

22. Über eine Mikrobestimmung des Oxyprolins in Blut und Harn; Beeinflussung des Oxyprolin-Gehaltes durch Verabreichung von Prolin

von O. Wiss.

(15. XII. 48.)

*K. Lang*¹⁾ hat eine Mikrobestimmung des Oxyprolins angegeben, die auf der von *Langheld*²⁾ beschriebenen Reaktion zwischen Aminosäuren und Natriumhypochlorit beruht. Nach *Lang* entsteht auf diese Weise aus Oxyprolin Oxypyrrolin. *E. Waldschmidt-Leitz* und *S. Akabori*³⁾ haben jedoch durch Isolierung Pyrrol als Reaktionsprodukt nachgewiesen. Die Abtrennung des Pyrrols erfolgt durch Wasserdampfdestillation mit der von *Lang* (l. c.) angegebenen Apparatur, die quantitative Bestimmung nach Kondensation mit p-Dimethylaminobenzaldehyd oder Isatin auf kolorimetrischem Wege. Im Gegensatz zu den Angaben von *Lang* ist die Bestimmung des Oxyprolins nach *Waldschmidt-Leitz* auch bei Verwendung von p-Dimethylaminobenzaldehyd gegenüber Prolin spezifisch. Eine Modifikation der beschriebenen Methode wurde von *McFarlane* und *Guest*⁴⁾ ausgearbeitet; das Oxyprolin wird mit Wasserstoffsuperoxyd in Pyrrol umgewandelt, das Pyrrol nach Kondensation mit Isatin photometrisch bestimmt. Es hat sich gezeigt, dass diese Methoden in der beschriebenen Form zur Bestimmung des freien Oxyprolins in Blut und Harn zu unempfindlich sind. Wir haben deshalb die von *Lang* angegebene, von *Waldschmidt-Leitz* verbesserte Methode so modifiziert, dass das freie Oxyprolin in Blut und Harn sich einfach bestimmen lässt.

Durch Fütterung von mit Isotopen markiertem Prolin wurde festgestellt, dass der Stoffwechsel des Prolins mit demjenigen des Oxyprolins in Beziehung steht. Ein Teil des so zugeführten isotopen Stickstoffes konnte aus dem Oxyprolin des Körpereweisses isoliert werden⁵⁾. Es war deshalb von Interesse festzustellen, wie der Oxyprolingehalt des Blutes und die Ausscheidung im Harn durch Verabreichung von Prolin beeinflusst werden.

¹⁾ *K. Lang*, Z. physiol. Ch. **219**, 148 (1933).

²⁾ *K. Langheld*, B. **42**, 2360 (1909).

³⁾ *E. Waldschmidt-Leitz* und *S. Akabori*, Z. physiol. Ch. **224**, 187 (1934).

⁴⁾ *McFarlane* und *Guest*, Canad. J. Research. Sec. B. **17**, 413 (1939).

⁵⁾ *M. R. Stetten* und *R. Schoenheimer*, J. Biol. Chem. **153**, 113 (1944).

Experimenteller Teil.Reagenzien¹⁾ und Apparate.

a) Reagenzien:

Natriumcarbonatlösung: 10-proz.

Hypochloritlösung: 8 g NaOH + 16 cm³ H₂O + 60 g Eis. Einleiten von Chlor bis zu einer Gewichtszunahme von 7,1 g; mit Wasser auf 100 cm³ auffüllen; Lösung in dunkler Flasche im Eisschrank aufbewahren.Natriumglutaminatlösung: 10 g Glutaminsäure + 67,5 cm³ n. NaOH + Wasser ad 100 cm³.

p-Dimethylaminobenzaldehydlösung: 2,5-proz. in Alkohol.

Salzsäure: 22,5-proz.

b) Apparate:

Anstelle der von *Lang* angegebenen Apparatur verwendeten wir zur Destillation einen durch Schliff mit absteigendem Kühler verbundenen Rundkolben von 50 cm³ Inhalt.Die Intensität des Farbstoffes wurde mit dem *Pulfrich*-Stufenphotometer gemessen; die Absorptionsspektren wurden mit dem *Beckman*-Spektrographen aufgenommen.

Durchführung der Bestimmung.

