

# Über die Verwendung von Triketohydrindenhydrat<sup>1)</sup> zum Nachweis von Eiweißstoffen und deren Abbaustufen.

Von

Emil Abderhalden und Hubert Schmidt.

(Aus dem physiologischen Institute der tierärztlichen Hochschule, Berlin.)

(Der Redaktion zugegangen am 24. März 1911.)

Herr Prof. Ruhemann in Cambridge hatte die große Freundlichkeit, uns das von ihm dargestellte Triketohydrindenhydrat, das, wie er selbst<sup>1)</sup> gefunden hat, mit Eiweißstoffen, Peptonen und Aminosäuren, selbst in großer Verdünnung, Blaufärbung gibt, zum Nachweis von Proteinen und ihren Abbaustufen im Tier- und Pflanzenorganismus zu überlassen. Wir haben zunächst eine große Anzahl verschiedenartiger Verbindungen auf ihr Verhalten gegenüber dem Reagens geprüft, um festzustellen, ob das Reagens für bestimmte Klassen von Verbindungen typisch ist. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die erhaltenen Resultate:

Eiereiweiß +	Oxyprolin — (rot, eosin-
Serumeiweiß +	farben).
Glykokoll +	Tryptophan +
Alanin +	Histidin +, nach einiger Zeit
Valin +	burgunderrot.
Leucin +	Arginin +
Isoleucin +	Lysin +
Asparaginsäure +	Pyrrolidoncarbonsäure —
Glutaminsäure +	Asparagin +
Glutaminsäuremonoäthyl-	Glutamin +
ester +	$\alpha$ -Aminobuttersäure +
Phenylalanin +	$\alpha$ -Amino- $\gamma$ -oxyvalerian-
Tyrosin +	säure +
Serin +	Diaminopropionsäure +
Cystin +	Glukosamin —
Prolin — (Gelbfärbung).	Glukosaminsäure +

<sup>1)</sup> Siegfried Ruhemann, Triketohydrindene Hydrate. Transactions of the Chemical Society. Vol. XCVII. S. 2025, 1910.

Glykocyamin —	Erepton (vollständig abgebautes Fleisch) +
Guanidoisocaprinsäure —	Glycinanhydrid —
Diglyceryl-tyrosinäther +	Alaninanhydrid —
Glycyl-glycin +	Leucinimid —
Glycyl-alanin +	Serinanhydrid —
Glycyl-tyrosin +	Alanyl-glycinanhydrid —
Glycyl-leucin +	Harnsäure —
Glycyl-tryptophan +	Alloxan —
Alanyl-glycin +	Uracil —
Alanyl-alanin +	Alloxantin —
Alanyl-leucin +	Guanidincarbonat — (nach einiger Zeit rötlich)
Alanyl-tyrosin +	Guanin —
Leucyl-glycin +	Allantoin —
Leucyl-alanin +	Sarkosin + (rot)
Diglycyl-glycin +	Hippursäure —
Leucyl-triglycyl-leucin +	Suprarenin —
Leucyl-oktaglycyl-glycin +	Harnstoff —
Leucyl-triglycyl-leucyl-oktaglycyl-glycin +	Ammoniak rotbraun
Albumose aus Seide + (Rotviolett)	Ammoniumcarbonat rot
Pepton aus Seide +	Essigsäures Ammon —
Pepton aus Wolle + (Rotviolett)	Oxalursäures Ammon —
Pepton aus Cheefoo-Seide + (Rötlich)	Hydroxylaminchlorhydrat —
	Homogentisinsäure —

Aus der Zusammenstellung geht klar hervor, daß Eiweißstoffe mit dem Reagens eine intensive Blaufärbung geben. Auch die Peptone zeigen eine deutliche Reaktion. Alle bis jetzt untersuchten Polypeptide gaben gleichfalls Blaufärbung. Das gleiche gilt für die untersuchten  $\alpha$ -Aminosäuren. Auch das Isoserin gab geringe Blaufärbung und ebenso das  $\beta$ -Alanin. Da jedoch die Reaktion bei verschiedenen Präparaten verschieden stark ausfiel, ist die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, daß bei der Empfindlichkeit der Reaktion Verunreinigungen in Betracht kommen. Von den  $\alpha$ -Aminosäuren machen eine Ausnahme das Prolin, Oxyprolin und die Pyrrolidoncarbon-

