

aus dem Röhrchen geschleudert wird. Man zieht in der Reibschale aus, zentrifugiert die Lösung wie oben angegeben und prüft auf Bleipapier. Um Täuschungen zu vermeiden, ist auch hier nur mit ganz sauberen Zentrifugaten zu arbeiten.

Empfindlichkeit der Spurenprobe: 0,5% Schwefel in 3—5 mg Substanz können gut nachgewiesen werden, was 15—25 γ Schwefel entspricht.

#### 4. Blindproben.

Selbstverständlich müssen die Reagentien, besonders beim Nachweis kleinsten Mengen und bei der Spurensuche, im Blindversuch auf Schwefelfreiheit geprüft werden.

### Zusammenfassung.

Es wird ein einfacher, sicherer und empfindlicher Mikronachweis von organisch gebundenem Schwefel beschrieben. Etwa 0,5 mg Substanz werden in einer Kapillare durch Erhitzen mit Kaliumcarbonat-Magnesium-Gemisch reduziert und der Schwefelwasserstoff durch Bleiacetat nachgewiesen.

Empfindlichkeit: Bei Substanzen von mittlerem Schwefelgehalt (etwa 10% S) kann bis zu 1 γ Schwefel erfasst werden. Bei kleinen Schwefelgehalten gelingt der Nachweis dieser Spuren bis zu 0,5 %S in 3—5 mg Substanz.

Zürich, Chemisches Institut der Universität,  
Mikroanalytisches Laboratorium.

## 33. Über die quantitative Bestimmung kleiner Mengen Glykokoll in Blut, Harn und Proteinhydrolysaten

von R. Krueger.

(20. XII. 48.)

Das Glykokoll ist schon seit 1820 bekannt, doch standen bis 1930 nur Isolierungsmethoden für seine Bestimmung zur Verfügung. Schon daraus lässt sich erkennen, wie schwierig es war, die einfachste Aminosäure mit einer spezifischen Reaktion quantitativ zu fassen. Der Orthophtaldialdehyd *Zimmermann*<sup>1)</sup>, der unter gewissen Bedingungen mit Glykokoll eine Färbung entstehen lässt, war das erste Reagens, mit dem eine kolorimetrische Bestimmung versucht wurde. Trotz mannigfacher Bearbeitungen der Methodik von *Klein* und *Linser*<sup>2)</sup>, *Patton*<sup>3)</sup> und *Abderhalden* und *Neumann*<sup>4)</sup> gelang es am Ende doch nicht, eine einfache, streng spezifische Bestimmung auf dieser Farbreaktion aufzubauen.

<sup>1)</sup> *W. Zimmermann*, Z. physiol. Ch. **189**, 4 (1930).

<sup>2)</sup> *G. Klein* und *H. Linser*, Z. physiol. Ch. **205**, 251 (1932).

<sup>3)</sup> *A. R. Patton*, J. Biol. Chem. **108**, 267 (1935).

<sup>4)</sup> *E. Abderhalden* und *A. Neumann*, Z. physiol. Ch. **238**, 177 (1936).

Man glaubte seit *Ruhemann's*<sup>1)</sup> Beobachtungen, dass das Glykokoll in seiner Reaktion mit Ninhydrin (Triketohydrindenhydrat) eine Ausnahmestellung einnähme. Alle anderen Monoamino-monocarbonsäuren zerfallen bei der Einwirkung von Ninhydrin in den um ein C-Atom ärmeren Aldehyd, Ammoniak und Kohlendioxyd. Dasselbe war eigentlich auch für das Glykokoll zu erwarten; es musste neben den beiden anderen Spaltprodukten Formaldehyd entstehen. Dieser konnte aber von keinem der Untersucher aufgefunden werden. Erst vor kurzer Zeit gelang es *MacFadyen*<sup>2)</sup>, nachzuweisen, dass beim Kochen mit Ninhydrin doch 0,96 Mol Formaldehyd aus 1 Mol Glykokoll entsteht. Er bediente sich des sehr empfindlichen Formaldehydnachweises von *Eegriwe*<sup>3)</sup>, den er nach der quantitativen Seite hin genau ausarbeitete. Bald nach ihm veröffentlichten *Alexander, Landwehr* und *Seligman*<sup>4)</sup> eine Methode zur Bestimmung des Glykokolls im Blute. Sie beruht auf derselben Umsetzung von Ninhydrin mit Glykokoll — der entstehende Formaldehyd wird mit dem Wasserdampf abdestilliert und danach in *Eegriwe's* Reaktion spektrophotometrisch gemessen. Auch diese Autoren geben an, dass der Formaldehyd in stöchiometrischem Verhältnis zum Glykokoll entstehe. Weiterhin, dass keine andere Aminosäure oder sonst im enteissten Blutfiltrat enthaltene Verbindung bei der Ninhydrineinwirkung Formaldehyd abspalte und die Bestimmung deshalb spezifisch sei. Allerdings werde bei zu langsamer Destillation ein erheblicher Verlust an Formaldehyd spürbar, weil dieser dann mit den im Blutfiltrat noch enthaltenen anderen Aminosäuren reagiere. Alle diese Befunde wurden hier nachgeprüft und dabei folgendes festgestellt:

1. In verdünnter Lösung entsteht aus Glykokoll in der Ninhydrinreaktion die theoretische Menge Formaldehyd.

2. Andere Aminosäuren, Peptide und einige weitere Verbindungen geben beim Kochen mit Ninhydrin keinen Formaldehyd ab.

3. Cystein, Cystin, Lysin, Histidin, Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan oder deren Spaltprodukte reagieren unter den von *Alexander* angegebenen Bedingungen irreversibel und in grossem Umfang mit dem aus Glykokoll abgespaltenen Formaldehyd.

Die Methode *Alexander's* liefert gemäss Punkt 3 schon im enteissten Blutfiltrat zu niedrige Glykokollwerte. Eine Anwendung auf Lösungen von höherem Aminosäuregehalt, wie z. B. Proteinhydrolysate, ist nicht möglich. Das Ziel der vorliegenden Untersuchung war daher, eine Methode zu finden, mit der man das Glykokoll auch in aminosäurehaltigen Lösungen bestimmen konnte. Im ersten

<sup>1)</sup> *S. Ruhemann*, Soc. **99**, 792, 1486 (1911).

<sup>2)</sup> *D. A. MacFadyen*, J. Biol. Chem. **158**, 107 (1945).

<sup>3)</sup> *E. Eegriwe*, Z. anal. Ch. **110**, 22 (1937).

<sup>4)</sup> *B. Alexander, G. Landwehr* und *A. M. Seligman*, J. Biol. Chem. **160**, 51 (1945).

Diese Arbeit wird im folgenden nur noch unter dem Namen *Alexander* zitiert.

Teil der Arbeit werden frühere Befunde nachgeprüft, insbesondere *Alexander's* Methode in ihrer Anwendung. Im zweiten wird eine neue Art der Glykokollbestimmung beschrieben.

