

168. Zur Mikrobestimmung von Ammoniak

zugleich 2. Mitteilung zur Methodik der chemischen Schwangerschaftsbestimmung¹⁾

von E. Albert Zeller.

(2. XI. 40.)

Conway hatte 1933 eine auf dem Prinzip der Diffusion beruhende Methode der Bestimmung kleinster Ammoniakmengen angegeben²⁾, die sich sehr bewährt hat. In flachen, runden Glasschalen wird durch Pottaschelösung das Ammoniak aus der zu untersuchenden Lösung ausgetrieben und im mittleren Einsatz, in dem sich Säure befindet, von dieser absorbiert (Fig. 1). Das Verfahren eignet sich u. a. sehr gut für die Bestimmung des durch kleine Diamin-oxydase-Mengen (Do.) gebildeten Ammoniaks und damit für die chemische Schwangerschaftsbeurteilung und -bestimmung³⁾.



Fig. 1.

Gefäße zur Ammoniakbestimmung nach *Conway*.

Das von *Conway* und auch von früheren Autoren verwendete Prinzip lässt sich, wie aus dem Folgenden hervorgeht, auch auf die etwas abgeänderten Reaktionsgefäße der *Barcroft*- und *Warburg*-Apparatur übertragen.

Die Reaktionsgefäße werden nämlich nicht in der üblichen Weise durch einen einfachen Schliff mit den Manometern verbunden, sondern durch einen Ventilstopfen (Fig. 2), sodass man nach Belieben die Gefäße vollständig abschliessen kann. In den Hauptraum (H.R.) wird, wie bei der *Conway*-„unit“, gesättigte Pottaschelösung, in den Einsatz (E.) verdünnte Salzsäurelösung gegeben. Dann befestigt man mittels Klammern (die dazu nötigen Glashaken sind bei der Zeichnung weggelassen worden) und bei geschlossenem Ventilstopfen (V.1) die Gefäße an das Manometer und schüttelt sie im Thermostaten in üblicher Weise bei 38°. Je nach den Ammoniak- und Flüssigkeitsmengen ist nach 15—30 Minuten sicher alles Ammoniak im Einsatz, von wo es herauspipettiert und mit *Nessler's* Reagens und Stufenphotometer oder mit irgend einer andern gebräuchlichen Methode bestimmt werden kann. Man kann übrigens auch die gewöhnlichen

¹⁾ 1. Mitteilung: E. A. Zeller und H. Birkhäuser, Schweiz. med. Wschr. **70**, 975 (1940).

²⁾ E. J. Conway et al., Biochem. J. **27**, 419 (1933); **29**, 2755 (1935).

³⁾ E. A. Zeller, 3. Mitteilung zur Methodik der chemischen Schwangerschaftsbestimmung.

Manometergefäße ohne Ventilstopfen für den vorliegenden Zweck improvisieren, indem man den Anfang der zum Manometer führenden Kapillare auf passende Weise, z. B. durch Paraffin, verschliesst. Gegenüber den mit Ventilstopfen versehenen Gefäßen besitzen diese Improvisationen, mit denen ich eine Zeitlang gearbeitet hatte, mehrere Nachteile. Sie sind viel umständlicher zu handhaben und nur beschränkter Anwendung fähig.

Das geschilderte Verfahren lässt sich in einfacher Weise zur Bestimmung kleiner, enzymatisch gebildeter Ammoniakmengen benutzen. In dem seitlichen Anhang (S. A.), der durch einen Ventilstopfen (V.2) verschlossen wird, befindet sich das Fermentsystem. Durch die beiden Ventilstopfen kann das Gefäß in bekannter Art mit einem bestimmten Gas gefüllt werden. Wenn die Reaktion zu Ende ist, kippt man die Enzymlösung in den Hauptraum, in dem sich Pottaschelösung befindet, die das Ammoniak austreibt. Wenn nur der Ventilstopfen 2 geschlossen wird, wird das durch das Enzym bewirkte Entstehen und Verschwinden eines Gases in normaler Weise manometrisch registriert. In dem geeigneten Zeitpunkt wird Ventilstopfen 1 geschlossen und die Ammoniakbestimmung angeschlossen. Diese Gefäße sind deshalb besonders für die experimentelle Behandlung der Aufgabe geeignet, die Sauerstoffmengen zu messen, die bei der oxydativen Desaminierung zur Abspaltung eines Mol Ammoniak nötig ist (vgl. das Beispiel der Diamin-oxydase¹).

