

Verschiebung des Spektrums nach 453, 423 $m\mu$ nach Behandlung mit säurehaltigem Chloroform). Die untere Schicht wird durch Blatt-xanthophyll gebildet. Kohlenwasserstoffe sind in nennenswerten Mengen nicht vorhanden.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.

199. Nachweis kleiner Mengen Alloxan.

Zur Frage seines Vorkommens im tierischen Organismus

von P. Karrer, F. Koller und H. Stürzinger.

(26. X. 45.)

Die Entdeckung von *Shaw Dunn*¹⁾, dass Alloxan schon in relativ kleinen Mengen nach intravenöser oder subcutaner Injektion beim Tier schweren Diabetes erzeugt, hat das Interesse für diese Verbindung in biologischer Hinsicht erhöht. Es schien daher erwünscht, für den Nachweis kleiner Alloxanmengen eine genügend empfindliche Methode auszuarbeiten.

Die ältere Literatur führt verschiedene Verfahren auf, die für den Alloxannachweis in Vorschlag gebracht wurden; sie erwiesen sich aber alle wenig empfindlich und könnten daher nur beim Vorliegen grosser Mengen der Verbindung Anwendung finden.

Pyrrrol soll beim Kochen mit wässriger Alloxanlösung violette Färbung ergeben, die mit Lauge in Grün umschlägt²⁾. Die Färbung ist aber schlecht erkennbar.

Beim Erhitzen von p-Phenylendiamin mit Alloxanlösung bildet sich ein blauschwarzer, in Wasser fast unlöslicher Niederschlag³⁾, der sich in Säuren mit blauer, in Alkohol mit violetter und in Laugen mit roter Farbe löst, doch erfolgt seine Bildung erst bei hoher Alloxankonzentration (> 1%).

Mit Hydroxylamin bildet Alloxan schon in der Kälte Violursäure, erkennbar durch ihre farbigen Salze. Versetzt man je 10 cm^3 wässrige Alloxanlösung bei Zimmertemperatur mit einigen Tropfen einer Lösung von salzsaurem Hydroxylamin und macht hierauf mit Natronlauge alkalisch, so beobachtet man nach 5 Minuten in der Verdünnungsreihe folgende Färbungen:

Alloxangehalt 1%	stark violett
0,1%	violett
0,01%	blassrosa
0,05%	gerade noch sichtbar
0,002%	nicht mehr sichtbar.

¹⁾ Vgl. dazu das Referat „Über den Alloxandiabetes“ von *E. Liebmann*, Schweiz. med. Wschr. **74**, 1339 (1944).

²⁾ *G. Ciamician, P. Magnaghi*, B. **19**, 106 (1886).

³⁾ *Möhlau und Litter*, J. pr. [2] **73**, 483 (1906).

Bei farblosen, klaren, wässrigen Alloxanlösungen liegt somit die Grenze der Erkennbarkeit dieser Farbreaktion bei 0,05 mg Alloxangehalt pro cm^3 ; mit trüben und gefärbten Lösungen sinkt die Empfindlichkeit der Reaktion natürlich stark. Auch die blauen Eisensalze der Violursäure geben keinen empfindlichen Farbttest.

Wir versuchten daher, die Bildung eines Iso-alloxazinfarbstoffs aus Alloxan zum Nachweis kleinerer Alloxanmengen auszunützen. Die starke Fluoreszenz der Iso-alloxazine erlaubt es, diese noch in sehr geringen Konzentrationen zu erkennen. Als Aminkomponente wählten wir N-Methyl-o-phenylendiamin, welches sich mit Alloxan zum 9-Methyl-iso-alloxazin vereinigt, sowie vergleichsweise auch o-Phenylendiamin, das mit Alloxan zum Alloxazin zusammentritt.

Wenn es sich darum handelt, Alloxan in eiweissfreien wässrigen Lösungen nachzuweisen, so kann dessen Kondensation mit N-Methyl-o-phenylendiamin, bzw. o-Phenylendiamin in der Hitze ausgeführt werden und ist dann in wenigen Minuten beendet. Bei Eiweiss-haltigen Flüssigkeiten (z. B. Serum) ist Erwärmung ungeeignet, da das entstehende Eiweisspräzipitat einen erheblichen Teil der gebildeten Iso-alloxazin- oder Alloxazin-Verbindung adsorbiert. Wir lassen daher die Reaktion zwischen Alloxan und N-Methyl-o-phenylendiamin, bzw. o-Phenylendiamin sich bei Zimmertemperatur vollziehen, wofür einige Stunden notwendig sind; in unseren Versuchen wurde stets eine Reaktionszeit von 24 Std. gewählt.

