

bei 366 $m\mu$, vermindert um die Extinktionsänderung des Blindwertes, multipliziert mit $9,15 \cdot 10^{-7}$ (82,5) ergibt den Gehalt an L(+)-Milchsäure in Mol (μg) in der Bestimmung. Die Faktoren für Messung bei 340 $m\mu$ sind $4,8 \cdot 10^{-7}$ (43,3). Der Umrechnung liegen die Extinktionskoeffizienten $\Delta E_{366} = 3,30 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$ und $\Delta E_{340} = 6,29 \cdot 10^6 \text{ cm}^2/\text{Mol}$, beide für 25° C, zugrunde. — *Ohne Vakuum*. Bis zu 0,2 ml Probelösung, die $0,25\text{--}2,5 \cdot 10^{-7}$ Mol L(+)-Lactat enthält, werden in einer 1 cm-Küvette mit 0,06 ml obiger DPN-Lösung versetzt und mit obigem Semicarbazidpuffer auf 1,65 ml aufgefüllt. Die Anfangsextinktion wird bei 366 $m\mu$ und 25° C gemessen; nach Erwärmen auf 37° C mischt man 0,02 ml MDH-Lösung ein [ungefähr 5 mg Protein/ml in 0,4 ml (? Ref.) gesättigter Ammoniumsulfatlösung mit mindestens 20000 E/mg Protein, MDH I Boehringer Nr. 15145]. Ein gleich-angesetzter Reagentienblindwert läuft mit. Nach 30 min bei 37° C wird auf 25° C abgekühlt und erneut photometriert. Die Berechnung erfolgt wie oben, die Faktoren sind für 366 $m\mu$: $5,06 \cdot 10^{-5}$ (45,6) und für 340 $m\mu$: $2,66 \cdot 10^{-7}$ (24,0). — Enteiweißung. 5 ml Blut oder Serum werden mit 2,5 ml 5% iger Perchlorsäure gemischt und 5 min bei 3000 U/min zentrifugiert. Ein aliquoter Teil des Überstandes wird mit 2 n KOH-Lösung neutralisiert und nach Kühlung vom Kaliumperchlorat durch Zentrifugieren getrennt.

E. MÜLLER, Würzburg

Eine Methode zur Bestimmung von Oxalsäure im Harn geben E. R. HAUSMAN, J. S. McANALLY und G. T. LEWIS¹ an. Sie beruht darauf, daß Oxalsäure mit Indol einen Farbkomplex bildet, der sich photometrisch auswerten läßt². — *Ausführung*. Der 24 Std-Harn wird in 10—12 ml Eisessig gesammelt. Er ist 48 Std haltbar und soll nicht gekühlt werden. Nach Verdünnen auf 2 l stellt man mit konz. Ammoniak auf pH 4,9—5,1 ein und versetzt 150 ml mit 1 g LLOYDS Reagens. Während 5 min schüttelt man ab und zu, läßt 5 min stehen und filtriert durch Whatman-Papier Nr. 1, wobei man die ersten 10 ml Filtrat verwirft. In 2 konische Zentrifugengläser pipettiert man je 40 ml Filtrat (Doppelansatz), setzt 0,2 ml gesättigte Calciumchloridlösung hinzu und läßt über Nacht bei 4° C stehen. Die Gläser werden bei 2—5° C 30 min mit 2000 U/min zentrifugiert. Nach Dekantieren von etwa 30 ml bringt man den aufgewirbelten Niederschlag mit 3 ml Eiswasser quantitativ in graduierte, konische 12 ml-Zentrifugengläser, zentrifugiert wieder, dekantiert den Überstand und läßt die umgekehrten Gläser einige Sekunden auslaufen. Der Niederschlag wird 2 mal mit je 2 ml 0,5 vol-% igem Ammoniak (5 ml konz. Ammoniak + 995 ml Wasser) gewaschen. Die letzten nach Dekantieren an der Wandung noch anhaftenden Flüssigkeitsreste entfernt man mit Filtrierpapier. Zum Niederschlag gibt man 1 ml 1 n Schwefelsäure, setzt die Gläser einige Sekunden in ein kochendes Wasserbad und bringt mit einem Glasstab alles in Lösung. Nach Abkühlen spült man den Stab mit weniger als 1 ml 1 n Schwefelsäure ab, bringt durch Zentrifugieren alle Flüssigkeit nach unten, füllt mit 1 n Schwefelsäure auf 2 ml auf (diese Marke muß mitunter nachgeeicht werden), verschließt, schüttelt und zentrifugiert. (Mitunter bilden sich in 1 n Schwefelsäure nicht lösliche geringe Niederschläge.) In Colorimetergläsern (Klett-Summerson) mischt man 1,5 ml Überstand mit 0,5 ml einer Lösung von 0,40 g Indol in 100 ml 95% igem Äthanol, unterschichtet mit 2 ml konz. Schwefelsäure, mischt mit einem Hakenglasstab, erwärmt 45 min in einem Wasserbad auf 80—90° C, kühlt unter der Wasserleitung, füllt mit Wasser auf 5 ml auf, mischt durch Rühren und läßt 45 min bei Raumtemperatur stehen. Die Farbe ist einige Stunden beständig; die Standardansätze sollen aber nach gleichem Zeitintervall wie die Proben abgelesen werden. Man benutzt das Grünfilter Nr. 54

¹ Clin. Chemistry 2, 439—444 (1956). Univ. of Miami, Coral Gables, Fla. (USA).

