Analyse mit eingehen.

Als Amylasepräparate wurden später neben der meist angewandten Malzdiastase, die im wesentlichen aus  $\beta$ -Amylase besteht, aber auch  $\alpha$ -Amylasen enthält, Takadiastase und tierische Amylasen angewandt. Die Takadiastase, bei der es sich um ein Fermentpräparat aus niederen Pilzen handelt, enthält neben Amylase noch die verschiedensten Fermente, wie Maltase und Phosphatasen. Mit diesem Fermentpräparat läßt sich die Stärkehydrolyse praktisch bis zur Glucosestufe führen. Dadurch erübrigt sich eine anschließende Säurehydrolyse. Es seien nur noch Methoden erwähnt, bei denen reine  $\alpha$ - und  $\beta$ -Amylase-Präparate benutzt wurden.

Das eine Verfahren wurde von S. M. Strepkov<sup>25)</sup> veröffentlicht. Dieses Verfahren stellt eine Mikrobestimmungsmethode der Stärke mit reiner  $\alpha$ -Amylase dar. Als Fermentpräparat benutzt der Autor verdünnten Speichel, der nach neueren Untersuchungen<sup>26)</sup>  $\alpha$ -Amylase in großer Reinheit enthält. Die zu untersuchende Probe wird bei 60° verkleistert und dann mit verdünntem und filtriertem Speichel hydrolysiert. Darauf wird die Zunahme an reduzierender Substanz mit alkalischer Eisen(III)-cyanid-Lösung jodometrisch bestimmt. Unter Berücksichtigung einer Blindprobe kann der ermittelte Titrationswert direkt zur Berechnung des Stärkegehaltes dienen. Dies ist deshalb möglich, weil bei Verwendung reiner  $\alpha$ -Amylase Glucose, Maltose und Dextrinmenge praktisch immer in gleichem Verhältnis stehen.

Die 2. Methode, die reine  $\beta$ -Amylase benutzt, wurde von Ch. S. Hanes<sup>27)</sup> zur Bestimmung von Stärke in pflanzlichem Material insbesondere in Äpfeln angegeben. Man extrahiert das pflanzliche Material mit 70–80proz. Alkohol und behandelt den Rückstand mit verd. HCl. Durch die Alkohol-Extraktion werden reduzierende Zucker und Glykoside entfernt, während durch die HCl-Behandlung die native Stärke in lösliche übergeht. Nach Extraktion der löslichen Stärke mit heißem Wasser erfolgt dann die Hydrolyse mit einem reinen  $\beta$ -Amylase-Präparat. Unter diesen Umständen ist die Zunahme an Reduktionsvermögen ein Maß für die vorhandene Stärke.

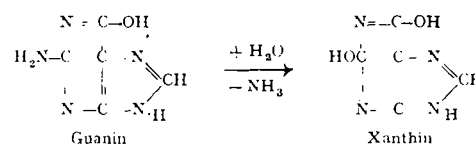
Es sei noch erwähnt, daß nach einer Methode von A. M. Kusin und Z. A. Makaeva<sup>28)</sup> auch Glykogen der Bestimmung mit Amylasen zugänglich ist.

## Amidasen

Diese für die Hydrolyse der C-N-Bindung spezifischen Fermente haben weitgehend Anwendung gefunden. Je nachdem, ob es sich um die Spaltung von Aminstickstoff oder um die Spaltung von Amidstickstoff handelt, unterscheidet man die Carbinamidasen und die Acylamidasen. Im ersten Falle entsteht bei der Hydrolyse Ammoniak und eine Alkoholgruppe. Im zweiten Falle wird Ammoniak und die entsprechende Säure gebildet. Da ihre Spezifität durchweg sehr groß ist, haben die meisten der heute bekannten Vertreter dieser Gruppe eine Anwendung in der enzymatischen Analyse gefunden.

## Guanase

Unter dem Einfluß dieses Ferments wird Guanin in Ammoniak und Xanthin in sehr spezifischer Weise gespalten.



<sup>25)</sup> Z. Analyt. Chem. 111, 72–89 [1938]; s. a. W. Z. Hassid, R. M. McCready u. R. S. Rosenfeld, Ind. Engng Chem., Analyt. Edit. 12, 142–44 [1940].

<sup>26)</sup> K. H. Meyer, E. H. Fischer, A. Staub u. P. Bernfeld, Helv. Chim. Acta 31, 2158–2172 [1948].

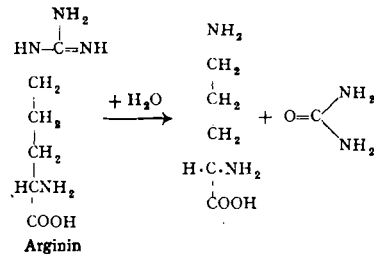
<sup>27)</sup> Biochemical J. 30, 168–75 [1936].

<sup>28)</sup> Biochimia 9, 14–21 [1944].

G. Schmidt<sup>29)</sup> hat auf dieser Fermentwirkung eine Methode gegründet, um in Geweben Guanin neben anderen Purinen zu bestimmen. Das durch die Einwirkung der Guanase aus Guanin abgespaltene Ammoniak wird mit einem Luftstrom aus dem Hydrolysegemisch in eine säurehaltige Vorlage übergetrieben und dort bestimmt. Es lassen sich mit dieser Methode noch 0,055 mg Guanin-N mit einem Fehler von 5% bestimmen.

