

#### 4. Über eine Mikrobestimmung des Alanin-Gehaltes im Blut

von O. Wiss.

(19. XI. 47.)

Nach der von *A. J. Kendall* und *Th. E. Friedmann*<sup>1)</sup> angegebenen Methode wird Alanin durch Desaminierung mit salpetriger Säure in Milchsäure übergeführt; diese wird zu Acetaldehyd oxydiert und dessen Bisulfitverbindung jodometrisch bestimmt. Sowohl die Desaminierung als die jodometrische Bestimmung des Acetaldehyds sind unspezifisch. Es ist deshalb wiederholt versucht worden, die Methode eindeutiger zu gestalten. *O. Fürth* und Mitarbeiter<sup>2)</sup> trennten durch Fraktionierung den Acetaldehyd von höher siedenden Aldehyden. *A. Fromageot* und *P. Heitz*<sup>3)</sup> gelang es, durch photometrische Bestimmung des Acetaldehydes Alanin neben anderen Aminosäuren zu bestimmen. Beide Methoden sind jedoch wegen der unspezifischen Desaminierungsreaktion nicht allgemein anwendbar. Die Einführung des Ninhydrins als spezifisches Desaminierungsmittel zur quantitativen Bestimmung des  $\alpha$ -Aminostickstoffs durch *D. D. van Slyke* und Mitarbeiter<sup>4)</sup> war daher ein grosser Fortschritt. Auf dieser Grundlage haben *A. J. Virtanen* und Mitarbeiter<sup>5)</sup> eine neue Alanin-Bestimmungsmethode ausgearbeitet. Das Alanin wird durch Ninhydrin zu Acetaldehyd zersetzt. Die Destillation erfolgt mit der von *Lieb* und *Zacherl*<sup>6)</sup> zur Milchsäurebestimmung angegebenen Apparatur. Diese ist mit einem wirksamen Rückflusskühler versehen, wodurch höher siedende Aldehyde vom Acetaldehyd getrennt werden sollen.

Ich habe versucht, die von *A. J. Virtanen* angegebene Methode zur Bestimmung des Alanins im Blute zu verwenden. Es hat sich gezeigt, dass einige Abänderungen der Vorschrift unumgänglich waren. *Virtanen* verwendet zur Desaminierung von 0,2–2 mg Alanin 20 mg Ninhydrin, 7,5 g Ammoniumsulfat als Kondensationsmittel und 0,5 g Citronensäure. Unter diesen Reaktionsbedingungen ist es nicht gelungen, die errechnete Menge Acetaldehyd zu erfassen. Es wurde deshalb in pikrinsaurem Milieu unter Verwendung von 100 mg Ninhydrin desaminiert. So gelingt es leicht, Alanin quantitativ in Acetaldehyd überzuführen, zudem wird ein Arbeitsgang erspart, da die Pikrinsäure auch zur Enteiweissung des Blutes dient. Weiterhin hat sich gezeigt, dass Aldehyde, welche durch Desaminierung von

<sup>1)</sup> J. of Infect. Diseases **47**, 171 (1930).

<sup>2)</sup> Bioch. Z. **251**, 404 (1932).

<sup>3)</sup> Mikroch. Acta **3**, 52 (1938).

<sup>4)</sup> J. Biol. Chem. **141**, 627 (1941); C. R. Trav. Carlsberg **22**, 486 (1938).

<sup>5)</sup> Z. physiol. Ch. **266**, 193 (1940).

<sup>6)</sup> Z. physiol. Ch. **211**, 211 (1932).

Valin, Leucin und Isoleucin entstehen, trotz des wirksamen Rückflusskühlers die jodometrische Bestimmung des Acetaldehyds stören können. Der Acetaldehyd wurde infolgedessen ähnlich wie von *Fromageot* und *Heitz* (loc. cit.) unter Zusatz von Piperazin und Natriumnitroprussid photometrisch ermittelt. Neuerdings haben *B. Alexander* und *A. N. Seligmann*<sup>1)</sup> eine Methode zur Alaninbestimmung angegeben. Sie verwenden zum photometrischen Nachweis eine Farbreaktion des Acetaldehyds, die durch Kondensation mit Oxydiphenyl zustande kommt. Die Durchführung ist bedeutend langwieriger und bietet für die Bestimmung im Blute keine erheblichen Vorteile.

## Experimenteller Teil.

### 1. Methode.

#### a) Reagentien:

Pikrinsäurelösung nach *van Slyke* (loc. cit.). Eine wässrige, gesättigte Lösung wird so verdünnt, dass zur Titration von 20 cm<sup>3</sup> Lösung, bei Verwendung von Phenolphthalein als Indikator, 8,73 cm<sup>3</sup> 0,1-n. NaOH benötigt werden.