### Experimentelles.

Es wurden folgende Reagenzien und Apparate verwendet:

1. Chromotropsäure (1,8-Dioxynaphthalin-3,6-disulfonsäure). Das technische Produkt<sup>1)</sup> wurde nach *Boyd* und *Logan*<sup>2)</sup> gereinigt.
2. Aminosäuren. Alle unten erwähnten Aminosäuren wurden bei der Fa. *Hoffmann-La Roche* in Basel bezogen. Ausser Tryptophan wurden sie sämtlich vor Gebrauch mindestens 2 mal umkristallisiert.
3. Schwefelsäure konz. ( $D = 1,84$ ). Die handelsübliche Säure wurde in der Glasschliffapparatur destilliert.
4. Aktive Adsorptionskohle (Carbo activatus siccus pulv.) der Fa. *E. Merck*, Darmstadt.
5. Destillationsapparat nach *Stotz*<sup>3)</sup>.
6. Destillationsapparat wie unten beschrieben (Fig. 3).
7. *Beckman* Spektrophotometer, Fa. *National Technical Laboratories*, Pasadena, U.S.A.

### Teil I.

#### Nachprüfung bisheriger Untersuchungen.

##### 1. Bestimmung von Formaldehyd und Glykokoll in reiner Lösung.

Nach *Eegriwe* (l. c.) kondensiert sich Formaldehyd bei  $100^{\circ}$  in stark schwefelsaurer Lösung mit Chromotropsäure zu einem violetten Farbstoff. Das Absorptionsspektrum desselben ist beschrieben (*MacFadyen, Alexander* (l.c.)). Wenn man Glykokoll der Ninhydrinreaktion unterwirft und dabei wirklich Formaldehyd entsteht, muss auch der so gewonnene Aldehyd unter denselben Bedingungen das gleiche Absorptionsspektrum hervorrufen. Es wurde daher reiner Formaldehyd und nach *Alexander* aus Glykokoll hergestellter Formaldehyd der Reaktion *Eegriwe's* unterworfen. Beide Lösungen zeigten violette Farbe. Ihre Absorptionsspektren wurden im *Beckman* Spektrophotometer gemessen. Im Bereich von  $430\text{--}625\text{ m}\mu$  war die Lichtabsorption beider Farbstoffe identisch. Absorptionsmaximum bei  $570\text{ m}\mu$ .

Um festzustellen, wieviel Formaldehyd das Glykokoll abspaltete, wurde gemäss *MacFadyen* (l. c.) eine genaue Formaldehydlösung durch Hydrolyse von Hexamethylenetetramin hergestellt, eine ebensolche durch Ninhydrinersetzung von Glykokoll. Die Versuche wurden so eingerichtet, dass bei vollständiger Zersetzung des Glykokolls die Formaldehydmenge in den Vergleichsansätzen gleich gross sein musste; sie wurde in *Eegriwe's* Reaktion spektrophotometrisch bestimmt. Es ergab sich, dass die verglichenen Formaldehydmengen innerhalb der Fehlgrenze der Methode übereinstimmten. Hiernach bestätigen sich die Untersuchungen von *MacFadyen* und *Alexander* (l. c.); Beim Kochen mit Ninhydrin entsteht (in verdünnter Lösung) 1 Mol Formaldehyd aus 1 Mol Glykokoll.

##### 2. Spezifität der Reaktion.

Bei der Anwendung der Methode *Alexander's* auf reine wässrige Lösungen sämtlicher natürlich im Eiweiss vorkommenden  $\alpha$ -Aminosäuren (5 mg/Ansatz) wurde kein Formaldehyd erhalten. Glucose und Furfurol gaben ebenfalls keinen Formaldehyd ab. Im Proteinhydrolysat dürfte die Methode folglich spezifisch sein. Wegen ihres Vorkommens in ver-

<sup>1)</sup> Für die Überlassung der Chromotropsäure habe ich der Firma *Geigy* in Basel zu danken.

<sup>2)</sup> *M.J. Boyd* und *M.A. Logan*, J. Biol. Chem. **146**, 279 (1942).

<sup>3)</sup> *E. Stotz*, J. Biol. Chem. **148**, 585 (1943).

schiedenen biologischen Flüssigkeiten wurden noch folgende Verbindungen untersucht: Glykogen (4 mg/Ansatz), Harnstoff (2 mg/Ansatz), Harnsäure (0,2 mg/Ansatz), Kreatinin (0,2 mg/Ansatz) und Hippursäure (2 mg/Ansatz). Auch hier konnte nirgends Formaldehyd nachgewiesen werden. Nach *Alexander* liess Alanyl-glycin 20% des von der gleichen Menge Glykokoll abgespaltenen Formaldehyds entstehen. Der Autor vermutete, dass sein Alanyl-glycin mit Glykokoll verunreinigt gewesen sei, ist der Sache aber nicht weiter nachgegangen. Bei der Nachprüfung konnte aus reinem Alanyl-glycin kein Formaldehyd entwickelt werden. Glycyl-glycin, bei dem noch am ehesten die Wahrscheinlichkeit einer Reaktion mit dem Ninhydrin bestand, wurde auch untersucht und spaltete ebenfalls keinen Formaldehyd ab.

### 3. Störung der Bestimmung durch andere Aminosäuren.

Formaldehyd reagiert in wässriger Lösung mit  $\alpha$ -Aminosäuren unter Bildung zahlreicher, verschiedener Verbindungen teils stabilen, teils instabilen Charakters<sup>1)</sup>). Da einige der Reaktionen irreversibel sind, war eine quantitative Bestimmung von Formaldehyd in Aminosäurelösungen bisher nicht möglich: immer liegt ein Teil desselben als Aminosäureverbindung vor und entzieht sich so der direkten Bestimmung (*Martin* und *Synge*<sup>2)</sup>, *Neuberger*<sup>3)</sup>). Es stand zu vermuten, dass auch in *Alexander's* Bestimmungsmethode gewisse Mengen des aus dem Glykokoll entstehenden Formaldehyds sich mit den noch im Blutfiltrat anwesenden Aminosäuren kondensierten, bevor diese selbst durch das Ninhydrin in die entsprechenden Aldehyde übergeführt waren. Der Verfasser gibt an, dass man solche Fehler durch rasche Destillation vermeiden könne, er schreibt vor, die Destillation in 15 Minuten zu beenden. In allen unten mitgeteilten Versuchen mit seiner Methode wurde die Destillationsdauer daher unter 15 Minuten gehalten.

Zuerst seien einige Experimente angeführt, aus denen hervorgeht, dass grosse Verluste an Formaldehyd entstehen, wenn Ninhydrinreaktion und Abdestillation des Formaldehyds gemäß *Alexander* und in Anwesenheit anderer Aminosäuren vorgenommen werden. Die Menge Formaldehyd, die durch Bindung an die Aminosäuren verloren geht, entspricht der Differenz des eingesetzten und wiedergefundenen Glykokolls in der nachfolgenden Tabelle. Pro Ansatz wurden je 500  $\gamma$  der Aminosäure mit 10—100  $\gamma$  Glykokoll destilliert. Im Destillat wurde gemäß Vorschrift die Chromotropsäurereaktion ausgeführt und die Extinktion im *Beckman* Spektrophotometer gemessen. Berechnung nach einer ebenso gewonnenen Eichkurve für reines Glykokoll.

Wie aus Tabelle 1 zu ersehen ist, führt vor allem die Anwesenheit der aromatischen Aminosäuren, des Lysins, Cystins und Cysteins zu erheblichen Verlusten an destillierbarem Formaldehyd. Durch Variation der Destillationsdauer konnte die Ausbeute nicht verbessert werden. Aus der Tabelle geht auch noch hervor, dass die verlorene, an andere Aminosäuren gebundene Formaldehydmenge im untersuchten Bereich der gebildeten direkt proportional ist. Am Beispiel des Lysins, Phenylalanins und Tryptophans wird das besonders deutlich: Wird die Menge zugesetzter Aminosäure konstant gehalten und die Formaldehydmenge variiert, entzieht sich immer der gleiche Prozentsatz des gesamten Formaldehyds der Bestimmung.