Alloxazin, das Umsetzungsprodukt von Alloxan und o-Phenylendiamin, zeigt in wässriger Lösung im Ultraviolettlicht blaue Fluoreszenz; diese ist noch bei 0,5 γ Alloxan pro cm^3 wässriger Flüssigkeit erkennbar. Die gelbgrüne Fluoreszenz des aus Alloxan und N-Methyl-o-phenylendiamin entstehenden 9-Methyl-iso-alloxazins kann noch bei einem Alloxangehalt von 5 γ pro cm^3 Flüssigkeit nachgewiesen werden. Die letztere Reaktion ist demnach etwas weniger empfindlich, trotzdem eignet sie sich für den Nachweis kleiner Mengen Alloxan in Lösungen, die Eiweiss enthalten oder gefärbt sind, besser, da sich N-Methyl-iso-alloxazin im Gegensatz zu Alloxazin mit Chloroform aus wässriger Lösung ausziehen lässt, wodurch die Sicherheit und Zuverlässigkeit der Bestimmungsmethode erhöht wird.

Handelt es sich um quantitative Abschätzungen der Alloxanmengen, so wird die beobachtete Fluoreszenz-Intensität mit jener von Vergleichslösungen verglichen.

Zahlreiche Versuche zeigten, dass bei der Bestimmung sehr kleiner Mengen Alloxan die Ausfällung der Eiweisstoffe, durch Erhitzen oder durch Trichloressigsäure oder durch Alkohol vor dem Umsatz mit N-Methyl-o-phenylendiamin, zu erheblichen Alloxanverlusten führt; vermutlich wird dieses vom ausflockenden Eiweiss adsorbiert, kann aber durch Lösungsmittel, wie Alkohol, nur unvollständig extrahiert werden. Wir haben schliesslich als beste und zuverlässigste Methode

zum Nachweis kleiner Alloxanmengen in einem Serum folgende Arbeitsweise entwickelt:

Mit der Pipette wird 1 cm³ mit Alloxan versetztes Serum in ein kleines Reagensglas gefüllt, mit ½ cm³ verdünnter Salzsäure (1:20) und 1 cm³ einer Lösung, die 250 γ N-Methyl-o-phenylendiamin-hydrochlorid¹⁾ enthält, versetzt, und die Flüssigkeit 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehengelassen. Es kann vorkommen, dass die Lösung dabei zu einer mit Eiweissflocken durchsetzten Gallerte erstarrt, was die Bestimmung indessen nicht stört. Man verdünnt mit destilliertem Wasser auf 10 cm³ und spült die Lösung in einen Chloroformextraktionsapparat für Flüssigkeiten, in welchem die wässrige Schicht ca. 10 cm hoch stehen soll. Nun lässt man die Extraktion mit Chloroform ca. 1 Stunde vor sich gehen, wobei die durch die wässrige Phase rinnenden Chloroformtropfen etwas Eiweiss in Form von Schaum mitreissen. Dieses ballt sich aber im Kölbchen zu einem kleinen Klumpen zusammen, von dem die Chloroformlösung leicht abgegossen werden kann. Die Apparatur ist vor Licht zu schützen. Nach der Extraktion wird der Chloroformauszug auf 2 cm³ eingedampft, evtl. mit einem Korn Calciumchlorid getrocknet und mit einer genau gleich behandelten Blindprobe unter der Ultraviolettlampe verglichen. Der Extrakt aus Blutserum ohne Alloxan zeigt schwach blaue Fluoreszenz, bei Gegenwart von Alloxan erscheint diese grünlich bis stark gelbgrün, je nach Konzentration.

Diese Methode gestattet einen Nachweis von Alloxan bis 10 γ pro cm³ Blutserum, sofern folgende Bedingungen erfüllt sind:

a) das Serum soll frisch und von klarer, gelber Farbe sein und darf kein Hämoglobin enthalten;

b) die Lösungen von Alloxan und salzsaurem N-Methyl-phenylendiamin müssen kurz vor dem Versuch frisch bereitet werden.

Handelt es sich darum, geringe Mengen Alloxan im Harn nachzuweisen, so kann man nach unseren Erfahrungen folgende Arbeitsweise anwenden:

1—5 cm³ Harn werden mit Salzsäure angesäuert, mit Wasser auf 10 cm³ verdünnt und im Extraktionsapparat zur Entfernung chloroformlöslicher Bestandteile ½ Stunde mit Chloroform extrahiert. Dann trennt man die Chloroformschicht ab, versetzt die wässrige Flüssigkeit mit 250 γ salzsaurem N-Methyl-o-phenylendiamin und erhitzt 10 Minuten im Wasserbad. Die abgekühlte Lösung wird 1 Stunde im Apparat mit Chloroform extrahiert, wobei sie vor Licht zu schützen ist. Den auf 2 cm³ eingedampften, durch ein kleines Filter gegossenen Chloroformauszug vergleicht man im Ultraviolettlicht mit der entsprechenden Blindprobe oder Testlösungen bezüglich Fluoreszenz.

