

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
7. Jg., S. 404—426, September 1969

Aminosäuren-Analyse in der klinischen Chemie

VON A. NIEDERWIESER und H.-CH. CURTIUS

Medizinisch-Chemische Abteilung der Universitäts-Kinderklinik Zürich

(Direktor: Prof. Dr. A. Prader)

(Eingegangen am 9. Juni 1969)

Es werden die wichtigsten heute gebräuchlichen Methoden zur qualitativen, semiquantitativen und quantitativen Analyse von Aminosäuren in biologischem Material beschrieben.

Amino acid analysis in clinical chemistry

The foregoing paper describes the most important methods currently used for the qualitative, semi-quantitative and quantitative determination of amino acids in biological material.

Man kennt heute mehr als 60 angeborene Störungen des Aminosäure-Stoffwechsels (1—5). Davon wurden mehr als 40 erst in den vergangenen 10 Jahren mit Hilfe der modernen Techniken der Aminosäuren-Analyse entdeckt. Verschiedene der z. T. schweren Krankheiten, die sich in einer Hyperaminoacidurie äußern, haben Schwachsinn zur Folge und können sogar zum Tode führen.

Die Bedeutung einer sicheren Frühdiagnose ist groß, da bei verschiedenen Formen der Hyperaminoacidurie (z. B. Phenylketonurie) die Entwicklung des Schwachsinn vermindert werden kann, wenn von frühestem Säuglingsalter an die Aminosäure, die sich im Blut pathologisch anhäuft, von der Nahrung weitgehend ferngehalten wird. Die Erkennung einer Aminoacidurie ist aber auch dann noch wertvoll, wenn die Diagnose für eine wirksame Behandlung des betreffenden Individuums bereits zu spät ist: Die Ermittlung von Erbträgern (6), Familienberatung und schnellstmöglich einsetzende Behandlung von kranken Neugeborenen aus der betreffenden Familie können weiteres Leid vermeiden.

Eine primäre Hyperaminoacidurie betrifft meist nur eine oder wenige Aminosäuren. Sie wird durch einen Enzym-

oder Transportdefekt im Aminosäurestoffwechsel verursacht, der oft erblich ist. Man unterscheidet:

Überlauf-Hyperaminoacidurien, bei denen sich eine oder mehrere Aminosäuren im Urin anhäufen und deshalb als solche oder als ihre Abbauprodukte auch vermehrt im Urin ausgeschieden werden. Die einzelnen Aminosäuren weisen eine unterschiedliche renale Clearance auf; diese kann so groß sein, daß die pathologische Konzentrationserhöhung der betreffenden Substanz nur im Urin, aber nicht im Plasma nachweisbar ist (Hyperaminoacidurie „ohne Nierenschwelle“).

Renale Hyperaminoacidurien, bei denen infolge eines defekten tubulären Rückresorptionsmechanismus für bestimmte Aminosäuren ebenfalls eine Hyperaminoacidurie ohne Aminosäureanstieg im Blut vorliegt. Teilweise ist auch die intestinale Resorption der gleichen Aminosäuren gestört.

Während das äußere Erscheinungsbild dieser schweren Krankheiten zumeist wenig Charakteristika aufweist, gelingt die Diagnose in der Regel rasch durch eine Aminosäuren-Analyse von Urin und Serum.

Die große Zahl der bisher bekannt gewordenen Aminoacidurien (Tab. 1) darf nicht darüber hinwegtäuschen, daß die meisten dieser Krankheiten extrem selten be-

Tab. 1. Hyperaminoacidurien

Nr.	Aminosäure	Konzentration erhöht in			Krankheit	Typ*)	Symptome	Defekt	Therapie bzw. Diät arm an Zugabe von	Literatur
		Plasma	Urin	Stuhl						
1.	Alanin siehe 9b, 24 β-Alanin β-Aib, γ-Aib, Tau	+	+		Hyper-β-alaninämie	A	Schlafsucht, Krämpfe vermehrte γ-Abu im Gehirn	β-Alanin-amino-transferase (EC 2.6.1.18)		(7)
2.	β-Aminoisobuttersäure siehe auch 1.	+	+		β-Aminoisobuttersäureausscheidung	A	Kein a) genetischer Polymorphismus (hohe Ausscheidung) b) Index von Leberfunktion und Gewebekatabolismus	D-(--)-β-Aminoisobuttersäure	unnötig	(5)

γ-Aminoisobuttersäure siehe 1
Arginin siehe 6, 14a—c

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Nr.	Aminosäure	Konzentration erhöht in			Krankheit	Typ*)	Symptome	Defekt	Therapie bzw. Diät		Literatur
		Plasma	Urin	Stuhl					arm an	Zugabe von	
3.	Argininobbernsteinsäure Cit	+	+	(+)	Argininobbernsteinsäureurie (Harnstoffcycluskrankheit)	A	Schwachsinn, Trichorhexis nodosa (brüchiges Haar) Krämpfe, Hyperammonämie, NH ₃ - Intoxikation	Argininosuccinat- lyase (EC 4.3.2.1*)	Protein		(8, 9)
4.	Citrullin siehe auch 3.	+	+		Citrullinämie, Citrullinurie (Harnstoffcycluskrankheit)	A	Erbrechen, Krämpfe, Hyperammonämie, Hepatomegalie, Schwachsinn	Argininobbernsteinsäure-Syn- thetase (EC 6.3.4.5)	Protein		(10, 11)
5.	Cystathionin	+	+		Cystathioninurie	A	Schwachsinn, Hypophysen- Psychosen, krankheit, Thrombopenie, Nierensteine	Mangelhafte Bindung von Pyridoxalphos- phat an Cysta- thionase (EC 4.2.1.15)		viel Pyri- doxal- phosphat	(12—14)
6.	Cystin Arg, Lys, Orn (sonst keine Amino- säuren vermehrt!) siehe auch 14c, 26		+	+	Cystinurie	B	Cystinsteine	Diaminomonocarboxyl- und Cystin-Trans- portsystem		D-Penicil- amin, viel Flüssigkeit, Alkali	
7a.	Glycin	+	+		Nichtketotische Hyperglycinämie	A	Schwachsinn, Apathie, Coma	Glycin-, Oxi- dase ¹¹ oder Glycin-Trans- aminase (EC 2.6.1.4)	Protein		(10, 20, 20a)
7b.	Glycin	+	+		Ketotische Hy- perglycinämie	A	massive Ketose, Erbrechen, Neutropenie, Thrombocyto- penie, Apathie, Coma, Hypo- gammaglobu- linämie, Schwachsinn u. Tod	?	Protein		(20—23)
7c.	Glycin		+	?	Hyperglycinurie De Vries-Typ	B	Calciumoxalat- steine, offenbar Vererbung	Transportsystem			(24, 25)
7d.	Glycin Phosphat		+		Dent-Typ	B	Vitamin D-re- sistente Rachitis	nichtkompetive Transport- hemmung			(26, 25)
7e.	Glycin Phosphat, Glucose		+		Scriver-Typ						(27)
7f.	Glycin Glucose		+		Kaaser-Typ		Dominante Ver- erbung, keine Symptome				(28, 25)
7g.	Glycin Pro siehe auch 12, 17a—c	(+) +	+			B	Hereditäre Taub- heit, Nephro- pathie, Hyper- prolinämie				(28a)
8.	Glutamin NH ₃ siehe auch 14a, b	+	+	(+)	Hyperammon- ämie (Harn- stoffcyclus- krankheit)	A	Erbrechen, Hepatomega- lie, Schwach- sinn	a) Carbamyl- phosphat-Syn- thetase (EC 2.7.2.5) b) Ornithin-carba- moyltransferase (EC 2.1.3.3)	Protein		(29, 30)
9a.	Histidin	+	+		Hyperhistidin- ämie	A	Sprachstörung, manchmal Schwachsinn	Histidase (EC 4.3.1.3)	Histidin		(31—35)
9b.	Histidin Ala	+			Hyperhistidin- ämie	A	wie 9a	Histidase (EC 4.3.1.3)	Histidin		(36)
9c.	Histidin Methylhistidin, Carno- sin, Anserin		+		Sonderform der juvenilen Idiotie		Schwachsinn, Krämpfe, Er- blindung, Ce- rebromaculare Degeneration				(37—39)
	Homoarginin siehe 14b										
10.	Homocystin 5-Adenosyl-homo- cystein, Homolan- thionin		+	+	Homocystinurie	A	Ectopia lentis, Schwachsinn, schlaflige Liga- mente, Arach- nodactylie, ge- rötete Wangen, blonde Haare, Linsen- luxation, Thromboembo- lische Phäno- mene	Cystathionin- Synthetase (EC 4.2.1.13)	Met	Cystin	(40—46)
	Methionin Homocystein	+	+	(+)							

Tabelle I (Fortsetzung)

Nr.	Aminosäure	Konzentration erhöht in			Krankheit	Typ*)	Symptome	Defekt	Therapie bzw. Diät arin an Zugabe von	Literatur
		Plasma	Urin	Schweiß						
11.	α -Hydroxybuttersäure Met, Ile, Leu, Val	+	+	+	Methionin-Malabsorption	D	ähnlich Osthouse Urin-Krankheit, Hyperphosphatämie, Geruch, Diarrhoe	Intestinales Transportsystem, bakterielle Entstehung von α -Hydroxybuttersäure aus Met	Met	(5, 47)
12.	Hydroxyprolin Gly, Pro siehe auch 17a-c Isoleucin siehe 12, 13, 20d	+	+	(+)	Hydroxyprolinämie	A	Schwachsinn, Mikrohämaturie	Hydroxyprolin-, Oxidase**		(48, 49)
13.	Leucin Ile, allo-Ile, Val siehe auch 11, 20d	+	+	+	Verzweigketten-Ketoacidurie (Atromstrup-Krankheit)	A	I. schwere Form bei Neugeborenen, Apnoe, Anfälle, Spastizität, Uringeruch nach Karamell II. intermittierende Form (I Fall): verzögerte geistige und motorische Entwicklung	α -Ketosäure-Dehydrogenase der verzweigten Aminosäuren fehlt völlig (EC 4.1.1.1) nur 10-20% des obigen Enzyms vorhanden	Leu, Ile, Val	(50-54) (54a)
14a.	Lysin, (Gln) Arg, Orn	+	+	+	Hyperlysinämie I kongenitale Lysin-Intoleranz	A	Intermittierende Hyperammonämie in Abhängigkeit von Diät	?	Protein	(55-58)
14b.	Lysin Orn, Arg Gln Homoarg	+	+	+	Hyperlysinämie II	A	Schwachsinn, Muskelhypotonie, Schübe von Lethargie und Pankreatitis	?	Lys	(57-59)
14c.	Lysin Orn, Arg siehe auch 6	+	+	+	Dianthioninocarbonyl- α -Aminoacidurie	D	Zwergwuchs, dominante Vererbung	Transportsystem (Cystintransport jedoch normal)		(204)
15.	Methionin (Tyr) siehe auch 11, 20c, d Ornithin siehe 6, 14 a-c	+	+	+	Hypermethioninämie	A	gewöhnlich als Folge akuter Lebererkrankung	?	Lebererkrankung behandeln	(6)
16a.	Phenylalanin	+	+	+	Phenylketonurie	A	Schwachsinn, Krämpfe, Ekzeme, blonde Haare, Mäusegeruch von Urin und Körper	Phenylalanin-4-Hydroxylase (EC 1.14.3.1)	Phenylalanin	(60-63)
16b.	Phenylalanin siehe auch 20d	+	+	+	Hyperphenylalaninämie	A	FeCl ₃ -Probe neg. Normale Kinder?	?		(64, 63)
17a.	Prolin Gly, Hydro	+	+	+	Hyperprolinämie I	A	Unklare Zusammenhang mit hereditärer Nephropathie	L-Prolin-Oxidase		(65-67, 49)
17b.	Prolin	+	+	+	Hyperprolinämie II	A	Schwachsinn und Krämpfe	vermutlich α -Pyrrolin-5-carboxy-Dehydrogenase (EC 1.5.1.2)		(49)
17c.	Prolin Gly, Hydro siehe auch 12	+	+	?	Iminoglycinurie (Josephs Syndrom bei Neugeborenen)	B	Krämpfe bei Neugeborenen und vermehrtes Protein im Liquor, bei Älteren keine besonderen Symptome außer Aminoacidurie	Transportsystem		(68, 49, 67)
18.	Sarcosin Athanolamin Taurin siehe 1 Theonin siehe 20	+	+	+	Sarcosinämie	A	Muskelhypotonie	Sarcosin-Oxidase (EC 1.5.3.1)		(69)
19a.	Tryptophan Indolderivate	+	+	+	Blue Diaper syndrome	D	Hypercalcämie, (wahrscheinlich autosomales rezessives Gen)	Intestinales Transportsystem		(70)

Tabelle I (Fortsetzung)

Nr.	Aminosäure	Konzentration erhöht in			Krankheit	Typ*)	Symptome	Defekt	Therapie bzw. Diät arni an Zugabe von	Literatur
		Plasma	Urin	Stuhl						
19b.	Tryptophan	+			Hypertryptophanämie	A	Zwergwuchs, Schwachsinn, Lichtempfindlichkeit, Ataxie	? Tryptophan-Pyrrolase oder Pörnylase	? Nicotinamid	(69a)
20a.	Tyrosin	+	+		Tyrosinose	A	Tyrosylurie, Myasthenia gravis (1 Fall bekannt)	Tyrosin-Transaminase? (EC 2.6.1.5)		(70—72, 5)
20b.	Tyrosin	+	+		Hypertyrosinämie I bei Frühgeburten (Tyrosylurie)	A	Tyrosylurie, in schweren Fällen ZNS-Depression	Parahydroxyphenylbrenztraubensäure-Oxidase ist teilweise inaktiv	Ascorbinsäure	(73—75, 72)
20c.	Tyrosin (und Met) Tyrosylverbindungen	+	+		Hypertyrosinämie II (erblich)	A	Lebercirrhose, Rachitis, Schwachsinn, Babers Syndrom bei älteren Kindern	Parahydroxyphenylbrenztraubensäure-Oxidase	Tyrosin Phe	(76, 77, 71, 72)
20d.	Tyrosin Ile, Leu, Met, Phe, Val siehe auch 15	+	+		Hypertyrosinämie III „Oast-House“ Urin-Krankheit	A	Schwachsinn, Krämpfe, Ödeme, weiße Haare, Geruch	vielleicht wie Typ II		(47, 78)
21.	Valin siehe auch 11, 13, 20d	+	+		Hypervalinämie	A	Erbrechen, Reizbarkeit, Schwachsinn	Valin- α -Ketoisovaleriansäure-Transaminase (Leukozyten)	Val	(78a, 5)
22.	Monoamino-monocarboxyl- α -Aminoacidurie		+	+	Hartnup-Krankheit	B	zeitweilig pellagraähnliche Zustände mit Psychosen, Ataxie, Schwachsinn	Transportsystem, unvollständige Resorption, auch im Jejunum	Nicotinamid	(79, 80)
23.	Allgemeine Aminoacidurie	—	+		Panconi-Syndrom	B	Kombinationen mit Glycosurie, Hypophosphaturie, Osteomalacie (meist mit chronischer Acidosis), Hypokaliämie, Hypouricämie	erworbene Abnormität z. B. durch Tetracycline, Schwermetalle, Salicylate, Vitamin-D-Mangel	frühzeitige Beseitigung des Toxins bzw. Behebung des Mangels	(81—83)
24.	Allgemeine Aminoacidurie (vor allem Ala, Gly, Ser, Thr, Glu, Val) Galaktose		+		Hereditäre Galaktosämie	B	Schwachsinn, Katarakt, Gelbsucht	nichtkompetitive Transporthemmung	Galaktose	(84—86)
25.	Allgemeine Aminoacidurie Phosphat		+		Oculocerebrorenales Syndrom	B	Renale Tubuläre Acidose, Hypotonie, Schwachsinn	nichtkompetitive Transporthemmung Defekt in NH_4 -Synthese		(5)
26.	Allgemeine Aminoacidurie hes. (Cys), Thr		+		Hepatoentzündliche Degeneration Wilson'sche Krankheit	B	Lebercirrhose, Tremor, Kayser-Fleischer Ringe, Kupferablagerung im Gewebe	? vermindertes Coeruloplasmin, Nierenschädigung verantwortlich für Aminoacidurie	Penicillamin	(87, 88)
27.	Alle Plasmaamino-säuren		+		Cystinose	B	Vitamin-D-resistente Rachitis, Zwergwuchs, Acidosis, Dehydratation, meist tödlich			(82, 80, 18)

*) A: Überlauf-Aminoacidurie mit normaler tubulärer Reabsorption.
B: Renale Hyperaminoacidurie, verringerte tubuläre Reabsorption.

merkt werden. Es ist aber anzunehmen, daß sich dieses Bild ändert, wenn in der Zukunft alle Neugeborenen auf Aminoacidurien untersucht werden. Wahrscheinlich sterben heute noch viele Säuglinge an unerkannten Aminosäure-Stoffwechselstörungen. Bereits in mehreren Ländern sind Ansätze vorhanden, Neugeborene routinemäßig auf solche Stoffwechsellanomalien zu untersuchen;

vgl. z. B. (90—93). Um den Aufwand für diese Analysen erträglich zu halten, werden zunächst einfache und preiswerte Screening-Tests angewendet. Ein positives Ergebnis dieser Tests (94) muß in der Regel durch eine quantitative Aminosäuren-Analyse überprüft werden. Um falsch-negative Resultate zu vermeiden, sollten Proben von Neugeborenen erst nach 3—5-tägiger Pflü-

terung mit Milch gesammelt werden. Physiologische Faktoren, welche die Interpretation von Screening-Tests beeinflussen, wurden u. a. von SCRIVER diskutiert (95). Weitere Anwendungsgebiete der Aminosäuren-Analyse betreffen z. B. Jodaminosäuren, die in Zusammenhang mit Schilddrüsenerkrankungen zunehmendes Interesse finden (siehe auch unter III), Kollagenstoffwechselstörungen und Kontrollen bei lang dauernder parenteraler Ernährung.

1. Orientierende chemische Urinproben auf Stoffwechselstörungen

Zur groben Auslese des Untersuchungsmaterials stehen zahlreiche Tests zur Verfügung (vgl. z. B. 3, 96—98), die aber alle unspezifisch sind und für eine endgültige Diagnose nicht ausreichen. In unserem Laboratorium werden u. a. folgende Proben durchgeführt:

Dinitrophenylhydrazin-Probe auf Ketonkörper

Positiv bei Ahorn-Sirup-Krankheit, Phenylketonurie, Histidinämie. Schwach positiv bei Acetonausscheidung, gelegentlich auch beim Lowe-Syndrom.

1 ml/ frischen, klaren Urin (evtl. Trübung und Färbung durch Zusatz von etwas Kieselgur und Zentrifugation beseitigen), mischen mit 1 ml/ Reagens (2 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 1/ 2N HCl). Das Gemisch 30 Min. bei Zimmertemperatur (evtl. kurz erwärmen) stehenlassen. Die Probe ist positiv, wenn eine gelbe Trübung oder ein Niederschlag auftritt. (Ein durch Aceton erzeugter Niederschlag löst sich durch kurzes Aufkochen.)

Eisenchlorid-Probe

Grüne Farbe bei Phenylketonurie und Histidinämie. Falsch-positive Resultate werden von Salicylaten und anderen Medikamenten erhalten. Windeltest (Reagens auf feuchte Windel tropfen) ist möglich.

Zu 1 ml/ frischem, klarem Urin langsam 6—10 Tropfen 10proz. Eisen-[III]-chloridlösung in 1N HCl geben. Phenylbrenztraubensäure, *p*-Hydroxyphenylbrenztraubensäure, Imidazolbrenztraubensäure geben sofort eine Grünfärbung. Die Farbe erreicht nach etwa 1 Min. ihr Maximum und wird in kurzer Zeit wieder gelb. Phenistix der Firma Ames beruhen auf demselben Prinzip.

Nitroprussid-Probe (BRAND-MEYER) auf Cystin und Homocystin

Positiv bei Cystinurie, Homocystinurie und massiven allgemeinen Aminoacidurien.

Zu 5 Teilen Urin gibt man 1 Teil 5proz. wäbr. Natriumcyanid-Lösung (Vorsicht: schweres Gift!) und läßt 10 Min. stehen. Man fügt dann einige Tropfen einer frisch hergestellten 1proz. wäbr. Natriumnitroprussid-Lösung (hellrot) zu. Positiv bei Purpurfärbung des Urins, die längere Zeit bestehenbleibt, während ein falsch-positives Resultat schnell in Braun umschlägt.

Nitroprussid-Probe nach BARBER auf Homocystin

Bei positivem Nitroprussid-Test wird der folgende Doppel-Test zur Unterscheidung von Cystin und Homocystin angewendet:

a) 5 ml/ Urin werden mit festem NaCl gesättigt. Man gibt 0,5 ml/ einer Lösung von 1proz. Silbernitrat in 3proz. Ammoniak zu, mischt und läßt 1 Min. stehen. Man gibt 0,5 ml/ einer frisch hergestellten 1proz. Natriumnitroprussid-Lösung zu und dann 0,5 ml/ 0,7proz. Natriumcyanid-Lösung (Vorsicht: Gift!).

b) genau wie unter a), jedoch verwendet man 3proz. Ammoniaklösung anstelle von ammoniakalischer Silbernitrat-Lösung. Sofortige Rotfärbung der Probe a) bedeutet Homocystin. Eine langsame Reaktion beruht auf Cystin oder einer anderen Verbindung. Eine Reaktion in Probe b) wird nicht von Homocystin verursacht.