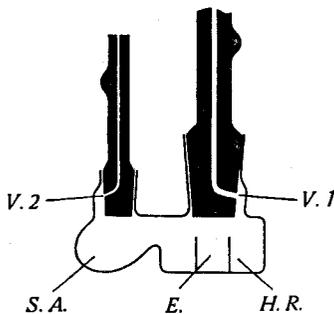


Fig. 2.

Manometergefäße zur gleichzeitigen Gas- und Ammoniakbestimmung².
Für die Erklärung vgl. Text.

Bisher verwendete ich die Gefäße hauptsächlich dazu, die Do. im Serum zu bestimmen. Diese ist, wie aus der vorangehenden Mitteilung hervorgeht (l. c.) in der Schwangerschaft wesentlich erhöht, was sehr wahrscheinlich mit dem hohen Do.-Gehalt der Placenta³

¹) E. A. Zeller, Helv. **21**, 880 (1938).

²) Die Gefäße wurden durch die Firma E. Keller, Basel, hergestellt. Für das Zeichnen der Figur bin ich Hrn. Peter Birkhäuser zu Dank verpflichtet.

³) E. A. Zeller, B. Schär und S. Staehlin, Helv. **22**, 837 (1939).

in Zusammenhang steht. Ihre Messung erlaubt daher eine einfache chemische Diagnostizierung und Beurteilung der Schwangerschaft. Es wird im folgenden diese Anwendung genauer beschrieben.

Die Messung der Diamin-oxydase im Serum.

1. Vorbereitung der Gefäße: In den gut getrockneten Gefäßen wird der innere und obere Rand des Einsatzes leicht gefettet und dieser mit $0,2 \text{ cm}^3$ 0,05-n. HCl beschickt. In den Hauptraum kommt 1 cm^3 gesättigte Pottaschelösung. Das Einfüllen geschieht durch eine eigens dafür angebrachte und mit einem einfachen eingeschliffenen Stopfen versehene Öffnung, die in Fig. 2 nicht dargestellt worden ist. Dann wird das Gefäß mit geschlossenem V.1 an dem Manometerschliff befestigt. V.2, das über den Wasserspiegel des Thermostats hinausragen soll, bleibt noch einige Minuten offen, bis der Temperatúrausgleich erreicht ist, damit kein Überdruck im Gefäß auftritt. Dann wird 15 Minuten mit normaler Frequenz geschüttelt, die Säure im Einsatz hinauspipettiert und verworfen, der Einsatz mit dest. Wasser gespült und neu beschickt.

2. Einfüllen des Serums und Substrats in den seitlichen Anhang: $0,2\text{—}0,5 \text{ cm}^3$ gründlich dialysiertes Serum¹⁾, $0,05 \text{ cm}^3$ 0,1-m. Cadaverin-Phosphatpufferlösung (p_H 7,2) bzw. $0,05 \text{ cm}^3$ reine Pufferlösung werden mit einem Tropfen Octylalkohol in den seitlichen Anhang gefüllt und durch die Apparatur Sauerstoff, der mit Säure und Bariumhydroxyd gewaschen wird, durchgeleitet. Dann wird, wenn nur das Ammoniak gemessen werden soll, V.1 geschlossen, nach einigen Minuten Temperatúrausgleich im Thermostat auch V.2. Die Manometer werden nur zeitweise mit normaler oder aber dauernd mit kleiner Frequenz geschüttelt. Der Versuch dauert 2—24 Stunden.