### Arginase

Arginase vermag Arginin in Ornithin und Harnstoff zu spalten. Da das Ferment sehr spezifisch ist, eignet es sich ausgezeichnet für die Arginin-Bestimmung. Die Grundlage der heute

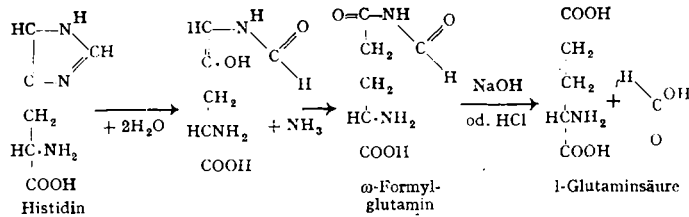


bekannten Verfahren bildet eine Bestimmungsmethode von B. C. P. Jansen<sup>30)</sup>. Jansen bestimmt Arginin im Eiweiß, indem er zuerst das Eiweiß hydrolysiert, das Hydrolysat der Wirkung der Arginase unterwirft und den gebildeten Harnstoff nach dem Ureaseverfahren bestimmt.

Andere Methoden arbeiten nach dem gleichen Prinzip, bestimmen aber den Harnstoff gravimetrisch mit Xanthydrol<sup>31)</sup>.

### Histidase

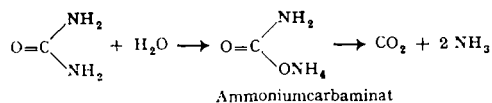
Das Histidin ist einer ähnlichen enzymatischen Bestimmungsmethode unter Verwendung der Histidase zugänglich. Die Histidase hydrolysiert Histidin unter Freiwerden von 2 Mol Ammoniak und Glutaminsäure-Bildung.



S. Edibacher, H. Bauer, H. R. Staehelin und A. Zeller<sup>32)</sup> bestimmen das in Freiheit gesetzte Ammoniak nach dem bereits erwähnten Durchlüftungsverfahren und berechnen aus der gefundenen Ammoniakmenge den Histidin-Gehalt.

### Urease

Die Urease hydrolysiert Harnstoff zu 2 Mol Ammoniak und einem Mol CO<sub>2</sub>.



Die Spezifität der Urease ist außerordentlich groß. Es konnte bis heute kein Substrat außer Harnstoff gefunden werden, auf das dieses Ferment einzuwirken vermag. Das Ferment ist also in idealer Weise dazu geeignet, Harnstoff in biologischem Material, wie z. B. Blut, Harn und Geweben zu bestimmen. Diese Bestimmungsmethoden haben weitgehende Anwendung in klinischen Laboratorien gefunden und werden in einigen Ländern (USA) fast ausschließlich angewandt.

Grundsätzlich ergeben sich 2 Möglichkeiten der enzymatischen Harnstoff-Bestimmung. Man kann entweder das freigesetzte Ammoniak als Grundlage nehmen oder den Harnstoff-

gehalt aus der CO<sub>2</sub>-Komponente des Hydrolysegemisches bestimmen. Beide Möglichkeiten sind in zahlreichen Bestimmungsmethoden verwirklicht worden.

Das erste Verfahren der enzymatischen Harnstoffanalyse wurde 1913 von E. K. Marshall jr.<sup>33)</sup> veröffentlicht. Marshall behandelt die zu untersuchende Lösung mit Sojabohnenurease und ermittelt das gebildete Ammoniak durch Titration im Hydrolysegemisch. Zum Vergleich wird eine Kontrollprobe unter gleichen Bedingungen, jedoch ohne Enzymzusatz, titriert. Man bezeichnet die Verfahren, die nach diesem Prinzip arbeiten, als enzymatische Harnstoffbestimmungen durch direkte Titration.

Eine wichtige Modifikation dieser Methode ergab die Anwendung des sog. Durchlüftungsverfahrens von Folin auf die Ammoniak-Bestimmung. Folin entwickelte es zur Bestimmung von Ammoniak in biologischen Flüssigkeiten. Man treibt das vorhandene Ammoniak in einem Luftstrom in eine Vorlage, die eine abgemessene Menge Säure enthält und kann durch Rücktitration der unverbrauchten Säure den Ammoniakgehalt ermitteln. Mit Hilfe dieses Verfahrens lassen sich Harnstoff-Bestimmungen noch in 0,2 cm<sup>3</sup> Blut mit guter Genauigkeit durchführen<sup>34)</sup>. Diesen Verfahren haften aber verschiedene Mängel an, welche die Durchführung von Mikroharnstoff-Bestimmungen sehr erschweren. Hierzu gehört vor allem das lästige Schäumen und Stoßen während der Destillation und die Gefahr des Mitreißen von Nebeltröpfchen. Die Mängel dieses Verfahrens konnte E. J. Conway<sup>35)</sup> 1934 in genial einfacher Weise beseitigen.

Conway ersetzt die Destillationsmethode durch eine Diffusionsmethode. Zu diesem Zwecke konstruierte er eine einfache Apparatur, die aus einer kleinen Petrischale mit einem halbhohen Innenraum besteht. Der Rand dieser Schale ist plan geschliffen und wird mit einer Glasplatte verschlossen. In den äußeren Raum des Gefäßes kommt die zu untersuchende Lösung und die Enzymlösung, während in den Innenraum eine genau abgemessene Menge Schwefelsäure einpipettiert wird. Nach der enzymatischen Hydrolyse wird K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung in den Außenraum des Gefäßes gegeben und die verschlossene Apparatur 1 h im Brutschrank aufbewahrt. Titriert wird nach der Diffusion im Innenraum des Gefäßes, wobei als Indikator ein Mischindikator aus Methylrot und Methylblau angewandt wird. Dieser Indikator gestattet durch seinen Umschlag von purpur nach hellgrün ganz vorzüglich die Bestimmung des Endpunktes der Titration. Es lassen sich mit dieser Methode z. B. Harnstoffbestimmungen in 0,2 cm<sup>3</sup> Blut mit einer Genauigkeit von 0,5 mg/100 cm<sup>3</sup> durchführen. Das Verfahren wurde später von G. E. Gibbs und P. L. Kirk<sup>36)</sup> noch weiter vervollkommen und gestattet dann sogar die Bestimmung von Harnstoff in 0,1 cm<sup>3</sup> Blut.