α -Nitroso- β -naphthol-Test auf Tyrosylurie

Positive Reaktion durch *p*-Hydroxyphenylbrenztraubensäure, *p*-Hydroxyphenylmilchsäure, *p*-Hydroxyphenyl-essigsäure. Negativ mit *o*-Hydroxyphenyl-essigsäure sowie mit Tyrosin.

1 ml/ 2,6N Salpetersäure, 1 Tropfen 2,5proz. wäbr. Natriumnitritlösung, 10 Tropfen 0,1proz. α -Nitroso- β -naphthol in 95proz. Äthanol und 3 Tropfen Urin werden gemischt und 2—3 Min. stehengelassen. Positiv bei orange/rot-Färbung.

II. Mikrobiologische Screening-Tests

Mikrobiologische Verfahren gestatten es, eine einzelne Aminosäure gleichzeitig in einer großen Reihe von Proben zu bestimmen. Pro Arbeitskraft können bis zu 100 Proben in einem Ansatz bearbeitet werden. Solche Tests sind daher im allgemeinen billig und eignen sich zur Massenuntersuchung. Die größte Verbreitung fand der *Agardiffusionstest nach GUTHRIE und SUSI* (99, 100). Dieser semiquantitative Test wird in großem Umfang zur Früherkennung der Phenylketonurie, Homocystinurie und Verzweigketten-Ketoacidurie (Ahorn-Sirup-Krankheit) eingesetzt. Als Probe dient ein mit dem zu testenden Blut getränktes Filterpapier, das in getrocknetem Zustand aufbewahrt und zur Untersuchung an ein Zentrallabor geschickt werden kann.

Aus der getränkten Papierzone werden kleine Scheibchen (Testblättchen) gestanzt, sterilisiert und auf die Oberfläche einer dünnen Agar-Agar-Schicht, die ein Minimal-Nährmedium nach DEMAIN, einen für die zu bestimmende Aminosäure spezifischen Antimetaboliten sowie Bakteriensporen enthält. Beim Bebrüten können nur dort Bakterien wachsen, wo die Wachstumshemmung des Antimetaboliten durch die aus dem Testblättchen herausdiffundierte Aminosäure aufgehoben wird. Der Durchmesser des sich bildenden Wachstumshofs ist bei standardisierter Durchführung ein Maß für die Konzentration der betreffenden Aminosäure im Blut. Zur Bestimmung von Phenylalanin, Homocystin und Leucin dient als Antimetabolit β (2-Thienyl)alanin bzw. L-Methionin-DL-sulfoximin bzw. Methylleucin (über Aminosäuren-Antagonisten siehe MEISTER (100a)). Es kommen Sporen z. B. von *Bacillus subtilis* 6633 ATCC zur Anwendung. Als Standard dient eine Reihe von Testblättchen, die mit Blut von zunehmender Aminosäurekonzentration getränkt sind.

Über quantitative mikrobiologische Aminosäurebestimmungen siehe unter IV.

III. Qualitative und semiquantitative elektrophoretische und chromatographische Verfahren¹⁾

Im Hinblick auf die zahlreichen möglichen Formen von Aminosäurestoffwechselstörungen (siehe Tab. 1) ist es

¹⁾ Vgl. die Übersicht von PATAKI, diese Z. 2, 129 (1964).



BEHRINGWERKE AG
MARBURG-LAHN

S. Behring

PTT-Reagenz

Reagenz zur Bestimmung
der partiellen Thromboplastin-Zeit

Einfacher Suchtest zur
präoperativen Diagnostik
von Gerinnungsstörungen



B65021



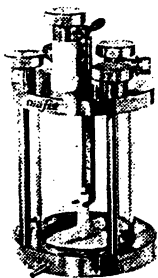
Für schnelle Konzentrierung, Reinigung und Fraktionierung von biologischen Flüssigkeiten

Diaflo®

MEMBRAN ULTRAFILTRATION

DIAFLO Membranen, in AMICON Ultrafiltrationszellen eingesetzt, konzentrieren verdünnte Proteinlösungen innerhalb kurzer Zeit 10 bis 1000-fach. Eine vollständige Beseitigung der Salze oder anderer kleiner Moleküle kann innerhalb der gleichen Zeit mittels Diafiltration erzielt werden.

DIAFLO Membranen verstopfen nicht und sind wieder verwendbar. Jeder Membrantyp besitzt eine bestimmte chemische Beständigkeit und charakteristische physikalische Eigenschaften. Alle Membranen sind nicht denaturierend und biologisch inert.



AMICON
ULTRAFILTRATIONS-
ZELLEN erlauben das
Arbeiten mit biologischen
Flüssigkeiten von
1 ML BIS ZU 20 LITERN

Amicon bietet ausserdem grössere industrielle Anlagen für kontinuierliche Verfahren.

amicon

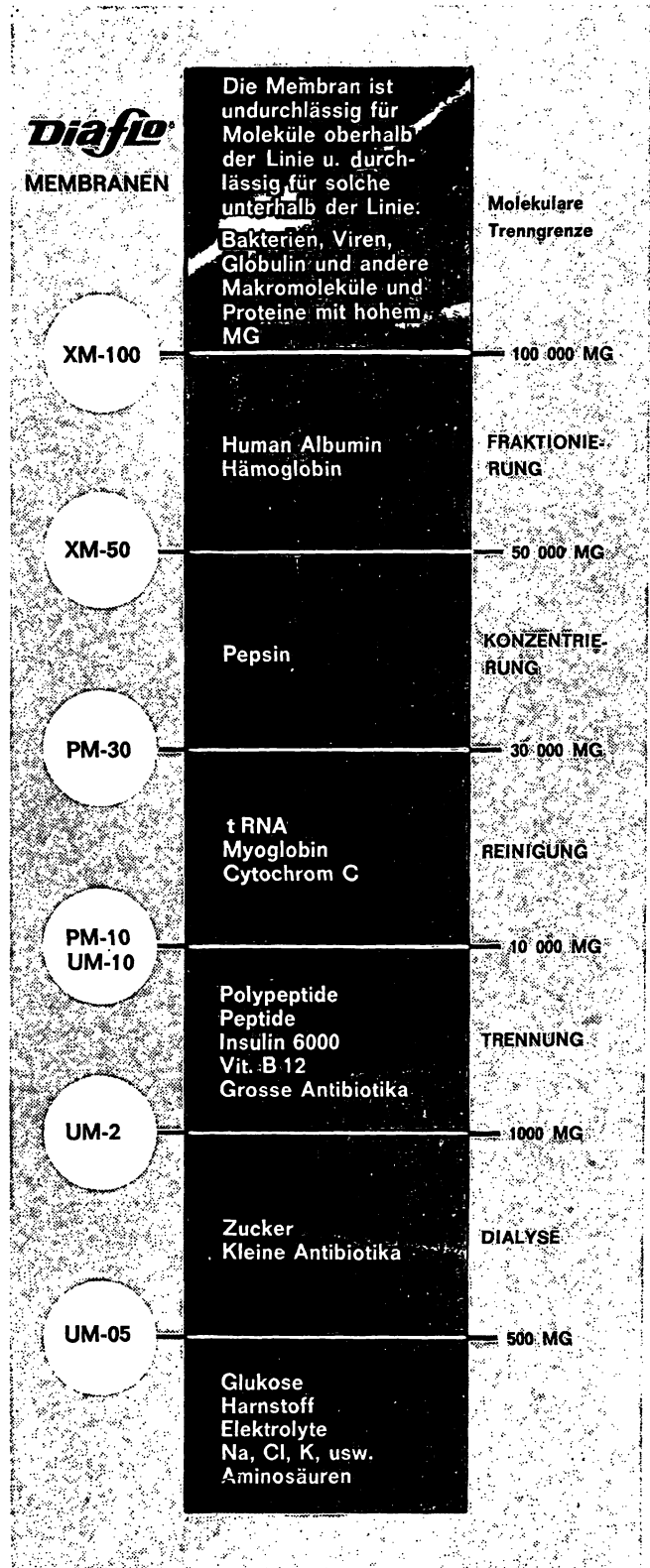
Abt.: 05

AMICON N.V.
In den U.S.A.:

Heemskerckstraat 43
27 Hartwell Ave.

DEN HAAG
Lexington

HOLLAND Ruf : (070) 642820
MASS. 02173



von Nachteil, daß die bisher genannten Tests nur auf eine einzige (Guthrie-Tests) oder auf wenige Aminosäuren spezifisch sind. Man kann damit zwar die zahlenmäßig häufigsten Aminoacidurien mit relativ geringem Aufwand erfassen, doch bleiben die selteneren Krankheiten unerkannt. Hingegen sind elektrophoretische und chromatographische Trennmethode in der Lage, jede nennenswerte Veränderung des normalen Aminosäuren-, „Spektrums“ zu erfassen. Da eine vollständige Trennung aller Komponenten und eine sichere Identifizierung zunächst nicht nötig ist, wurden bereits viele einfache und billige Screening-Verfahren auf dieser Basis ausgearbeitet. Diese Verfahren scheinen uns insofern einander weitgehend äquivalent zu sein, als sie gestatten, eine Unregelmäßigkeit irgendwelcher Art aufzudecken. Bei den relativ wenigen aus dem Rahmen fallenden Fällen ist eine genauere, wenn möglich sogar quantitative Analyse anzuschließen. Als Pionier auf diesem Gebiet wirkte zweifellos DENT (101—103), der sehr früh den Vorteil der Papierchromatographie zur Untersuchung von Aminosäuren im Urin erkannte. Fast alle chromatographischen Methoden wurden seitdem für solche

Zwecke verwendet. Im Falle von Urin wird zweckmäßigerweise zunächst α -Aminostickstoff oder Kreatinin bestimmt und ein auf den betreffenden Gehalt bezogenes Volumen zur Analyse eingesetzt.

Hochspannungs-Elektrophorese von Urin

Hochspannungs-Elektrophorese ist ein rasches Trennverfahren. Es eignet sich besonders zur Untersuchung von Aminosäuren im Urin, da die anwesenden Salze — im Gegensatz zur Chromatographie — in der Regel nicht stören. Eiweißhaltige Proben sollten vor der Analyse enteiweißt werden. Hochspannungs-Elektrophorese auf Papier wurde von zahlreichen Autoren eindimensional (z. B. (104—106)) und in Kombination mit Papierchromatographie (z. B. (105, 107—109)) verwendet. Für technische Details verweisen wir auf die hervorragende Übersicht von EFRON (110) sowie auf Handbücher (z. B. (111—113)). In unserem Laboratorium wird nach dem unten angegebenen Verfahren gearbeitet. Mit eindimensionaler Elektrophorese können bis zu 100 Analysen pro Tag von einer Person bewältigt werden. Zeigt sich auf dem eindimensionalen Pherogramm eine deutliche

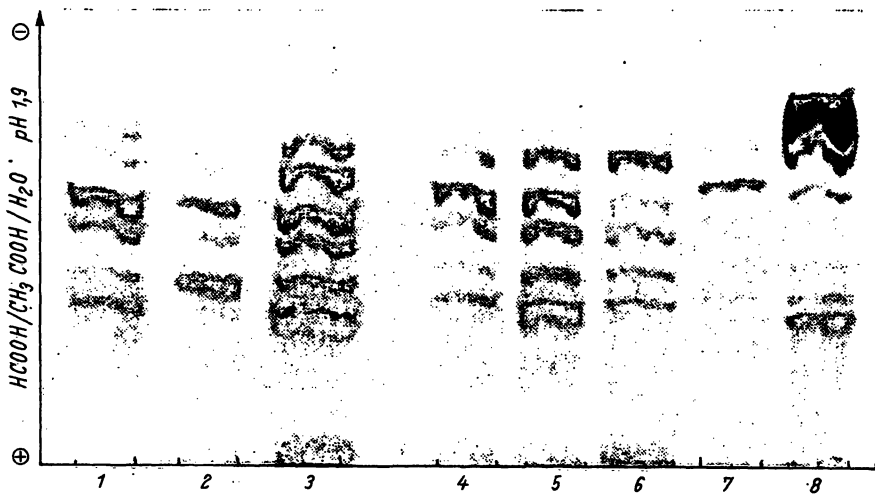


Abb. 1
Hochspannungselektrophorese von normalen und pathologischen Urinen auf Schleicher & Schüll Nr. 2043 b in Essigsäure/Ameisensäure/Wasser (26 + 120 + 854, v + v), pH 1,9 bei 100 V/cm (siehe Text).
1: Mischurin, 2 Wochen — 6 Monate;
2: Verzweigtketten-Ketoacidurie, 3 Monate;
3: Generelle Aminoacidurie, 6 Monate;
4: Mischurin, 2—5 Jahre;
5: Phenylketonurie, 3,5 Jahre;
6: Histidinämie, 2 Jahre;
7: Mischurin, 10—20 Jahre;
8: Cystinurie, 14 Jahre

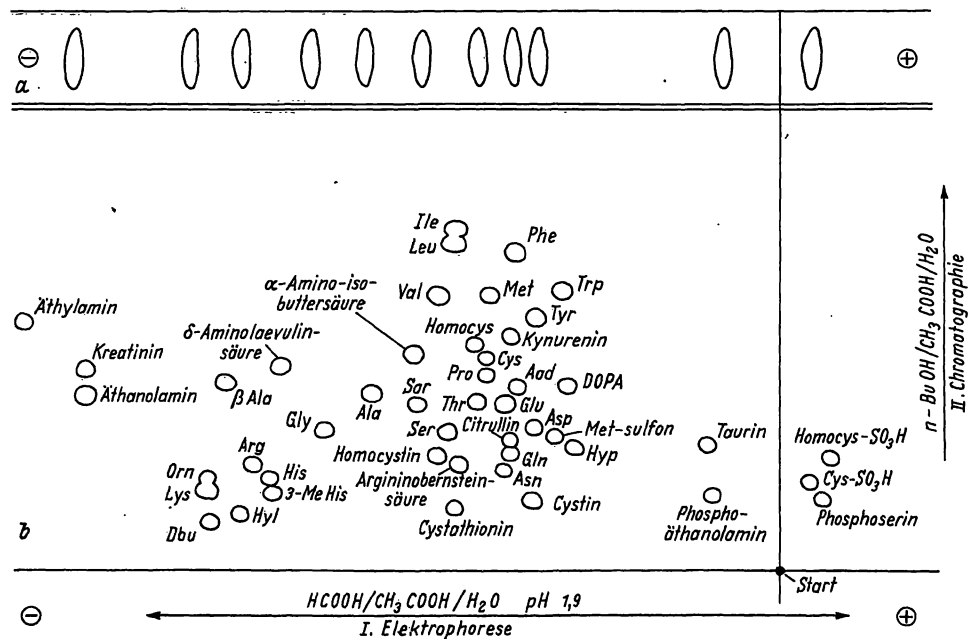


Abb. 2
Kombination von Hochspannungselektrophorese und Papierchromatographie. Fleckenmuster zur Identifizierung von Urinaminosäuren.
a) Elektrophorese allein (vgl. Abb. 1)
b) Kombination von Elektrophorese (vgl. a) und Papierchromatographie n-Butanol/Eisessig/Wasser (4 + 1 + 5, v + v).

Konzentrationserhöhung einer oder mehrerer Banden (Abb. 1), so kombinieren wir die Elektrophorese mit Papierchromatographie in der zweiten Dimension. Dies erlaubt eine weitgehende Identifizierung der betreffenden Komponente. Eine solche zweidimensionale Trennung ist in Abbildung 2 dargestellt.

Eindimensionales Pherogramm

Auf Schleicher & Schüll-Papier Nr. 2043 (20 × 40 cm), das mit Puffer pH 1,9 (120 ml/ Eisessig, 26 ml/ Ameisensäure ad 1000 ml/ mit dest. Wasser) getränkt ist, werden die Proben als 2 cm lange Streifen aufgetragen (10 cm vom schmalen, der Kathode zugewandten Seitenrand entfernt, in gegenseitigem Abstand von 1 cm). Das jeweils aufzutragende Volumen in μl ergibt sich aus

$$\frac{1500}{\text{mg}/100 \text{ m/Kreatinin}}$$

entsprechend einer Auftragsmenge von 1,5 μg Kreatinin. Als Standard wird je nach Altersklasse ein Mischurin mitaufgetragen (0—1; 1—5; 5—10 bzw. 10—20 Jahre). In einer Elektrophoreseapparatur der Firma Camag²⁾ wird 20 min bei 200 Watt (100 V/cm) im obigen Puffer pH 1,9 getrennt. Das Pherogramm wird 10 min bei 110° getrocknet, in Ninhydrin-Reagens nach MOFFAT und LYTLE [114] getaucht und 4 min auf 110° erwärmt. Es entstehen polychromatische Zonen, die aufgrund ihrer Position und Farbe identifiziert werden können. Das Ninhydrin-Reagens besteht aus:

Lösung I: 1 g Ninhydrin, 500 ml/ Äthanol abs., 100 ml/ Eisessig, 20 ml/ 2,4,6-Collidin.

Lösung II: 1% $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$ in abs. Alkohol. Unmittelbar vor Gebrauch werden 150 ml/ Lösung I mit 10 ml/ Lösung II gemischt.

Kombination von Elektrophorese mit Chromatographie

Zur Elektrophorese wird die Probe 10 cm vom schmalen, der Kathode zugewandten Seitenrand und 1 cm von einem langen Rand punktförmig sowie 15 cm vom langen Rand entfernt strichförmig (1 cm lang) aufgetragen. 17 cm vom langen Rand entfernt wird daneben Standard-Mischurin aufgetragen. Man trennt wie oben. Das getrocknete Pherogramm wird zu einem Zylinder gerollt, mit einer Plastikbüroklemme oben zusammengehalten, mit dem punktförmigen Startfleck nach unten in einen mit der oberen Phase des Fließmittels n-Butanol/Eisessig/Wasser (4 + 1 + 5 v + v) beschichteten Chromatographiertank gestellt, und 14 cm hoch chromatographiert (3—4 h). Das Chromatogramm wird getrocknet und wie oben gefärbt.

Papier- und Dünnschicht-Chromatographie

Die Pionierleistung von DENT auf dem Gebiet der Papierchromatographie (PC) von Aminosäuren im Urin (101—103) wurde bereits erwähnt. Seitdem wurden zahlreiche papierchromatographische Methoden zur Trennung von Aminosäuren in biologischen Flüssigkeiten ausgearbeitet. Eine Übersicht geben BIGWOOD und Mitarbeiter (115) und SMITH (116). Heute wird in der Regel die Dünnschichtchromatographie (DC) gegenüber der PC wegen ihrer Schnelligkeit, ihres größeren Trennvermögens und bequemerer Handhabung vorgezogen (vgl. BRENNER und Mitarbeiter (117) und PATAKI (118, 119)).

Urin und Serum enthalten beträchtliche Mengen an Fremdstoffen wie Salze bzw. Proteine, welche die PC oder die DC stören können, wenn die Aminosäuren in freier Form chromatographiert werden. Gewöhnlich

²⁾ Andere ebenso brauchbare Fabrikate sind erhältlich z. B. bei den Firmen L. Hormuth (Heidelberg-Wiesloch), Shandon (London).

müssen diese Störsubstanzen vor der Chromatographie durch Entsalzung bzw. Enteiweißung entfernt werden (siehe unten). Je nach der verwendeten Technik treten dabei z. T. beträchtliche Verluste von bestimmten Aminosäuren auf (120). Serumamino-säuren können aber auch ohne vorherige Enteiweißung chromatographiert werden (121). Störungen von Begleitsubstanzen sind besonders gering, wenn die Aminosäuren in Derivate umgewandelt und als solche chromatographiert werden. Dazu bieten sich in erster Linie die intensiv gelb gefärbten Dinitrophenylderivate an, die sich sehr leicht von Salzen und Proteinen extrahieren und ausgezeichnet chromatographieren lassen. Die Trennung als Dansyl-Derivate wurde ebenfalls versucht (122), doch ist diese Methode trotz der nahezu 100fach größeren Empfindlichkeit wegen Artefaktbildung (123) gegenwärtig nicht zu empfehlen.

Entfernung von Salzen, Proteinen und Kohlenhydraten

a) Nach HARRIS und Mitarbeitern (124) (Modifikation). Taurin, Cysteinsäure und Phosphoethanolamin gehen mit dem Waschwasser verloren.

Dowex 50-X 8 Ionenaustauscher (200—400 mesh) wird durch mehrmaliges aufeinanderfolgendes Waschen mit 1N NaOH, H_2O , 1N HCl, H_2O gründlich gereinigt, 5 cm hoch in eine Säule mit innerem \varnothing 6 mm gefüllt und mit H_2O gewaschen. Man läßt 1 ml/ der auf pH 2—2,5 angesäuerten Probe (Serum oder Plasma mit gleichem Volumen Wasser verdünnen!) durchlaufen und wäscht mit 3 ml/ 0,5N Essigsäure und 2 ml/ H_2O nach. Die Aminosäuren werden mit 2 ml/ 2N Ammoniak eluiert und das Eluat eingedampft. Man bestimmt den Kreatininhalt der ursprünglichen Probe und löst den Rückstand des Eluats in soviel ml/ H_2O , daß eine Kreatininkonzentration von 1 mg/ml/ entsteht.

b) Nach KRAFFCZYK und HELGER (125) auf einer Zweischichten-Dünnschichtplatte.