säure. Diese drei Säuren besitzen keine Amino-, sondern eine Iminogruppe. Bei allen drei Verbindungen gab ihre Lösung nach Zusatz des Reagens keine Blaufärbung. Nach den bisherigen Erfahrungen tritt eine Blaufärbung nur dann auf, wenn neben einer freien Aminogruppe eine freie Carboxylgruppe vorhanden ist. Von beiden Gruppen können die Verbindungen auch mehrere besitzen. Ob im Einzelfalle die Stellung der Aminogruppe zum Carboxyl von Bedeutung ist, bedarf noch einer weiteren Prüfung.

Wie aus der Tabelle weiterhin hervorgeht, geben die Diketopiperazine keine Blaufärbung. Das Triketohydrindenhydrat ist ein vorzügliches Reagens auf die Reinheit der Diketopiperazine. Die geringste Beimengung von Aminosäuren oder Polypeptiden gibt sich an der eintretenden Blaufärbung zu erkennen. Glukosamin gibt keine Färbung, wohl aber die Glukosaminsäure. Die untersuchten Purinbasen, die Harnsäure und das Uracil gaben keine Blaufärbung. Färbungen treten auf mit alkalischen, speziell ammoniakalischen Lösungen. Wir beobachteten in keinem Falle Blaufärbung. Fast in allen Fällen trat sofort eine rotbraune Färbung auf. Ammoniak kann die Farbreaktion stören. Ist solches vorhanden, dann wird es am besten durch Verdampfen der Lösung vertrieben. Erwähnt sei noch, daß die Haut sich mit dem Reagens intensiv blau färbt.

Wir benützten zu unseren Versuchen eine Lösung von 0.1 g des Reagens in 30 ccm, und in einzelnen Fällen in 10 ccm Wasser. Von dieser Lösung gaben wir zu der zu prüfenden Flüssigkeit (jeweils ca. 1 ccm) 1–2 Tropfen. Dann erhitzen wir kurze Zeit bis zum Sieden. Beim Abkühlen zeigt sich dann beim positiven Ausfall der Reaktion eine mehr oder weniger intensive Blaufärbung. Von großer Bedeutung für den Ausfall der Reaktion ist die Reaktion der zu prüfenden Lösung. Sie muß neutral sein. Ist die Reaktion schwach sauer, dann erhält man ebenfalls Blaufärbung, jedoch mit einem Stich ins Rötliche. Ist die Reaktion stärker sauer, dann tritt Rotviolett bis Rotfärbung ein. Schließlich kann die Färbung auch ganz ausbleiben. Sehr störend ist alkalische Reaktion. Sie verhindert das Zustandekommen der Blaufärbung. Wir haben

bei all unseren Versuchen streng darauf geachtet, daß die Reaktion neutral war.

Eine größere Reihe von Untersuchungen haben wir angestellt, um zu prüfen, welche Mengen von Aminosäuren noch eine deutliche Reaktion geben. Ferner prüften wir den Einfluß von Neutralsalzen. Es ergab sich, daß diese die Reaktion nicht stören, sondern eher begünstigen. Glykokoll ergab bei Anwendung des Reagenses in einer Verdünnung von 0,1 g in 30 ccm Wasser, bei Verwendung von 0,1 ccm dieser Lösung noch eine deutliche Reaktion bei einer Verdünnung von 1 : 10000. Alanin ließ sich unter den gleichen Bedingungen ebenfalls noch in einer Verdünnung von 1 : 10000 sehr scharf nachweisen. l-Tyrosin verlangte eine größere Konzentration (1 : 5000). Noch verdünntere Lösungen der genannten Aminosäuren gaben gleichfalls unter günstigen Bedingungen noch eine Reaktion; jedoch ist die Färbung nicht mehr sehr ausgesprochen. Wir betrachten die oben angegebenen Verdünnungen als die Grenze, bis zu der Aminosäuren mit Sicherheit nachgewiesen werden können.

Wir haben zunächst im Harn und im Blute nach vorheriger Abtrennung der Eiweißstoffe auf Produkte gefahndet, welche mit dem Reagens eine Färbung geben. Im Harn entfernten wir eiweißartige Stoffe durch Dialyse. Zur Enteiweißung des Blutes verwendeten wir das Verfahren von Michaelis und Rona (Eisenhydroxyd).