Da die bläuliche Fluoreszenz der Blindproben hier meist stärker ist als jene bei den Versuchen mit Serum, bleibt die Empfindlichkeit der Nachweismethode hinter jener bei den Serumversuchen etwas zurück. Die mit dem beschriebenen Verfahren nachweisbaren kleinsten Alloxanmengen betragen ca. 20—30 γ pro 1 cm³ Harn.

Mit den hier beschriebenen Methoden wurde versucht, Alloxan im Serum und im Harn von Diabetikern nachzuweisen. Die Ergebnisse waren vollkommen negativ. Hierauf wurden zwei Blutproben von Kaninchen, denen 0,2, bzw. 0,3 g pro kg Körpergewicht intravenös injiziert worden waren und von denen eines Glykosurie aufwies,

¹⁾ Ist die zu erwartende Alloxanmenge grösser als 100 γ, so müssen selbstverständlich auch entsprechend grössere Quantitäten N-Methyl-o-phenylendiamin zur Anwendung gelangen.

3 Stunden und 1 Stunde nach der Injektion entnommen und auf Alloxangehalt geprüft, ebenso der von diesen Tieren stammende Harn. Auch hier war das Ergebnis negativ. Schliesslich wurden einem Hund 100 mg Alloxan pro kg Körpergewicht intravenös injiziert (1 g bei einem 10 kg schweren Hund), das sind mehr als 100 mg%. 5 Minuten nach der Injektion entnahm man das Blut für die Alloxanbestimmung. Es konnten aber darin nur noch 1—2 mg% Alloxan nachgewiesen werden, die Hauptmenge war also bereits aus dem Blut verschwunden, bzw. verändert worden. Eine Probe mit 150 mg Alloxan pro kg Tiergewicht und Blutentnahme vor und 3 Minuten nach der Injektion ergab dieselbe Alloxankonzentration (1—2 mg%). Gleich behandelte Kontrollproben, bei welchen nachträglich zum Serum bestimmte Mengen Alloxan zugesetzt worden waren, fielen positiv aus, so dass methodische Fehler als ausgeschlossen gelten dürfen. Das injizierte Alloxan verschwindet somit sehr schnell aus dem Blutkreislauf und wird auch nicht als solches durch die Niere ausgeschieden. Welche Veränderung es erfährt, ist noch unbekannt.

Versuche über das Schicksal des Alloxans nach Verfütterung sind schon alt. So stellte *Koehne*¹⁾ fest, dass nach Verabreichung von 8 g Alloxan an Hunde dieses im Körper zum grössten Teil zerstört wird. Auch *Lusini*²⁾, der Hunde mit Alloxan fütterte, nimmt an, dass es zum grössten Teil oxydiert wird und geringe Mengen als Alloxanthin und Parabansäure im Harn abgeschieden werden. *Wöhler*³⁾ fand, dass Alloxanthin nach der Aufnahme im menschlichen Organismus in Harnstoff übergeht. Nach *Cerecedo*⁴⁾ geht nach Verfütterung von Alloxan an Hunde dieses anscheinend in Alloxanthin über und wird, wie bei der direkten Verabreichung von Alloxanthin, im Harn teilweise als Murexid abgeschieden, wodurch dieser rot gefärbt wird; ein Abbau zu Harnstoff finde nicht statt. In diesem Zusammenhang sei erwähnt, dass der von uns untersuchte Kaninchenharn, der im Anschluss an intravenöse Alloxaninjektionen gesammelt worden war, keine Rotfärbung zeigte, somit keine wesentlichen Mengen Murexid enthielt.

Alloxan ist gegen Alkalien sehr empfindlich. Wird die Lösung von 100 mg Alloxan in 100 cm³ Wasser und 1 cm³ gesättigter Natriumbicarbonatlösung 15 Minuten auf 37° erwärmt (p_H 7,5—8), so kann nachher in der angesäuerten Lösung mit unserer Alloxanbestimmungsmethode die Verbindung nicht mehr nachgewiesen werden. Dasselbe tritt ein, wenn man die alkalische Lösung 30 Minuten bei Zimmertemperatur stehen lässt.

Zürich, Chemisches Institut der Universität
und Medizinische Klinik des Kantonsspitals.

¹⁾ Diss. Rostock 1894.

²⁾ Ann. chim. e farmacol. **21**, 241 (1894).

³⁾ A. **65**, 335 (1848).

⁴⁾ J. Biol. Chem. **93**, 283 (1931).