Diese Entsalzungsmethode ist besonders für Routine-zwecke geeignet. Man kann die Proben aber anschließend nur eindimensional chromatographieren. Ein Beispiel ist in Abbildung 3 wiedergegeben.

Stark saurer Ionenaustauscher, z. B. Dowex 50-X 8 400 mesh (< 60 μ) wird mit 1N Salzsäure, Wasser, Methanol und Äther gewaschen und an der Luft getrocknet. 5 g Austauscher und 45 g Cellulose für DC werden mit 180 ml/ einer 0,05proz. Carboxymethylcellulose in H_2O homogenisiert. 10 ml/ dieser Ionenaustauscher-Streichmasse werden neben 80 ml/ normaler Cellulose-Streichmasse (z. B. 50 g Cellulose SF + 200 ml/ H_2O) in ein geeignetes Mehrschichten-Streichgerät gefüllt und in 0,25 mm

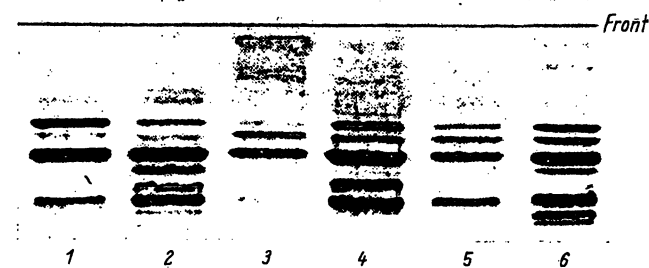


Abb. 3

Dünnschicht-Chromatogramm von Harnamino-säuren auf einer Zweischichtenplatte nach KRAFFCZYK und HELGER [125]. Die Entsalzung erfolgt am Start auf einem Schichtstreifen von saurem Ionenaustauscher, die Chromatographie erfolgt auf der anschließenden Cellulose-Schicht (siehe Text).

1: Fanconi-Syndrom; 2: Normalurin; 3: Verzweigtketten-Ketoacidurie; 4: Homocystinurie; 5: Normalurin; 6: behandelte PKU (Anmerkung: Nach unserer Meinung könnte Probe 1 Normalurin und Probe 2 Fanconi-Syndrom darstellen)

Tab. 2. Fließmittel zur Papier- und Dünnschicht-Chromatographie von Aminosäuren im Urin. a) und b) bezeichnen Fließmittelkombinationen für die zweidimensionale Technik

Fließmittel	DC PC	Schichtmaterial	Laufzeit (h)	Literatur
1. a) wassergesättigtes Phenol b) 2,6-Lutidin/Wasser (2 + 1)	+ z. B.	Whatman No. 1	15 8—15	DENT (102, 103)
2. a) Lutidin/Pyridin/n-Butanol/Wasser (8 + 7 + 7 + 13) b) Phenol/Wasser/10% NH ₃ (800 g + 200 g + 1 ml) Zusatz von 5 mg 8-Hydroxychinolin zu 1000 g als Stabilisator	+ Whatman No. 1		8—15 15	WADMAN und Mitarbeiter (128)
3. a) Butanol/CH ₃ COOH/H ₂ O (4 + 1 + 1 v + v) b) Phenol/H ₂ O (75 + 25 v + v)	+	Kieselgel G	1,5 2,5	BRENNER und NIEDERWIESER (129) OPIENSKA-BLAUTH und Mitarbeiter (130) und BARON und ECONOMIDIS (131)
4. a) CHCl ₃ /Methanol/17% NH ₃ (2 + 2 + 1 v + v) b) Phenol/H ₂ O (75 + 25 g + g)	+	Kieselgel G	1 2,5	BRENNER und Mitarbeiter (132) und ROKKONES (133)
5. a) Pyridin/Aceton/58% NH ₃ /Wasser (45 + 30 + 5 + 20 v + v) b) Isopropanol/Ameisensäure/Wasser (75 + 12,5 + 12,5 v + v)	+	Cellulose MN 300 (Macherey & Nagel)	1,5 2	WHITE (134)
6. a) Äthanol/Wasser (83 + 17) 3 × 8 cm hoch b) t-Butanol/Äthylmethylketon/conc. NH ₃ /H ₂ O/Diäthylamin (50 + 30 + 10 + 20 + 0,3 v + v)	+	Cellulose (Merck) Vorbeschichtete Platten	3 × 1 1,5	BREMER und Mitarbeiter (121)
7. a) Aceton/Eisessig/Wasser (70 + 10 + 20 v + v) 2 × 8 cm hoch b) Phenol/15% wäfr. Ameisensäure (75 g + 25 ml) 1 × 8 cm hoch	+	Cellulose (Merck) vorbeschichtete Platten	2 × 0,5 2	BREMER und Mitarbeiter (121)
8. 1. mit H ₂ O waschen 2. mit Methanol/conc. NH ₃ /H ₂ O (15 + 50 + 35) 2 × 1,5 cm über Ionenaus- taucher-Chromatographie 3. Butanol/Aceton/Eisessig/H ₂ O (35 + 35 + 10 + 20) 2 × 7,5 cm	+	Zweischichtenplatten: I: stark saurer Ionenaus- taucher II: Cellulose SF (Merck)		KRAFFCZYK und HELGER (125)
9. a) Pyridin/Aceton/conc. NH ₃ /Wasser (45 + 30 + 5 + 20 v + v) b) Isopropanol/HCOOH/H ₂ O (75 + 12,5 + 12,5 v + v)	+	Cellulose MN 300 (Macherey und Nagel)	1,5 2	WHITE (134)

dicker Schicht ausgestrichen (2—4 cm breiter Ionenaustauscherstreifen). Nach Trocknen bei 90° sind die Platten gebrauchsfertig zur Chromatographie: Man trägt auf dem Ionenaustauscherstreifen 2 µl Urin in einem 2 cm langen Strich auf (1,5 cm vom Plattenrand entfernt), chromatographiert mit H₂O in die Celluloseschicht bis zum oberen Plattenrand, trocknet die Schicht und eluiert die Aminosäuren durch DC in Methanol/Wasser/conc. Ammoniak (50 + 35 + 15 v + v) zweimal 1,5 cm weit über dem Austauscherstreifen in die Cellulose-Schicht. Nach Trocknung kann mit Fließmittel 8.3 (Tab. 2) chromatographiert werden.

Zweidimensionale Chromatographie von freien Aminosäuren

Die allgemeinen Techniken der PC und der DC sind in einschlägigen Handbüchern beschrieben (126, 116) bzw. (118, 119, 127). Zur Dünnschichtchromatographie trägt man in einer Ecke einer Dünnschichtplatte jeweils 1,5 cm von den Rändern entfernt 1 µl einer entsalzten Urinlösung entsprechend 1 µg Kreatinin oder 5 µl unteiweißtes Serum auf³⁾ und chromatographiert 10 cm weit in beiden Dimensionen. Bewährte Fließmittelkombinationen für die zweidimensionale PC und DC von Aminosäuren in biologischem Material sind in Tabelle 2 zusammengestellt; siehe aber auch (269). Die fertigen Chromatogramme werden 10 Min. bei 110° getrocknet und die Aminosäuren mit 0,2proz. Ninhydrin in n-Butanol/Eisessig (95 + 5 v + v) einfarbig oder besser mit dem Moffat-Lytle Reagens ((114) siehe S. 410) polychro-

matisch nachgewiesen. Die Identifizierung der Flecken erfolgt anhand eines Fleckenmusters, das durch Chromatographie einer Standardmischung erhalten wurde, sowie aufgrund der Fleckenfarbe. Abbildung 4 zeigt ein

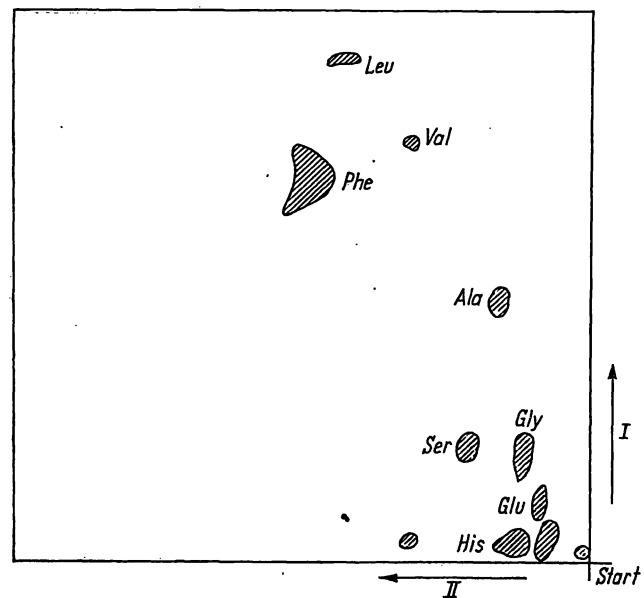


Abb. 4
Dünnschicht-Chromatogramm von Aminosäuren im Urin bei einer Phenylketonurie nach BREMER und Mitarbeiter (121)
Lauffrichtung I (3mal): Äthanol H₂O (83 + 10, v + v),
Lauffrichtung II: t-Butanol/Methyläthylketon/25% NH₃/H₂O/Diäthylamin (50 + 30 + 10 + 20 + 0,3, v + v)

³⁾ Die einfachen Microcap Mikropipetten eignen sich am besten für diesen Zweck. Erhältlich bei Drummond Scientific Company, Broomall, Pa, USA.

Tab. 3
Konzentration von freien Aminosäuren im Blutplasma und Serum von Neugeborenen und Erwachsenen in mg/100 ml^{*)}

	Neugeborene			Erwachsene				
	Mittelwert	Plasma ¹⁾ S ^{**})	Bereich	Mittelwert	Plasma ¹⁾ Bereich	Mittelwert	Serum ²⁾ S ^{**})	Bereich
Alanin	2,94	0,49	2,10—3,65	2,99	1,87—5,89	3,37	0,46	2,78—4,22
α -Aminobuttersäure	0,15	0,06	0,06—0,30	0,21	0,08—0,36	0,31	0,15	0,17—0,64
Arginin	0,94	0,30	0,38—1,53	1,30	0,37—2,40	1,86	0,45	1,01—2,29
Asparagin	(0,60)			(0,58)	0,54—0,65			
Asparaginsäure	0,11	0,05	bis 0,22	0,10	bis 0,32	0,48	0,14	0,27—0,67
Citrullin	0,28	0,09	0,15—0,50	0,53 ⁴⁾	0,21—0,97 ⁴⁾	0,89	0,24	0,68—1,23
Cystin	1,47	0,32	0,85—2,02	1,05	0,20—2,02	1,23	0,17	0,89—1,43
Glutamin	11,16	2,04	7,86—14,01	8,30 ⁴⁾	6,07—10,15 ⁴⁾			
Glutaminsäure	0,76	0,37	0,30—1,57	0,85	0,21—2,82	2,74	0,77	2,10—3,82
Glycin	2,58	0,52	1,68—3,86	1,78	0,90—4,16	1,87	0,27	1,54—2,16
Histidin	1,19	0,25	0,76—1,77	1,15	0,49—1,66	1,61	0,17	1,42—1,84
Isoleucin	0,52	0,11	0,35—0,69	0,83	0,48—1,28	0,88	0,16	0,63—1,23
Leucin	0,95	0,23	0,61—1,43	1,45	0,98—2,30	1,60	0,22	1,27—1,93
Lysin	2,93	0,67	1,67—3,93	2,24	1,21—3,48	2,73	0,43	2,22—3,32
Methionin	0,44	0,12	0,13—0,61	0,34	0,09—0,59	0,37	0,03	0,23—0,46
Ornithin	1,21	0,33	0,65—2,00	0,79	0,39—1,40	1,12	0,36	0,79—1,82
Phenylalanin	1,30	0,23	0,69—1,82	0,88	0,61—1,45	0,94	0,53	0,74—1,34
Prolin	2,13	0,38	1,23—3,19	2,12	1,17—3,87	1,82	0,61	0,83—3,50
Serin	1,72	0,36	0,99—2,55	1,18 ⁴⁾	0,68—2,03 ⁴⁾	1,59	0,37	1,30—2,31
Taurin	1,76	0,50	0,93—2,70	0,79	0,34—2,10			
Threonin	2,59	0,25	1,36—3,99	1,54	0,94—2,30	2,23	0,49	1,85—2,75
Tryptophan	0,65	0,35	bis 1,37	0,98 ⁴⁾	0,51—1,49 ⁴⁾	(1,22)		
Tyrosin	1,26	0,30	0,76—1,80	0,94	0,39—1,58	1,07	0,12	0,77—1,20
Valin	1,60	0,46	0,94—2,88	2,50	1,65—3,71	2,91	0,78	2,10—4,52

^{*)} Normalwerte weiterer Altersgruppen sind in unserem Labor in Vorbereitung.

^{**}) Standardabweichung.

¹⁾ Werte von 9 Knaben und 16 Mädchen nach HAMILTON aus (213).

²⁾ Daten aus 9 Laboratorien von 39 Männern und 37 Frauen, zusammengestellt von HAMILTON (213).

³⁾ Nüchternseren von 7 Normalpersonen, enteweiß mit 5% Salicylsäure, Daten nach BREUER und Mitarbeiter (249).

⁴⁾ Werte von 3 Männern und 5 Frauen nach HAMILTON aus (213).

Beispiel. Die Dünnschichtchromatographie kann auch mit Elektrophorese kombiniert werden (135—140), wobei eine besonders gute Trennung von sauren, neutralen und basischen Aminosäuren erreicht wird.

Chromatographie von Aminosäuren als DNP-Derivate

2,4-Dinitrophenyl-(DNP-)Derivate wurden von SANGER zur Bestimmung der N-terminalen Aminosäure in Proteinen eingeführt (141). Es zeigte sich, daß sich die DNP-Aminosäuren durch Papierchromatographie (142) und Dünnschichtchromatographie (143) ausgezeichnet trennen lassen. Durch bloße Extraktion kann man sie von Salzen und anderen wasserlöslichen Störsubstanzen ebenso wie von DNP-Aminen trennen. Während der Chromatographie kann man die intensiv gelben Farbstoffe mit bloßem Auge verfolgen. Wegen dieser günstigen Eigenschaften haben BRENNER und Mitarbeiter (144, 145) mit Erfolg versucht, Aminosäuren im Urin als DNP-Derivate durch DC nachzuweisen. Die Methode erwies sich auch in anderen Laboratorien erfolgreich (146—150a) und in bezug auf Trennwirkung und Empfindlichkeit den bisherigen Methoden überlegen (151, 149). Die Trennung von Aminosäuren beispielsweise im Blut (146), Sperma (152), Stuhl (in unserem Labor durchgeführt (153)) und im Meerwasser (hohe Salzkonzentration!) (154) zeigen den nahezu universellen Anwendungsbereich. Abbildung 5 zeigt die Trennung von Aminosäuren im Stuhl als DNP-Derivate. Leider eignet sich die bisherige Methode wenig für umfangreichere Routineuntersuchungen; ohne einen Extraktionsautomaten werden von einer Person nur etwa 20 Analysen pro Woche bewältigt.

Nachweis von Aminosäuren im Stuhl (153) und Urin (144, 149) als DNP-Derivate

Extraktion des Stuhls: Man versetzt 10 g frischen Stuhl mit 100 ml Wasser und homogenisiert die Mischung während 10 min. Man

zentrifugiert, dekantiert und wäscht das Zentrifugat mit 100 ml Wasser nach. Die vereinigten Extrakte werden filtriert und sofort weiterverarbeitet oder tiefgefroren.

Dinitrophenylierung von Stuhlextrakt: Man versetzt 20 ml Stuhlextrakt mit 5N NaOH bis zur schwachen Rosafärbung vom Phenolphthaleinpapier, mit 5 ml Puffer pH 8,8 (8,4 g NaHCO₃ in 100 ml Wasser lösen, mit 5N NaOH auf pH 8,8 einstellen) sowie mit 2 ml 10proz. Lösung von 2,4-Dinitrofluorbenzol in abs. Äthanol. Die Mischung wird in einer braunen Flasche im Wasserbad von 40° während 1 h geschüttelt, dann abgekühlt und 3mal mit je 10 ml Äther extrahiert (Extrakt verwerfen, enthält überschüssiges Reagens und DNP-Amine). Die wäbr. Lösung wird nun vorsichtig mit 6N HCl deutlich kongosauer gestellt (pH < 2) und 5mal mit je 10 ml Äther extrahiert. Die vereinigten Ätherextrakte werden über Na₂SO₄ sicc. getrocknet, filtriert und eingedampft. Dieser *Extrakt 1* enthält die „ätherlöslichen“ DNP-Aminosäuren. Er wird in 2 ml Aceton aufgenommen; davon werden 10 μ l zur DC aufgetragen.

Die noch gelb gefärbte wäbr. Lösung wird nun 5mal mit je 10 ml sek-Butanol/Essigester (1 + 1 v + v) extrahiert, die vereinigten Extrakte werden — in Abweichung von der Vorschrift (144, 153) — durch Zusatz von CaCl₂ getrocknet (Salzphase im Scheidetrichter abziehen), filtriert und eingedampft. Dieser *Extrakt 2* enthält die „säurelöslichen“ DNP-Aminosäuren. Er wird in 2 ml sek-Butanol/Essigester (1 + 1) aufgenommen; davon werden 40 μ l zur DC aufgetragen.

Dinitrophenylierung von Urin nach (144): Man versetzt 25 ml frischen Urin tropfenweise mit 5N NaOH bis zur schwachen Rosafärbung vom Phenolphthaleinpapier, filtriert durch einen trockenen Faltenfilter, versetzt 20 ml Filtrat mit 5 ml Puffer pH 8,8 und 2 ml 10proz. Dinitrofluorbenzol-Lösung in abs. Äthanol, und verfährt weiter wie oben bei Dinitrophenylierung von Stuhl beschrieben. Man trägt von Extrakt 1 und Extrakt 2 entsprechend 0,1—0,3 mg Kreatinin auf.

Zweidimensionale DC von DNP-Aminosäuren auf Kieselgel G (Merck):

Die ätherlöslichen DNP-Aminosäuren werden in der ersten Dimension 2mal chromatographiert in Toluol/2-Chloräthanol/Pyridin/25proz. Ammoniak (50 + 35 + 15 + 7 v + v) (144), Zwischentrocknung 10 min im Luftstrom. Trocknung nach der zweiten DC: 10 min Luftstrom, 10 min Trockenschrank bei 60°, 15 min Luftstrom. Danach folgt Chromatographie in der zweiten Dimen-

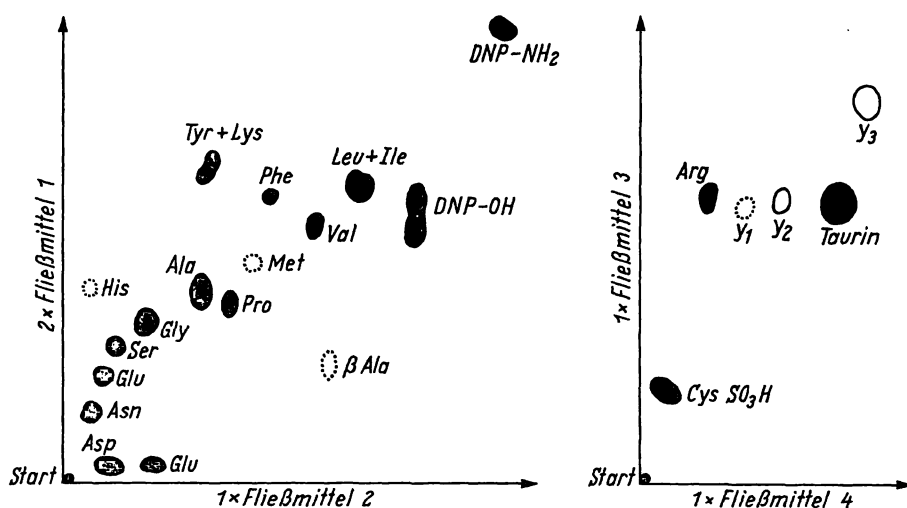


Abb. 5
Dünnschicht-Chromatogramme von Aminosäuren im Stuhl, chromatographiert als DNP-Derivate (153).
Links ätherlösliche, rechts säurelösliche DNP-Aminosäuren
DNP-OH = 2,4-Dinitrophenol;
DNP-NH₂ = 2,4-Dinitroanilin

sion im Fließmittel Chloroform/Benzylalkohol/Eisessig (70 + 30 + 3 v + v) (143).

Säurelösliche DNP-Aminosäuren: Es sind dies die Derivate von Arginin, Homoarginin, Citrullin, Homocitrullin, Taurin, Cysteinsäure, Homocysteinsäure und Histidin (letzteres nur zu etwa 50%). Man chromatographiert in der ersten Dimension in Butanol/Eisessig/Wasser (4 + 1 + 1 v + v) und in der zweiten in sek-Butanol/25proz. Ammoniak (70 + 30 v + v). Eine andere, sehr gute Fließmittelkombination ist Phenol/Wasser/17proz. Ammoniak (80 + 20 + 2 v + v) (erste Dimension) und Toluol/2-Chloräthanol/Pyridin/20proz. Ammoniak (35 + 50 + 15 + 10 v + v) nach (149), siehe auch (144, 152).