4,5 cm³ Analyse, die einen Gehalt von ca. 2—6 γ Oxyprolin enthalten soll, wird im Rundkolben unter Eiskühlung mit 0,5 cm³ Natriumcarbonatlösung und 0,5 cm³ eiskalter Natriumhypochloritlösung versetzt, gut gemischt und während 3 Minuten in der Kälte stehen gelassen. Nach Zusatz von 1,5 cm³ Natriumglutaminatlösung und einer Spatelspitze Bimssteinpulver wird der Kolben an den Kühler angeschlossen, der Inhalt auf dem Luftbad zum Sieden erhitzt und bis zur Trockne in ein graduiertes Röhrchen von ca. 15 cm³ Inhalt destilliert. Die Destillation soll vom Zeitpunkt des Siedens an nach 10 Minuten beendet sein. Die Flamme muss nach Trocknung des Rückstandes sofort entfernt werden; bei Überhitzung zersetzt sich die Glutaminsäure unter Bildung von grossen Mengen Pyrrol. Der Inhalt der Vorlage wird mit Wasser auf 7 cm³ aufgefüllt. Nach Zusatz von 2 cm³ p-Dimethylaminobenzaldehydlösung und 1 cm³ Salzsäure bildet sich der unbeständige Farbstoff. Da die Intensität des Farbstoffes sehr rasch ein Maximum erreicht, aber rasch wieder abnimmt, wird genau nach 2 Minuten gemessen. Es werden 3 cm-Küvetten und Filter S 53 verwendet.

Eichkurve.

Ansätze von je 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 und 8 γ Oxyprolingehalt werden nach obiger Vorschrift behandelt und ergeben die folgende Eichkurve.

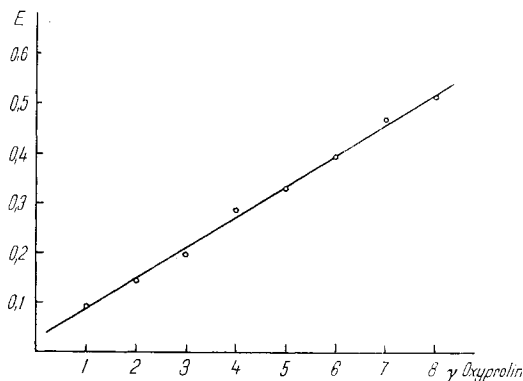


Fig. 1.

¹⁾ Nach Angaben von *Lang* und *Waldschmidt-Leitz* (l. c.).

Spezifität.

In Übereinstimmung mit den Angaben von *Waldschmidt-Leitz* konnte festgestellt werden, dass reines Prolin, nach obiger Vorschrift behandelt, mit p-Dimethylaminobenzaldehyd keinen Farbstoff ergibt. Auch den Befund, dass Pyrrol als Reaktionsprodukt entsteht, konnten wir bestätigen: Äquimolare Mengen von Pyrrol und mit Natriumhypochlorit behandeltem Oxyprolin (5,11 γ Pyrrol und 10 γ Oxyprolin) wurden mit p-Dimethylaminobenzaldehyd kondensiert. Die Absorptionsspektren zeigen denselben Verlauf.

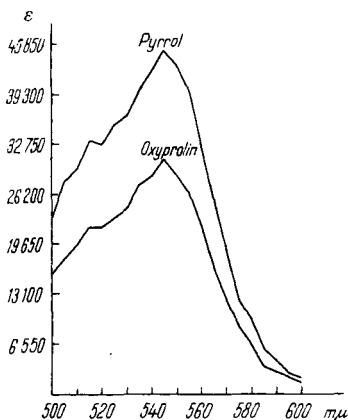


Fig. 2.

Aus dem Vergleich der Kurven ist weiterhin ersichtlich, dass aus Oxyprolin ca. 70% der theoretischen Menge Pyrrol gebildet werden.

Um den eventuellen Einfluss anderer Aminosäuren zu prüfen, wurde eine bekannte Menge Oxyprolin in einer Aminosäuremischung bestimmt. Die Zusammensetzung des Gemisches entsprach ungefähr einem Caseinhydrolysat. Es enthielt in 100 cm³ Lösung:

Glykokoll	100 mg
Alanin	280 mg
Serin	375 mg
Cystin	18 mg
Methionin	175 mg
Threonin	195 mg
Valin	350 mg
Leucin	605 mg
Isoleucin	325 mg
Arginin	205 mg
Lysin	345 mg
Asparaginsäure	315 mg
Glutaminsäure	1140 mg
Phenylalanin	260 mg
Tyrosin	320 mg
Histidin	125 mg
Prolin	410 mg
Oxyprolin	100 mg

Das Aminosäuregemisch wurde folgendermassen verdünnt: 1 cm³ auf 100 cm³, davon 1 cm³ auf 10 cm³. In 3 Parallelansätzen, in welchen je 2 cm³ der Lösung (ent-

sprechend 2 γ Oxyprolin) zur Bestimmung verwendet wurden, fanden wir 2,1 γ , 2 γ und 2,15 γ Oxyprolin. Es zeigt sich also, dass sich das Oxyprolin innerhalb der Fehlergrenze der Methode (maximale Abweichung ± 5 –10%) wieder nachweisen lässt.