Neben diesen Titrationsverfahren existiert noch eine große Anzahl von Verfahren, bei denen Ammoniak colorimetrisch, meist mit Nessler's-Reagens, bestimmt wird. Auch hier läßt sich zwischen den Bestimmungsmethoden durch direkte Nesslerisation im Hydrolysegemisch und den Verfahren unterscheiden, bei denen die Bestimmung mit Nessler's-Reagens nach Destillation in eine Vorlage erfolgt.

Die Methoden, Harnstoff aus der CO<sub>2</sub>-Komponente des Hydrolysegemisches zu bestimmen, basieren auf einem Verfahren, das S. Partos<sup>37)</sup> 1920 veröffentlichte. Die Messung des entstandenen CO<sub>2</sub> erfolgt manometrisch. Da zur Durchführung dieser Methoden ein erheblicher apparativer Aufwand erforderlich ist, haben sich diese Methoden, obwohl sie mit sehr geringem Zeitaufwand arbeiten, bis heute nicht recht in der Praxis durchsetzen können.

Auf die Möglichkeit, Glutamin mit Glutaminase<sup>38)</sup> und Allantoin mit Allantoinase<sup>39)</sup> zu bestimmen, kann an dieser Stelle nur hingewiesen werden.

### Proteasen

Im Gegensatz zu der Bedeutung der Peptidasen zur Konstitutionsermittlung von Polypeptiden ist ihre Bedeutung in der enzymatischen Analyse bisher nur gering.

Wichtiger sind die Verfahren, bei denen Proteinase, die eigentlich eiweißspaltenden Fermente, angewandt werden. Bei diesen Verfahren handelt es sich ausschließlich um Verfahren, die Verdaulichkeit verschiedener eiweißhaltiger Nahrungs- und Futtermittel zu bestimmen<sup>40)</sup>.

Die Verfahren haben vor den sonst üblichen Tierversuchen den Vorteil, daß sie einen wesentlich geringeren Zeit- und Arbeitsaufwand erfordern und meist besser reproduzierbar sind.

<sup>33)</sup> J. biol. Chemistry 14, 283–90 [1913].

<sup>34)</sup> F. Rappaport, Mikrochemie 14, 49–74 [1933].

<sup>35)</sup> Biochemical J. 27, 430–34 [1933].

<sup>36)</sup> Mikrochemie 16, 25–36 [1934].

<sup>37)</sup> Biochem. Z. 103, 292–98 [1920].

<sup>38)</sup> R. M. Archibald, J. biol. Chem. 154, 643–56 [1944].

<sup>39)</sup> R. Fosse, A. Brunel u. P. de Graeve, C. R. heb. Séances Acad. Sci. France 188, 1632–34 [1929].

<sup>40)</sup> P. Schwarze, Biedermanns Zbl. Agrik.-Chem., Abt. B Tierernähr. 9, 346–47 [1937]; C. Carius, Getreide, Mehl u. Brot 3, 209–12 [1949]; H. Steudel, Z. ges. exp. Med. 95, 580–88 [1935].

<sup>29)</sup> Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 208, 225–36 [1932]; 219, 191–206 [1933].

<sup>30)</sup> Chem. Weekblad 14, 125–29 [1917].

<sup>31)</sup> V. C. Kierk, J. M. Luck u. A. E. Smith, J. biol. Chemistry 90, 677–96 [1931].

<sup>32)</sup> Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 270, 158–64 [1941].

Man läßt die beiden für die Verdauung von Eiweiß im Organismus verantwortlichen Enzymkomplexe, Pepsin und Trypsin, unter entspr. Bedingungen auf das zu untersuchende Nahrungsmittel einwirken und bestimmt den Grad der Verdauung meist durch Bestimmung des in Lösung gegangenen Stickstoffs. Man muß sich bei den Verdauungsversuchen *in vitro* allerdings vor Augen führen, daß die Verhältnisse im Organismus nur angenähert erreicht werden. Als Absolutwerte sind die mit diesen Verfahren ermittelten Werte deshalb kaum brauchbar. Dagegen sind diese Verfahren zur Bestimmung der Verdaulichkeit immer dann von hohem Wert, wenn es sich darum handelt, relative Werte zu erhalten.

## Dehydrasen

Diese Fermente, welche die Dehydrierung einer Anzahl von wichtigen Substraten durchzuführen vermögen, haben in drei Fällen eine wichtige Anwendung in der enzymatischen Analyse gefunden.

Die für die Dehydrierung von Bernsteinsäure spezifische Succinodehydrase vermag Bernsteinsäure zu Fumarsäure zu dehydrieren. Dabei muß der abgespaltene Wasserstoff von einem Acceptor übernommen werden. Als Acceptor eignet sich vorzüglich Methylenblau, das durch die Aufnahme von Wasserstoff entfärbt wird.

T. Broman<sup>41)</sup> gab 1930 eine Methode an, mit der es gelingt, noch 1  $\gamma$  Bernsteinsäure auf Grund der Entfärbung von Methylenblau nachzuweisen. T. Thunberg<sup>42)</sup>, der Entdecker des Fermentes, hat diese Methode dann für die quantitative Bestimmung der Bernsteinsäure ausgearbeitet. In neuerer Zeit hat S. Forssman<sup>43)</sup> dann diese Methode dadurch, daß er Eisen(III)-cyanid als Wasserstoffacceptor anwendet und das gebildete Eisen(II)-cyanid durch Titration bestimmt, verbessert. Die Genauigkeit dieser Methode für Mengen unter 200  $\gamma$  Bernsteinsäure beträgt  $\pm 5 \gamma$ .