0,2%ige Lösung von Natriumbisulfit

Kaltgesättigte, wässrige Lösung von Piperazin

4%ige wässrige Lösung von Natriumnitroprussid (unmittelbar vor Gebrauch frisch bereiten)

0,5%ige Stärkelösung

0,1-n. Jodlösung

0,02-n. Natriumthiosulfatlösung

Gesättigte Natriumbicarbonatlösung

Ninhydrin in Substanz

b) Apparatur: nach *Lieb-Zacherl* (loc. cit.), hergestellt von *Paul Haack*, Wien, später von *E. Keller & Co.*, Basel.

#### c) Desaminierung:

1 cm<sup>3</sup><sup>2)</sup> frisch entnommenes Vollblut wird mit 7 cm<sup>3</sup>, oder 1 cm<sup>3</sup> Serum mit 5 cm<sup>3</sup> Pikrinsäurelösung in einem kleinen Zentrifugenglas gemischt und zentrifugiert. Bei Verwendung von Vollblut werden 6 cm<sup>3</sup>, bei Verwendung von Serum 5 cm<sup>3</sup>, d. h. die gesamte überstehende Flüssigkeit in den Reaktionskolben gegeben und mit 100 mg Ninhydrin und einer Spatelspitze Bimssteinpulver versetzt. Als Vorlage werden 3 cm<sup>3</sup> Bisulfitlösung in das Ansatzgefäß gegeben. Die Gefäße werden an den Apparat angeschlossen, die Reaktionslösung wird zum Sieden erhitzt und 20 Minuten so belassen, während ein schwacher Luftstrom den gebildeten Acetaldehyd in die Vorlage saugt.

#### d) Photometrische Bestimmung des Acetaldehydes:

Das überschüssige Bisulfit der Vorlage wird unter Zugabe von einem Tropfen Stärkelösung mit 0,1-n. Jodlösung eben bis zur Blaufärbung titriert. Das überschüssige Jod wird mit 0,02-n. Thiosulfat bis zur Entfärbung reduziert.

Die so behandelte Vorlage wird quantitativ in ein gradiertes Reagensglas von 10 cm<sup>3</sup> Inhalt übergeführt. Nach Zusatz von 0,6 cm<sup>3</sup> Natriumbicarbonatlösung wird bis auf 6 cm<sup>3</sup> aufgefüllt, 1,5 cm<sup>3</sup> Piperazinslösung und 0,5 cm<sup>3</sup> Natriumnitroprussidlösung zugegeben. Die Farbtintensität erreicht nach 2—3 Minuten ein Maximum, das ca. eine Minute bestehen bleibt, so dass die photometrische Bestimmung unmittelbar nach Zugabe der

<sup>1)</sup> J. Biol. Chem. **159**, 9 (1945).

<sup>2)</sup> Wenn wenig Blut zur Verfügung steht, genügen auch 0,5 cm<sup>3</sup> Blut, das mit Wasser auf 1 cm<sup>3</sup> ergänzt wird.

Reagentien vorgenommen werden muss. Aus dem gleichen Grund wird gegen Wasser als Vergleichswert photometriert, und die Extinktion des Leerwertes bei jeder Bestimmung kontrolliert, indem 3 cm<sup>3</sup> unbehandelte Bisulfittlösung, wie oben beschrieben, verarbeitet und von den Analysenwerten abgezogen werden. Die Bestimmung erfolgt mit dem *Pulfrich*-Stufenphotometer bei 20 mm Schichtdicke mit Filter S 57.

e) Eichkurve:

Es wurden im Reaktionsgefäß je 1 cm<sup>3</sup> einer Alaninlösung, enthaltend 20–150  $\gamma$  Alanin, mit 5 cm<sup>3</sup> Pikrinsäurelösung versetzt und nach obiger Vorschrift desaminiert und photometriert.

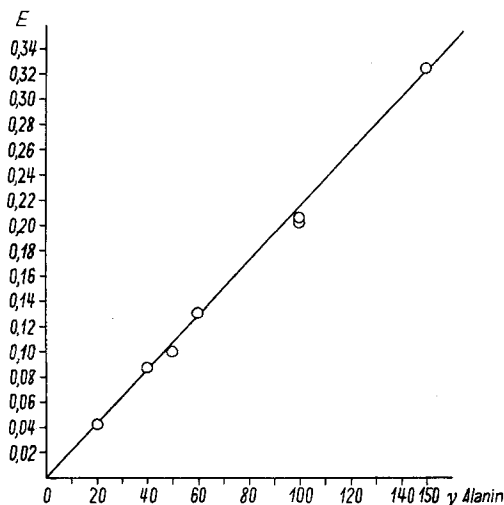


Fig. 1.