Bestimmung des Oxyprolins in Blut und Harn.

Das Blut wird nach *Folin*¹⁾ mit Natriumwolframat und Schwefelsäure enteiwissst: 1 Teil Blut wird mit 2 Teilen Wasser haemolysiert und mit je 1 Teil Wolframat und Schwefelsäure versetzt. Bei hohem Oxyprolingehalt muss das enteiwissste Blut eventuell weiter verdünnt werden.

Im Harn wird Oxyprolin ohne besondere Vorbearbeitung, eventuell nach Verdünnung, bestimmt.

Normalwerte verschiedener Tierarten.

Der Gehalt an Oxyprolin im Blut bei Kaninchen, Meerschweinchen und Ratten ist bei gewöhnlicher Ernährung gering und schwankt innerhalb ziemlich weiter Grenzen.

Tabelle 1.

	Anzahl der Untersuchungen	Durchschnittlicher Oxyprolingehalt	Schwankungsbereich
Ratten	5	0,132 mg%	0,087–0,187 mg%
Meerschweinchen .	9	0,29 mg%	0,218–0,478 mg%
Kaninchen	7	0,171 mg%	0,075–0,264 mg%

Über die Beeinflussung des Oxyprolingehaltes durch verschiedene Ernährung berichten wir an anderer Stelle²⁾.

Beeinflussung des Oxyprolingehaltes im Blut und der Ausscheidung im Harn durch Verabreichung von Prolin.

21 Ratten von ca. 200 g Körpergewicht wurden je 100 mg Prolin in 5-proz. Lösung subcutan injiziert. Die Tiere wurden in verschiedenen Zeitabständen getötet und im Blut der Oxyprolingehalt bestimmt. Bei einer weiteren Gruppe wurde die Ausscheidung von Oxyprolin im 24 Stunden-Harn gemessen.

Tabelle 2.

Oxyprolingehalt in mg%, nach			
1/2 Stunde	1 Stunde	2 Stunden	4 Stunden
0,574	0,625	0,437	0,193
0,6	0,768	0,5	0,196
1,04	1,09	0,406	0,218
0,574	1,06	0,685	
	0,875	0,593	

¹⁾ *O. Folin* und *H. Wu*, *J. Biol. Chem.* **38**, 81 (1919); **41**, 367 (1920); *Laborat. Manual of biol. Chemistry*, S. 227, New York—London 1925.

²⁾ *O. Wiss*, *Helv.* **32**, 153 (1949).

Aus den Zahlen der Tabelle 2 geht hervor, dass schon nach $\frac{1}{2}$ Stunde der Oxyprolin-gehalt auf ein Mehrfaches der Normalwerte angestiegen ist und dass der Gehalt allmählich absinkt, so dass er nach 4 Stunden wieder im Bereich der Normalwerte liegt. Aus Tabelle 3 ist ersichtlich, dass auch die Ausscheidung von Oxyprolin im Harn erheblich zunimmt.

Tabelle 3.

Der Tagesharn wurde auf 20 cm³ mit Wasser verdünnt und ein aliquoter Teil zur Bestimmung verwendet.

Oxyprolinausscheidung im Tagesharn in γ	
unbehandelte Ratten	nach Injektion von Prolin
4,5	90
6,25	96
11,25	200
9,0	140

Zusammenfassung.

1. Es wird eine Methode beschrieben, die es ermöglicht, den Oxyprolinegehalt in kleinen Mengen Blut und Harn zu bestimmen.
2. Die Methode ist gegenüber den andern Aminosäuren spezifisch.
3. Durch Verabreichung von Prolin an Ratten steigt der Oxyprolinegehalt des Blutes an und die Ausscheidung im Harn nimmt zu.

Physiologisch-chemisches Institut der Universität Basel.

23. Untersuchungen über die freien Aminosäuren im Blute bei verschiedener Ernährung¹⁾.

II. Die entbehrlichen Aminosäuren

von O. Wiss

(15. XII. 48.)

In einer früheren Mitteilung²⁾ wurde über den Gehalt an freien essentiellen Aminosäuren im Blut und über dessen Beeinflussung durch verschiedene Ernährung berichtet. Es hat sich dabei gezeigt,

¹⁾ Teilweise vorgetragen an der 32. Tagung des Schweizerischen Vereins der Physiologen und Pharmakologen (31. Januar 1948 in Basel).

²⁾ *O. Wiss*, *Helv.* **31**, 2148 (1948).