Eine Reihe von Verfahren<sup>44)</sup> benutzen die Tatsache, daß die Succinodehydrase-Präparate immer zugleich Cytochromoxydase enthalten, dazu, Bernsteinsäure auf Grund des verbrauchten Sauerstoffs manometrisch zu bestimmen. (Um die reine Succinodehydrase-Wirkung zu erhalten, muß in den oben erwähnten Verfahren die Cytochromoxydase durch  $CN^-$  ausgeschaltet werden.) Mit diesen manometrischen Methoden läßt sich Bernsteinsäure in Geweben mit einem maximalen Fehler von  $\pm 5\%$  bestimmen.

Mit den gleichen Methoden lassen sich auch Fumar- und Maleinsäure nach Reduktion zu Bernsteinsäure in biologischen Vorkommen bestimmen<sup>45)</sup>. Es lassen sich so noch 0,05 mg Fumarsäure in Geweben erfassen.

Ähnlich läßt sich auch die biologisch wichtige  $\alpha$ -Ketoglutarinsäure nach Oxydation zu Bernsteinsäure bestimmen<sup>46)</sup>.

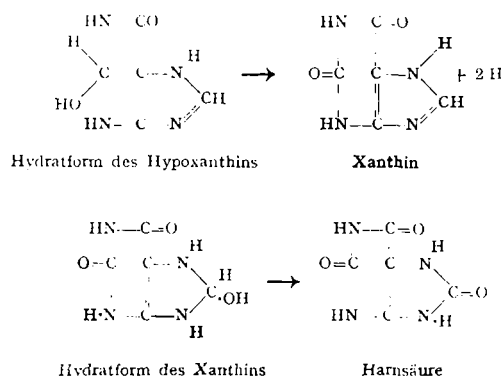
Nach dem Prinzip der Methylenblaumethode kann auch Citronensäure mit Citricodehydrogenase bestimmt werden<sup>47)</sup>. Es lassen sich auf Grund der Entfärbung von Methylenblau noch 10  $\gamma$  erfassen.

Milchsäure läßt sich unter Verwendung von Eisen(III)-cyanid als Wasserstoffacceptor mit Hilfe von Milchsäuredehydrase bestimmen<sup>48)</sup>. Dieses Verfahren gestattet es, 5–200  $\gamma$  Milchsäure mit einer Genauigkeit von  $\pm 1 \gamma$  zu bestimmen.

## Gelbe Oxydationsfermente

Aus dieser Fermentgruppe eignet sich das sog. *Schardinger-Enzym* vorzüglich dazu, Xanthin und Hypoxanthin in biologischen Vorkommen zu bestimmen. Unter der Wirkung dieses Fermentes werden die beiden Oxypurine zu Harnsäure oxydiert. Durch Bestimmung der Sauerstoff-Aufnahme und der

gebildeten Harnsäure gelingt es sogar, Xanthin und Hypoxanthin nebeneinander zu bestimmen<sup>49)</sup>.



Ein weiteres Ferment dieser Gruppe ist in neuester Zeit wichtig zur Bestimmung von Glucose in biologischem Material geworden. Es handelt sich dabei um die Glucoseoxydase. Dieses Ferment zeigt eine vorzügliche Spezifität für Glucose und führt diese unter Sauerstoff-Aufnahme und Bildung von  $H_2O_2$  in Gluconsäure über.

Es mag in diesem Zusammenhang interessieren, daß dieses Ferment unter dem Namen Notatin als Antibiotikum in niederen Pilzen gefunden wurde. Erst später stellte es sich heraus, daß die antibiotischen Eigenschaften auf dem bei der Glucose-Oxydation freiwerdenden  $H_2O_2$  beruhen.

D. Keilin und E. F. Hartree<sup>50)</sup> bestimmen die Glucose mit diesem Ferment, indem sie den verbrauchten Sauerstoff manometrisch messen. Dieser Sauerstoff-Wert dient dann zur Berechnung des Glucose-Gehaltes.

Eine Möglichkeit, *d*-Aminosäuren in Aminosäure-Gemischen zu bestimmen, ergibt sich durch Anwendung einer weiteren Oxydase, der sog. *d*-Aminosäureoxydase. Dieses Ferment ist spezifisch auf die unnatürliche Konfiguration der Aminosäuren eingestellt. Unter der Wirkung dieses Fermentes werden *d*-Aminosäuren oxydativ zu  $\alpha$ -Ketosäuren desaminiert. Die Bestimmung kann sowohl durch manometrische Messung des verbrauchten Sauerstoffes<sup>51)</sup> als auch durch colorimetrische Bestimmung der entstandenen  $\alpha$ -Ketosäuren erfolgen.

## Ascorbinsäureoxydase

Von den kupfer-haltigen Oxydasen hat die Ascorbinsäureoxydase die wichtigste Anwendung in der enzymatischen Analyse gefunden. Unter der Wirkung dieses Fermentes wird Ascorbinsäure zu Dehydroascorbinsäure oxydiert. Im Prinzip beruhen alle Methoden zur enzymatischen Bestimmung von Ascorbinsäure darauf, daß man die zu untersuchende Lösung vor und nach der enzymatischen Oxydation mit Dichlorindophenol titriert und dadurch das Reduktionsvermögen der durch die enzymatische Oxydation veränderten Ascorbinsäure ermittelt. Um die an sich nicht sehr hohe Spezifität dieses Fermentes zu erhöhen, haben W. Diemair und K. Zerban<sup>52)</sup> in neuester Zeit die Methode dadurch modifiziert, daß sie die Oxydationsgeschwindigkeit des Fermentes als Grundlage der Bestimmungsmethode nehmen. Auf diese Weise ist es möglich, zwischen Ascorbinsäure und anderen reduzierenden Substanzen zu unterscheiden, wodurch die Ascorbinsäure-Bestimmung eine erhöhte Sicherheit erhält.