3. Messung des gebildeten Ammoniaks: Zu diesem Zweck wird das Serum in den Hauptraum eingekippt und durch teilweises Rückkippen der im Anhang verbliebenen Flüssigkeitsrest ebenfalls alkalisiert. Dann wird mit normaler Geschwindigkeit 30 Minuten geschüttelt, das Gefäß vom Manometer abgelöst und die Salzsäure des Einsatzes in ein Messkölbchen von 10 bzw. 25 cm^3 pipettiert und der Einsatz zweimal mit destilliertem Wasser gespült. In das Kölbchen gibt man $0,4$ bzw. $1,0 \text{ cm}^3$ des nach *Folin* und *Wu*²⁾ hergestellten *Nessler*'schen Reagens, füllt zur Marke auf und lässt es 10 Minuten bis zur Ablesung stehen. In der überwiegenden Mehrzahl der Fälle kann die Diagnose auf Schwangerschaft ohne jedes optische Hilfsmittel gestellt werden. Im positiven Fall ist zwischen dem Ansatz mit Cadaverin und dem ohne Cadaverin ein starker Unterschied vorhanden, im negativen bleiben beide Lösungen praktisch

¹⁾ E. A. Zeller und H. Birkhäuser, l. c.

²⁾ O. Folin und H. Wu, J. Biol. Chem. **38**, 87 (1919).

farblos. Die Messung erfolgt jedesmal mit Hilfe des Stufenphotometers unter Verwendung des Filters S 43. Die Lösungen werden in 15 cm langen Mikroküvetten, die zur Füllung ca. 10 cm³ Lösung brauchen, auf ihre Absorption hin untersucht. Diese langen Absorptionsgefäße sind aber nur dann nötig, wenn es sich um kurzfristige Versuche von 2—4 Stunden Dauer und um sehr kleine Serumengen handelt, während in den übrigen Fällen die üblichen Küvetten von 3—5 cm Länge ausreichen.

Die Methode gestattet, bis zu 0,1 γ N pro cm³ Lösung zu bestimmen. Die Genauigkeit könnte, wenn es nötig wäre, durch die Anwendung der *Conway'schen* Mikrotitration¹⁾ noch erhöht werden. Die Unterschiede zwischen Ansätzen mit und ohne Cadaverin betragen bei Schwangern nach 4 Stunden durchschnittlich 1 γ , bei Nichtschwängern weniger als 0,1 γ ; die Minuswerte sind bei den letztern oft sogar etwas höher als die Pluswerte. Nach längerer Versuchsdauer sind die Unterschiede entsprechend grösser.

Die mit dieser Methode an einem grossen klinischen Material gewonnene Erfahrung wird an anderer Stelle mitgeteilt werden.

Hrn. Prof. Dr. A. Labhardt, Direktor der Universitäts-Frauenklinik Basel, danke ich für die Überlassung der Blutproben.

Physiologisch-chemisches Institut der Universität Basel.

169. Zur Kenntnis der Triterpene.

(57. Mitteilung²⁾).

Über 2-Desoxy-betulin und 2-Desoxy-allo-betulin

von L. Ruzicka und Stephen D. Heineman.

(2. XI. 40.)

Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass bei der Umwandlung der primären Hydroxylgruppe des Betulins in eine Methylgruppe Lupeol gebildet wird³⁾. Im Betulin liegt somit ein Oxy-Derivat des Lupeols vor, für dessen Konstitution auf Grund von Abbauversuchen beim Lupeol⁴⁾ und beim Betulin⁵⁾⁶⁾ Formel I zur Diskussion gestellt wurde.

¹⁾ E. J. Conway, *Biochem. J.* **28**, 283 (1934).

²⁾ 56. Mitt. *Helv.* **23**, 1338 (1940).

³⁾ L. Ruzicka und M. Brenner, *Helv.* **22**, 1523 (1939).

⁴⁾ L. Ruzicka und G. Rosenkranz, *Helv.* **23**, 1311 (1940).

⁵⁾ L. Ruzicka und M. Brenner, *Helv.* **23**, 1325 (1940).

⁶⁾ L. Ruzicka und A. H. Lamberton, *Helv.* **23**, 1338 (1940).