Hatte sich erwiesen, dass die Anwesenheit von Aminosäuren die Glykokollbestimmung von *Alexander* stört, so war als nächstes festzustellen, wie gross die Fehler sein würden, wenn man die Methode auf das Blutfiltrat oder andere aminosäurehaltige Lösungen anwendete. Es wurden deshalb die Verhältnisse, wie sie in einem natürlichen Blutfiltrat, Lebereiweißhydrolysat und Caseinhydrolysat vorliegen, künstlich nachgeahmt. Das Caseinhydrolysat wurde gewählt, weil darin die Bedingungen für die Glykokollbestimmung besonders ungünstig sind, beträgt doch nach neuesten Angaben der

<sup>1)</sup> Übersicht bei *D. French* und *J. T. Edsall*, Adv. Prot. Chem. **2**, 278 (1945).

<sup>2)</sup> *A. J. P. Martin* und *R. L. M. Synge*, Biochem. J. **35**, 294 (1941).

<sup>3)</sup> *A. Neuberger*, Biochem. J. **38**, 309 (1944).

Tabelle 1.

Störender Einfluss begleitender Aminosäuren auf die Glykokollbestimmung nach Alexander.

Destilliert in Gegenwart von 500 γ	Glykokoll einge- setzt γ	wieder gefunden γ	Verlust CH <sub>2</sub> O in %	Destilliert in Gegenwart von 500 γ	Glykokoll einge- setzt γ	wieder gefunden γ	Verlust CH <sub>2</sub> O in %
Alanin . . . .	80	72,5	9	Asparaginsäure	80	58	27
Serin . . . .	80	55	31	Glutaminsäure	80	59	26
Cystin . . . .	80	40	50	Phenylalanin .	20	7,5	62
Cystein . . . .	20	10	50		60	19	68
	60	31	48		80	29	64
Methionin . . .	80	66	18	Tyrosin . . . .	20	8	60
Threonin . . . .	60	45	25		60	37,5	37
Valin . . . .	80	59	26		80	55,5	31
Leucin . . . .	80	71	11	Histidin . . . .	20	7,5	62
Isoleucin . . . .	80	66	17		60	28	53
Citrullin . . . .	80	68	15		80	34	57
Arginin . . . .	80	63	21	Tryptophan . . .	20	11	45
Lysin . . . .	10	2,5	75		60	36	40
	20	7,5	62		80	44,5	44
	40	15	62				
	60	22,5	62				
	80	32	60				
	100	39	61				

Glykokollgehalt des Caseins (mikrobiologisch bestimmt) nur 1,93%<sup>1)</sup>. Alle in den erwähnten Lösungen vorhandenen Aminosäuren wurden im natürlichen Mengenverhältnis abgewogen und gelöst. Die Mengen in mg, bezogen auf 100 mg Glykokoll, sind in Tabelle 2 aufgeführt. Die Zahlen für die Eiweißhydrolysate sind Zusammenstellungen von Block und Bolling<sup>2)</sup> entnommen, diejenigen für das Blutfiltrat (Rattenblut nach Schenck enteiweißt) verdanke ich einer persönlichen Mitteilung von Herrn Dr. O. Wiss.

Die angeführten Mengen der reinen, insbesondere ganz glykokollfreien Aminosäuren wurden zusammen in 100 cm<sup>3</sup> Wasser gelöst, und diese Stammlösung so verdünnt, dass pro Ansatz (in 5 cm<sup>3</sup>) 10 bis 100 γ Glykokoll und entsprechende Mengen der übrigen Aminosäuren enthalten waren. Die Figur 1 zeigt Eichkurven, die mit Alexander's Methode an einer Lösung von reinem Glykokoll und den drei Lösungen der Tabelle 2 gewonnen wurden. Allen Eichkurven lag der gleiche Glykokollgehalt zugrunde.

Aus den abgebildeten Kurven ergeben sich die Fehler, welche bei der Anwendung der Methode Alexander's in einigen biologischen Flüssigkeiten zu erwarten sind. Eine Korrektion derselben auf rechnerischem Wege dürfte wohl kaum möglich sein. Bei der Annahme, dass im verdünnten Blutfiltrat 30—50 γ Glykokoll pro Ansatz zu bestimmen sind, ist ein Fehler von 25—35% zu erwarten. Derselbe beträgt für die gleichen Glykokollmengen im Leberhydrolysat 20—25%, im Caseinhydrolysat 53—67%. Es wurde noch nachgeprüft, ob auch im Blutfiltrat, im Gegensatz zu den Kurven der Fig. 1, bei gleichbleibender Menge anderer Aminosäuren und steigender Menge Glykokoll der Formaldehydverlust prozentual gleich bleibt. Zum künstlichen Blutfiltrat, das auf einen Gehalt

<sup>1)</sup> S. Shankman, M. N. Camien und M. S. Dunn, J. Biol. Chem. **168**, 51 (1947).

<sup>2)</sup> R. J. Block und D. Bolling, The Amino Acids Composition of Proteins and Foods, 1947.

Tabelle 2.

Auf 100 mg Glykokoll bezogene Zusammensetzung von künstlichem Blutfiltrat (Ratte), Leberhydrolysat und Caseinhydrolysat.

Aminosäure	mg im Blutfiltrat (Ratte)	mg im Leberhydrolysat	mg im Caseinhydrolysat
Glykokoll . . . . .	100	100	100
Alanin . . . . .	186	4	280
Serin . . . . .	71	85	375
Cystin . . . . .	29*	16*	18*
Methionin . . . . .	9	38	175
Threonin . . . . .	93	68	195
Valin . . . . .	214	73	350
Leucin . . . . .	60	99	605
Isoleucin . . . . .	46	66	325
Arginin . . . . .	208	77	205
Lysin . . . . .	371*	74*	345*
Asparaginsäure . . . . .	20	81	315
Glutaminsäure . . . . .	314	134	1140
Phenylalanin . . . . .	34*	86*	260*
Tyrosin . . . . .	20*	46*	320*
Histidin. . . . .	49*	31*	125*
Prolin . . . . .	86	—	410
Oxyprolin . . . . .	—	—	100
Tryptophan . . . . .	55*	—	—
Glykokoll in % des Gesamtaminosäuregehaltes . .	5,1	9,28	1,77

\* Aminosäuren, welche die Bestimmung stark stören.