Es sei noch eine interessante Methode von P. F. Sharp, D. B. Hand und E. S. Guthrie<sup>53)</sup> erwähnt, mit der es gelingt, Sauerstoff in biologischen Flüssigkeiten mit großer Genauigkeit zu bestimmen. Sie benutzen die Ascorbinsäureoxydase auf Grund ihrer ausschließlichen Acceptorspezifität für molekularen Sauerstoff. Man setzt der zu untersuchenden Flüssigkeit reduzierte Ascorbinsäure und Ascorbinsäureoxydase zu und bestimmt die Abnahme an reduzierter Ascorbinsäure nach bestimmter Zeit.

<sup>41)</sup> Skand. Arch. Physiol. 59, 25–31 [1930].

<sup>42)</sup> Acta med. Scand. Suppl. 90, 122–23 [1938].

<sup>43)</sup> Acta physiol. Scand., Suppl. 2 Nr. 5, 1–121 [1941].

<sup>44)</sup> H. A. Krebs, Biochemical J. 31, 2095–2124 [1937].

<sup>45)</sup> H. A. Krebs, D. H. Smyth u. E. A. Evans Jr., ebenda 34, 1041–45 [1940].

<sup>46)</sup> F. Haurowitz u. M. Tunca, ebenda 39, 443–45 [1945].

<sup>47)</sup> T. Thunberg, Biochem. Z. 206, 109–19 [1929]; L. Reichel u. A. Neeff, Naturwiss. 23, 391 [1935].

<sup>48)</sup> J. Lehmann, Skand. Arch. Physiol. 80, 237–64 [1938].

<sup>49)</sup> H. A. Krebs u. A. Oerström, Biochemical J. 33, 984–89 [1939].

<sup>50)</sup> Biochemical J. 42, 230–38 [1948].

<sup>51)</sup> F. Lipmann, O. K. Behrens, E. A. Kabit u. D. Burk, Science [New York] 91, 21–23 [1940].

<sup>52)</sup> Biochem. Z. 316, 189–201 [1944].

<sup>53)</sup> Ind. Engng. Chem., Analyt. Ed. 13, 593 [1941].

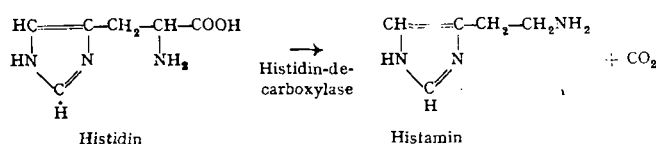
## Verschiedene Fermente

Erwähnt werden kann hier nur, daß die Katalase zur  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Bestimmung herangezogen werden kann<sup>54)</sup>.

Die Uricase, das Ferment des Harnsäure-Abbaus, kann zur enzymatischen Harnstoff-Bestimmung benutzt werden. Unter dem Einfluß dieses Fermentes wird Harnsäure bis zur Stufe des Allantoins abgebaut.

Die meisten Verfahren beruhen darauf, daß Harnsäure vor und nach der enzymatischen Hydrolyse mit Phosphorwolframsäure colorimetrisch bestimmt wird. Dabei zeigt es sich, daß nur  $\frac{2}{3}$  der ohne enzymatische Hydrolyse colorimetrisch gemessenen Werte wirklich durch Harnsäure bedingt sind. Das weitere Drittel wird durch reduzierende Substanzen wie Glutathion, Phenol, Ascorbinsäure, Glucose, Tyrosin, Tryptophan und Cystein bedingt<sup>55)</sup>.

Eine sehr wichtige Anwendung haben in neuester Zeit eine Gruppe von Fermenten, die sog. Aminosäuredecarboxylasen, in der Aminosäure-Analyse gefunden. Diese Fermente finden sich vor allem in den Bakterien und vermögen Aminosäuren unter Entstehung des betreffenden Amins zu decarboxylieren. Diese Fermente sind sehr spezifisch. Es konnten für



eine ganze Anzahl von Aminosäuren spezifische Decarboxylasen aufgefunden werden. Mit ihnen gelingt es, einzelne Aminosäuren sehr spezifisch in Proteinhydrolysaten zu bestimmen. Die Methodik ist einfach. Es wird in der Warburg-Apparatur das unter dem Einfluß des Fermentes entwickelte  $\text{CO}_2$  manometrisch gemessen.

So gelingt es, *l*-Lysin, *l*-Tyrosin, *l*-Histidin, *l*-Glutaminsäure, *l*-Ornithin und *l*-Arginin mit den für jede dieser Aminosäuren spezifischen Fermentpräparaten zu bestimmen<sup>56)</sup>. Diese Methode ist in voller Entwicklung und verspricht noch für eine Reihe wichtiger Aminosäuren spezifische Bestimmungsmethoden.

Als letztes Ferment dieser Gruppe sei die Penicillinase erwähnt, die Penicillin unter Entstehung von Penicillinsäure spaltet. Wahrscheinlich handelt es sich bei diesem Ferment um eine spezifische Esterase. Dieses Ferment ist verschiedentlich zur Penicillin-Bestimmung herangezogen worden. Die meisten Verfahren beruhen auf der Messung der Acidität der enzymatisch entstandenen Penicillinsäure<sup>57)</sup>. Diese enzymatischen Verfahren sollen genauer sein als die üblichen mikrobiologischen Bestimmungsmethoden.