² BERGERMAN, J., und J. S. ELLIOT: Analyt. Chemistry 27, 1014 (1955); vgl. diese Z. 152, 378 (1956); 155, 80 (1957).

(540 $m\mu$) (die Maximalabsorption liegt bei 525—530 $m\mu$). Standardlösungen laufen in dreifachen Ansätzen mit, sie bestehen aus 1,0 ml Gebrauchslösung (siehe unten), 0,5 ml 1 n Schwefelsäure und 0,5 ml Indollösung. Den Blindwert ergibt eine Lösung von 1,5 ml 1 n Schwefelsäure und 0,5 ml Indollösung. Standardlösung: Man löst 1,4870 g Natriumoxalat (äquivalent 1,0000 g Oxalsäure) in Wasser zu 1 l Gebrauchslösung: 50 ml Standardlösung + 50 ml 2 n Schwefelsäure \cong 0,5 mg Oxalsäure/1,0 ml 1 n Schwefelsäure. Die Werte bei 3 Menschen schwanken zwischen 12 und 49 mg/Tag. Zugesezte Oxalsäure findet man zu 95—110% wieder.

E. MÜLLER, Würzburg

Papierchromatographische Identifizierung und quantitative Bestimmung von Ketosäuren. Ketosäuren und andere Carbonylverbindungen in *biologischem Material* werden von E. KUN und M. GARCIA-HERNANDEZ¹ quantitativ bestimmt. Die Verbindungen werden in ihre 2,4-Dinitrophenylhydrazone (DNPH) übergeführt und papierchromatographisch getrennt und isoliert. Die einzelnen Stoffe werden nochmals chromatographiert und katalytisch zu den entsprechenden Aminen reduziert. — *Ausführung.* Zur Darstellung der DNPH wird das biologische Material zunächst durch Zusatz von 0,05—0,1 seines Volumens an eiskalter 60% iger Perchlorsäure enteiweißt. Das Gemisch bleibt im Eisbad und wird nach 10 min in einen Überschuß (50—200 ml) von frisch hergestellter 2,4-Dinitrophenylhydrazinlösung (1 g/1 l 2 n Salzsäure) filtriert (Whatman Nr. 1). Das Reaktionsgemisch bleibt 2 Std bei Zimmertemperatur und dann über Nacht bei 4° C stehen. Mit Ausnahme der β -Mercaptobrenztraubensäure werden alle untersuchten Ketosäuren unter diesen Bedingungen quantitativ in die DNPH übergeführt. Durch die Perchlorsäure wird nur Acetessigsäure zum Teil zersetzt. Die Zersetzung von Diketobersteinsäure und Oxalglykolsäure, die bereits in neutraler Lösung durch 2-wertige Ionen erfolgt, kann durch Zusatz von 0,02 m Äthylendiamintetraacetat vermindert werden. — Die DNPH werden im Scheidetrichter 2 mal mit 10 ml Äthylacetat ausgeschüttelt, der Extrakt wird zur Trocknung durch wasserfreies Natriumsulfat filtriert und das Lösungsmittel im Stickstoffstrom bei 30—40° C abgedampft. Der Rückstand wird in wenig Äthylacetat aufgenommen und papierchromatographisch (absteigend) in Ketonsäuren und andere Carbonylverbindungen getrennt. Man verwendet Whatman-Papier Nr. 1, das mit 0,1 m Kaliumphosphatpuffer (pH 7,3) getränkt und bei Zimmertemperatur getrocknet worden ist. Als Lösungsmittel dient ein Gemisch aus Petroläther und 95% igem Äthanol (1 : 4). Die getrennten Verbindungsgruppen werden mit Äthylacetat aus dem Papier extrahiert. Liegen nur Ketosäuren vor, genügt die Reinigung über die Natriumsalze. Man extrahiert dazu den Äthylacetatextrakt mit 20 ml 10% iger Na₂CO₃-Lösung, gibt diesen neuen Extrakt sofort in das Eisbad, säuert mit Salzsäure auf pH 1 an, extrahiert zweimal mit Äthylacetat, trocknet mit Na₂SO₄ und verdampft wie oben angegeben. Die DNPH der Ketosäuren werden dann voneinander chromatographisch auf dem wie oben getränkten Whatman-Papier Nr. 1 mit 83% igem Äthanol als Lösungsmittel getrennt. Die einzelnen Komponenten werden wieder extrahiert und ihre Absorptionen im Phosphatpuffer bei 365—370 $m\mu$ gemessen. 78—90% der vorhandenen Ketosäuren werden nach dieser Methode gefunden. In Zweifelsfällen erfolgt Reduktion zur Aminosäure. Der Extrakt aus dem Chromatogramm wird zur Trockne eingedampft, in 3—5 ml Eisessig aufgenommen und mit 1—2 mg Platinoxid als Katalysator in Wasserstoffatmosphäre geschüttelt. Die Aminosäuren werden papierchromatographisch identifiziert. Die DNPH von Formaldehyd, Acetaldehyd und Aceton werden zur Identifizierung ebenfalls zu den Aminen reduziert.

EVA NEUHAUS

¹ Biochim. biophysica Acta (Amsterdam) **23**, 181—186 (1957). Univ. Madison, Wis.