Nachweis von Jodaminosäuren im Plasma

Die Hormone der Thyroidea, Thyroxin und Trijodthyronin, sind Aminosäuren. Diese und andere Jodaminosäuren spielen daher in der Kontrolle der Schilddrüsenaktivität eine große Rolle (155). Die Bestimmung des proteingebundenen Jods und der Jodbindungskapazität sind im Augenblick unersetzliche, aber doch recht summarische Tests, die nichts über das Konzentrationsverhältnis der einzelnen Jodaminosäuren aussagen. Nachdem es feststand, daß Jodotyrosine im Blut vorkommen (vgl. z. B. (156—158)), bestand ein Interesse für einfache Nachweismethoden. Diese Substanzen zeigen zwar keine Hormonwirkung, aber ihre Konzentrationen scheinen sich ähnlich der der Jodothyronine bei thyroidealen und extrathyroidealen Krankheiten zu ändern, so daß sich ein für die betreffende Krankheit charakteristisches Bild der Jodaminosäuren ergibt (159 bis 162). Zirkulierende phenolische Jodaminosäuren sind zumindest teilweise an Trägerproteine gebunden, von denen sie aber größtenteils durch Extraktion mit organischen Lösungsmitteln befreit (163) und dann mit Hilfe chromatographischer Methoden aufgetrennt werden können. Eine Fülle verschiedener Verfahren wurde beschrieben. Dünnschichtchromatographisch lassen sich Jodaminosäuren besonders gut trennen auf Cellulose G in Ameisensäure/Wasser (10 + 50 v + v) (164), auf Cellulose G in Aceton/0,5N Essigsäure (20 + 80 v + v) (165) sowie auf Kieselgel G in Phenol/Aceton/1N NaOH (2 + 7 + 1 v + v) in NH₃-Atmosphäre (166). Eine Übersicht gibt ZAPPI (167), siehe auch (118, 119). Sofern die Substanzen nicht radioaktiv markiert sind, basiert

der Nachweis und die quantitative Bestimmung zumeist auf der äußerst empfindlichen katalytischen Wirkung von Jod (Jod in Phenolen tauscht in Gegenwart von Cl⁻ aus!) auf die Redoxreaktion Ce (IV)/As (III) (168, 169) bzw. Fe (III)/As (III) (170). Es bestehen aber Probleme hinsichtlich der Spezifität (171, 172), die durch ein Differenzverfahren beseitigt werden können (173, 174). Ein weiteres Nachweisverfahren besteht in der photochemischen Dejodierung und Nachweis des Jods mit Stärke (175).

IV. Quantitative Bestimmung

Mikrobiologische Bestimmung von Aminosäuren

Diese Methode ergab lange Zeit die zuverlässigsten Werte von Aminosäurekonzentrationen im Blut. In abgewandelter Form (Hemmtest) wird sie heute zur semi-quantitativen Massenuntersuchung nach GUTHRIE benutzt (siehe oben). Das Untersuchungsmaterial, z. B. enteiweißtes Serum, wird mit einem Nährmedium inkubiert, das alle notwendigen Nährstoffe außer der zu bestimmenden Aminosäure enthält, und mit einem geeigneten Mikroorganismus beimpft (als Beispiel siehe Bestimmung von Phenylalanin nach PRESCOTT und Mitarbeiter (176), Tyrosin nach GUNNESS und Mitarbeiter (177), Aminosäuren in Plasma und Urin nach HARPER und Mitarbeiter (263). Nach einer bestimmten Inkubationszeit wird die Zunahme von Mikroorganismen am einfachsten durch Turbidimetrie anhand einer Eichkurve gemessen, oder die metabolische Aktivität der Mikroorganismen durch pH-Messung (*Lactobacillus casei* (178)) oder Titration der produzierten Milchsäure bestimmt (179, 180). Es eignen sich *Lactobacillus arabinosus* 17/5 ATCC 8014 zur Bestimmung von Leucin, Isoleucin, Valin und Tryptophan; *Leuconostoc mesenteroides* P 60 ATCC 8042 für Histidin, Lysin, Phenylalanin und Methionin; *Streptococcus faecalis* R. ATCC 9790 für Arginin und Threonin. Die Methode der Milchsäuretitration soll nach SCHWERDTFEGER (180) nahezu gleich gute Ergebnisse (+ 4—6%) liefern wie die automatische Ionenaustausch-Chromatographie nach STEIN und MOORE.

Die mikrobiologische Methodik gestattet es, eine einzelne Aminosäure gleichzeitig in bis zu 20 Untersuchungsproben je Ansatz zu bestimmen. Die Ergebnisse werden stets auf eine jeweils neu aufgestellte Eichkurve bezogen und können durch Wuchs- oder Hemmstoffe (Antibiotika!) im Untersuchungsmaterial beeinflusst werden. Der apparative Aufwand ist gering, die Analysendauer relativ lang (etwa 6 Tage). Die Genauigkeit wird im allgemeinen mit ± 10 – 15% angegeben. Die Empfindlichkeit ist extrem hoch; die Methode eignet sich daher zur Spurenanalyse.

Eine Automatisierung mikrobiologischer Verfahren wurde bereits zur Untersuchung von Antibiotika gearbeitet (180a, b). Da zahlreiche physiologische Parameter, wie z. B. CO_2 -Milchsäure Produktion, Glucose-, Aminosäure-Verbrauch, zur Messung der biologischen Aktivität herangezogen werden können, sollte es auch möglich sein, die mikrobiologischen Verfahren zur Aminosäuren-Analyse zu automatisieren. Entsprechende Arbeiten sind uns aber bis jetzt nicht bekannt geworden.

Kolorimetrische und enzymatische Bestimmungsmethoden

Es können hier nur einige wichtige Bestimmungsmethoden erwähnt werden. Wir verweisen auf Handbücher wie z. B. (181–183).

Phenylalanin

Die häufig benutzte *fluorometrische Bestimmung* nach McCAMAN und ROBINS (184), modifiziert von WONG und Mitarbeitern (185), vgl. auch AMBROSE (185a) beruht auf der Fluoreszenzmessung des Phenylalanin-Ninhydrin-Kupferkomplexes in Gegenwart von L-Leucyl-L-alanin (186). Benötigt werden nur 5–25 μl Serum, das mit Trichloressigsäure enteiweißt wird. Die stark pH-abhängige relative Fluoreszenz wird bei 515 nm (Aktivierung bei 365 nm) und pH 5,88 gemessen. Die Methode wurde von HILL und Mitarbeitern (187) automatisiert, wobei die Enteiweißung mit Trichloressigsäure durch Dialyse ersetzt wurde. Mit dem Technicon-Autoanalyzer können damit 60 Analysen pro h durchgeführt werden (Variations-Koeffizient etwa $\pm 10\%$). Eine *enzymatische Bestimmungsmethode* beschrieben LA DU und MICHAEL (188). Dabei wird Phenylalanin in Gegenwart von L-Aminosäure-oxidase (EC 1.4.3.2) aus *Crotalus adamanteus* Schlangengift durch Luftsauerstoff zu Phenylbrenztraubensäure oxydiert und das gebildete H_2O_2 durch Katalase zerstört. In 1M Natriumarsenat-Borat-Lösung bildet sich der Boratkomplex der Enolform von Phenylbrenztraubensäure, der bei 308 nm gemessen wird. Tyrosin und Tryptophan werden miterfaßt und können durch Differenzmessung bei 308, 330 und 350 nm mitbestimmt werden. Serumprotein stört und wird z. B. durch Ultrafiltration entfernt. Phenylalanin kann im Ultrafiltrat bis zu 0,4 mg/100 ml erfaßt werden. Dazu werden etwa 0,4 ml Serum benötigt. Der Variationskoeffizient beträgt etwa $\pm 5\%$ bei 2,2 mg Phenylalanin/100 ml.

Ohne die vorgeschaltete enzymatische Oxidation können Phenylbrenztraubensäure und *p*-Hydroxyphenyl-

brenztraubensäure direkt als Enol-Borat-Komplex (189) sowohl im Serum als auch im Urin bestimmt werden (190).

Nach UDEFRIEND und COOPER (193) kann Phenylalanin nach Decarboxylierung mit *Phenylalanin-Decarboxylase* aus *Streptococcus faecalis* als Phenäthylamin bestimmt werden. Das Amin wird aus stark alkalischem Milieu mit Chloroform-Amylalkohol-Mischung extrahiert. Die Lösung wird mit einer wäßr. Methylorange-Lösung geschüttelt und die optische Absorption der Chloroformphase gemessen. Die spezifische Methode weist aber größere technische Schwierigkeiten auf (194). Weitere, weniger spezifische Methoden siehe z. B. (194).

Tyrosin

Die fluorometrische Bestimmung von Tyrosin geht zurück auf die Gerngross-Reaktion (195). In einer Modifikation von WAALKES und UDEFRIEND (196) wird Tyrosin in Gegenwart von salpetriger Säure mit 1-Nitroso-2-naphthol zu einer gelben, fluoreszierenden Verbindung gekuppelt. Der Reagensüberschuß wird mit Methylenchlorid entfernt, und die relative Fluoreszenz bei 570 nm (Anregung bei 460 nm) gemessen. Tyramin und ortho- und parasubstituierte Phenole reagieren ebenfalls. Die Methode wurde von HOCELLA (197) für den Technicon-Auto-Analyzer umgearbeitet, wobei der Überschuß an 1-Nitroso-2-naphthol mit Natriumpyrosulfit beseitigt und Äthanol als Lösungsmittel durch Dimethylsulfoxid unter Zusatz von Röhm und Haas Surfactant 705 ersetzt wurde.

Tyrosin kann nach enzymatischer Oxidation auch als Enol-Borat-Komplex der *p*-Hydroxyphenylbrenztraubensäure neben Phenylalanin und Tryptophan bestimmt werden (LA DU und MICHAEL (188), siehe unter Phenylalanin).

Hydroxyprolin

Die Bestimmung von Hydroxyprolin ist wichtig u. a. zum Nachweis von metabolischen Knochenkrankheiten und des Kollagenumsatzes.

Zur *kolorimetrischen Bestimmung* von Hydroxyprolin wird die Probe im alkalischen Milieu mit H_2O_2 (NEUMANN und LOGAN (198)) oder besser in schwach saurem Milieu mit Chloramin-T (STEGEMANN (199, 200)) oxydiert und anschließend in saurem Milieu mit *p*-Dimethylaminobenzaldehyd umgesetzt. Unspezifische Chromogene können nach PROCKOP und UDEFRIEND (201) am Anfang der alkalischen Oxidation extrahiert und die Spezifität der Reaktion kann durch Extraktion des am Ende vorliegenden Chromogens erhöht werden. Die Oxidation mit Chloramin-T vermeidet die unangenehme Störung durch Tyrosin und Tryptophan und läßt sich technisch einfacher durchführen. Urin muß durch Ionenaustauschersäulen (Amberlite IRA 410—OH') zur Entfernung interferierender Substanzen vorbehandelt werden (202, 268), ebenso Plasma nach Enteiweißung (200). Eine Übersicht der recht empfindlichen (0,5 μg) und genauen ($\pm 3\%$) Methode geben STEGEMANN und STALDER (200).

Eine *enzymatische Bestimmung* von freiem Hydroxyprolin wurde von ROSANO beschrieben (203). Ein adaptiertes Enzymsystem, isoliert aus *Pseudomonas fluorescens* A-312, baut Hydroxyprolin spezifisch zu NH_3 bzw. zu einem primären Amin ab. Gemessen wird die Absorptions-Abnahme der mit Ninhydrin in saurem Medium (204) erhaltenen Farbe der cyclischen Iminosäuren. Es können noch 0,5 μg Hypro/Probe nachgewiesen werden.

Cystin

Kolorimetrisch wird Cystin zumeist nach der Methode von SULLIVAN, HESS und HOWARD (205, 206) oder einer der zahlreichen Modifikationen (vgl. z. B. (207, 208)) bestimmt, wobei es durch Cyanid in Cystein und Thiocyanat reduziert und das gebildete Cystein mit 1,2-Naphthochinon-4-sulfonat in einen roten Farbstoff verwandelt wird. Dieser wird bei 500–520 nm gemessen. In einer Mikromethode (209) lassen sich damit noch 20 nMol/m^l bestimmen. Die Cystinognost-Testpackung der Firma Heyl & Co, Berlin 37, arbeitet nach dem gleichen Prinzip. Die Methode von SULLIVAN und Mitarbeitern wurde inzwischen auch für den Technicon Auto-Analyzer angepaßt (210). Damit können täglich bis zu 120 Doppelbestimmungen durchgeführt werden.

Histidin

Histidin wird mit Histidase (EC 4.3.1.3) in Gegenwart von Glutathion in Urocaninsäure gespalten. Die Bildung der Urocaninsäure wird im UV bei 277 nm kinetisch verfolgt (210a, b), Serum wird mit $\text{ZnSO}_4 + \text{Ba}(\text{OH})_2$ enteiweißt.

Eine von AMBROSE und Mitarbeitern (265) kürzlich beschriebene Methode zur fluorometrischen Bestimmung von Histidin im Blut basiert auf der analogen Kondensation von Histamin mit *o*-Phthalaldehyd in stark alkalischem Milieu (266). Der im Fall von Histidin labile Fluorophor wird durch Ansäuern mit Phosphorsäure stabilisiert und bei 436 nm (Aktivierung bei 360 nm) bestimmt. In einer Mikromodifikation genügen 100 μl Serum. Von 45 untersuchten Substanzen zeigen nur Histamin, DL-*m*-Tyrosin und L-Cystin eine nennenswerte Fluoreszenz (52 bzw. 9 bzw. 7% der Histidin-Fluoreszenz bei gleicher Konzentration von 10 mg/100 ml).

Säulenchromatographie an Ionenaustauschern⁴⁾

Unter den quantitativen Analysenmethoden nimmt die Ionenaustauscher-Chromatographie bei weitem die wichtigste Stellung ein. Im allgemeinen werden Kationenaustauscher, in einigen Spezialfällen auch Anionenaustauscher benutzt. Neuderings spielt auch die Chromatographie an Chelat-Harzen eine wichtige Rolle.

Prinzip

Die Trennung von Aminosäuren mittels Ionenaustauscher erfolgt an 15–150 cm langen Kolonnen von 0,5–9 mm I. D. mit Hilfe von Ionenaustauschern. Die

⁴⁾ Eine ausführliche Zusammenfassung geben BENSON [211] und HAMILTON [212, 213].

Aminosäuren werden mit Puffern verschiedener pH-Werte und verschiedener Ionenstärke eluiert, mit Ninhydrin-Reagens versetzt, auf 100° erwärmt, photometrisch gemessen und die Extinktionen mit einem Recorder aufgezeichnet. Für die Güte und Schnelligkeit der Trennung sind die folgenden Parameter wichtig:

1. pH des Puffers
2. Ionenstärke des Puffers
3. Temperatur der Säule
4. Durchflußgeschwindigkeit
5. Säulenlänge
6. Säulenquerschnitt
7. Harz, Quervernetzung, Partikelgröße usw.

Das pH des Puffers muß auf die Art des verwendeten Ionenaustauschers abgestimmt sein. Um reproduzierbare Elutionszeiten und gute Trennungen der einzelnen Aminosäuren zu erhalten, sind genau eingestellte Puffer unerlässlich, wobei besonders zu beachten ist, daß die Natriumkonzentration auf $\pm 0,001$ Mol/l und das pH auf 0,01 pH Einheiten genau eingestellt werden müssen. Eine Erhöhung von Temperatur, Ionenkonzentration und pH führt zu einer größeren Geschwindigkeit der Analyse, die Trennung hingegen verschlechtert sich meist. Es ist daher von größter Bedeutung, die Parameter 1–3 maximal günstig einzustellen.

Ein Substanzpeak wird bei gegebenem Säulenquerschnitt um so breiter, je länger die Säule ist, je schlechter sie gepackt und je ungünstiger die Durchflußgeschwindigkeit gewählt wird. Wenn die Substanzen nicht getrennt werden können, bewirkt eine Säulenverlängerung eine Verbesserung der Trennung. Der Abstand der Maxima zweier Peaks wächst mit dem Elutionsvolumen (V_m), die Summe der Peakbreiten aber mit $\sqrt{V_m}$, so daß theoretisch auch in ungünstigen Fällen eine vollständige Trennung erreicht werden kann. Bei Verkleinerung des Säulenquerschnittes und Konstanthalten aller übrigen Parameter werden die Peaks schmaler und damit die Empfindlichkeit größer. Von diesem Prinzip wird beim Mikroanalysator von KIRSTEN und KIRSTEN Gebrauch gemacht (214).

Auch die Korngröße des Harzes ist für die Trennfähigkeit von Bedeutung. Eine Verkleinerung der Korngröße führt zu einer Vergrößerung der Austauschkapazität; ein rundes Harzkorn verbessert die Dichte und Gleichmäßigkeit der Packung.

Die heutigen Geräte beruhen immer noch auf dem von SPACKMAN, STEIN und MOORE erstmals beschriebenen Prinzip (215). Die meisten Apparate arbeiten vollautomatisch mit Programmierung von Temperaturwechsel, Pufferwechsel, Waschschritten und Probengebern. Die Probengeber (vgl. dazu z. B. (215a, b, c)) sind in der Lage, 20 und mehr Proben automatisch auf die Kolonne aufzutragen. Zur Berechnung der Chromatogramme wird ein derartiger Vollautomat zweckmäßig mit einem Integrator ausgestattet.

a) Trennung an Kationenaustauschern

Die Kationenaustauscher bestehen im allgemeinen aus einem mit Divinylbenzol quervernetzten Polystyrolharz,

das SO_3^- -Gruppen trägt. Der Grad der Quervernetzung beeinflusst die Trenngüte und die mechanischen Eigenschaften des Harzes. Bei dem verwendeten pH liegen die meisten Aminosäuren als Kationen vor. Diese positiv geladenen Aminosäuren konkurrieren auf dem Austauscher mit den Kationen des Puffers. Je nach ihrer Ladung (isoelektrischer Punkt) werden sie verschieden schnell eluiert. Die Elution erfolgt hauptsächlich mit Na-Citratpuffern verschiedener Ionenstärken und verschiedener pH-Werte, denen ein Netzmittel (Brij-35), ein Antioxidans (Thiodiglycol) und Caprylsäure zugesetzt werden. Zur Trennung von Glutamin und Asparagin können Li-Citratpuffer (216, 271) oder spezielle Temperaturprogramme (217) verwendet werden. Um Verluste von Glutamin infolge Cyclisierung und Hydrolyse zu vermeiden, soll die Säulentemperatur 35° nicht überschreiten (272). Puffer mit Äthanol-Zusatz bewirken eine bessere Trennung zwischen Threonin und Serin. Das Eluat aus den Kolonnen wird mittels Ninhydrin-Reaktion automatisch analysiert. Dem Ninhydrin-Reagens, das sich aus Methylcellosolve, 4N Natriumacetat-Puffer pH 5,5 und Ninhydrin zusammensetzt, wird im allgemeinen SnCl_2 (215), Hydrindantin (218) oder Cyanid (219) zugesetzt. Diese Reagenzien sind im allgemeinen luft- und lichtempfindlich, und die Zubereitung und Lagerung muß unter hoch gereinigtem Stickstoff erfolgen.

Fast alle heute käuflichen Geräte benutzen einen diskontinuierlichen Pufferwechsel. Das anfänglich von Technicon benutzte Prinzip der Gradientenelution (220) ergab häufig Peakverschiebungen.