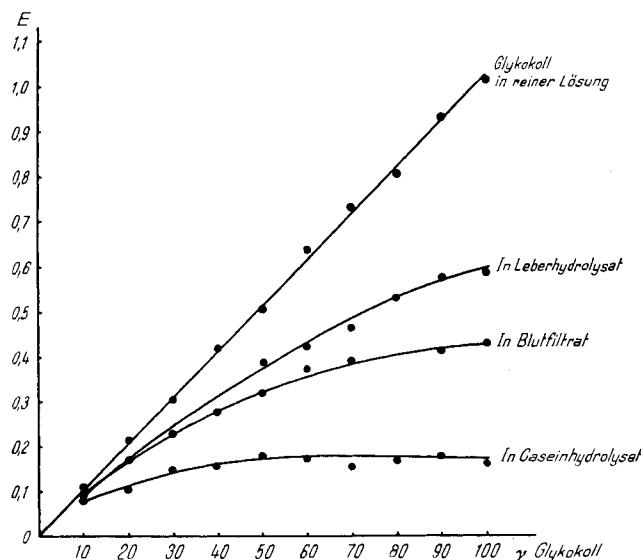


Fig. 1.

von  $40\gamma$  Glykokoll verdünnt war, wurden 10, 20, 30, 40, 50 und  $60\gamma$  Glykokoll zugesetzt. Es ergab sich die folgende Kurve:

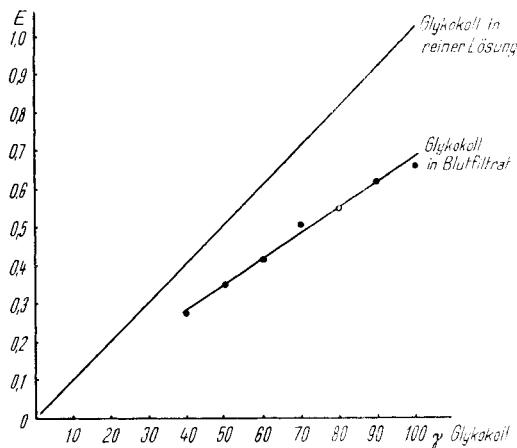


Fig. 2.

Es stellte sich heraus, dass auch hier die verlorene Menge Formaldehyd von der Gesamtmenge des entstehenden abhängig ist. Dass sich diese Verhältnisse in den Zusatzversuchen Alexander's nicht offenbart haben, lag wohl daran, dass die zugesetzten Mengen zu gering waren und die Unterschiede deshalb teilweise innerhalb der Fehlerbreite der Methode blieben.

Wurde die Destillation des Glykokolls in Gegenwart von Glykogen (4 mg/Ansatz), Harnstoff (2 mg/Ansatz), Harnsäure (0,2 mg/Ansatz), Kreatinin (0,2 mg/Ansatz) oder Hippursäure (2 mg/Ansatz) ausgeführt, traten keine Verluste von Formaldehyd auf.

## Teil II.

### Bestimmung des Glykokolls im Beisein anderer Aminosäuren.

Aus den bisher beschriebenen Versuchen geht hervor, dass die Bestimmungsmethode Alexander's nur auf Lösungen angewendet werden darf, die keine freien Aminosäuren enthalten. Das bedeutet, dass sie für biologische Flüssigkeiten kaum, für Proteinhydrolysate gar nicht brauchbar ist. Um eine Bestimmung des Glykokolls auch in solchen Lösungen zu ermöglichen, wurde versucht, den störenden Einfluss der Aminosäuren auszuschalten, ohne die von MacFadyen (l. c.) beschriebene spezifische Ninhydrin- und Chromotropsäurereaktion zu verlassen. Alle Massnahmen und Versuchsanordnungen, die dafür geeignet schienen, wurden ausschliesslich an den künstlichen Aminosäurelösungen der Tabelle 2 geprüft, da deren Glykokollgehalt keinem Zweifel unterlag.

#### 1. Verbesserung der Reaktionsbedingungen.

Zum Vergleich mit dem folgenden sei zuerst das Vorgehen Alexander's kurz beschrieben:  $5 \text{ cm}^3$  der Analyse, enthaltend 1— $100\gamma$  Glykokoll, werden mit  $2 \text{ cm}^3$  Phosphatpuffer ( $p_H = 5,5$ ) und  $1 \text{ cm}^3$  1-proz. Ninhydrinlösung (10 mg) aus einem  $50 \text{ cm}^3$  Rundkölbchen mit absteigendem Kübler in ein graduiertes Reagensglas destilliert, bis sich nur noch  $1 \text{ cm}^3$  Flüssigkeit im Kölbchen befindet. Es wird gekühlt, die Apparatur geöffnet und  $2 \text{ cm}^3$  Wasser hineingegeben, worauf endgültige Destillation bis zur Trockne folgt. Das Destillat wird auf  $10 \text{ cm}^3$  aufgefüllt,  $5 \text{ cm}^3$  davon werden unter Kühlung mit  $4 \text{ cm}^3$  konz. Schwefelsäure ( $D = 1,84$ ) gemischt (ergibt 8,3-m.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). Zu dieser

Lösung werden  $0,1 \text{ cm}^3$  5-proz. Chromotropsäurelösung ( $0,55 \text{ mg/cm}^3$  Reaktionsflüssigkeit) gegeben. Die Lösung wird sodann 30 Minuten im siedenden Wasserbad gehalten und die Extinktion des entstandenen Farbstoffes mit Filter 565 oder 540 gemessen.

Es musste auffallen, dass nur 10 mg Ninhydrin pro Ansatz verwendet wurden, während es sonst für quantitative Zwecke üblich ist, das Ninhydrin in grossem Überschuss zuzugeben — siehe z. B. *Van Slyke* und Mitarbeiter<sup>1)</sup>. Versuche mit 20, 30, 50, 70 und 100 mg Ninhydrin pro Ansatz ergaben bei Anwendung auf die Lösungen der Tabelle 2 eine Verbesserung der Formaldehydausbeute bis zu 50%. 70 und 100 mg lieferten nicht mehr destillierbaren Formaldehyd als 50 mg. Für die weiteren Versuche wurden daher 50 mg Ninhydrin pro Ansatz verwendet. Wie *MacFadyen* (l. c.) in seinen Untersuchungen überzeugend nachweisen konnte, darf die Konzentration der Schwefelsäure in *Eegriewe's* Reaktion nicht tiefer sein als 9-m. Wird die Lösung 30 Minuten bei 100° gehalten und übersteigt die Formaldehydkonzentration nicht  $1,7 \gamma$  pro  $\text{cm}^3$ , müssen mindestens 1,5 mg Chromotropsäure im  $\text{cm}^3$  enthalten sein, wenn optimale Färbung erzielt werden soll. In den folgenden Versuchen wurde deshalb mit 9,3-m. Schwefelsäure und 2 mg Chromotropsäure pro  $\text{cm}^3$  gearbeitet. Auf die Reinheit der Schwefelsäure ist besonderer Wert zu legen: wird Chromotropsäure zugegeben, darf sich keine Gelbfärbung bilden, die nicht von der geringen Eigenfarbe der Chromotropsäure herrührt. Tritt eine zusätzliche Farbvertiefung auf, so ist die Schwefelsäure verunreinigt und die Analysen geben zu niedrige Formaldehydwerte. Die Verunreinigung kann durch Destillation entfernt werden.