f) Berechnung:

Die Eichkurve zeigt, dass  $\gamma$  Alanin/E = 460 beträgt. Da bei Verwendung von insgesamt 8 cm<sup>3</sup> Analysenflüssigkeit (1 cm<sup>3</sup> Blut und 7 cm<sup>3</sup> Pikrinsäure) 6 cm<sup>3</sup> zur Bestimmung gelangen, wird der Gehalt nach folgender Gleichung errechnet:

$$\gamma \text{ Alanin/cm}^3 \text{ Blut} = \frac{E \cdot 460 \cdot 8}{6} = E \cdot 615$$

Die entsprechende Gleichung bei Verwendung von 1 cm<sup>3</sup> Serum ist

$$= \frac{E \cdot 460 \cdot 6}{5} = E \cdot 552$$

g) Genauigkeit:

Die Genauigkeit der Methode ist vom Gehalt abhängig. Bei kleinen Werten von 20–30  $\gamma$ /cm<sup>3</sup> beträgt in Parallelbestimmungen die maximale Abweichung ca.  $\pm 10\%$ , bei Werten über 50  $\gamma$ /cm<sup>3</sup> nur ca.  $\pm 5\%$ .

## 2. Spezifität.

### In Gegenwart anderer Aminosäuren und Peptide:

17 Aminosäuren wurden nach oben beschriebener Methode desaminiert und der gebildete Aldehyd jodometrisch bestimmt. Je 1 mg Glykokoll, Glutaminsäure, Arginin, Histidin, Lysin, Serin, Threonin, Cystin, Tyrosin, Tryptophan, Prolin und Kreatin bildeten keine jodometrisch bestimmbare Aldehydmenge<sup>1)</sup>. Bei den übrigen Aminosäuren konnten jodometrisch ganz erhebliche Mengen Aldehyd nachgewiesen werden.

<sup>1)</sup> Die jodometrische Bestimmung erfolgte nach den Angaben von *Virtanen* (loc. cit.).

1 mg Alanin	verbrauchte	2,25 cm <sup>3</sup> 0,01-n. Jodlösung	= 100% des errechneten Wertes
1 mg Valin	„	1,64 cm <sup>3</sup> 0,01-n. Jodlösung	
1 mg Leucin	„	1,40 cm <sup>3</sup> 0,01-n.	„
1 mg Isoleucin	„	1,32 cm <sup>3</sup> 0,01-n.	„
1 mg Asparaginsäure	„	0,4 cm <sup>3</sup> 0,01-n.	„
1 mg Phenylalanin	„	0,4 cm <sup>3</sup> 0,01-n.	„

Es musste demnach angenommen werden, dass entweder auch höher siedende Aldehyde den Kühler passieren, oder aber dass Zersetzung zu Acetaldehyd eintritt.

Photometrische Kontrolluntersuchungen haben nun ergeben, dass durch Desaminierung der angeführten Aminosäuren keine wesentlichen Mengen Acetaldehyd gebildet werden. Je 30  $\gamma$  Valin, Leucin, Isoleucin, Asparaginsäure und Phenylalanin wurden desaminiert und photometrisch untersucht; dabei liess sich keine Erhöhung der Extinktion im Vergleich zum Leerwert feststellen. Es darf deshalb angenommen werden, dass auch die anderen freien Aminosäuren des Blutes die photometrische Bestimmung des Alanins nicht beeinflussen. Weiterhin hat sich gezeigt, dass Alanin-haltige Peptide nicht mitbestimmt werden.

#### Spezifität in Gegenwart von Brenztraubensäure:

Trotzdem es sehr unwahrscheinlich war, dass Brenztraubensäure als Begleitsubstanz des Alanins bei der Bestimmung zu Acetaldehyd decarboxyliert werde, schien es nicht überflüssig, die Kontrolle durchzuführen. Brenztraubensäure in physiologischer Konzentration von 30  $\gamma$ /cm<sup>3</sup> ergab keine Zunahme des Acetaldehyds.

#### Einfluss von präformiertem Acetaldehyd:

Untersuchungen von W. Stepp<sup>1)</sup> haben gezeigt, dass Acetaldehyd in geringen Mengen im Blut vorhanden ist. Obwohl sehr kleine Konzentrationen angegeben werden, wurde untersucht, ob die Alaninbestimmung dadurch beeinträchtigt wird. Blutserum wurde zu diesem Zwecke unter Weglassen des Ninhydrin-Zusatzes im übrigen so behandelt, wie das für die Alaninbestimmung angegeben ist. Es hat sich gezeigt, dass im Vergleich zum Leerwert keine Erhöhung der Extinktion auftritt, so dass ein störender Einfluss des vorgebildeten Acetaldehyds ausgeschlossen werden kann.