## Enzymatische Effektoranalyse

Die Zahl der Analysenmethoden dieser Gruppe ist bis heute noch gering. Der Grund hierfür ist, daß die analytische Auswertung der Effektorwirkung eine genaue Kenntnis der Kinetik zur Voraussetzung hat. Erst dann, wenn es gelingt, eine bestimmte Effektorwirkung von der Wirkung anderer Effektoren zu trennen, ist die Voraussetzung zur analytischen Auswertung gegeben. Der Wert dieser Methoden beruht in erster Linie darauf, daß infolge der hohen Empfindlichkeit der Fermente gegenüber solchen Effektoren außerordentlich geringe Mengen dieser Stoffe erfaßt werden können. Die Empfindlichkeit dieser Methoden kann nur noch mit den in der Spektralanalyse üblichen Empfindlichkeiten verglichen werden. Die geringe Menge der Effektoren wird durch die katalytische Wirksamkeit des Fermentes stark vergrößert. Die Grundlage dieser Analysenmethoden bildet die genaue Messung der Fermentwirkung. Von der Genauigkeit dieser Messung hängt also im wesentlichen die Genauigkeit dieser Analysen ab. Aus der Differenz der Aktivitätsmessungen mit und ohne Effektorzusatz ergibt sich auf Grund einer vorher ermittelten Eichkurve die Menge des vorhandenen Effektors.

<sup>54)</sup> H. Wieland u. T. F. Macrae, Liebigs Ann. Chem. 483, 228 [1930].

<sup>55)</sup> O. H. Buchanan, W. D. Block u. A. A. Christman, J. biol. Chemistry 157, 181–87 [1945].

<sup>56)</sup> R. M. Archibald, Ann. New York Acad. Sci. 47, 181–86 [1946].

<sup>57)</sup> R. I. Henry u. R. D. Housewright, J. biol. Chemistry 167, 559–571 [1947].

## Fluorionen-Analyse

Bereits 1908 wurde von S. Amberg und A. S. Loevenhart<sup>58)</sup> die hohe Empfindlichkeit der Esterasen gegenüber Fluor-Ionen zum Nachweis von Fluor-Ionen in Lebensmitteln herangezogen. Als Ferment wird Lipase aus Schweineleber benutzt. Aus der Aktivitätsverminderung nach Zusatz der zu untersuchenden Lösung wird auf das Vorhandensein von  $\text{F}^-$  geschlossen. Diese Form des F-Nachweises ist aber nicht sehr spezifisch, da eine Anzahl anderer Ionen und organischer Verbindungen ebenfalls eine starke Beeinflussung der Fermentaktivität ergeben.

In neuester Zeit wurde deshalb von H. Stetter<sup>59)</sup> die  $\text{F}^-$ -Schädigung in ihrer Abhängigkeit vom  $\text{pH}$ , der Substratkonzentration und der Temperatur sorgfältig untersucht. Außerdem wurde der Einfluß von Fremd-Ionen auf die Fluor-Schädigung systematisch ermittelt. Als Fermentpräparate wurden durch fraktionierte Tanninfällung nach B. Helferich und H. Stetter<sup>60)</sup> gereinigte Präparate der Kartoffelphosphatase benutzt. An Stelle der von S. Amberg und A. S. Loevenhart angewandten ungenauen Aktivitätsmessung in ungepuffertem, heterogenem Milieu tritt die Aktivitätsmessung durch jodometrische Bestimmung des aus Phenylphosphat abgespaltenen Phenols in Citratgepufferter Lösung.

Es ergab sich, daß die  $\text{F}^-$ -Schädigung bei  $\text{pH}$  3,8 ein Maximum zeigt. Mit steigender Temperatur nimmt die Empfindlichkeit gegenüber  $\text{F}^-$  ab. Als optimal erweist sich eine Substratkonzentration von 0,1–0,05 mol. Störend wirken vor allem  $\text{TiO}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Be}^{2+}$  und  $\text{MoO}_4^{2-}$ . Unter Beachtung dieser experimentellen Befunde wurde ein Mikronachweis für  $\text{F}^-$  ausgearbeitet, der darauf beruht, daß die  $\text{F}^-$ -Schädigung bei  $\text{pH}$  3,8 ein Maximum zeigt. Die Empfindlichkeit beträgt 0,02  $\gamma/\text{cm}^3$ . Darüber hinaus wird eine Mikrobestimmungsmethode für  $\text{F}^-$  angegeben, die es gestattet,  $\text{F}^-$ -Mengen von 0,05–1  $\gamma$  mit einer Genauigkeit von  $\pm 0,001$ –0,01  $\gamma$  je nach Bereich der Eichkurve zu bestimmen. Die Genauigkeit auf eingewogenes  $\text{F}^-$  bezogen beträgt 1%. Die Störung durch  $\text{Al}^{3+}$  und  $\text{TiO}^{2+}$  kann dadurch ausgeschaltet werden, daß man dem Ferment von vornherein eine größere Menge  $\text{Al}^{3+}$  und  $\text{TiO}^{2+}$  zusetzt.

## Eserin-Bestimmung

Eine andere Esterase, die Cholinesterase, die für die Spaltung von Acetylcholin spezifisch ist, hat eine wichtige Anwendung für die Bestimmung des Alkaloids Eserin gefunden. Eserin hemmt die Cholinesterase in starkem Maße. Durch Messung der Hemmwirkung auf das Ferment können D. Vincent und P. Beaujard<sup>61)</sup> Mengen von 1–50  $\gamma$  Eserin mit guter Genauigkeit bestimmen. Da auch andere Alkaloide wie Genoserin, Dioxycodeinon, Morphin und Heroin eine ähnliche Hemmwirkung ausüben, kann die Bestimmungsmethode auch auf diese Alkaloide ausgedehnt werden.