## 2. Empfindlichkeit.

Aus den Eichkurven der Figur 1 ist zu erkennen, dass die Glykokollbestimmung nach *Alexander* ganz unmöglich wird, sobald die Konzentration der begleitenden Aminosäuren hoch ist. Im künstlichen Caseinhydrolysat und Blutfiltrat hört oberhalb einer Konzentration von 40 bzw. 80 γ Glykokoll wegen des dann hohen Gehaltes an anderen Aminosäuren die bis dahin regelmässige Steigung der Eichkurven auf; sie beginnen der Abszisse parallel zu laufen. Es lag nahe, den gefährlichen Bereich zu vermeiden und die Messungen nur noch zwischen 1 und 40 γ Glykokoll vorzunehmen. Allerdings musste dafür die Empfindlichkeit der Methode erhöht werden. Destillierte man den Formaldehyd mit der Hälfte der bisherigen Flüssigkeitsmenge über und verwendete für *Eegriewe's* Reaktion das ganze Destillat, statt die Hälfte davon zu verwerfen, war eine Verdoppelung der Empfindlichkeit zu erwarten. Entsprechende Analysen von  $5 \text{ cm}^3$  Volumen, die 1—40 γ Glykokoll in  $4 \text{ cm}^3$  und daneben 50 mg Ninhydrin in  $1 \text{ cm}^3$  Phosphatpuffer enthielten, ergaben denn auch die gleichen Extinktionswerte wie 2—80 γ Glykokoll nach *Alexander* gemessen. Für *Eegriewe's* Reaktion wurde dabei das ganze Destillat verwendet. Bei diesem Vorgehen schwankten die Werte für Parallelbestimmungen jedoch mehr als vorher. Das lag vor allem daran, dass für die erschöpfende Destillation von  $5 \text{ cm}^3$  der tote Raum der Destillationsapparate mit  $50 \text{ cm}^3$ -Kölbchen (ca.  $88 \text{ cm}^3$ ) zu gross war. Schon bei der Destillation von  $10 \text{ cm}^3$  waren in dieser Hinsicht Schwierigkeiten aufgetreten, so dass *Alexander* vorschrieb, die an den Wandungen der Kölbchen kondensierte Flüssigkeit zu allerletzt noch mit freier Flamme ins Destillat zu treiben. Für geringe Flüssigkeitsmengen erwies es sich aber als vorteilhafter, kleinere Kölbchen und Destillationsaufsätze mit weniger grossem totem Raum (ca.  $25 \text{ cm}^3$ ), zu verwenden. Um die Kondensation möglichst zu vermeiden, wurden sie tief in ein heißes Glycerinbad eingetaucht. Das heiße Bad hatte noch einen weiteren Vorteil; die Temperatur konnte nicht übermäßig steigen, wenn das Kolbeninnere trocken geworden war. Destillationsapparate der abgebildeten Form haben sich bewährt, sie sind in Anlehnung an das von *Stotz* (l. c.) gegebene Prinzip gebaut.

Wie die Figur zeigt, wurden die Kölbchen fast bis zum oberen Rand des Schliffes in das Glycerinbad eingetaucht. Der Auftrieb presste sie dabei fest an den Schlipfaufschliff, so dass sich eine besondere Befestigung erübrigte. Vor der Destillation wurde das Bad

<sup>1)</sup> D. D. *Van Slyke*, R. T. *Dillon*, D. A. *MacFadyen* und P. *Hamilton*, J. Biol. Chem. 141, 627 (1941).

auf etwa  $140^{\circ}$  aufgeheizt, dann das kalte Kölbchen hineingesenkt und die Badtemperatur während des Destillierens auf  $140^{\circ}$  gehalten. Die auf diese Art recht gleichmässige Destillationsdauer betrug ca. 5 Minuten. Das Destillat wurde ohne weitere Vorsichtsmassnahmen in gewöhnlichen Reagensgläsern aufgefangen. Mit Verlust von Formaldehyd ist trotz des offenen Systems nicht zu rechnen, da Formaldehyd aus verdünnter wässriger Lösung bei Zimmertemperatur kaum flüchtig ist; vergleiche *Boyd* und *Logan*<sup>1)</sup>. Es wurde nachgeprüft, ob es wirklich nötig ist, die Destillation gegen Ende zu unterbrechen und mit neuem Wasser zu wiederholen, wenn man den gesamten Formaldehyd erhalten will. Wurde ohne Unterbrechung destilliert und das Destillat fraktioniert aufgefangen, so konnten im vorletzten Kubikzentimeter desselben nur noch wenig, im letzten nur gelegentlich Spuren von Formaldehyd (über den Leerwert hinaus) nachgewiesen werden.

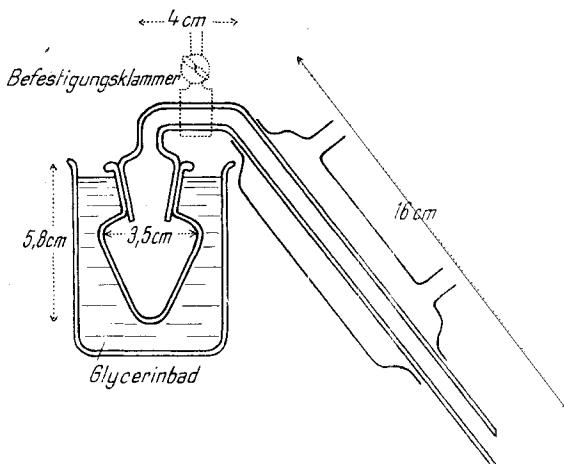


Fig. 3.

Zugabe von Wasser in das nun trockene Kölbchen und nochmalige Destillation ergab keinen Formaldehyd mehr. Es wurde daher auf diese Operation verzichtet. Wenn man insgesamt 5 cm<sup>3</sup> ohne Unterbrechung destillierte, betrug das Destillat 4,85 bis 4,98 cm<sup>3</sup>. Die fehlenden Restbeträge von 0,02 bis 0,15 cm<sup>3</sup> wurden vernachlässigt, weil sie immer wiederkehrten, wenig schwankten und keinen Formaldehyd mehr erhalten konnten.

### 3. Ausschaltung der störenden Aminosäuren.

Durch die bisher beschriebenen Änderungen der Methodik gelang es zwar im künstlichen Leberhydrolysat, das eingesetzte Glykokoll vollständig wiederzufinden, im künstlichen Blutfiltrat betrug der Fehler bei einer Bestimmung von 40 γ Glykokoll aber immer noch 15% (vorher 30%), im künstlichen Caseinhydrolysat 32% (vorher 60%). Es war also unumgänglich, die Bindung des Formaldehyds an die Aminosäuren noch auf andere Weise zu verhindern. Zuerst wurde versucht, die Bindung durch das pH zu beeinflussen. Anstatt mit Phosphatpuffer von pH 5,5 wurde mit Citratpuffer (*Sorensen*) bei pH 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 und Phosphatpuffer (*Sorensen*) bei 6,0 und 7,0 destilliert. Es konnte bei keinem dieser pH-Werte eine Vermehrung des destillierbaren Formaldehyds gegenüber pH 5,5 beobachtet werden. In den Versuchen bei pH 1,0 zeigte sich eine Verminderung um 8%. Ansätze mit 2 cm<sup>3</sup> Essigsäure in 5 cm<sup>3</sup> (pH 1,52, Glaselektrode) schienen zuerst erfolgversprechend, doch stellte sich bald heraus, dass der verwendete Eisessig Formaldehyd enthielt. Selbst Eisessig, der über Chromsäure stabilisiert war<sup>2)</sup>, enthielt durch-

<sup>1)</sup> *M.J. Boyd* und *M.A. Logan*, J. biol. Chem. **160**, 571 (1945).

