

Einige Beobachtungen und Versuche mit Triketohydrindenhydrat (Ruhemann).

Von

Emil Abderhalden und Hubert Schmidt.

(Aus dem physiologischen Institute der Universität Halle a. S.)

(Der Redaktion zugegangen am 12. April 1913.)

Das Triketohydrindenhydrat, dessen Entdeckung wir Ruhemann verdanken, gibt mit allen Verbindungen, die in α -Stellung zum Carboxyl eine Aminogruppe tragen, beim Kochen der wässerigen Lösung eine mehr oder weniger intensive Blaufärbung. Diese Eigenschaft macht das Triketohydrindenhydrat in hervorragendem Maße geeignet, um Verbindungen der genannten Art nachzuspüren.¹⁾ Die Empfindlichkeit der Reaktion hängt ganz wesentlich von der Konzentration des Triketohydrindenhydrats und des mit diesem reagierenden Produktes ab. So kann man z. B. dann, wenn in solchen Verdünnungen gearbeitet wird, daß keine Färbung sich zeigt, durch Eindampfen des Gemisches noch eine Farbreaktion erhalten. Dieser Umstand ist besonders wichtig, weil bei der Anwendung des Triketohydrindenhydrats zum Nachweis von dialysierbaren, mit dem genannten Reagens unter Farbbildung reagierenden Stoffen ganz besonders sorgfältig darauf geachtet werden muß, daß bei vergleichenden Versuchen genau gleich stark eingedampft wird. Der eine von uns hat für sein Dialysierverfahren Reagenzgläser mit einer Marke herstellen lassen, damit man direkt ablesen kann, ob man bei allen Versuchen gleich stark gekocht hat. Gewiß sind Fehlreaktionen z. B. bei der Serodiagnostik der Schwangerschaft durch verschieden

¹⁾ Emil Abderhalden und Hubert Schmidt, Über die Verwendung von Triketohydrindenhydrat zum Nachweis von Eiweißstoffen und deren Abbaustufen. Diese Zeitschrift, Bd. 72, S. 37, 1911.

starkes Einkochen hervorgerufen worden. Es sei deshalb an dieser Stelle noch besonders auf diesen Punkt hingewiesen.

Um die Verwertbarkeit des Triketohydrindenhydrats zum Nachweis von dialysierbaren, die Biuretreaktion nicht gebenden Aminosäurederivaten und Aminosäuren selbst zu demonstrieren, haben wir in verschiedenen Körperflüssigkeiten auf solche Verbindungen gefahndet.

Die einzelnen Versuche sind alle in der gleichen Art durchgeführt worden. Die Flüssigkeit wurde in eine Dialysierhülle gebracht und stets gegen destilliertes Wasser bei Zimmertemperatur dialysiert. Der Versuch wurde nach 16—24 Stunden abgebrochen. Zur Verhinderung von Fäulnis und von Verdunstung wurden Hülseninhalt und Außenflüssigkeit mit Toluol überdeckt. Von dem auf ein bestimmtes Volumen eingedampften Dialysate wurden genau 10 ccm mit 0,2 ccm einer 1%igen wässrigen Triketohydrindenhydratlösung — auch Ninhydrin genannt — genau eine Minute gekocht.

Es zeigte sich, daß frische Milch, Harn, Speichel, Blutplasma und -serum, Lymphe, Schweiß, Inhalt einer Cysticerkencyste, frisches Eiereiweiß, frisches Fleisch, gekochtes Eiereiweiß, gekochtes Fleisch an das Dialysat Stoffe abgeben, die keine Biuretreaktion zeigen, wohl aber mit Triketohydrindenhydrat reagieren. Zu bemerken ist noch, daß das frisch dem eben getöteten Tiere entnommene Fleisch und ferner das gekochte Ei im Kochwasser in die Dialysierhülle gegeben wurden, weil wir wissen wollten, ob in diesen Produkten einfachere Verbindungen vorhanden sind, die den Aminosäuren verwandt oder mit diesen identisch sind.

Die Tatsache, daß Schweiß ganz intensiv reagiert, ist praktisch sehr wichtig. Man wird bei der Anwendung des Reagenses vorsichtig darauf achten müssen, daß kein Gegenstand, der nachher mit dem Triketohydrindenhydrat zusammentrifft, mit Schweiß in Berührung kommt. Dreht man z. B. einen Siedestab eine Weile zwischen den Fingern, dann gibt dessen Kochwasser bereits mit Triketohydrindenhydrat eine Farbreaktion.

Bemerkt sei noch, daß Mineralsäuren und die saure Reak-

tion überhaupt die Farbbildung hemmen, bis vernichten. Ferner sind auch Alkalien schädlich.

Einige Beispiele mögen zeigen, wie die erwähnten Versuche im einzelnen durchgeführt worden sind.

Das Eiweiß eines Hühnereies wird in einen Dialysierschlauch gebracht und 22 Stunden bei Zimmertemperatur gegen 300 ccm destilliertes Wasser dialysiert. Das Dialysat wird auf 15 ccm eingedampft. Es gibt keine Biuretreaktion, wohl aber positive Ninhydrinreaktion.

Ein ganzes Hühnerei wird gegen 300 ccm Wasser dialysiert. Dauer des Versuches 24 Stunden. Es wird das Dialysat auf 15 ccm eingengt. Keine Biuretreaktion, positive Ninhydrinreaktion.

900 ccm ganz frische Milch werden 20 St. gegen 1500 ccm destillierten Wasser dialysiert. Das Dialysat wird auf 20 ccm eingengt. Biuretreaktion negativ, Ninhydrinreaktion stark positiv.

70 ccm Speichel 22 Stunden gegen 300 ccm destilliertes Wasser dialysiert. Das auf 10 ccm eingengte Dialysat ergibt keine Biuretprobe, wohl aber eine starke Ninhydrinreaktion.