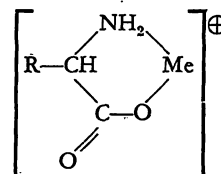
b) Trennung an Anionenaustauschern

Für die Auftrennung von stark sauren Aminosäuren ist die Anionenaustauscher-Chromatographie besser geeignet; so werden z. B. Aminosulfonsäuren und O-Phosphorylhydroxyaminosäuren an Kationenaustauschern nur schlecht zurückgehalten. Zur Auftrennung von S-Carboxymethyl-Derivaten von Cystein, Homocystein und Penicillamin sowie von Monoaminodicarbonsäuren ist die Anionenaustauscher-Chromatographie ebenfalls besser geeignet. Ein solches Verfahren wurde von BORNER (221) und später von BURTIS und WARREN (222) beschrieben. Als Harz fanden Austauscher vom Typ Dowex 1 und Natriumformiatpuffer pH 4,2 bzw. Bio-Rad AG 1—X8 und Natriumacetatpuffer pH 4,4 Verwendung.

c) Ligand-Austausch Chromatographie

Diese Methode beruht auf der Komplexbildung der zu untersuchenden Substanzen mit schwach basischen Metallionen wie Nickel, Kobalt, Kupfer, Cadmium oder Zink (223—226) und Chromatographie der Komplexe an einem Kationenaustauscher. Die Metallionen bleiben dabei weitgehend an den Kationenaustauscher gebunden. Dieser kann speziell auf das betreffende Metallion wirkende Chelatgruppen — z. B. Iminodiessigsäuregruppen — aufweisen (227), welche das Schwermetallion besonders intensiv binden, oder aus einem konventionel-

len Sulfonsäureharz bestehen (228). Der erstgenannte Harztyp verhindert ein Auswaschen des komplexierenden Ions durch konzentrierte Salzlösungen und eignet sich daher zur Konzentrierung von Aminosäuren aus Salzlösungen. Der zweitgenannte Harztyp wurde von einer Forschungsgruppe der Firma Hitachi zur beschleunigten Aminosäuren-Analyse herangezogen⁵⁾. Um ein Auswaschen des komplexierenden Ions zu verhindern, muß in diesem Fall das Metallsalz dem Elutionspuffer in der Gleichgewichtskonzentration zugesetzt werden. α -Aminosäuren bilden daher sowohl in der Puffer- als auch in der Harzphase Kationenkomplexe von der Art



wobei die beiden noch freien Koordinationsstellen des Metallions Me^{++} entweder vom Lösungsmittel oder von Ionenaustauschergruppen eingenommen werden. Die Affinität der Aminosäuren zum Ionenaustauscharz nimmt dadurch zu. Das Ausmaß der Komplexbildung wird bestimmt durch das pH und die jeweilige Stabilitätskonstante. Während beim normalen Ionenaustausch von freien Aminosäuren die jeweilige Aciditätskonstanten (isoelektrischer Punkt) neben Adsorptionseffekten die Trennung weitgehend bestimmen, kommt beim Ligand-Austauschverfahren der Komplexstabilitätskonstante eine ebenso wichtige Bedeutung zu. Bei Erhöhung des pH nimmt die Komplexbildung zu, während der Ionenaustauschvorgang abnimmt. Im mittleren pH-Bereich, der für die Chromatographie besonders interessant ist, kommen beide Vorgänge nebeneinander vor. Als besonders günstig haben sich die Zink-Komplexe erwiesen. Sie erlauben die Trennung von sauren und neutralen Aminosäuren aus physiologischen Flüssigkeiten innerhalb von 3,5 h und von basischen Aminosäuren innerhalb von 4,5 h (Abb. 6). Die Reihenfolge der Elution der Aminosäure-Komplexe ist ähnlich der Ionenaustauscher-Chromatographie von freien Aminosäuren (Cystin erscheint infolge seines besonders stabilen Zink-Komplexes etwas später). Hervorzuheben ist die ausgezeichnete Trennung von Tyrosin und Phenylalanin; Hydroxyprolin und Asparaginsäure, Threonin und Serin und im basischen Bereich von Tryptophan und den für Histidin-Stoffwechselstörungen wichtigen Dipeptiden Anserin und Carnosin sowie den Histidinen. Hingegen trennen sich Glycin und Alanin nicht immer vollständig.

Weniger komplizierte Aminosäurengemische wie Proteinhydrolysate können sogar innerhalb von 2 h komplett analysiert werden, wobei zur Trennung von sauren und neutralen Aminosäuren ein einziger Puffer

⁵⁾ Das Verfahren kann bei dem neuen automatischen Aminosäuren-Analysator KLA-3B von Hitachi-Perkin-Elmer verwendet werden. Vergleiche die diesbezüglichen Firmenschriften.

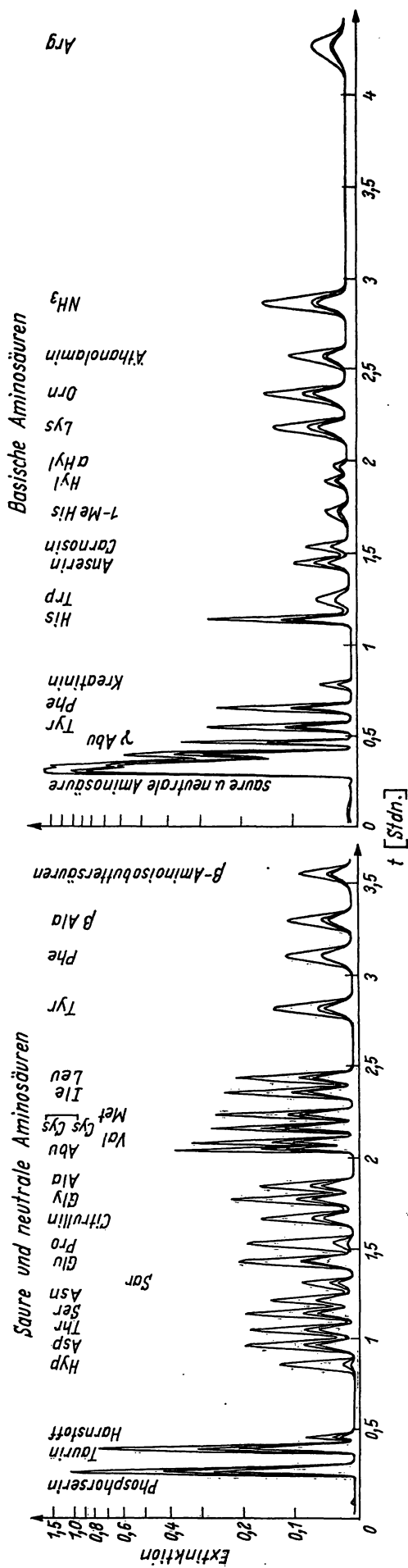


Abb. 6 Aminosäuren-Chromatogramme (physiologische Testmischung) nach dem Liganden-System (Zink-Komplexe).

Saure und neutrale Aminosäuren: Vorsäule 9 x 100 mm, Hauptsäule 9 x 400 mm, 0,12N Natriumacetat pH 3,02 von 0—80 min, 0,12N Natriumacetat pH 4,12 von 80—210 min Säulentemperatur 0—60 min, 35°; 60—210 min, 65°; Fließgeschwindigkeit des Puffers 90 ml/h, des Ninyhydrins 45 ml/h, Gegendruck 20 kg/cm².

Basische Aminosäuren: Säulengröße 9 x 500 mm, 0,32N Natriumacetat 0—10 min pH 5,53; 10—60 min pH 6,30; 60—270 min pH 5,53. Säulentemperatur 65° (Hitachi-Perkin-Elmer Fallprospekt Modell KLA-3 B 1968); Fließgeschwindigkeit wie oben, Gegendruck 12 kg/cm².

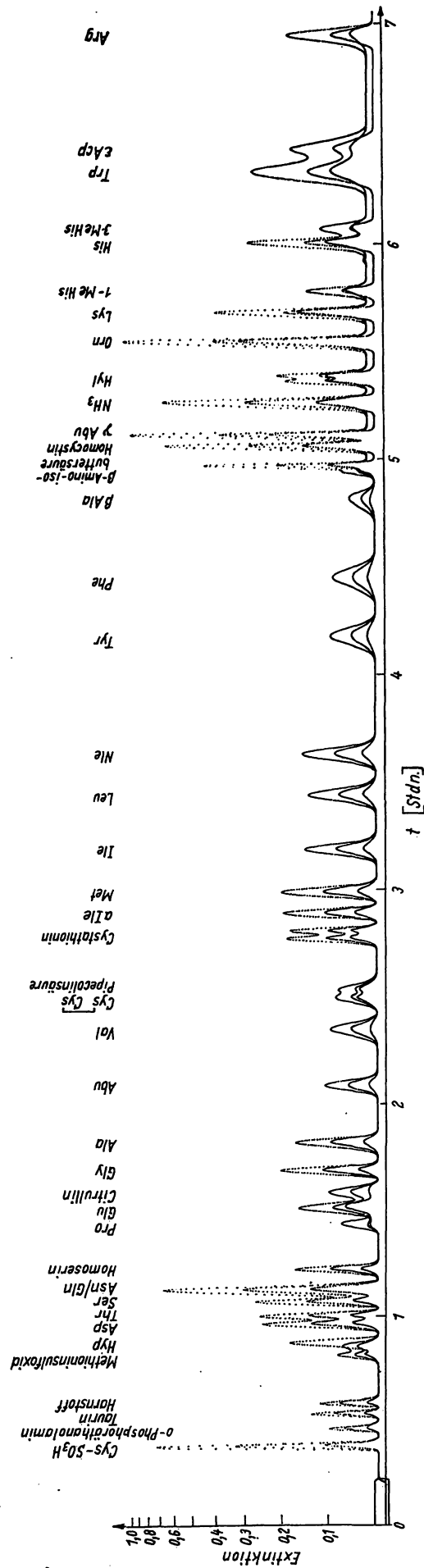


Abb. 7

Aminosäuren-Chromatogramm einer physiologischen Testmischung nach dem Säulenverfahren nach ANDERS [233]. Auftrag etwa 0,125 μMol pro Aminosäure; Säulengröße 9 x 540 mm; Puffer: 0,2N Natriumcitrat pH 3,25 und 3,6; 0,8N Natriumcitrat pH 4,5; Säulentemperatur: 30°, 50°, 60°; Fließgeschwindigkeit: Puffer 80 ml/h, Ninyhydrin 40 ml/h; Gegendruck: 25 kg/cm².

genügt (55 mM Natriumacetat pH 4,10; 0,4 mM Zinkacetat; 6% Äthylalkohol; 55°, 120 ml/h).

Die Verwendung von Metall-Liganden in der Harzphase bringt auch einige rein technische Vorteile; so wird beispielsweise der Hydratationszustand des Ionenaustauschers durch die ständige Anwesenheit von Zink stabilisiert, was die mechanischen Eigenschaften der Säule verbessert. Geringe pH-Änderungen im Puffer wirken sich nicht mehr so stark auf die Trennung aus. Dagegen ist die Metallkonzentration im Puffer kritisch in bezug auf die Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen Harz und Puffer, und Fließgeschwindigkeit und Arbeitstemperatur müssen besonders gut kontrolliert werden, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten (211). Die Regeneration der Säule kann leicht zu einer Störung des oben erwähnten Gleichgewichts führen.

Vorbereitung des biologischen Materials

a) Blutplasma

Zur Bestimmung der Aminosäurekonzentration im Blut wählen die meisten Untersucher heparinisiertes Plasma; die Serumwerte liegen etwas höher (228a). Nach dem Abkühlen des Blutes wird das Plasma durch Zentrifugieren abgetrennt. Die Aufbewahrung von Vollblut bewirkt eine starke Veränderung der Aminosäurekonzentration; ebenso ist eine hämolytische Plasmaprobe für die quantitative Aminosäureanalyse nicht geeignet. Eine Lagerung nicht enteiweißter Plasma-Proben ist ebenfalls nicht zu empfehlen, da die Werte von Asparaginsäure und Glutaminsäure zunehmen, während diejenigen von Cystin jedoch abnehmen.

Zur Enteiweißung kommen die unten aufgeführten Methoden in Betracht, wobei die Sulfosalicylsäure-, Pikrinsäure-Enteiweißung und die Ultrazentrifugation die gebräuchlichsten sind.

Sulfosalicylsäure-Enteiweißung: 1 ml Plasma wird mit 4 ml 3proz. Sulfosalicylsäure versetzt, geschüttelt und abzentrifugiert. Ein Aliquot des Überstandes wird mit Puffer pH 2,2 auf ein bestimmtes Volumen gebracht (5 ml), ein Teil dieser Lösung kann ohne weitere Behandlung auf die Säule aufgetragen werden.

Pikrinsäure-Enteiweißung: 1 ml Plasma wird mit 5 ml einer 1proz. Pikrinsäurelösung versetzt, einige Sekunden geschüttelt und anschließend zentrifugiert. Ein Aliquot des Überstandes wird auf eine kleine Anionenaustauschersäule (Harzhöhe 3 cm) in der Chloridform gegeben (Dowex 2×8; 200—400 mesh) und mit 0,02N Salzsäure eluiert. Das Eluat wird eingeengt, auf pH 8,0 gebracht und 4 h zur Oxydation von Cystein zu Cystin stehen gelassen. Anschließend wird der pH-Wert mit 2N HCl auf 2,0 bis 2,2 eingestellt und die Probe mit Puffer pH 2,2 auf ein bestimmtes Volumen gebracht.

Ultrazentrifugation (229, 230): 1 ml Plasma oder Serum wird mit 1 ml internem Standard (siehe Seite 419) gemischt und mit 0,2N Citratpuffer pH 2 auf 10 ml gebracht. Man läßt die Probe 30 min im Kühlschrank stehen und zentrifugiert dann 30—40 min bei 50000 g oder 20 min bei 78000 g. Man saugt die Lipidschicht ab und entnimmt das benötigte Volumen aus der mittleren Schicht.

Gelfiltration: Zur Abtrennung von Aminosäuren, Proteinen und größeren Peptiden ist auch die Gelfiltration gut geeignet. Sie ist jedoch zeitlich und apparativ etwas anspruchsvoller als die vorher beschriebenen Methoden. Das Plasma (1—2 ml) wird z. B. auf eine Biogel-P4-Säule (40×1,5 cm) aufgetragen, welche mit 0,05M Phosphatpuffer pH 7,5 äquilibriert ist. Nach Einsickern der Probe wird mit Wasser eluiert. Die Proteinfraktion, welche am Anfang

die Säule passiert, wird verworfen und die anschließenden nicht-molekularen Fraktionen gesammelt, vereinigt und eingeengt. Das Konzentrat wird auf pH 2,2 gebracht und mit Puffer pH 2,2 auf z. B. 5 ml aufgefüllt. Es empfiehlt sich, in einem Vorversuch ein Vergleichsplasma zu analysieren und mit Hilfe der Ninhydrinfärbung und mit einem Protein-Reagens (z. B. Folin-Ciocalteu) die genauen Positionen von Proteinfraktionen und Aminosäurefraktionen zu lokalisieren (Tüpfelreaktion).

Trichloressigsäure-Enteiweißung: 1 ml Plasma wird mit 1 ml 10proz. Trichloressigsäure-Lösung versetzt, geschüttelt und abzentrifugiert. Der Überstand wird zur Entfernung von überschüssiger Trichloressigsäure 5mal mit je 5 ml Äther ausgeschüttelt, die wäbr. Phase eingeengt und mit Puffer pH 2,2 auf ein bestimmtes Volumen gebracht.

Ultrafiltration: Eine weitere Möglichkeit zur Enteiweißung ist die Ultrafiltration, welche unter Druck und in kalter Umgebung durchgeführt wird. Man erhält ein eiweißfreies Filtrat. Die nachteilig lange Filtrationsdauer kann durch ein Schüttelgerät wesentlich verkürzt werden.

b) Urin

Zur quantitativen Aminosäuren-Analyse sollte ausschließlich 24 Std. Urin verwendet werden, der bei + 4° gesammelt wurde. Sollte kein Kühlschrank zur Verfügung stehen, so müssen Zusätze von Toluol, Chloroform oder Thymol zugegeben werden. Ein Aliquot von 50 ml Urin wird tiefgefroren. Um das genaue Auftragsvolumen zu ermitteln, bestimmt man im allgemeinen den α -Aminostickstoff (231). Enthält der Urin Eiweiß, so wird nach einer der vorher beschriebenen Methoden enteiweißt. Wird der eiweißfreie Urin nur zur Bestimmung auf neutrale und saure Aminosäuren verwendet, so trägt man den Urin nach pH Einstellung auf 2,0—2,2 sofort auf die Säule auf; für die basischen Aminosäuren muß der Ammoniak entfernt werden:

Man versetzt 5 ml der Urinprobe mit 2N NaOH (pH 11) und dampft im Exsikkator über konz. H₂SO₄ ein. Anschließend wird die trockene Probe mit 2N HCl auf pH 2,2 eingestellt und mit Puffer pH 2,2 auf ein bestimmtes Endvolumen (10 ml) gebracht. Die Auftragsmenge richtet sich weitgehend nach der Empfindlichkeit des Gerätes.

c) Liquor

Der durch Lumbalpunktion erhaltene Liquor wird zentrifugiert und der Überstand mit einer der obigen Methoden enteiweißt. Eine Enteiweißung ist aber nicht unbedingt erforderlich.

d) Gewebeextrakte

Für die Erfassung der freien Aminosäuren aus biologischem Gewebe ist die Enteiweißungsmethode von großer Bedeutung. Die Aufbearbeitung muß raschmöglichst erfolgen. Praktisch wird so verfahren, daß man das Gewebe mit dem Enteiweißungsmittel, z. B. Pikrinsäure, direkt homogenisiert. Man verwandelt Glutathion zu Glutathion-S-Sulfonat (231a), welches zu Beginn der Analyse erscheint. Bei dieser Reaktion werden Cystin und Cystein ebenfalls verändert.

e) Erythrocyten

Die Erythrocyten werden 3—4 mal in eiskalter 0,9proz. NaCl-Lösung gewaschen und zentrifugiert. Die anschließende Hämolyse wird wie folgt durchgeführt: Der

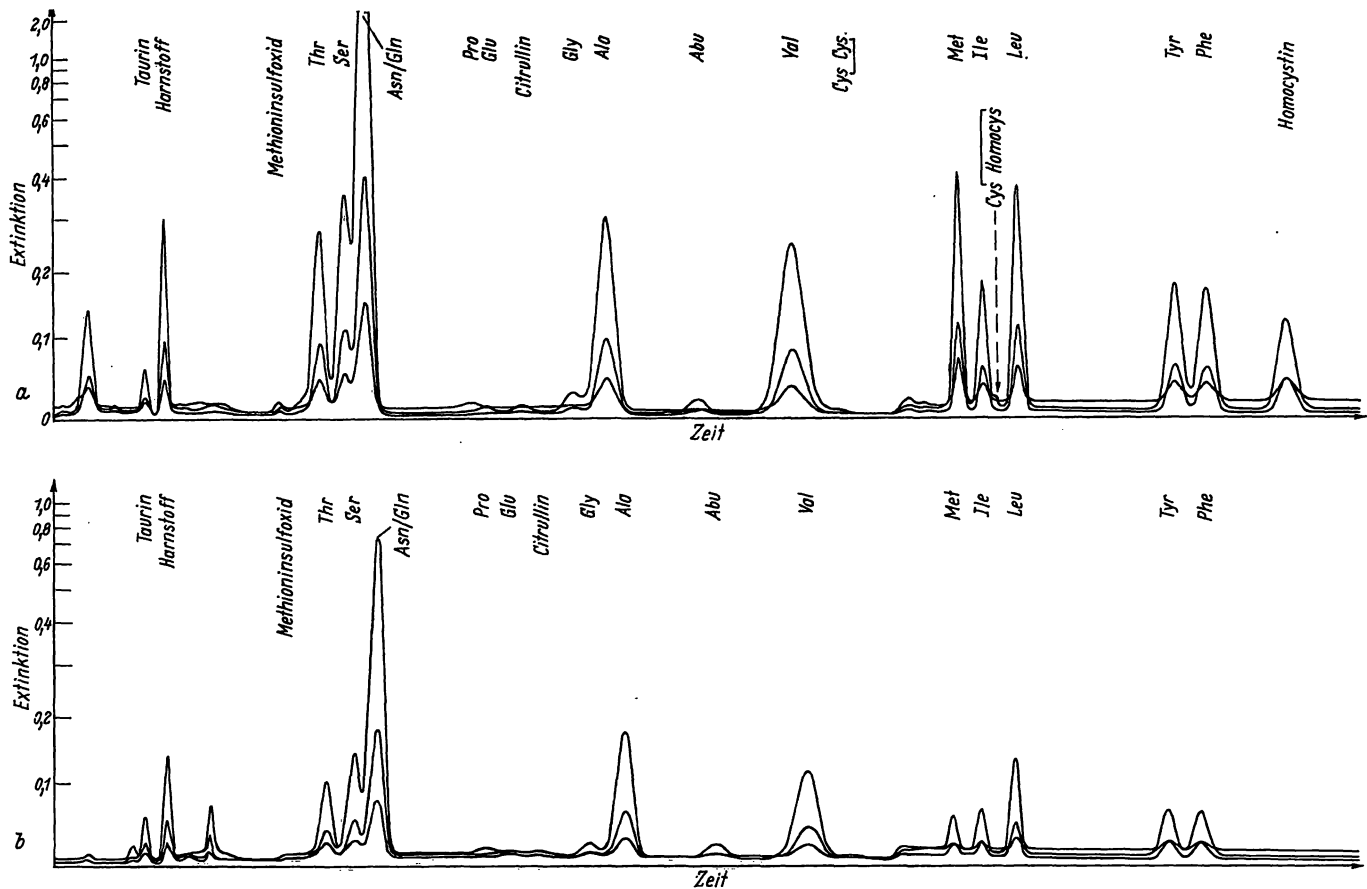


Abb. 8

Aminosäuren-Chromatogramm vom Augenkammerwasser a) eines Homocystinurie-Patienten (oben) und b) eines Kontrollfalls (unten) nach (236).

Erythrocytenbrei wird mit dem doppelten Volumen von kalter 0,1N HCl 24 h bei 4° stehengelassen. Durch Osmose erfolgt die Zellsprengung. Andere Möglichkeiten sind die mechanische Zerstörung durch Homogenisieren der Zellen in der Kälte oder wiederholtes Tiefrieren auf etwa -30° und rasches Auftauen (Kältehämolys). Die Zellreste sind durch Zentrifugation aus dem tiefroten Hämolysat zu entfernen. Anschließend wird nach einer der vorher beschriebenen Methoden enteiweißt.