Beim Harn prüften wir stets vor der Dialyse und dann das Dialysat und den nicht dialysierbaren Teil für sich. In allen Fällen erhielten wir mit dem ganz frischen Harn vom Menschen eine positive Reaktion. Meist gaben auch das Dialysat und der Inhalt des Dialysierschlauches Blaufärbung. Wir haben auch Pferde-, Rinder- und Hundeharn untersucht. Auch hier erhielten wir beim ganz frischen Harn fast durchweg eine positive Reaktion. Wir werden die gesamten Erfahrungen mitteilen, wenn wir über ein größeres Material verfügen.

Das enteiweißte Blut engten wir unter vermindertem Druck bis auf 50 ccm ein. Im allgemeinen verwandten wir 500—600 ccm Blut vom Pferd, vom Rind und vom Hund.

Sowohl beim Harn als bei den Blutproben stießen wir bei Anstellung der Reaktion auf Schwierigkeiten. Es zeigte sich, daß, wie oben erwähnt, die Reaktion des Mediums von ausschlaggebender Bedeutung ist. Um in jedem Falle vor Täuschungen bei negativem Ausfall der Reaktion sicher zu sein, gaben wir zu der mit Natriumbicarbonat sorgfältig neutralisierten Lösung soviel Glykokoll hinzu, als nach unseren Vorstudien eben noch nachweisbar war. Wurde dann die Reaktion positiv, während die Kontrollprobe ohne Glykokollzusatz unter sonst ganz gleichen Bedingungen negativ blieb, dann war der Schluß berechtigt, daß nicht die Zusammensetzung der Flüssigkeit schuld am negativen Ausfalle der Reaktion war. Dagegen lag noch die Möglichkeit vor, daß die Konzentration der eventuell vorhandenen Aminosäuren oder sonstigen Eiweißabbauprodukte eine so geringe war, daß sie für den Nachweis mit dem Reagens nicht genügten. Wir engten deshalb auf ein noch geringeres Volumen ein und prüften dann wiederum mit dem Reagens. In manchen Fällen gelang es, auf diese Weise noch eine positive Reaktion hervorzurufen. Was nun unsere bisherigen Erfahrungen mit enteweißtem Blut anbetrifft, so erhielten wir in fast allen Fällen eine deutlich positive Reaktion. Wir sind vorläufig nicht in der Lage, anzugeben, welcher Natur die im enteweißten Blute vorhandenen, die Reaktion bewirkenden Verbindungen sind. Wir haben alle, eine positive Reaktion gebenden Lösungen vereinigt. Die gesamten Lösungen entsprachen ca. 8 l Blut. Die auf 210 ccm eingeeengte Flüssigkeit enthielt 2,2764 g Stickstoff. Sie gab keine Biuretreaktion. Ebenso fielen alle Reaktionen auf Aminosäuren — Tyrosin, Tryptophan, Cystin, Histidin — negativ aus. Die Frage, ob in dem angewandten Blut ursprünglich Peptone vorhanden waren, muß hier ausscheiden, weil noch nicht mit Sicherheit erwiesen ist, ob bei der angewandten Art der Enteißung Peptone bestimmter Art mitgerissen werden. Versuche mit einigen Peptonarten — Seidenpeptone, Witte-Peptone, Peptone aus Horn und mit Ammonsulfat aussalzbare Peptone aus Horn und aus Seide — ergaben, daß diese nach der Enteißung noch nachweisbar waren. Doch erscheinen uns die Versuche

noch nicht umfangreich genug, um die Eisenhydroxydmethode zur Entscheidung der Frage nach dem Vorkommen von Peptonen im Blute heranzuziehen. Nach allen sonstigen, im Laufe der letzten Jahre gesammelten Erfahrungen sind normalerweise die Biuretreaktion gebenden Stoffe im Blute nicht vorhanden. Nur in einigen Fällen schwerer Tuberkulose konnten wir Peptone im Blute nachweisen.