Diese Versuche wurden mehrfach, immer mit dem gleichen Resultate durchgeführt. Schwierigkeiten ergaben sich nur bei der Galle und beim Harn. Bei der Galle störte die Farbe des Dialysates. Man konnte nicht erkennen, ob eine Blaufärbung eingetreten war. Beim Harn machte sich die Reaktion und vor allem der Ammoniakgehalt störend geltend. Man muß vor Anstellung der Probe unbedingt das Ammoniak entfernen. Zu sehr interessanten Resultaten gelangt man, wenn man das Dialysat und den nicht dialysierten Anteil für sich untersucht. Während oft nur das Dialysat reagiert, erhält man ab und zu auch Fälle, bei denen das Dialysat keine Reaktion zeigt, dagegen der nicht dialysierte Teil sich stark färbt. Es handelt sich dann offenbar um schwer dialysable Verbindungen. Genauere Untersuchungen stehen noch aus.

Wir haben weiterhin festgestellt, bis zu welcher Verdünnung man einzelne Aminosäuren mittels der Triketohydrindenhydratreaktion noch erkennen kann. Wir wandten dabei immer 10 ccm der Aminosäurelösung an und gaben dazu 0,2 ccm der 1%igen wässrigen Ninhydrinlösung und kochten genau gleich stark bei allen Proben und immer eine Minute.

Die folgende Tabelle zeigt, bei welcher Verdünnung noch eine Reaktion eintrat. Bei Änderung der Versuchsbedingungen kann die Reaktion noch empfindlicher gemacht werden.

Glykokoll	1 : 65 000
d-Alanin	1 : 26 000
d-Valin	1 : 15 000
l-Leucin	1 : 25 000
d-Glutaminsäure	1 : 22 000
Asparagin	1 : 19 000
dl-Phenylalanin	1 : 26 000
l-Histidin	1 : 79 000
α -Aminobuttersäure	1 : 16 000.

Wir haben die erwähnte Reaktion noch zu anderen Versuchen angewandt. In neuerer Zeit werden sehr oft Eiweißarten zu intravenösen oder subcutanen oder intraperitonealen Injektionen benützt. Es ist nun sehr wichtig, daß bei derartigen Versuchen immer mit genau dem gleichen Material gearbeitet wird. Es können zu leicht Abbaustufen aller Art dem Eiweiß beigemischt sein und eventuell die Erscheinungen, die der Injektion folgen, bewirken. Es können vor allen Dingen auch Differenzen in einzelnen Beobachtungen durch das ungleiche, ja vorläufig nur sehr unexakt definierbare Material bedingt sein. Wir haben zu diesem Zwecke Eiweißstoffe der Dialyse unterworfen und die Außenflüssigkeit mit Ninhydrin geprüft. Erst dann, wenn das Dialysat nicht mehr reagierte, verwendeten wir die Proteine. In der Tat verloren Proteine, die im rohen Zustand Erscheinungen aller Art bewirkt hatten, ihre Giftigkeit ganz, wenn wir sie der Dialyse unterwarfen. Es gilt dies besonders von Eiweißlösungen, die aufbewahrt worden waren, um bei einer Reinjektion ein gleiches Material zur Hand zu haben. Man wird in Zukunft fordern müssen, daß zu Anaphylaxiestudien nur durch Dialyse gereinigte Proteine Verwendung finden dürfen. Besonders interessant erscheint uns die Beobachtung, daß aus Hämoglobin dargestelltes Globin, das sehr giftig erschien, seine

Wirksamkeit einbüßte, als es durch Dialyse gereinigt wurde. Wir werden später auf diese Beobachtungen eingehend zurückkommen.

Eine weitere Anwendungsweise ergibt die folgende Beobachtung. Kiliani¹⁾ hat aus Antiarissaft einen sehr schön krystallisierenden Eiweißkörper isoliert. Dieser gibt interessanterweise mit Triketohydrindenhydrat keine Reaktion. Man kann nun in sehr schöner Weise die Aufspaltung dieses Proteins durch Alkalien und Säuren mittels des Ninhydrins verfolgen. Das erste Auftreten der Reaktion zeigt den Eintritt der Spaltung an. Vielleicht läßt sich der Kilianische Eiweißkörper als ein feines Reagens auf proteolytische Fermente verwenden. Allerdings muß dann die Fermentlösung so verdünnt verwendet werden, daß sie selbst nicht mehr mit Triketohydrindenhydrat reagiert. Vermerkt sei noch, daß auch manche Abbaustufen der Proteine mit Triketohydrindenhydrat nicht reagieren. Wir werden auch die Plasteinbildung von diesen Gesichtspunkten aus studieren. Es ist wohl möglich, daß gar keine Synthese, sondern irgend eine Anhydridbildung — kurz eine Festlegung von Amino- oder Carboxylgruppen vorliegt, so daß dann vielleicht die Reaktion ausbleibt.

Diese Bemerkungen mögen genügen, um zu zeigen, daß das Triketohydrindenhydrat ganz ausgezeichnet dazu geeignet ist, um überall Verbindungen nachzuspüren, die dem Typus der Aminosäuren nahe stehen. Durch das Dialysierverfahren kann man die kolloiden Stoffe ausscheiden und ferner mittels der Biuretreaktion auch die Peptone feststellen, oder aber bei negativem Ausfall der Probe beweisen, daß einfachere Verbindungen als Peptone vorliegen müssen.

¹⁾ H. Kiliani, Über α - und β -Antiarin und über krystallisiertes Eiweiß aus Antiarissaft. Ber. d. Deutsch. chem. Gesellschaft., Jg. 46, S. 667 1913.