<sup>2)</sup> Hergestellt von der Firma *Ciba*, Basel.

schnittlich  $1,8\gamma$  Formaldehyd im Kubikzentimeter, und es gelang nicht, ihn ganz zu entfernen. Dass es sich wirklich um Formaldehyd handelte, konnte durch Messung des Absorptionsspektrums der Chromotropsäureverbindung sichergestellt werden. Bei der Destillation mit Ninhydrin vermehrte sich dieser Formaldehyd teilweise um 100%. Die Vermehrung war unregelmässig und verfälschte die für Glykokoll erhaltenen Werte.

Es wurde auch daran gedacht, die andern Aminosäuren vorher mit im Überschuss zugesetztem Formaldehyd abzusättigen, den nicht gebundenen dann abzudampfen und endlich Ninhydrin zuzugeben, um den Formaldehyd aus Glykokoll ungestört zu entwickeln. Bei  $p_H = 2,0, 4,0, 6,0, 7,0$  und  $8,0$ , ist das nicht gelungen — wohl deshalb, weil auch das Glykokoll mit dem Formaldehyd Verbindungen einging.

Gemäss einer Angabe von *Jolles*<sup>1)</sup> sollte Glykokoll in schwefelsaurer Lösung von Kaliumpermanganat nicht angegriffen werden. Es wurde versucht, die störenden Aminosäuren zu oxydieren, ohne dabei das Glykokoll in Mitleidenschaft zu ziehen. Das war nicht möglich, denn bei Permanganatkonzentrationen, die ausreichten, die störenden Aminosäuren zu oxydieren, wurde auch ein Teil des Glykokolls zerstört.

Da mit den erwähnten und noch einigen anderen Massnahmen die Bindung des Formaldehyds nicht verhindert werden konnte, sollten nun die störenden Aminosäuren vor der Bestimmung beseitigt werden. Allerdings war das nur dann von Nutzen, wenn das Glykokoll nicht auch mit entfernt wurde. Fällungen in konzentrierter Lösung, auch kombinierte, mit Wolframsäure, Pikrinsäure, Quecksilberacetat und ähnlichen Mitteln führten nicht zum Ziel.

#### 4. Adsorption der störenden Aminosäuren.

Für die Aufteilung von Aminosäuregemischen in die einzelnen Komponenten ist neuerdings die Chromatographie in wässriger Lösung mit Erfolg herangezogen worden. Das Verfahren beruht auf den teilweise recht grossen Unterschieden in den Adsorptionsaffinitäten verschiedener Aminosäuremoleküle zum gleichen Adsorbens — z. B. Aktivkohle — oder auch auf der elektrolytischen Dissoziation der sauren und basischen Aminosäuren, die eine Abtrennung derselben durch Austauschadsorption an Kation- oder Anionenaustauschern wie Aluminiumoxyd oder Kunstarzen ermöglicht. Nach *Schramm* und *Primosigh*<sup>2)</sup> werden z. B. die aliphatischen Aminosäuren unter bestimmten Bedingungen an Aktivkohle nicht adsorbiert, während die aromatischen fest haften bleiben und nur durch die Elution mit einer geeigneten Lösung wieder von der Kohle verdrängt und frei erhalten werden können. Eine feinere Differenzierung der so entstandenen Gruppen gelingt noch bis zu einem gewissen Grade durch Änderung des Adsorptionsmediums (Zusatz organischer Lösungsmittel), vor allem aber mit Hilfe weiterer Adsorptionen an anderen Adsorbentien. So trennten *Turba* und Mitarbeiter zuerst die basischen Aminosäuren von den sauren und neutralen durch ihre Adsorption an Filtrol-Neutrol, später gaben sie ein durchgegliedertes Schema zur systematischen Trennung vieler Aminosäuren mittels wiederholter Adsorption unter verschiedenen Bedingungen<sup>3)</sup>. *Wieland*<sup>4)</sup> zeigte, dass es gelingt, die basischen Aminosäuren an Aluminiumoxyd festzuhalten, die sauren am gleichen Adsorbens nach dessen Behandlung mit Salzsäure zu adsorbieren. Das Aluminiumoxyd wandelt dabei seinen Charakter und wird vom Kation- zum Anion-austauscher. Diese Hinweise mögen genügen; eine Zusammenfassung der Arbeiten auf diesem Gebiet findet sich bei *Tiselius*<sup>5)</sup>, dessen grundlegenden Untersuchungen wir auch eine elegante Methode<sup>6)</sup> zur mengenmässigen Bestimmung der bei der Chromatographie adsorbierten Aminosäuren verdanken.

<sup>1)</sup> *A. Jolles*, Z. physiol. Ch. **31**, 389 (1900).

<sup>2)</sup> *G. Schramm* und *J. Primosigh*, B. **76**, 373 (1943).

<sup>3)</sup> *F. Turba* und *M. Richter*, B. **74**, 1829 (1941); *F. Turba*, *M. Richter* und *F. Kuchar*, Naturwiss. **31**, 508 (1943).

<sup>4)</sup> *Th. Wieland*, Z. physiol. Ch. **273**, 24 (1942).

<sup>5)</sup> *A. Tiselius*, Adv. Protein Chem. **3**, 67 (1947).

<sup>6)</sup> *A. Tiselius* und *S. Claesson*, Ark. Kemi, Mineral. Geol. **15 B**, No. 18 (1942).