Die quantitative Aminosäuren-Analyse erfordert die vorherige Messung des Gesamtvolumens der Blutprobe sowie die Bestimmung des Hämatokritwertes.

Ausführung der Analyse an Kationenaustauschern

Die Analyse von biologischem Material stellt größere Ansprüche an die Trennleistung als die einfache Analyse von Proteinhydrolysaten. Während bei der Analyse von Hydrolysaten im allgemeinen nur 20 Aminosäuren zu bestimmen sind, müssen bei physiologischen Flüssigkeiten mehr als 50 Komponenten voneinander getrennt werden. Wir unterscheiden dabei 2 Methoden: das *Einsäulenverfahren* und das *Zweisäulenverfahren*.

1. Das Einsäulenverfahren

PIEZ und MORRIS empfahlen eine Einsäulen-Gradientenelution für die Analyse der sauren, neutralen und basischen Aminosäuren in einem Lauf (220). Von diesem Verfahren machte das System von Technicon Gebrauch.

Mit Lithiumcitrat-Puffern läßt sich damit eine hervorragende Trennung von Aminosäuren aus physiologischem Material in 21 h erzielen (270). HAMILTON benutzt einen diskontinuierlichen Pufferwechsel (232) und führt eine Analyse in 20 h durch. Mit einem speziellen, 65 h dauernden Verfahren konnte HAMILTON in einem Chromatogramm von 0,5 ml/ Urin insgesamt 175 Peaks nachweisen (213). Neuerdings ist es auch möglich, physiologische Materialien im Einsäulenverfahren mit diskontinuierlichem Pufferwechsel in 7 h mit 3 Puffern durchzuführen (233) (Abb. 7).

2. Zweisäulenverfahren

Das ursprüngliche Verfahren von SPACKMAN, STEIN und MOORE (215) benutzt zur Trennung der sauren und neutralen Aminosäuren an einer 150 × 0,9 cm Kolonne zwei Puffer, die in der Mitte der Analyse gewechselt werden. Ein dritter Puffer mit höherer Ionenstärke und pH wird für die Analyse der basischen Aminosäuren mit einer zweiten Kolonne von 50 × 0,9 cm durchgeführt. Zur Analyse von physiologischen Flüssigkeiten benutzen schon SPACKMAN, STEIN und MOORE (215) einen Pufferwechsel bei den sauren und neutralen und einen bei den basischen Aminosäuren sowie einen Temperaturwechsel bei beiden Läufen. Die Analyse benötigte etwa 22 h. Die Einführung sphärischer Ionenaustauscher und die Verwendung hoher Drucke gestattet in neuerer Zeit eine drastische Kürzung der Kolonnenlänge und der Analysenzeit (211, 212, 234).

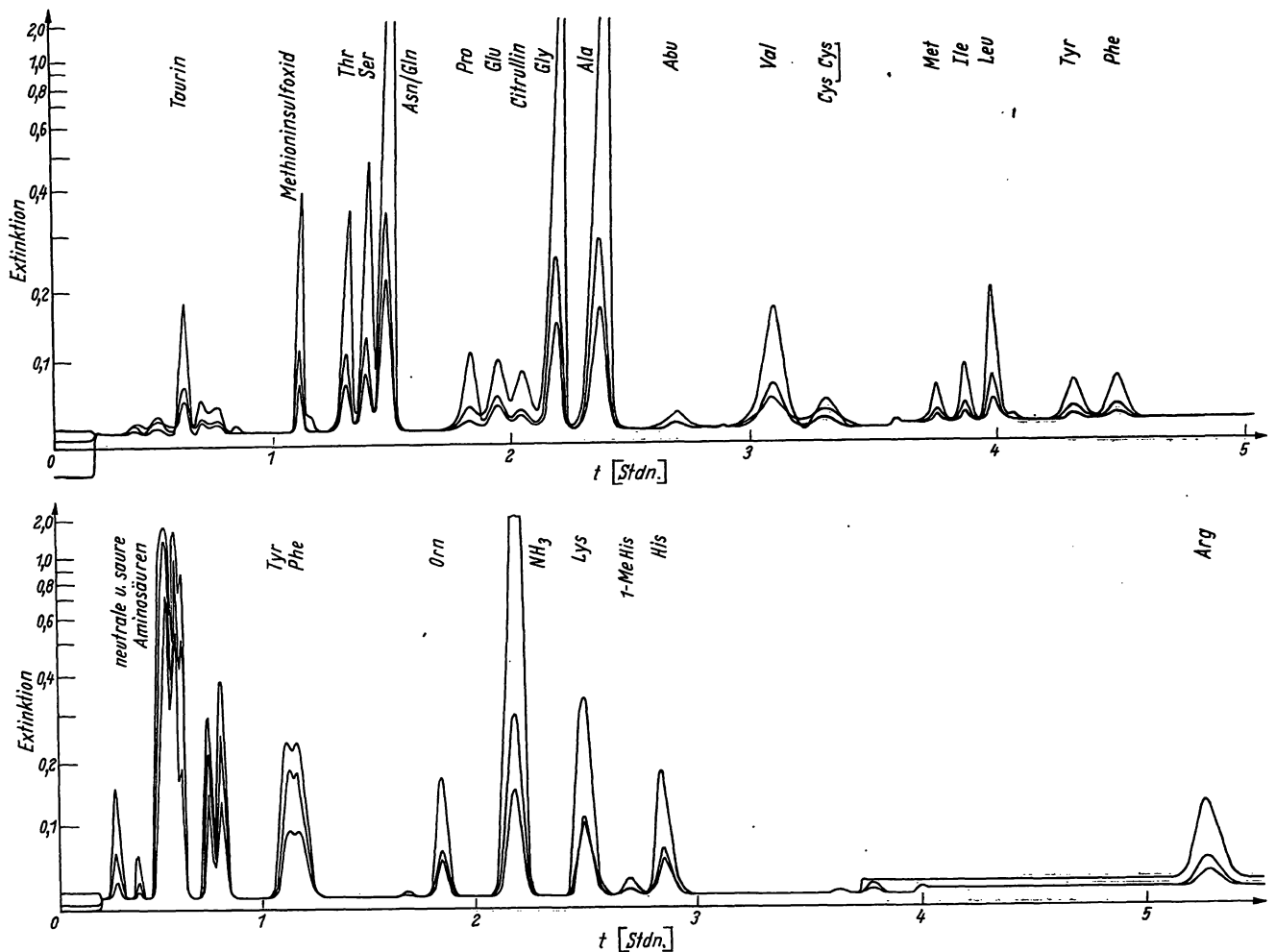


Abb. 9

Aminosäuren-Chromatogramme von sauren und neutralen (oben) sowie basischen Aminosäuren (unten) (233).

Saure und neutrale Aminosäuren: Säulenlänge 56 cm; Beginn pH 3,25 während 2,5 h, Natriumkonzentration 0,2N; pH 4,25 bis 6 h, Natriumkonzentration 0,2N; Temperaturwechsel von 30° auf 55° nach 2 h; Fließgeschwindigkeiten: 50 ml Puffer, 25 ml Ninhydrin pro h.
Basische Aminosäuren: Säulenlänge 20 cm; Beginn pH 4,26 während 3 h, Natriumkonzentration 0,35N; pH 5,28 bis 6 h, Natriumkonzentration 0,38N; Temperaturwechsel von 30° auf 55° nach 2,5 h; Fließgeschwindigkeit: 50 ml Puffer, 25 ml Ninhydrin pro h.

Während die Empfindlichkeit der Analyse früher bei 10 nMol pro Aminosäure lag, können heute durch Verwendung von Mikroküvetten und durch Spreizung des Schreiberbereiches mit Hilfe von Expandern noch 1–2 Nanomol pro Aminosäure nachgewiesen werden (235, 212, 211); vgl. dazu auch Abbildung 8 (236). Die Reproduzierbarkeit dieser Art von Analysen liegt bei $\pm 5\%$, während diejenige normaler Analysen zwischen $\pm 1\%$ und $\pm 3\%$ liegt.

Zur Verminderung des Fehlers verwenden einige Untersucher einen internen Standard, z. B. Homocitrullin (Norleucin ist weniger geeignet) für saure und neutrale Aminosäuren und α -Amino- γ -guanidinobuttersäure für die basischen Aminosäuren (229).

Eine gewöhnliche komplette Aminosäuren-Analyse von physiologischen Flüssigkeiten dauert immer noch 10 h (Abb. 9). Bei gewissen angeborenen Stoffwechselerkrankungen wie Phenylketonurie, Tyrosinose, Histidinämie, Verzweigtketten-Ketoacidurie, Homocystinurie und Hyperprolinämie ist es für die Klinik erforderlich, die Aminosäuren-Analysen häufig durchzuführen. Hierfür stehen heute sogenannte Kurzprogramme zur Verfügung (vgl. z. B. (237, 238, 213)), die es gestatten, nur

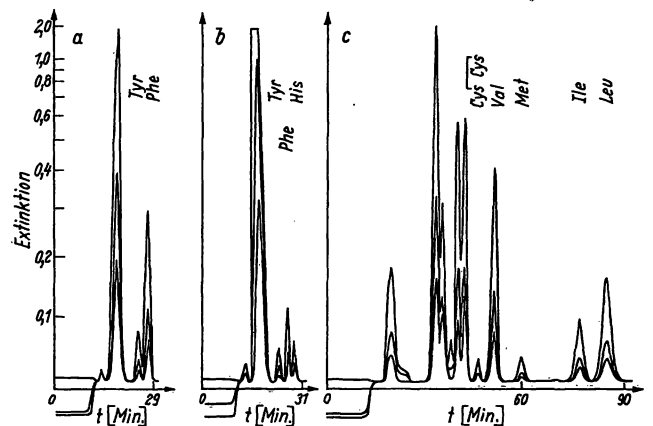


Abb. 10

Aminosäuren-Kurzchromatogramme (Bio-Cal).

A: Kurzprogramm für Phenylketonurie und Tyrosinämie: Säule 9 x 400 mm, Harzhöhe 220 mm; Auftrag: 0,2 ml Plasma eines Gesunden nach 1 h oraler L-Phenylalanin-Belastung (100 mg/kg Körpergewicht); 0–7 min 0,38N Natriumcitrat pH 5,28, 7–15 min 0,4N NaOH, 15–41 min Puffer pH 5,28. Säulentemperatur 57°; 80 ml/h Puffer und 40 ml/h Ninhydrin.

B: Kurzprogramm für Histidinämie
Auftrag: 0,2 ml Plasma eines Frühgeborenen; Säule, Temperatur und Durchlaufgeschwindigkeit siehe A; 0–9 min 0,38N Natriumcitrat pH 6,5; 9–17 min 0,4N NaOH, 17–44 min Puffer pH 6,5

C: Kurzprogramm für Hypervalinämie, Verzweigtketten-Ketoacidurie und Leberstörungen
Auftrag: 0,4 ml Plasma eines Gesunden. Säule, Temperatur und Durchlaufgeschwindigkeit siehe A. 0–65 min 0,35N Natriumcitrat pH 3,15; 65–80 min 0,4N NaOH; 80–110 min Puffer pH 3,15

wenige oder eine Gruppe von Aminosäuren in kürzerer Zeit quantitativ zu erfassen. Einige wesentliche Kurzprogramme sind in Abbildung 10 dargestellt.

3. Auswertung der Chromatogramme

Die Auswertung der Chromatogramme erfolgt im allgemeinen nach der Methode „Halbwertsbreite \times Höhe“ und Multiplikation mit einem Eichfaktor, der sich aus einem Testlauf ergibt. Zur Auswertung eines kompletten Chromatogramms benötigt man etwa 1 h. Zur Erleichterung der Auswertung wurde ein Nomogramm beschrieben (239). Zur Ermittlung der Peakfläche werden häufig Integratoren eingesetzt. Man unterscheidet mechanische (nicht sehr genaue) und elektronische Integration. Die Peakflächen werden entweder ausgedruckt oder in einem Computer weiterverarbeitet. Eine Zusammenfassung gibt HIRS (240, 241).

Gaschromatographische Bestimmung von Aminosäuren

Die Gaschromatographie (GC) besitzt gegenüber der Flüssig-Chromatographie nach wie vor zahlreiche Vorteile: Die Nachweisgrenze liegt bei Verwendung eines Flammenionisationsdetektors bei 1 pMol und bei einem Massenspektrometer-Detektor sogar noch tiefer. Die Analysendauer kann meistens auf weniger als 30 min herabgesetzt werden. Ein Gaschromatograph ist preiswerter als ein hoch-spezialisierter Aminosäuren-Analysator und bleibt jederzeit universell einsetzbar.

Es hat daher in der Vergangenheit nicht an Versuchen gefehlt, die GC auch für die Aminosäuren-Analyse einzusetzen (vgl. die Reviews (242—245)).

Derivate

Aminosäuren können in freier Form nicht gaschromatographiert werden, sondern müssen dazu in Derivate umgewandelt werden. Eine Fülle verschiedener Derivate wurde vorgeschlagen, darunter die Reaktionsprodukte der Ninhydrin-Reaktion, α -Chloroaminsäuremethylester, 2,4-Dinitrophenylmethylester, Phenylthiohydantoin-aminosäuren, N,N-Dimethylaminsäuremethylester, α -Methoxymethylester, Trimethylsilyl-aminosäuren und Acylaminsäureester. Hinsichtlich der Derivatisierung bestehen erhebliche Ansprüche: Sie soll bei allen in

Frage kommenden, chemisch sehr heterogenen Aminosäuren sehr gut reproduzierbar, rasch und möglichst quantitativ verlaufen und soll Verbindungen ergeben, die unzersetzt chromatographiert und vollständig voneinander getrennt werden können. Es dürfen auch keine Nebenprodukte gebildet werden, die die Trennung beeinträchtigen. Von den oben genannten Derivaten erfüllen im Augenblick die Acylaminsäureester die meisten dieser Bedingungen.

Systematische Untersuchungen zeigten (242), daß Acylaminsäureester höherer Alkohole bessere Chromatogramme ergeben. So werden heute bevorzugt N-Acetylaminosäurebutylester oder N-Trifluoracetylaminosäurebutylester verwendet. Die Veresterung erfolgt zweckmäßig in zwei Schritten: Man bildet zunächst die Methyl-ester (HCl-Gas-Katalyse) und schließt eine Umesterung mit Butanol an. Relativ schwierig zu verestern sind Lysin, Histidin und Cystin. Die Butylester werden anschließend acyliert. Dabei machten besonders Arginin und Tryptophan Schwierigkeiten. Arginin kann indessen vor der Analyse mittels Arginase in Ornithin verwandelt (246) und Histidin durch Ozonspaltung in Asparaginsäure überführt (246, 242) und durch Analyse von behandelter und unbehandelter Probe bestimmt werden.

Stationäre Phasen

Nahezu 100 verschiedene stationäre Phasen wurden bereits zur gaschromatographischen Trennung von Aminosäurederivaten untersucht. Aufmerksamkeit ist indessen nicht nur der flüssigen Phase, sondern auch dem Trägermaterial zu schenken. Für Trifluoracetylaminosäuremethylester eignet sich eine gemischte Phase (2,5% auf desaktiviertem Diatoport S) von XE-60, QF-1 und MS-200 im Verhältnis 46 + 27 + 27 (g/g) (247), wobei sich 22 Aminosäurederivate einschließlich Arginin trennen lassen. Trifluoracetylaminosäure-n-butylester können besonders gut mit Äthylenglycoladipat (EGA) auf Chromosorb W getrennt werden. Bei Änderung der Beladung von 0,5—2% wurden indessen Peak-Verschiebungen beobachtet (248) (optimale Trennung bei 0,65% Beladung). Für die polaren Aminosäurederivate eignet sich nach GEHRKE (243) eine Säule von 1,5% g/g OV-17 auf Chromosorb G (Abb. 11).

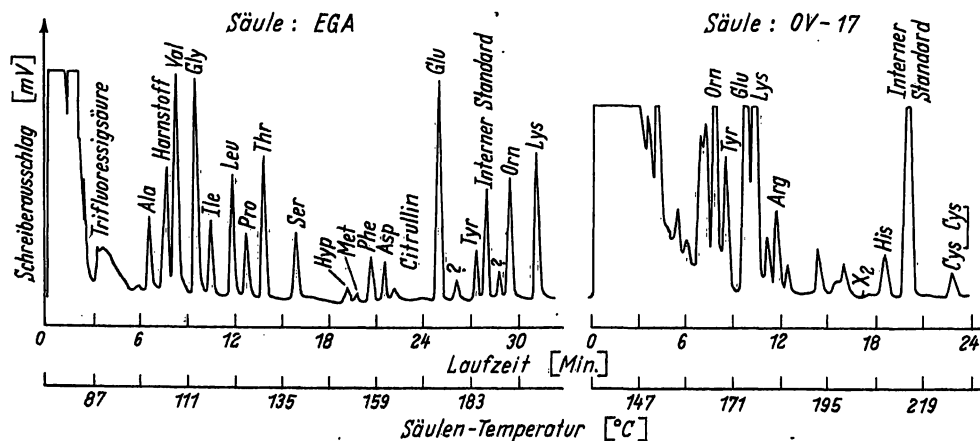


Abb. 11

Gaschromatogramm von Aminosäuren aus Blutplasma als N-Trifluoracetyl-n-Butylester nach GEHRKE und Mitarbeitern [243].

Injizierte Probenmenge je etwa 10 μ g Gesamt-Aminosäuren. Säule EGA: 0,35% (g/g) Äthylenglycoladipat auf 80/100 mesh hitzebehandeltem Chromosorb G. Glassäule 1,5 m \times 4 mm I. D. Starttemperatur 75°, Temperaturprogramm 4° pro min. Säule OV-17: 1,5% (g/g) Phenylmethylsilicon (OV-17) auf 80/100 mesh Chromosorb G. Glassäule 1 m \times 4 mm I. D. Starttemperatur 135°, Temperaturprogramm 4° pro min.

Quantitative Bestimmung

Die Anzeige des für analytische Gaschromatographie in der Regel eingesetzten Flammenionisationsdetektors ist sehr unspezifisch. Dies ist gegenüber der Flüssig-Chromatographie mit anschließender Ninhydrin-Reaktion von Nachteil. Bei der Analyse von biologischem Material ist daher zu erwarten, daß die Anwesenheit einer Fülle von nicht interessierenden Substanzen die quantitative Auswertung des Aminosäuren-Chromatogramms unmöglich macht. Biologisches Material ist deshalb vor der Derivatisierung vorzureinigen. Die Aminosäuren werden dazu zweckmäßig an einer kurzen Säule von stark saurem Ionenaustauscher (z. B. Amberlite IR-120 H) adsorbiert und nach Waschen mit Wasser anschließend mit Ammoniak eluiert (vgl. S. 410, Entsalzung, siehe auch (243)). Gegebenenfalls sind noch weitere Reinigungsschritte (z. B. Extraktion der Aminosäurederivate) der gaschromatographischen Analyse vorzuschicken.

Um Fehler durch Verluste während der vorbereitenden Operation und Derivatisierung sowie bei der Injektion möglichst klein zu halten, muß der Probe ein interner Standard — z. B. *n*-Butylstearat — zugefügt werden. Die molare Ansprechbarkeit des Flammenionisationsdetektors variiert bei den verschiedenen Aminosäuren. Für jede Aminosäure ist daher eine separate Eichkurve anzufertigen, die aber im Arbeitsbereich praktisch linear verläuft. 5—10 nMol Aminosäuren können noch bestimmt werden (242). Der Arbeitsbereich liegt bei 0,1 bis 35 µg pro Aminosäure (243) bei einem Fehler von etwa ± 2%. Semiquantitative Analysen können bei Anwendung einer Submikrotechnik noch mit weniger als 200 ng Aminosäuremischung durchgeführt werden.

Diskussion

Die Aminosäure-Analyse spielt außer für biochemische Probleme, wie Sequenzanalyse von Peptiden, Proteinen, Enzymen etc. auch für die klinische Chemie eine immer größere Rolle. Klinisch chemische Anwendungen sind vor allem hereditäre Aminosäure-Stoffwechselstörungen und renale Hyperaminoacidurien. Eine vermehrte Ausscheidung von Hydroxyprolin zeigt sich häufig beim Marfan-Syndrom und bei Kollagenosen. Einzelne interessante Untersuchungen liegen auch bei Mamma-Carcinom (250), Myocard-Infarkt (251) und Psoriasis (252) vor.