Die von uns beobachtete Reaktion mit dem Reagens — die Reaktion war auch bei der eingeeengten Flüssigkeit noch stark positiv — kann nur bedingt sein durch Verbindungen, die mindestens eine Carboxylgruppe und eine Aminogruppe enthalten. Die gewöhnlichen Peptone sind nach unseren Beobachtungen, wie schon erwähnt, ausgeschlossen. Es kann sich nur um abiurete Eiweißabbauprodukte oder andere mindestens eine Amino- und Carboxylgruppe tragende Verbindungen handeln. Von bekannten Verbindungen kämen in Betracht Aminosäuren, einfacher gebaute, die Biuretreaktion nicht gebende Polypeptide, und ferner die im Blute nachgewiesenen Oxyproteinsäuren. Wir haben uns zunächst mit Hilfe der Formoltitration (Sörensen) davon überzeugt, daß Verbindungen vorliegen, die eine Aminogruppe enthalten. Wir bestimmten zuerst den Ammoniakgehalt der Lösung. Es kamen von dem in der enteiweißten Flüssigkeit vorhandenen Stickstoff 1,680 g Stickstoff auf Ammoniak; Aminostickstoff waren vorhanden 0,378 g. Um festzustellen, ob Aminosäuren im freien Zustande im Blute vorhanden sind, haben wir die enteiweißte Flüssigkeit (ca. 8 Liter Blut entsprechend) in zwei Teile geteilt. Die eine Hälfte wurde unter vermindertem Druck bei 40° des Wasserbades zur Trockene verdampft. Den Rückstand übergossen wir mit zirka dem zwanzigfachen Volumen absoluten Alkohols. Dann leiteten wir unter Kühlung trockene, gasförmige Salzsäure ein. Die Veresterung wurde unter gleichen Bedingungen wiederholt. Wir arbeiteten besonders sorgfältig, um eine Hydrolyse von komplizierter gebauten Produkten zu vermeiden. Wir setzten dann in der gewohnten Weise die Ester mit Natriumhydroxyd und Kaliumcarbonat in Freiheit. Die getrocknete ätherische Lösung wurde vorsichtig unter vermindertem Druck

bei Zimmertemperatur verdampft. Der Rückstand zeigte den typischen Geruch der Aminosäureester nicht. Wir verseiften den Rückstand durch Kochen mit der zirka zwanzigfachen Menge Wassers, bis die anfangs deutlich alkalische Reaktion verschwand. Dann verdampften wir zur Trockene. Es ließ sich keine der bekannten Aminosäuren mit Sicherheit nachweisen.

Die zweite Hälfte der enteweißten Flüssigkeit erhitzen wir mit rauchender Salzsäure, um eventuell vorhandene Aminosäuren in Bindung enthaltende Produkte zu spalten. Das Hydrolysat verdampften wir zur Trockene. Der Rückstand wurde unter denselben Bedingungen verestert, wie oben angegeben. Auch hier setzten wir die Ester in Freiheit. Es war ein schwacher Geruch nach Aminosäureester nachweisbar, doch glückte es auch hier nicht, Aminosäuren zu identifizieren.

Es sind im hiesigen Institut umfassende Untersuchungen über das Vorkommen von Eiweißabbauprodukten und Aminosäuren im Blute, in anderen Körperflüssigkeiten und in Organpreßsäften im Gange. Wir benützen das Reagens als Indikator auf derartige Produkte. Fällt die Reaktion positiv aus, dann ist das für uns ein Hinweis darauf, daß es sich lohnt, an großen Mengen der betreffenden Flüssigkeit zu prüfen, welche Verbindungen der Reaktion zugrunde liegen. Nach unseren bisherigen Erfahrungen sind sehr große Mengen von Blut nötig, um eine eindeutige Entscheidung der Frage nach dem Vorkommen von Eiweißabbauprodukten im Blute zu ermöglichen. Die vorliegende Mitteilung soll nur auf den hohen Wert des Ruhemannschen Reagens auf Körper, die mindestens eine Aminogruppe und eine Carboxylgruppe besitzen, hinweisen. Wir heben noch hervor, daß nur die Blaufärbung nach den bisherigen Erfahrungen entscheidend ist. Wichtig ist, das sei nochmals betont, daß die Reaktion der zu prüfenden Flüssigkeit neutral ist. Zu empfehlen ist in allen Fällen eine Kontrolle unter Zusatz der eben gerade noch nachweisbaren Menge einer Aminosäure.

---