## Tannin-Bestimmung

H. R. Barnell und E. Barnell<sup>62)</sup> ziehen die Diastase zur Bestimmung von Tannin in Früchten heran. Tannin hemmt die Amylase-Wirkung bereits in kleinsten Konzentrationen, wie dies ja auch bei vielen anderen Fermenten bekannt ist. Die Autoren bestimmen das Tannin auf Grund der Differenz der zur Hydrolyse einer bestimmten Menge Stärke mit und ohne Tannin-Zusatz benötigten Zeit.

## Glutathion-Bestimmung

Im Gegensatz zu den bisher erwähnten Verfahren dieser Gruppe von Analysenmethoden beruht die Glutathion-Bestimmung nicht auf einer Hemmwirkung, sondern auf einer durch Glutathion bewirkten sehr spezifischen Aktivierung der Glyoxalase. Die Glyoxalase verwandelt Methylglyoxal in Milchsäure.

Von G. E. Woodward<sup>63)</sup> wurde dieser Aktivierungseffekt zum ersten Male für die Bestimmung von Glutathion in biologischen

<sup>58)</sup> J. biol. Chemistry 4, 149 [1908].

<sup>59)</sup> Chem. Ber. 81, 532–540 [1948].

<sup>60)</sup> Liebigs Ann. Chem. 558, 234 [1947]; 560, 191 [1948].

<sup>61)</sup> Ann. Pharm. France 3, 22–26 [1945].

<sup>62)</sup> Ann. Botany 9, 77–99 [1945].

<sup>63)</sup> J. biol. Chemistry 109, 1–10 [1935].



Vorkommen herangezogen. Die Messung der Enzymaktivität beruht darauf, daß man das Ferment in Bicarbonat-Puffer auf Methylglyoxal einwirken läßt. Das durch die Bildung von Milchsäure in Freiheit gesetzte  $\text{CO}_2$  wird dann manometrisch gemessen. Aus dem ermittelten Aktivierungseffekt kann direkt auf die Glutathion-Menge geschlossen werden. Da die Aktivierung sehr spezifisch ist, besitzt diese Methode einen hohen Wert. Die Werte sind wesentlich zuverlässiger als die jodometrisch erhaltenen. Diese Methode wurde modifiziert und verbessert<sup>64</sup>). So kann z. B. auch die oxydierte Form des Glutathions bestimmt werden, wenn man vor der Bestimmung elektrolytisch reduziert.

### Fermente als Indikatoren

In dieser Gruppe von Analysemethoden läßt sich zwischen den Verfahren unterscheiden, bei denen der Nachweis von Naturstoffen auf Grund ihres Gehaltes an charakteristischen Fermenten erfolgt, und den Verfahren, bei denen eine Veränderung von Naturstoffen durch die Veränderung der Aktivität der in ihnen enthaltenen Fermente erkannt werden kann. Alle diese Verfahren beruhen also letztlich auf einer Aktivitätsmessung der in diesen Naturstoffen enthaltenen charakteristischen Fermente.

### Erkennung von Naturstoffen auf Grund ihres Fermentgehaltes

Auf Grund des Nachweises der im Honig enthaltenen Amylase lassen sich Honigbeimischungen zu Süßwaren ermitteln<sup>65</sup>).

In gleicher Weise läßt sich Sojabohnenmehl als Beimischung zu Nahrungsmitteln durch Nachweis der im Sojabohnenmehl in hoher Konzentration enthaltenen Urease leicht auffinden<sup>66</sup>).

Durch Bestimmung der in der Kleie enthaltenen Oxydasen kann der Kleiegehalt von verschiedenen Mehlsorten ermittelt werden<sup>67</sup>).

Erwähnt seien noch Verfahren, mit denen es gelingt, Blutspuren auf Grund ihrer Peroxydase- und Katalaseaktivität zu identifizieren<sup>68</sup>).

### Erkennung einer erfolgten Veränderung von Naturstoffen auf Grund der Veränderung der Fermentaktivität

Am wichtigsten und zahlreichsten sind hier die Verfahren zum Nachweis der Milcherhitzung. Diese Methoden beruhen darauf, daß alle Fermente durch Erhitzen inaktiviert werden. Die Temperaturen, bei denen diese Inaktivierung erfolgt, liegen für die meisten Fermente in dem Temperaturbereich zwischen 55–80°.

Schon sehr bald nach Einführung des Pasteurisierungszwanges für Milch trat das Bedürfnis auf, eine Methode zu finden, um rohe Milch von pasteurisierter zu unterscheiden. Fast alle in der Milch vorkommenden Fermente wurden im Laufe der Zeit als Indikatoren für die Milcherhitzung herangezogen.

Die wichtigsten in der Milch vorhandenen Enzyme sind die Milchperoxydase, die Milchamylase, die Milchlipase, das Schar-dinger-Enzym, die Milchkatalase und die Milchphosphatase. Da diese Fermente alle verschiedene Inaktivierungstemperaturen zeigen, sind sie in ganz verschiedener Weise für den Nachweis von stattgehabter Erhitzung geeignet.

Bereits zu Ende des vorigen Jahrhunderts wurde die Milchperoxydase für den Nachweis der Milcherhitzung herangezogen. Dieses Ferment wird bei 78–79° zerstört. Es läßt sich leicht durch Zusatz von Guajakol und  $\text{H}_2\text{O}_2$  auf Grund der eintretenden Färbung nachweisen. Außer Guajakol eignen sich auch Benzidin und andere Diamine für diesen Nachweis. Diese Probe eignet sich gut für den Nachweis hoch erhitzter Milch, hat sich

aber für den Nachweis der Dauerpasteurisierung und Kurzzeiterhitzung später nicht durchsetzen können, da die Thermostabilität des Fermentes zu groß ist und außerdem Spuren von Schwermetallen wie Kupfer leicht eine Peroxydase-Wirkung vortäuschen können.