Grundsätzlich sollten bei allen hospitalisierten Patienten, bei denen eine Aminosäure-Stoffwechselstörung in Frage käme, orientierende qualitative Urinalysen auf Aminosäuren bzw. deren Metabolite durchgeführt werden. Bei positivem Ausfall einer der unter I aufgeführten Proben muß eine semiquantitative oder eine quantitative Analyse erfolgen; auch ein unter Umständen negatives Resultat sollte bei fortbestehender unklarer Diagnose mittels semiquantitativer Analyse weiter verfolgt werden. Quantitative Analysen aller Aminosäuren sind zur endgültigen Diagnose (evtl. Belastungstest) bei gewissen Stoffwechselstörungen zur Kontrolle der Behandlung und zur rechtzeitigen Erkennung diätbedingter Störungen des Aminosäurespiegels erforderlich. Die

qualitativen Proben sind in der Regel sehr unspezifisch. Die Dinitrophenylhydrazin-Probe ist stark pH- und temperaturabhängig und daher trotz guter Spezifität heikel durchzuführen. Sie spricht auf alle Ketosäuren an, so auch auf die beim Gesunden vorhandene 2-Oxoglutarinsäure und Brenztraubensäure, die allerdings erst bei längerer Inkubationsdauer ausfallen. Die Analysenvorschrift ist daher auch zeitlich genau einzuhalten. Die Eisenchlorid-Probe ist sehr unspezifisch und spricht nicht nur auf Aminosäure-Metaboliten, sondern auch auf zahlreiche andere Substanzen, auch Arzneimittelmetaboliten an. Bei der Phenylketonurie (PKU) wird der Test häufig erst dann positiv, wenn der Zeitpunkt für eine wirksame Behandlung bereits überschritten ist. Für eine Frühdiagnose der PKU kommt daher nur eine Bestimmung des Phenylalanins im Blut in Betracht. Die Nitroprussid-Probe ist spezifisch auf SH- und Disulfid-Gruppen und ist daher bei Cystin und Homocystin positiv. Eine positive Probe kann aber nur mit einiger Erfahrung von unspezifischen Reaktionen, wie z. B. von Kreatinin, unterschieden werden. Entsprechendes gilt auch für die Probe auf Homocystin nach BARBER.

Das heute am meisten durchgeführte Screeningverfahren ist der semiquantitative mikrobiologische Test auf PKU nach GUTHRIE und SUSI (99, 100). Wesentliche Vorteile sind: die Blutproben können auf Filterpapier eingetrocknet versandt werden, der Test ist relativ billig, einfach und in großen Serien durchführbar. Der Test kann auch auf andere Substanzen angewandt werden, z. B. Methionin, Leucin, Galaktose etc. Nachteile des Verfahrens sind: es ist ein spezialisiertes Labor erforderlich die Analysendauer ist lang und es wird jeweils nur eine Substanz erfaßt, ein positives Resultat muß durch eine quantitative Methode bestätigt werden. Es ist zu erwarten, daß die semiquantitativen mikrobiologischen Tests in absehbarer Zeit weitgehend durch quantitative, automatische Verfahren ersetzt werden (vgl. hierzu (180a, b)).

Bei der fluorometrischen, automatischen Phenylalanin-Bestimmung mittels Autoanalyser (187) können hingegen 40—60 Proben pro h analysiert werden. Dabei bleibt der Vorteil der eingetrockneten Blutflecken auf Filterpapier erhalten und es werden quantitative Resultate erzielt. Dasselbe gilt für Bestimmung von Tyrosin (197). Alle bisher genannten Analysenverfahren beziehen sich jeweils nur auf eine oder wenige Aminosäuren. Der Vorteil der chromatographischen Verfahren liegt vor allem darin, daß jede Art von Aminosäure-Stoffwechselstörungen bemerkt wird. Der Guthrie-Test könnte unseres Erachtens am ehesten durch Dünnschicht-Chromatographie abgelöst werden, mit der bei vergleichbarem Aufwand eine semiquantitative Analyse auf alle Aminosäuren durchgeführt werden kann. Es ist allerdings nicht möglich, das Verfahren der eingetrockneten Blutflecken ohne Modifikationen zu übernehmen (vgl. dazu auch (267)). Untersuchungen über die Verwendbarkeit von Blutproben in Kunststoffkapillaren sind noch im Gange. Bei Urinalysen müssen die Proben vor der

Chromatographie entsalzt werden, was einen zusätzlichen Aufwand erfordert. Die Einführung der Zweischichten-Platte durch KRAFFCZYCK und HELGER (125) stellt hier einen großen Fortschritt dar.

Die Aminosäuren-Analyse als DNP-Derivate nach BRENNER und Mitarbeitern (144, 145) ist wegen der guten Trennung und Extraktion besonders geeignet für die Untersuchung heterogener Gemische wie z. B. Stuhl (153), sowie für spezielle wissenschaftliche Aufgabenstellungen. Für Massenuntersuchungen ist die Methode aber zu arbeitsaufwendig. Die anfänglich von DENT für klinisch-chemische Routine-Analysen eingeführte Papierchromatographie wird zwar in USA noch häufig verwendet, ist aber als überholt anzusehen. Dies gilt sicher nicht für die Hochspannungselektrophorese, die sehr rasch durchführbar ist, aber doch einen zusätzlichen apparativen Aufwand erfordert. Sie ist besonders für die salzhaltigen Urinproben vorteilhaft.

Die spezifischen enzymatischen und kolorimetrischen Methoden finden nur in Einzelfällen Verwendung. Die quantitativen mikrobiologischen Verfahren waren früher von Bedeutung und erzielten eine beachtliche Spezifität und Genauigkeit. Die Ergebnisse bleiben aber mit einer Unsicherheit behaftet, da Wachstumsstoffe oder Antibiotika in den untersuchten Proben zu beachtlichen Fehlern führen können. Durch den großen Erfolg der chromatographischen Verfahren sind die mikrobiologischen Methoden in den Hintergrund getreten.

Unter den quantitativen chromatographischen Analysemethoden spielt heute zweifellos die Säulenchromatographie im Zweisäulenverfahren an Kationenaustauschern bei weitem die größte Rolle. Mit modernen, vollautomatischen Geräten kann heute eine Genauigkeit von 1—2% erzielt werden. Mit Hilfe von Mikroküvetten, Skalenexpandern und Verringerung des Säulenquerschnitts wurde eine Empfindlichkeitssteigerung auf 1 nMol pro Aminosäure erzielt. Die heutigen Mikroanalysatoren mit extrem reduziertem Säulenquerschnitt dürften sich aber weniger für Routine- als vielmehr für spezielle wissenschaftliche Fragestellungen eignen. Durch Verwendung neuer Harze konnte bei zunehmender Analysengeschwindigkeit auch die Trennleistung wesentlich gesteigert werden: Die ursprüngliche Analysenzeit für physiologisches Material wurde inzwischen von 22 h (215) auf 10 h und im Einsäulenverfahren sogar

auf 7 h reduziert. Mehrkolonnensysteme (253, 254) sowie automatische Probengeber (215a, b, c) gestatten eine wesentlich rationellere Ausnutzung der Analysengeräte. Wie im ursprünglichen Verfahren wird auch heute noch mit SnCl_2 stabilisiertes Ninhydrin verwendet. Es gelang bisher nicht, ein Reagenz zu finden, das ähnlich empfindlich und spezifisch auf Aminoverbindungen ist, aber nicht seine Nachteile (Oxydationsempfindlichkeit) aufweist. Vom zeitweilig verwendeten Gradienten-Elutionsverfahren wurde inzwischen wieder abgegangen. Die Anionenaustauscher-Chromatographie ergänzt bei speziellen Fragestellungen die Kationenaustauscher-Chromatographie. Der Ligandenaustausch könnte in der Zukunft eine größere Bedeutung erlangen. Im Augenblick liegen vor allem in Europa noch zu wenig Erfahrungen vor.

Bei automatischer Probenaufgabe ist der Einsatz von elektronischen Integratoren zur Flächenermittlung fast unerlässlich. Bei kleiner Anzahl von Aminosäure-Analysatoren benötigt jedes Gerät einen eigenen Integrator, wobei die Umrechnung von Flächenwerten in Konzentrationswerte mit einem Tischrechner erfolgt. Bei großen Einheiten wird sich in Zukunft die Frage stellen, ob ein zentraler Integrator mit Computeranschluß und entsprechendem Tape oder Lochstreifen-einheiten an den einzelnen Geräten vorzuziehen ist.

Die Gaschromatographie von Aminosäuren aus physiologischen Flüssigkeiten ist zwar heute noch nicht für Routineanalysen brauchbar. Schwierigkeiten liegen in der Derivatbildung und der Unspezifität des Detektors. Die wesentlich kürzere Analysendauer, der geringere apparative Aufwand und die hervorragende Trennleistung berechtigen zu weiteren Versuchen. Die Möglichkeit der Kombination mit Radiogaschromatographie (255, 256) und Massenspektrometrie (257—262) eröffnen neue Wege zur Untersuchung von Stoffwechselstörungen z. B. mit Hilfe von Zellkulturen. Diese Kombinationen wären auch von Vorteil bei der Identifizierung der zahlreichen, in physiologischen Flüssigkeiten nachgewiesenen (213) unbekanntesten Substanzen.

Herrn Prof. Dr. T. GERRITSEN danken wir für wesentliche Hinweise und Diskussionen zu dieser Arbeit, Frau Dr. R. HERNANDEZ für Hilfe bei der Literaturbeschaffung und Fräulein C. LOOSEN für Mithilfe bei der Abfassung des Manuskripts.

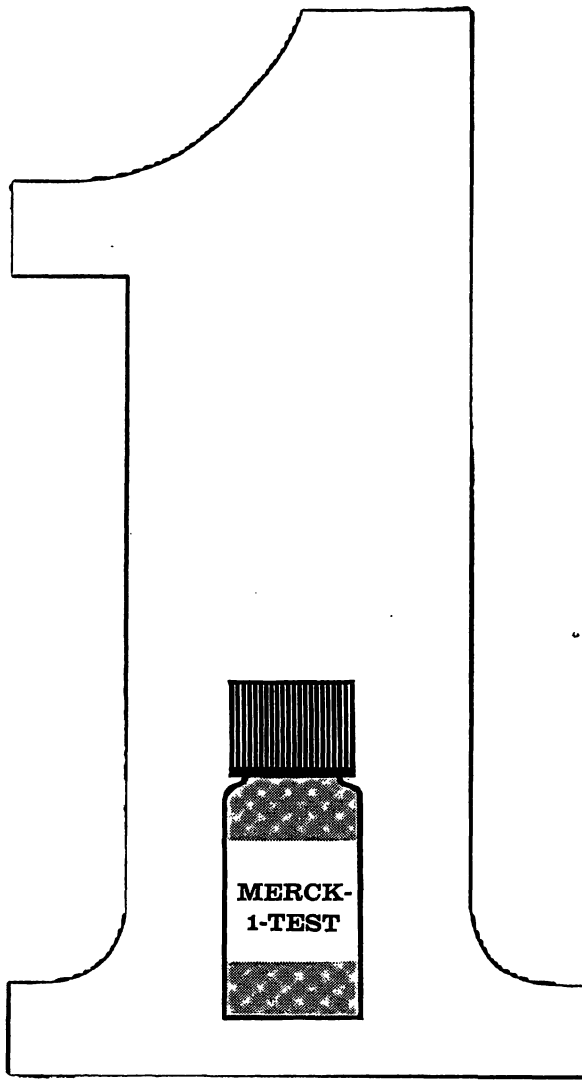
Literatur

1. DETTERBECK, F. J. und M. S. THESIS, Mich. State University (1969), in Vorbereitung. — 2. NYHAN, W. L., „Amino Acid Metabolism and Genetic Variation“, McGraw-Hill Book Comp., New York (1967). — 3. STANBURY, J. B., J. B. WYNGAARDEN und D. S. FREDRICKSON, „The Metabolic Basis of Inherited Disease“, McGraw-Hill Book Comp., New York, 2nd Ed. (1966). — 4. HSIA, D. Y. und T. INOUE, „Inborn Errors of Metabolism“, Year Book Med. Publ., Chicago (1966). — 5. SCRIVER, C. R., in Cecil Loeb, Textbook of Medicine, S. 1219—1226 (Editors P. B. Beeson, W. McDermott), 12th Ed. Saunders, Philadelphia (1967). — 6. HSIA, D. T., Birth Defects Orig. Art. Ser. 4, 92 (1968). — 7. SCRIVER, C. R., S. PUESCHEL und E. DAVIES, N. England J. Med. 274, 636 (1966). — 8. EFRON, M. L., in 3, S. 393—408.

9. MOSER, H. W., M. L. EFRON, H. BROWN, R. DIAMOND und C. G. NEUMANN, Amer. J. Med. 42, 9 (1967). — 10. McMURRAY, W. C., J. C. RATHBUN, F. MOHYNDIN und S. J. KOEGLER, Pediatrics Springfield 32, 347 (1963). — 11. MOHYNDIN, F., J. D. RATHBUN und W. C. McMURRAY, Amer. J. Dis. Child. 113, 152 (1967). — 12. HARRIS, H., L. S. PENROSE und D. H. THOMAS, Amer. Human Genet. 23, 442 (1959). — 13. FRIMTER, G. W., A. HAYMOVITZ und M. HORWITH, N. England J. Med. 268, 333 (1963). — 14. FRIMTER, G. W., in 3, S. 409. — 15. WOLLASTON, W. H., Philos. Transact. Roy. Soc. London, Biol. Sc. 100, 223 (1810). — 16. STEIN, W. H., Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 78, 705 (1951). — 17. DENT, C. E. und G. A. ROSE, Quart. J. Med. 20, 205 (1951). — 18. KNOX, W. E., in 3, S. 1262. — 19. GERRIT-

- SEN, T., E. KAVEGGIA und H. A. WAISMAN, *Pediatrics* Springfield 36, 882 (1965). — 20. NYHAN, W. L., T. GERRITSEN und T. ANDO, in 2, S. 255. — 20a. RAMPINI, S., D. VISCHER, H.-Ch. CURTIUS, P. W. ANDERS, F. TANCREDI, W. FRISCHKNECHT und A. PRADER, *Helv. paediatr. Acta* 22, 135 (1967). — 21. CHILDS, B., W. L. NYHAN, M. BORDEN, L. BARD und R. E. COOKE, *Pediatrics* Springfield 27, 522 und 539 (1961). — 22. CHILDS, B. und W. L. NYHAN, *Pediatrics* Springfield 33, 403 (1964). — 23. SCHREIER, K. und W. MÜLLER, *German Medical Monthly* 9, 437 (1964). — 24. DE VRIES, A., S. KOCHWA, J. LAZEBNIK, M. FRANK und M. DJALDETT, *Amer. J. Med.* 23, 408 (1957). — 25. WYNGAARDEN, J. B. und S. SEGAL, in 3, S. 341. — 26. DENT, C. E. und H. HARRIS, *J. Bone Joint Surg.* 38B, 204 (1956). — 27. SCRIVER, C. R., R. B. GOLDBLOOM und C. ROY, *Pediatrics* Springfield 34, 357 (1964). — 28. KAESER, H., P. COTTIER und I. ANTENER, *J. Pediatr.* S. Louis 61, 386 (1962). — 28a. FUHRMANN, W., *Z. Kinderhk.* 82, 514 (1959). — 29. LEVIN, B., *Amer. J. Dis. Child.* 113, 142 (1967). — 30. RUSSELL, A., B. LEVIN, V. G. OBERHOLZER und L. SINCLAIR, *Lancet* London 1962/II 699. — 31. GHADIMI, H., M. W. PARTINGTON und A. HUNTER, *New Eng. J. Med.* 265, 221 (1961). — 32. GHADIMI, H., M. W. PARTINGTON und A. HUNTER, *Pediatrics* Springfield 29, 714 (1962). — 33. LA DU, B. N., R. R. HOWELL, G. A. JACOBY, J. E. SEEGER, E. K. SOBER, V. G. ZANNONI, J. P. CANBY und L. K. ZIEGLER, *Pediatrics* Springfield 32, 216 (1963). — 34. LA DU, B. N., in 3, S. 366. — 35. GHADIMI, H. und R. ZISCHKA, in 2, S. 133. — 36. AUERBACH, V. H., A. M. DIGEORGE und G. G. CARPENTER, in 2, S. 145. — 37. BESSMAN, S. P. und R. BALDWIN, *Science* Washington 135, 789 (1962). — 38. LEVENSON, J., K. LINDAHL-KIESSLING und S. RAYNER, *Lancet* London 1964 II 756. — 39. TOCCI, P. M. und S. P. BESSMAN, in 2, S. 161—168. — 40. GERRITSEN, T., J. G. VAUGHN und H. A. WAISMAN, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 9, 493 (1962). — 41. GERRITSEN, T. und H. A. WAISMAN, *Pediatrics* Springfield 33, 413 (1964). — 42. CARSON, N. A. und D. W. NELL, *Arch. Dis. Child.* London 37, 505 (1962); 38, 425 (1963). — 43. WERDER, E. W., H.-Ch. CURTIUS, F. TANCREDI, P. W. ANDERS und A. PRADER, *Helv. paediatr. Acta* 21, 1 (1966). — 44. PERRY, T. L., S. HANSEN, L. McDUGALL und P. D. WARRINGTON, *Clin. Chim. Acta* Amsterdam 15, 409 (1967). — 45. GERRITSEN, T. und H. A. WAISMAN, in 3, S. 420. — 46. PERRY, T. L., in 2, S. 279—296. — 47. SMITH, A. J. und L. B. STRANG, *Arch. Dis. Child.* London 33, 109 (1958). — 48. EFRON, M. L., E. M. BRIBBY, L. G. PALATTAO und C. V. PRYLES, *New Eng. J. Med.* 267, 1193 (1962). — 49. EFRON, M. L., in 3, S. 376. — 50. MENKES, J. H., P. L. HURST und J. M. CRAIG, *Pediatrics* Springfield 14, 462 (1954). — 51. WESTALL, R. G., J. DANCIS und S. MILLER, *Amer. J. Dis. Child.* 94, 571 (1957). — 52. DANCIS, J., M. LEVITZ, S. MILLER und R. G. WESTALL, *Brit. Med. J.* 1, 91 (1959). — 53. DANCIS, J. und M. LEVITZ, in 3, S. 353. — 54. SNYDERMAN, S. E., in 2, S. 171. — 54a. DANCIS, J., J. HUTZLER und T. ROKKONES, *New Eng. J. Med.* 276, 84 (1967). — 55. COLOMBO, J. P., R. RICHTERICH, A. SPAHR, A. DONATH und E. ROSSI, *Lancet* London 1964 I 1014. — 56. GHADIMI, H., P. KOTTMEIER, R. ACHS, R. PRABHU und B. JAFFE, *Proc. Soc. Pediatr. Res. 35th Annual Meeting*, S. 33, Philadelphia (1965). — 57. WOODY, N. C., J. HUTZLER und J. DANCIS, *Amer. J. Dis. Child.* 112, 577 (1966). — 58. GHADIMI, H., V. I. BINNINGTON und P. PECORA, *New Eng. J. Med.* 273, 723 (1965). — 59. GHADIMI, H. und R. ZISSCHKA, in 2, S. 227. — 60. FÖLLING, A., *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 227, 169 (1934). — 61. JERVIS, G. A., R. J. BLOCK, D. BOLLING und L. KANZE, *J. biol. Chemistry* 134, 105 (1940). — 62. KNOX, W. E., in 3, S. 258. — 63. ALLEN, R. J., L. FLEMING und R. SPIRITO, in 2, S. 69. — 64. AUERBACH, V. H., A. M. DIGEORGE und G. G. CARPENTER, in 2, S. 11. — 65. SCHÄFER, I. A., C. R. SCRIVER und M. L. EFRON, *New Eng. J. Med.* 267, 51 (1962). — 66. SCRIVER, C. R., I. A. SCHÄFER und M. L. EFRON, *Nature* London 192, 672 (1961). — 67. SCRIVER, C. R., in 2, S. 327. — 68. JOSEPH, R., M. RIBIERRE, J. C. JOB und M. GIRAULT, *Arch. franç. pédiatr.* 15, 374 (1958). — 69. GERRITSEN, T. und H. A. WAISMAN, *New Eng. J. Med.* 275, 66 (1966). — 69a. TADA, K. H., ITO, Y. WADA und T. ARAKAWA, *Tohoku J. Exper. Med.* 80, 118 (1963). — 70. MEDES, G., *Biochem. J.* 29, 917 (1942). — 71. LA DU, B. N., in 3, S. 295. — 72. SHEAR, C. S., W. L. NYHAN und P. M. TOCCI, in 2, S. 97. — 73. LEVINE, S. Z., E. MARPLES und H. H. GORDON, *J. Clin. Invest.* 20, 199 (1941). — 74. LEVINE, S. Z., H. H. GORDON und E. MARPLES, *J. Clin. Invest.* 20, 209 (1941). — 75. HSIA, D. Y., M. LITWACK, M. O. FLYNN und S. JAKOVIC, *New Eng. J. Med.* 267, 1067 (1962). — 76. GENTZ, J., R. JAGENBURG und R. ZETTERSTRÖM, *J. Pediatr.* S. Louis 66, 670 (1965). — 77. KOGOUR, M. D., K. N. SHAW und G. N. DONNELL, *Amer. J. Dis. Child.* 113, 47 (1967). — 78. JEPSON, J. B., A. J. SMITH und L. B. STRANG, *Lancet* London 1958 II 1334. — 78a. TADA, K., Y. WADA und T. ARAKAWA, *Amer. J. Dis. Child.* 113, 64 (1967). — 79. BARON, D. N., C. E. DENT, H. HARRIS, E. W. HART und J. B. JEPSON, *Lancet* London 1956 II 421. — 80. JEPSON, J. B., in 3, S. 1283. — 81. FANCONI, G., *Jber. Kinderhk.* 147, 229 (1936). — 82. DETONI, G., *Ann. paediatr.* Basel 187, 42 (1956). — 83. LEAF, A., in 3, S. 1205. — 84. ISSELBACHER, K. I., in 3, S. 178. — 85. HSIA, D. Y., S. GREEN, M. KAY und S. S. GELLIS, *Amer. J. Dis. Child.* 88, 258 (1954). — 86. CUSWORTH, D. C., C. E. DENT und F. V. FLYNN, *Arch. Dis. Child.* London 30, 150 (1955). — 87. STEIN, W. H., A. G. BEARN und S. MOORE, *J. Clin. Invest.* 33, 410 (1954). — 88. BEARN, A. G., in 3, S. 761. — 89. HARRISON, H. E., *J. Chron. Dis.* 7, 346 (1958). — 90. MCCREADY, R. A. und M. G. HUSSEY, *Newborn phenylketonuria (PKU) detection program in Massachusetts: progress report. Presented at American Public Health Association Convention, Kansas City, Kansas, Nov. 12, 1963.* — 91. SCRIVER, C. R., *Canad. Med. Assoc. J.* 92, 1360 (1965). — 92. SCRIVER, C. R., *Ped. Clin. N. Amer.* 12, 807 (1965). — 93. THALHAMMER, O., *Msch. Kinderhk.* 117, 37 (1969). — 94. SCRIVER, C. R., *Pediatrics* Springfield 39, 764 (1967). — 95. SCRIVER, C. R., in „Progress in Medical Genetics“ (A. Bearn and A. G. Steinberg, Eds.), *Grune & Stratton, New York, Vol. 2*, 83 (1962). — 96. P. M. TOCCI, in 2, S. 480. — 97. BERRY, H. K., *Clin. Chem. New York* 5, 603 (1959). — 98. PERRY, T. L., S. HANSEN und L. McDUGALL, *Canad. Med. Assoc. J.* 95, 89 (1966). — 99. GUTHRIE, R. und A. SUSI, *Pediatrics* Springfield 32, 338 (1963). — 100. GUTHRIE, R., *Birth Defects Orig. Art. Ser.* 4, 92 (1968). — 100a. MEISTER, A., *Biochemistry of the Amino Acids*, Academic Press, New York (1965), Vol. I, S. 231—268. — 101. DENT, C. E., *Lancet* London 1947/I 637. — 102. DENT, C. E., *Biochem. J.* 41, 240 (1947). — 103. DENT, C. E., *Biochem. J.* 43, 169 (1948). — 104. MABRY, C. C. und W. R. TODD, *J. Laborat. Clin. Med.* S. Louis 61, 146 (1962). — 105. SAMUELS, S., *Arch. Neurol.* 10, 322 (1964). — 106. JUUL, P., *Scand. J. Clin. Laborat. Invest.* 18, 629 (1966). — 107. EFRON, M. L., *New Eng. J. Med.* 72, 692 (1959). — 108. in 4, Vol. 2, S. 60. — 109. BOTTOMLY, S. S., *Analytic Biochem.* 18, 472 (1967). — 110. EFRON, M., in I. Smith, *Chromatographic and Electrophoretic Techniques* Vol. II, S. 159—189, Interscience Pub., New York (1960). — 111. HANNIG, K., in *Biochemisches Taschenbuch* (H. M. Rauen, Editor), Band 2, S. 938, Springer-Verlag Heidelberg (1964). — 112. CLOTTEN, R. und A. CLOTTEN, *Hochspannungselektrophorese*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1962). — 113. STEVENS, K. M., in *Electrophoresis, A Practical Laboratory Manual* (S. T. Nerenberg, Editor), C. A. Davis Comp., Philadelphia (1966), S. 147. — 114. MOFFAT, E. D. und R. I. LYTLE, *Analytic. Chem.* 31, 926 (1959). — 115. BIGWOOD, E. J., R. CROART, E. SCHRAMM, P. SOUPART und H. VIS, *Adv. Clin. Chem.* 2, 201 (1959). — 116. SMITH, I., *Chromatographic and Electrophoretic Techniques*, Interscience Publ. Inc., New York (1962). — 117. BRENNER, M., A. NIEDERWIESER und G. PATAKI, in E. Stahl, *Dünnschichtchromatographie*, S. 403, Springer-Verlag, Heidelberg (1962). — 118. PATAKI, G., *Techniques of Thin-Layer Chromatography in Amino Acid and Peptide Chemistry*, Ann Arbor Science Publ. Inc., Ann Arbor, Michigan (1968). — 119. PATAKI, G., *Dünnschicht-Chromatographie in der Aminosäure- und Peptid-Chemie*, Walter de Gruyter & Co., Berlin (1966). — 120. OEPEH, H. und I. OEPEH, *Klin. Wschr.* 41, 921 (1963). — 121. BREMER, H. J., W. NÜTZENADEL und H. BICKEL, *Msch. Kinderhk.* 117, 32 (1969). — 122. CROWSHAW, K., S. J. JESSUP und P. W. RAMWELL, *Biochem. J.* 70, 79 (1967). — 123. NEEDLE, D. J. und R. J. POLLITT, *Biochem. J.* 97, 607 (1965). — 124. HARRIS, C. K., E. TIGANE und G. S. HANES, *Canad. J. Biochem.* 39,