Die Anwendung von Adsorptionsmethoden liess hoffen, auch im vorliegenden Fall das Glykokoll vor seiner Bestimmung von den störenden Aminosäuren abtrennen zu können. Die quantitative Adsorption von Glykokoll ist nach *Schramm* und *Primosigh* (l. c.) in 10-proz. Formaldehydlösung an Aluminiumoxyd möglich, nach *Turba* und Mitarbeitern (l. c.) ausserdem in 50-proz. alkoholischer Lösung an Filtrol-Neutrol. Sowohl in formolhaltiger, wie in alkoholischer Lösung wird die Dissoziation der Aminogruppe des Glykokolls aufgehoben, so dass es sauren Charakter annimmt und an den erwähnten Kationtauschern adsorbierbar wird. Nach der Elution wäre die Bestimmung dann im Adsorbat auszuführen. Gerade Formaldehyd in die Bestimmungslösung hineinzubringen, schien aber hier nicht ratsam. Auch Versuche in alkoholischer Lösung gaben keine guten Resultate, weil kein Filtrol-Neutrol zur Verfügung stand und andere Adsorbentien ähnlichen Charakters verwendet werden mussten. Ausserdem bedeutete die Elution des Glykokolls einen zeitraubenden neuen Arbeitsgang mit eigenen Fehlerquellen, der sich auf Serienbestimmungen ungünstig auswirkte. Nach einigen Vorversuchen dieser Art wurde daher ein anderer Weg eingeschlagen. Messungen von *Tiselius*<sup>6)</sup> zeigten, dass Aktivkohle Glykokoll nicht adsorbiert. Dagegen wird ein gewisser Prozentsatz aller anderen Aminosäuren festgehalten, ein besonders hoher bei den aromatischen. Man musste also versuchen, die störenden Aminosäuren durch Kohleadsorption zu entfernen und das Glykokoll im Eluat zu bestimmen. *Tiselius*<sup>1)</sup> vergiftete die Kohle vor der Adsorption mit Cyanid, um eine Oxydation der Aminosäuren, wie sie *Warburg* und *Negelein*<sup>2)</sup> beschrieben, zu verhindern. Das war hier nicht durchführbar, weil das Cyanid die Glykokollbestimmung erheblich störte und sich schwer ganz entfernen liess. Statt der sonst üblichen Chromatographie durch eine Säule von Adsorbens wurde daher nur noch eine gewöhnliche Kohleadsorption in der Lösung durchgeführt. Das Adsorptionsgleichgewicht stellte sich schon nach kurzem Schütteln her; saugte man dann schnell ab, konnte nennenswerte Oxydation auch nicht stattfinden. Zuerst wurden die günstigsten Bedingungen für eine solche Adsorption ausfindig gemacht. Das pH hatte wenig Einfluss, wurde aber zwischen 5,0 und 7,0 gehalten. Eine grosse Rolle spielte dagegen das Konzentrationsverhältnis der Kohle zu den Aminosäuren. Adsorptionen mit hoher Kohlekonzentration in ganz verdünnter Lösung zeigten die besten Ergebnisse. Die für die nachfolgende Bestimmung des Glykokolls nötige Verdünnung der Ausgangslösung wurde deshalb auch zum Adsorbieren gebraucht. Als günstig erwies sich z. B. folgendes Vorgehen: 10 cm<sup>3</sup> endgültig verdünntes künstliches Caseinhydrolysat (Tab. 2) mit 5,64 mg Aminosäuren und 100 γ Glykokoll wurden mit 1 g Kohle 1 Minute geschüttelt, schnell abgenutscht und das Glykokoll wie üblich bestimmt. Dabei musste der Feuchtigkeitsgehalt der Kohle (14%) für die Berechnung berücksichtigt werden. Adsorptionen bei 0° zeigten keinen Vorteil gegenüber solchen bei Zimmertemperatur. Hohe Neutralsalzkonzentrationen, wie sie z. B. nach saurer Hydrolyse und Neutralisation mit starker Lauge auftreten, beeinflussen die Adsorption der Aminosäuren ungünstig. Die Neutralsalzkonzentration sollte unter 2% gehalten werden. Wichtig ist, dass zwischen verschiedenen Kohlesorten grosse Unterschiede im Adsorptionsverhalten bestehen. Durch Bestimmung des Glykokolls in reiner Lösung vor und nach der Adsorption wurde festgestellt, wieviel Glykokoll adsorbiert (evtl. oxydiert) wurde (Spalte a der Tabelle 3); durch Adsorption im Caseinhydrolysat der Tabelle 2 und nachheriger Bestimmung des Glykokolls konnte von der Verbesserung der Glykokollwerte auf die Adsorption der störenden Aminosäuren geschlossen werden (Spalte b der Tabelle 3).

Die Aktivkohle von *Merck* hat sich für die Versuche als die günstigste erwiesen, denn sie adsorbierte die störenden Aminosäuren besonders gut. Allerdings hielt sie auch 9% des Glykokolls zurück. Da die Herabsetzung der Glykokollwerte durch die Adsorption aber in reiner Lösung und im Caseinhydrolysat gleich und der Gesamtmenge Glykokoll genau proportional war, wurde an der *Merck*-Kohle festgehalten. Aminostick-

<sup>1)</sup> *A. Tiselius*, Ark. Kemi, Mineral. Geol. **15 B**, No. 6 (1941).

<sup>2)</sup> *O. Warburg* und *E. Negelein*, Bioch. Z. **113**, 257 (1921).

stoffbestimmungen nach *Van Slyke*<sup>1)</sup> vor und nach einmaliger Adsorption mit dieser Kohle ergaben, dass 65% der Aminosäuren des Caseinhydrolysates (Tabelle 2) adsorbiert wurden. Dabei blieben insbesondere die störenden aromatischen Aminosäuren in solcher Menge an der Kohle haften, dass die Glykokollbestimmung in der behandelten Lösung nun ohne Verluste vor sich gehen konnte. Als Grundlage für die Messungen diente die Eichkurve der in gleicher Weise mit Kohle behandelten reinen Glykokoll-Lösung: Sie ist eine Gerade von der Formel  $5,6 \cdot E - 5,5 = \gamma$  Glykokoll.

Tabelle 3.

Adsorption mit 1 g	von 40γ Glykokoll wiedergefunden	
	a) in reiner Glykokollösung	b) in Caseinhydrolysat
Carbo medicinalis <i>Merck</i> . . . . .	90%	87%
Blutkohle <i>Kahlbaum</i> . . . . .	98%	67%
Carboraffin * . . . . .	82%	69%
Desorex * . . . . .	18%	55%
Holzkohle <i>Schering</i> . . . . .	100%	81%
Medicinalkohle <i>Merck</i> mit 1% KCN vorbehandelt . . . . .	62%	65%
Aktivkohle <i>Merck</i> . . . . .	91%	91%
Ohne Adsorbens . . . . .	—	68,5%

\* Bezogen bei der Firma *M.F.Christen*, Küschnacht-Zürich.

Die Tabelle 4 lässt erkennen, dass die Glykokollwerte für alle mit Adsorbens behandelten aminosäurehaltigen Lösungen innerhalb der Fehlerbreite mit denen für gleich behandeltes reines Glykokoll übereinstimmen. In der Kohleadsorption war also das Mittel gefunden, die störenden Aminosäuren so weit aus der Lösung zu entfernen, dass eine quantitative Glykokollbestimmung möglich wurde. Der günstigste Bereich für die Messung liegt zwischen 10 und 40 γ Glykokoll, der prozentuelle Fehler der Methode nimmt bei steigender Glykokollmenge ab.

Tabelle 4.

γ Glykokoll eingesetzt	γ Glykokoll nach einmal. Adsorption wiedergefunden				mittl. Fehler
	in reiner Lösung	im Blutfiltrat	im Leberhydrolysat	im Caseinhydrolysat	
10	9,5; 11,75	8,25; 9,0	10; 11,5	11,25; 9,75	± 0,681
20	18,25; 21,5	20; 19,9; 19,25; 19	22	20,75; 18; 22	± 0,775
30	32; 30	29,25; 30,1	30,5	29,5; 30,5	± 0,661
40	39; 39,2; 42; 41,8	38,8; 39,75	40,9; 42	39,75; 38,5; 39,75	± 0,677

<sup>1)</sup> D. D. Van Slyke, B. 43, 3170 (1910).

### 5. Durchführung der Bestimmung.

Erforderliche Reagentien:

5-proz. Ninhydrin in Phosphatpuffer; 5 g Ninhydrin, 3,5 g  $K_3PO_4$  und 20 g  $KH_2PO_4$  werden mit Wasser auf 100 cm<sup>3</sup> aufgefüllt.

7-proz. wässrige Chromotropsäurelösung, am besten täglich frisch zu bereiten. Reine konz. Schwefelsäure ( $D = 1,84$ ).

1. Vorbereitung: Eiweißhaltige Flüssigkeiten werden zuerst nach *Folin* und *Wu*<sup>1)</sup> enteiweißt. Für Blut empfiehlt sich, dabei im Verhältnis 1:8 (statt 1:10) zu verdünnen. Harn ist 1:10 mit Wasser zu verdünnen. Wird das Glykokoll im Proteinhydrolysat bestimmt und für die Hydrolyse Schwefelsäure benutzt, muss dieselbe durch Barium hydroxyd entfernt werden. Nach *Abderhalden* und *Neumann* (l. c.) adsorbiert das gebildete Bariumsulfat aber einen Teil des Glykokolls. Der von der Lösung abgetrennte Bariumsulfatniederschlag wird daher dreimal mit vorher angesäuertem Wasser ausgekocht. Die so erhaltenen wässrigen Auszüge sind vor der endgültigen Verdünnung mit der Hydrolysatlösung zu vereinigen.