#### Bestimmung von Alanin, dem Blutserum zugesetzt:

Um Aufschluss darüber zu erhalten, ob die im Blut gefundene Alaninmenge dem wirklichen Gehalt entspricht, oder ob infolge der Vorbehandlung wie Eiweissfällung usw. nur ein Teil des Alanins erfasst wird, wurde eine bestimmte Alaninmenge zu Blutserum zugesetzt und nachher die Bestimmung durchgeführt. Die folgenden Werte zeigen, dass sich das zugesetzte Alanin innerhalb der Fehlergrenze der Methode quantitativ nachweisen liess.

Tabelle 1.

Nr.	Serum 1 cm <sup>3</sup>	Alanin		
		Zusatz	Gefunden total	Differenz
1	Ratte A	—	49 $\gamma$	—
2	Ratte A	50 $\gamma$	98 $\gamma$	49 $\gamma$ = 98%
3	Ratte A	50 $\gamma$	98 $\gamma$	49 $\gamma$ = 98%
4	Ratte A	50 $\gamma$	96 $\gamma$	47 $\gamma$ = 94%
5	Ratte B	—	50 $\gamma$	—
6	Ratte B	50 $\gamma$	104 $\gamma$	54 $\gamma$ = 108%
7	Ratte B	50 $\gamma$	102 $\gamma$	52 $\gamma$ = 104%

<sup>1)</sup> Z. physiol. Ch. 107, 29 (1919).

## Zusammenfassung.

1. Es wird eine Methode zur Bestimmung des Alanins im Blute angegeben; sie beruht auf der Desaminierung durch Ninhydrin und nachfolgender photometrischer Bestimmung des entstandenen Acetaldehyds.

2. Die Methode ist spezifisch. Andere Aminosäuren stören die Bestimmung nicht.

3. Dem Blute zugesetztes Alanin lässt sich innerhalb der Fehlerbreite der Methode quantitativ nachweisen.

Physiologisch-chemisches Institut der Universität Basel.

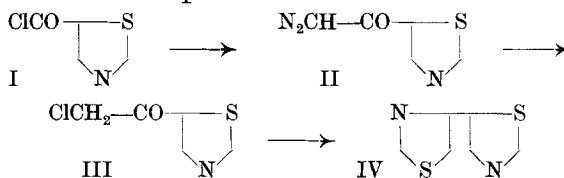
## 5. Über 5-Chloracetyl-thiazol

von H. Erlenmeyer und J. Ostertag.

(22. XI. 47.)

Im Zusammenhang mit strukturchemischen Untersuchungen in der Thiazolreihe interessierten wir uns für die Eigenschaften des 5-Chloracetyl-thiazols (Thiazolyl-(5)-chlormethyl-ketons) (III).

Ausgehend von Thiazol-(5)-carbonsäurechlorid (I)<sup>1)</sup> erhielten wir durch Umsatz mit Diazomethan das Thiazolyl-(5)-diazomethylketon (II). Dieses Diazoketon zeigt eine nicht normale Beständigkeit. Es kann aus verdünntem Alkohol in grossen, bis 100 mg schweren Rhomboedern erhalten werden und ist im Vakuum (12 mm) bei 60–65° unzersetzt sublimierbar. Bei schnellem Erhitzen über 90° zersetzt es sich unter Verpuffen.



Das Diazomethyl-keton liess sich durch Kochen mit Chlorwasserstoff in absolutem Alkohol zum gesuchten Chlormethylketon (III) vom Smp. 54–55° umsetzen.

Um die Struktur dieser Verbindung sicherzustellen, prüften wir die Reaktion mit Thioformamid und erhielten hierbei 4,5'-Dithiazolyl (IV) vom Smp. 93–94°<sup>2)3)</sup>.

<sup>1)</sup> H. Erlenmeyer und H. v. Meyenburg, *Helv.* **20**, 204 (1937).

<sup>2)</sup> Über 2,2'- und 4,4'-Dithiazolyl vgl. H. Erlenmeyer und E. H. Schmid, *Helv.* **22**, 698 (1939); H. Erlenmeyer und H. Ueberwasser, *Helv.* **22**, 938 (1939).

<sup>3)</sup> Einige Derivate des 4,5'-Dithiazolyls wurden von E. Ochiai, Y. Tamamushi und F. Nagasawa, *B.* **73**, 28 (1940) dargestellt, die mit Hilfe einer *Friedel-Crafts*'schen Reaktion aus 2-Oxy-4-methylthiazol das 5-Acetylderivat erhielten, daraus durch Bromierung das 5-Brom-acetyl-derivat herstellten und dieses mit einer Reihe von Thioamiden kondensierten.