Wesentlich besser eignet sich die Milchamylase zum Nachweis der Dauerpasteurisierung. Der Nachweis der Amylase ist mit der Jod-Stärkereaktion in einfacher Weise durchzuführen. Mit der Amylase-Reaktion läßt sich nachweisen, ob die Milch über 55° erhitzt wurde. So wird das Ferment durch eine Dauerpasteurisierung von 30 min bei 55° inaktiviert<sup>69</sup>). Darüber hinaus eignet sich das Ferment auch für den Nachweis der sog. Kurzzeiterhitzung. Das Ferment wird so z. B. durch 30–45 sec langes Erhitzen auf 71–74° inaktiviert. Es lassen sich noch 5% Rohmilchzusatz zu pasteurisierter Milch erkennen. Trotz der Vorteile gegenüber der Peroxydase-Reaktion konnte die Amylase-Reaktion in der Praxis nicht voll befriedigen.

Ein Fortschritt wurde erst erreicht, als H. D. Kay und W. R. Graham<sup>70</sup>) 1935 die Milchphosphatase zum Nachweis der Milcherhitzung heranzogen. Die Phosphatase erfüllt in vorzüglicher Weise die Anforderungen, die an einen Indikator für die Pasteurisierung gestellt werden können. Die Aktivitätsbestimmung erfolgt einfach und sicher durch colorimetrische Bestimmung des aus Phenylphosphat abgespaltenen Phenol mit *Folins* Reagens. Die Bedingungen für die Hitzeinaktivierung dieses Fermentes stehen in guter Übereinstimmung mit den amtlich geforderten Pasteurisierungstemperaturen und Pasteurisierungszeiten für die Dauerpasteurisierung und Kurzzeiterhitzung. Kleine Abweichungen lassen sich sicher erkennen. Beim Erhitzen auf 62° wird die Phosphatase in 20 min, bei Erhitzen auf 61° in 45 min und bei Erhitzen auf 60° in 75 min zerstört. Temperaturabweichungen von 1° und Abweichungen von 10 min in der Erhitzungszeit lassen sich sicher erkennen<sup>71</sup>). Außerdem läßt sich Zuzusatz von 0,1% Rohmilch sicher ermitteln.

Von den zahlreichen Modifikationen dieser Methode sei hier nur noch eine für die Praxis wichtige Schnellmethode von H. Scharer<sup>72</sup>) erwähnt. Diese Probe ist in einer halben Stunde durchzuführen und beruht darauf, daß das aus Phenylphosphat abgespaltene Phenol colorimetrisch erfaßt wird.

In neuester Zeit haben C. Huggins und P. Talalay<sup>73</sup>) Phenolphthalein-phosphat als Substrat für die Phosphataseprobe der Milch vorgeschlagen. Das farblose Phenolphthalein-phosphat bildet unter der Wirkung der Phosphatase Phenolphthalein zurück, das auf Grund seines Farbstoffcharakters leicht nachgewiesen werden kann.

Von den übrigen Verfahren dieser Gruppe soll hier nur noch eine Methode zum Nachweis der Trocknungstemperatur von Medizinalhefe erwähnt werden. Da die Zymase bereits bei 40–50° zerstört wird, andererseits aber die Hefekatalase erst bei 60–65° inaktiviert wird, lassen sich auf Grund der Messungen der beiden Aktivitäten weitgehende Aussagen über die Erhitzungstemperatur machen<sup>74</sup>).

### Schluß

Überblickt man das Gebiet der enzymatischen Analyse, so läßt sich feststellen, daß diese Analysemethoden bereits heute bei der Analyse von Naturstoffen unentbehrlich sind und daß man in Zukunft mit dem Fortschreiten unserer Kenntnisse auf dem Fermentgebiet noch viele wertvolle Analysemethoden erwarten darf. Dabei ist eine eingehende Kenntnis der Fermente und ihrer Wirkungsweise unbedingte Voraussetzung. Nur Analysemethoden, bei denen diese Voraussetzungen erfüllt sind, vermögen den Vorteil, den die Anwendung von Fermenten zu bieten vermag, voll zu nutzen.

Eingeg. am 19. April 1950.

[A 269]

<sup>64</sup>) J. Schoonover, Dohan u. G. E. Woodward, J. biol. Chemistry 129, 393–403 [1939].

<sup>65</sup>) W. Stoldt, Z. Unters. Lebensmittel 67, 435–41 [1934].

<sup>66</sup>) Ch. H. La Wall u. J. W. E. Harrison, J. Assoc. Agric. Chemists 17, 32–34 [1934].

<sup>67</sup>) P. Nottin u. Lenroigne, C. R. Acad. Agriculture France 17, 239 [1931].

<sup>68</sup>) F. Schwarz, Dtsch. Z. ges. gerichtl. Med. 27, 1–34 [1936].

<sup>69</sup>) P. Weinstein, Z. Unters. Lebensmittel 68, 73–80 [1934]; A. Schloemer u. B. Bleyer, Z. Unters. Lebensmittel 80, 425–29 [1940].

<sup>70</sup>) J. Dairy Res. 6, 191–203 [1935].

<sup>71</sup>) C. A. Koppejan, Congr. int. techn. chim. Ind. agric. C. R. 5, 11 325–34.

<sup>72</sup>) J. Dairy Sci. 21, 21–34 [1938].

<sup>73</sup>) J. biol. Chemistry 159, 399–410 [1945], s. a. H. Janecke u. W. Diemair, Z. analyt. Chem. 130, 56–57 [1949].

<sup>74</sup>) E. Richter, Apoth.-Ztg. 45, 1447 [1930].