2. Adsorption: Z. B. 10 cm<sup>3</sup> der so vorbehandelten Lösung mit einem pH von ca. 6,5, enthaltend 25—100 γ Glykokoll und nicht mehr als 2% Neutralsalze, werden in einem *Erlenmeyer*-Kölbchen mit 1 g Aktivkohle *Merck* versetzt. Nachdem durch Umschwenken die Luft aus der Kohle verdrängt ist, wird das Kölbchen verschlossen und 1 Minute kräftig geschüttelt. Dann wird mit einer kleinen Nutsche, oder einem Trichter, in dessen Verengerung ein Wattebausch eingepresst ist, schnell von der Kohle abgesaugt. Etwa 2 cm<sup>3</sup> der Lösung bleiben in der Kohle zurück.

3. Bestimmung des Glykokolls: 4 cm<sup>3</sup> des klaren Filtrats werden in die Kölbchen (Figur 3) eingefüllt. Dazu kommt 1 cm<sup>3</sup> der Ninhydrin-Pufferlösung, die vor Gebrauch kurz erhitzt und wieder abgekühlt werden muss, da das Ninhydrin bei Zimmertemperatur auskristallisiert. Anstatt größerer Siedesteine hat sich Bimssteinpulver bewährt. Die gefüllten Kölbchen werden nun an die Schlitte angedreht und in das schon vorgeheizte (140°) Glycerinbad eingetaucht. Die Destillation nimmt etwa 5 Minuten in Anspruch; auf gute Kühlung ist besonders zu achten. Als Vorlage dienen gewöhnliche Reagensgläser, die mit einer Asbestplatte vor der Hitze des Brenners zu schützen sind. Ist das Kolbeninnere trocken geworden, wird noch kurze Zeit gewartet, dann der letzte Tropfen des Destillats mit dem Rand des Reagensglases abgestreift und aufgefangen. Das Destillat wird im gleichen Reagensglas mit 5 cm<sup>3</sup> konz. Schwefelsäure unterschichtet. Dafür ist eine Bürette zu verwenden. Es folgt Mischung der Schichten mit einem Glasstab, dessen Ende breitgedrückt ist; dabei wird unter fliessendem Wasser gekühlt, bis die Lösung wieder Zimmertemperatur angenommen hat. Nun sind 5 Tropfen (0,2 cm<sup>3</sup>) der Chromotropsäurelösung zuzugeben, worauf erneut gemischt wird. Endlich werden die Reagensgläser 30 Minuten in ein siedendes Wasserbad gestellt, worin sie nicht dem Licht ausgesetzt sein sollen. Sie oben zu verschliessen ist unnötig, wenn dafür gesorgt wird, dass kein Kondenswasser hineintropfen kann. Nach raschem Abkühlen wird die Extinktion der Lösung gegen ein Gemisch von 4 cm<sup>3</sup> Wasser, 5 cm<sup>3</sup> konz. Schwefelsäure und 5 Tropfen Chromotropsäurelösung gemessen, welches ebenfalls 30 Minuten im Wasserbad gehalten wurde. Man nimmt die Messung bei 570 mμ und 1 cm Schichtdicke vor. Die Berechnung der Glykokollwerte geschieht an Hand einer Eichkurve von reinem Glykokoll, dessen Lösung genau so adsorbiert und behandelt wird wie die Analyse.

Bemerkungen: 1. Bei der Destillation von 4 cm<sup>3</sup> Wasser mit 1 cm<sup>3</sup> der Ninhydrin-Pufferlösung, tritt ein geringer Leerwert auf, wenn man die Methode in der beschriebenen Weise ausführt. Da die Berechnung des Glykokolls aber nach einer Eichkurve geschieht, in der dieser Leerwert sowieso enthalten ist, braucht die Extinktion nicht gegen den Leerwert gemessen zu werden. 2. Steht keine *Merck*-Aktivkohle zur Verfügung, kann auch andere aktive Kohle verwendet werden. Deren Eigenschaften sind vor der Benutzung zu untersuchen (s. o.).

<sup>1)</sup> *O.Folin* und *H.Wu*, *J. Biol. Chem.* **38**, 81 (1919); **41**, 367 (1920).

### 6. Qualitativer Nachweis von Glykokoll.

Manchmal wird es von Nutzen sein, im Reagensglas festzustellen, ob eine Lösung überhaupt Glykokoll enthält oder nicht. Man kann dazu folgendermassen verfahren: Etwa 5 cm<sup>3</sup> der zu prüfenden Lösung (mit mindestens 1 mg Glykokoll darin) werden mit einem Spatel voll Aktivkohle kurz geschüttelt. Es wird von der Kohle abfiltriert und die Lösung mit 2–3 Tropfen konz. Schwefelsäure versetzt. Dazu fügt man 1 cm<sup>3</sup> 5-proz. wässrige Ninhydrinlösung und kocht etwa 1 Minute. Es wird gekühlt und die Lösung mit dem gleichen Volumen konz. Schwefelsäure unterschichtet. Dann wird unter fliessendem Wasser gemischt (Glasstab mit breitgedrücktem Ende). Nach Zugabe von einigen Krystallen Chromotropsäure wird wieder aufgekocht (Vorsicht!). Entstehung einer violetten Farbe zeigt das Vorhandensein von Glykokoll an. Die Probe ist in dieser Form nicht ausführbar, wenn die Lösung Substanzen enthält, die von der Schwefelsäure verkohlt werden. In diesem Falle destilliert man nach Zufügen der Ninhydrinlösung mit einem Kniestock in ein zweites Reagensglas über und nimmt die Chromotropsäurereaktion im Destillat vor.

Herrn P.-D. Dr. O. Wiss danke ich für Anregung und Förderung bei dieser Arbeit.

### Zusammenfassung.

Es wird nachgewiesen, dass die Bestimmungsmethode von Alexander, Landwehr und Seligman (l. c.) zu niedrige Glykokollwerte liefert, wenn sie in Lösungen ausgeführt wird, die freie Aminosäuren enthalten.

Es wird eine Bestimmungsmethode für das Glykokoll beschrieben, die auch auf aminosäurehaltige Lösungen anwendbar ist.

Physiologisch-chemisches Institut der Universität Basel.

## **34. Der Einfluss zugeführter natürlicher Aminosäuren auf den Alanin- und Brenztraubensäuregehalt des Blutes<sup>1)</sup>**

von F. Hatz.

(20. XII. 48.)

*Hier*<sup>2)</sup> untersuchte vor kurzem beim Hunde, wie 11 verschiedene Aminosäuren den Gehalt von 12 einzelnen freien Aminosäuren im Blute beeinflussen. Der Gehalt der jeweils enteral verabreichten Aminosäure steigt im Blut an. Leucin, Isoleucin und Methionin bewirken, wenn ihr Gehalt im Blut selbst hoch ist, eine Senkung des Gehaltes einiger anderer Aminosäuren. Der Tyrosingehalt des Blutes

<sup>1)</sup> Teilweise vorgetragen an der 33. Tagung des Schweizerischen Vereins der Physiologen und Pharmakologen (3. Juli 1948 in Bern).

<sup>2)</sup> S. W. Hier, J. Biol. Chem. 171, 813 (1947).