MERCK



MERCK

TEST

Ein Test in einem Glas

Cholinesterase

GOT (UV)

GPT (UV)

HBDH (UV)

LDH (UV)

**Eine neue Konzeption für Sicherheit
und Zeitersparnis in Klinik- und
Praxislabor**

**Öffnung der 1-Test-Gläser
im Handumdrehen**

**Lösungsmittel in der Packung
enthalten; daher kein destilliertes
Wasser notwendig**

E. MERCK AG · DARMSTADT

**Eine Frage
an den
Biochemiker:**

Haben Sie hoffnungslose Trennprobleme?

„Dann versuchen Sie es doch einmal mit der ‚Quickfit‘ Gegenstromverteilung! — Sie wollen nicht literweise mit Lösungsmitteln herumplantschen? — Keine Angst! Unsere Maschine ist vollautomatisiert, auch die Zugabe und Entnahme der Lösungsmittel.“

QUICKFIT



**Gegenstrom-
Verteilmaschine**

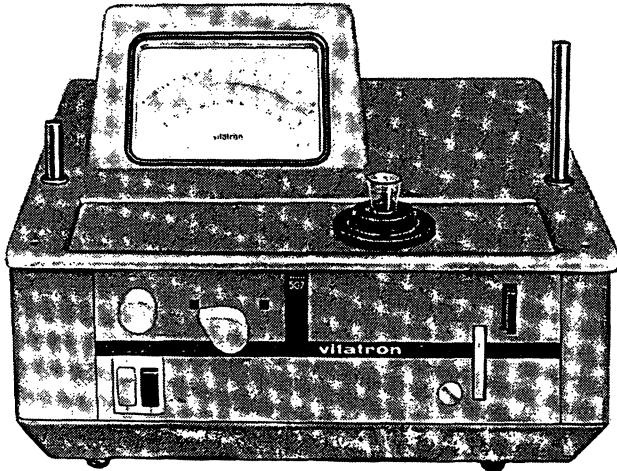
mit zwei beweglichen
Phasen;
programmierbar von

$$\frac{\text{Oberphase}}{\text{Unterphase}} = \frac{1}{24} \text{ bis } \frac{24}{1};$$

daher auch
Konzentrierungen möglich.

QUICKFIT LABORGLAS GMBH

Wiesbaden-Schiernstein · Hüttenstraße 8
Telefon (06121) 64091 · FS 04186 503



Wir sind sicher:

**Das VITATRON UC 200
PRÄZISIONS-COLORIMETER**
ist eines der stabilsten
Ein-Strahl-Photometer der Welt.

Es hat die Stabilität und Linearität eines
Doppel-Strahl Monochromator-Gerätes, kostet
aber weniger als die Hälfte.

Wir können Ihnen hier nicht all seine Vorzüge
beschreiben. Aber wenn Sie in Ihrem Labor
ein wenig Platz übrig haben (nur 32 cm x 32 cm),



dann führen wir es Ihnen gern vor.
Sollten Sie noch etwas mehr Platz haben
(30 cm x 43 cm), dann bringen wir auch unseren
VITATRON-DIGITALWANDLER mit.
Er druckt automatisch die Photometeranzeige
als Konzentration oder Extinktion aus,
zusammen mit der Proben-Nummer.
Fordern Sie bitte weitere Informationen an!
Unsere Service-Station ist in Ihrer Nähe.

vitatron

Vitatron GmbH

5024 Pulheim, Postfach 9 · Ruf: Stommeln 02238/7312

- 439 (1961). — 125. KRAFCZYK, F. und R. HELGER, Z. analyt. Chem. 243, 536 (1968). — 126. HAIS, I. M. und K. MACEK, Handbuch der Papierchromatographie, VEB Gustav Fischer Verlag Jena, (1958) und (1963). — 127. STAHL, E., Dünnschichtchromatographie, Springer-Verlag, Heidelberg (1962) und (1968).
128. WADMAN, S. K., F. J. VAN SPRANG, G. J. VAN STEKELBURG und P. K. DE BREE, Acta Paediatr. Scand. 56, 485 (1967). — 129. BRENNER, M. und A. NIEDERWIESER, Experientia Basel 16, 378 (1960). — 130. OPIENSKA-BLAUTH, J., H. KRACZKOWSKI und H. BRUSZKIEWICZ, in G. B. Marini-Bettolo, Thin-Layer Chromatography, Elsevier, Amsterdam (1964). — 131. BARON, D. N. und J. ECONOMIDIS, J. Clin. Path. London 16, 484 (1963). — 132. FAHMY, A. R., A. NIEDERWIESER, G. PATAKI und M. BRENNER, Helv. chim. Acta 44, 2022 (1961). — 133. ROKKONES, T., Scand. J. Clin. Laborat. Invest. 16, 149 (1964). — 134. WHITE, H. H., Clin. Chim. Acta Amsterdam 21, 297 (1968). — 135. SAMUELS, S. und S. S. WARD, J. Laborat. Clin. Med. S. Louis 67, 669 (1966).
136. WALKER, W. H. und M. BARK, Clin. Chim. Acta Amsterdam 13, 241 (1966). — 137. TROUGHTON, W. D., Techn. Bull. Regist. Med. Techn. 36, 137 (1966). — 138. TROUGHTON, W. D., R. S. BROWN und N. A. TURNER, Amer. J. Clin. Path. 46, 139 (1966).
139. FARRELLY, R. O. und W. B. WATKINS, Clin. Chim. Acta Amsterdam 20, 291 (1968). — 140. AMBERT, J., C. PECHERY und C. CARPENTIER, Ann. biol. clin. Paris 24, 17 (1966). — 141. SANGER, F., Biochem. J. 39, 507 (1945); 40, 261 (1946); 45, 562 (1949). — 142. BISERTE, G. und R. OSTEUX, Bull. Soc. Chim. biol. Paris 33, 50 (1951). — 143. NIEDERWIESER, A., Dissertation Universität Basel (1962). — 144. WALZ, D., A. R. FAHMY, G. PATAKI, A. NIEDERWIESER und M. BRENNER, Experientia Basel 19, 213 (1963). — 145. BRENNER, M., A. NIEDERWIESER und G. PATAKI, in „New Biochem. Separations“ (A. T. James and L. J. Morris, Editors), van Nostrand, London (1964). — 146. PATAKI, G. und M. KELLER, diese Z. 1, 157 (1963). — 147. PATAKI, G., diese Z. 2, 129 (1964). — 148. PATAKI, G. und M. KELLER, Helv. chim. Acta 47, 787 (1964). — 149. BÜRGI, W., J. P. COLOMBO und R. RICHTERICH, Klin. Wschr. 43, 1202 (1965). — 150. TANCREDI, F. und H.-CH. CURTIUS, unveröffentlicht. — 150a. FIGGE, K., Clin. Chim. Acta Amsterdam 12, 605 (1965). — 151. PATAKI, G. und M. KELLER, Helv. chim. Acta 47, 787 (1964). — 152. KELLER, M. und G. PATAKI, Helv. chim. Acta 46, 1687 (1963). — 153. TANCREDI, F. und H.-CH. CURTIUS, diese Z. 5, 106 (1967).
154. PALMORK, K. H., Acta Chem. Scand. 17, 1456 (1963). — 155. PITT-RIVERS, R. und J. R. TATA, „The Chemistry of Thyroid Diseases“, Charles Thomas Publ., Springfield, Illinois, USA (1960). — 156. RHODES, B. A. und H. N. WAGNER, Nature London 210, 647 (1966). — 157. WEINERT, H., H. MASUI, I. RADICHEWICH und S. C. WERNER, J. Clin. Invest. 46, 1264 (1967). — 158. ZAPPI, E., G. HOPPE, M. SCHMIDT und F. PRANGE, diese Z. 6, 286 (1968). — 159. OBERDISSE, K. und E. KLEIN, „Die Krankheiten der Schilddrüse“, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1967).
160. FÖLDES, J., G. GYERTYÁNFY, G. TAMÁS, E. GESZTESI und J. TAKÁCS, Nuklearmedizin 6, 400 (1967). — 161. SHALOM, E. S., J. Endocr. 36, 1 (1966). — 162. MEANS, J. H., L. J. DEGROOT und J. B. STAMBURY, „The Thyroid and its Diseases“, McGraw-Hill Book Co., New York, Toronto (1963). — 163. ZAPPI, E. und G. HOPPE, Nuklearmedizin 6, 420 (1967). — 164. FAIRCLOTH, M. A., A. D. WILLIAMS und W. H. FLORSHEIM, Analytic. Biochem. 12, 437 (1965). — 165. ZAPPI, E., J. Chromatog. 30, 611 (1967).
166. SCHNEIDER, G. und C. SCHNEIDER, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 332, 316 (1963). — 167. ZAPPI, E., in „Progress in Thin-Layer Chromatography and Related Methods“ (A. Niederwieser, G. Pataki, Editors), Ann Arbor Science Publ. Inc., Ann Arbor, Michigan (im Druck). — 168. BOWDEN, C. H., N. F. McLAGAN und J. H. WILKINSON, Biochem. J. 59, 93 (1955). — 169. MANDL, R. H. und R. J. BLOCK, Arch. Biochem. Biophysics 81, 25 (1959). — 170. GMELIN, H. und A. I. VIRTANEN, Acta Chem. Scand. 13, 1469 (1959). — 171. BARKER, S. B., in „Methods in Hormone Research“ (R. Dorfman, Editor), Academic Press, New York (1962). — 172. BARKER, S. B., Biochem. J. 90, 214 (1964). — 173. POSTMES, TH., Clin. Chim. Acta Amsterdam 10, 581 (1964). — 174. Row, V. V., R. VOLPÉ und C. EZRIN, Clin. Chim. Acta Amsterdam 13, 666 (1966). — 175. STAHL, E. und J. PFEIFLE, Z. analyt. Chem. 200, 377 (1964). — 176. PRESCOTT, B. A., E. BOREK, A. BRECHER und H. WAELSCH, J. biol. Chemistry 181, 273 (1949). — 177. GUNNESS, M., I. M. DWYER und J. L. STOKES, J. biol. Chemistry 163, 159 (1946). — 178. BICKEL, H., J. GERRARD und E. M. HICKMANS, Lancet London 1953 II 812. — 179. SCHWEIGERT, B. S. und E. E. SNELL, Nutrit. Abstr. Rev. 16, 497 (1947). — 180. SCHWERDTFEGGER, E., Z. analyt. Chem. 243, 501 (1968). — 180a. GERKE, J. R., T. A. HANEY, J. F. PAGANO und A. FERRARI, Ann. N. Y. Acad. Sci. 87, 782 (1960). — 180b. SHAW, W. H. C. und R. E. DUNCOMBE, Analytic. Chem. 88, 694 (1963). — 181. BLOCK, R. J. und D. BOLLING, The Amino Acid Composition of Proteins and Foods, C. C. Thomas, Springfield, Ill., (1951). — 182. in 4, Vol. 2. — 183. BERGMAYER, H. U., Methoden der enzymatischen Analyse, Verlag Chemie, Weinheim (1962). — 184. McCAMAN, M. W. und E. ROBINS, J. Laborat. Clin. Med. S. Louis 59, 885 (1962). — 185. WONG, P. W. K., T. INOUE und M. O. FLYNN, Clin. Chem. New York 10, 1098 (1964). — 185a. AMBROSE, J. A., Clin. Chem. New York 15, 15 (1969). — 186. in 4, Vol. 2, S. 69. — 187. HILL, J. B., G. K. SUMMER, M. W. PENDER und N. O. ROSZEL, Clin. Chem. New York 11, 542 (1965). — 188. LA DU, B. N. und P. J. MICHAEL, J. Laborat. Clin. Med. S. Louis 55, 491 (1960).
189. KNOX, W. E. und B. M. PITT, J. biol. Chemistry 225, 675 (1957). — 190. GENTZ, J., B. LINDBLAD, S. LINDSTEDT und R. ZETTERSTRÖM, J. Laborat. Clin. Med. S. Louis (1969) im Druck. — 191. BERRY, H. K., B. UMBARGER und S. B. SUTHERLAND, J. Pediatr. S. Louis 67, 609 (1965). — 192. BERRY, H. K., Clin. Chim. Acta Amsterdam 20, 299 (1968). — 193. UDENFRIEND, S. und J. R. COOPER, J. biol. Chemistry 203, 953 (1953). — 194. WOOLF, L. I., in Adv. Clin. Chem. (H. Sobotka und C. P. Stewart, Editors), Academic Press, New York, Vol. 6, 172 (1963).
195. GERNGROSS, O., K. VOSS und H. HERFELD, Chem. Ber. 66, 435 (1933). — 196. WAALKES, T. P. und S. UDENFRIEND, J. Laborat. Clin. Med. S. Louis 50, 733 (1957). — 197. HOCHHELLA, N. J., Analytic. Biochem. 21, 227 (1967). — 198. NEUMANN, R. E. und M. A. LOGAN, J. biol. Chemistry 184, 299 (1950). — 199. STEGEMANN, H., Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 311, 41 (1958). — 200. STEGEMANN, H. und K. STALDER, Clin. Chim. Acta Amsterdam 18, 267 (1967). — 201. PROCKOP, D. J. und S. UDENFRIEND, Analytic. Biochem. 1, 228 (1960). — 202. STALDER, K., Z. analyt. Chem. 272, 196 (1965). — 203. ROSANO, C. L., Analytic. Biochem. 15, 341 (1966). — 204. PIEZ, K. A., F. IREVERE und H. L. WOLFF, J. biol. Chemistry 223, 687 (1956). — 205. SULLIVAN, M. X., W. C. HESS und H. W. HOWARD, J. biol. Chemistry 145, 621 (1942). — 206. HESS, W. C. und M. X. SULLIVAN, Arch. Biochem. Biophysics 3, 53 (1943). — 207. McDONALD, W. B. und F. X. FELLERS, J. Amer. Med. Ass. 197, 396 (1966). — 208. LANGE, J., K. FREUND und H. BÜEHL, Arzneim.-forsch. Aulendorf 17, 856 (1967). — 209. MATSUURA, T. und D. SZAFARZ, Experientia Basel 21, 737 (1965). — 210. KURTZMAN, C. H., P. SMITH und D. G. SNYDER, Analytic. Biochem. 12, 282 (1965). — 210a. MEHLER, A. H. und H. TABOR, J. biol. Chemistry 201, 775 (1953). — 210b. in 4, Vol. 2, S. 92. — 211. BENSON, J. V., in „New Techniques in Amino Acid, Peptide and Protein Analysis“ (Editors: A. Niederwieser und G. Pataki), Ann Arbor Science Publ. Inc., Ann Arbor, Michigan (im Druck). — 212. HAMILTON, P. B., in „Advances of Chromatography“, Vol. 2, S. 3—62 (Editors: J. C. Giddings und R. A. Keller), Marcel Dekker, New York (1966). — 213. HAMILTON, P. B., in „Handbook of Biochemistry, Selected Data for Molecular Biology“, S. B-43—B-55 (Editor: H. A. Sober), The Chemical Rubber Co., Cleveland, Ohio (1968). — 214. KIRSTEN, E. und R. KIRSTEN, Biochem. Biophys. Res. Commun. 7, 76 (1962). — 215. SPACKMAN, D. H., W. H. STEIN und S. MOORE, Analytic. Chem. 30, 1190 (1958). — 215a. CRESTFIELD, A. M., Analytic. Chem. 35, 1762 (1963). — 215b. DUS, K., S. LINDROTH, R. PAPST und R. M. SMITH, Analytic. Biochem. 18, 532 (1967). — 215c. DYMOND, B., Analytic. Chem. 40, 919 (1968).
216. MOORE, S. und W. H. STEIN, J. biol. Chemistry 176, 367 (1948). — 217. ORESKES, I., F. CANTOR und S. KUPFER, Analytic. Chem. 37, 1720 (1965). — 218. Technicon (Instruction Manual). 219. ROSEN, H., C. W. BERARD und S. M. LEVENSON, Analytic. Biochem. 4, 213 (1962). — 220. PIEZ, K. A. und L. MORRIS,

- Analytic. Biochem. 1, 187 (1960). — 221. BORNER, K., diese Z. 4, 212 (1966). — 222. BURTIS, C. A. und K. S. WARREN, Clin. Chem. New York 14, 290 (1968). — 223. SJOSTROM, E., Svensk. Kem. Tidskr. 64, 150 (1952). — 224. HELFFERICH, F., Nature London 189, 1001 (1961). — 225. HELFFERICH, F., J. Amer. chem. Soc. 84, 3237, 3242 (1962). — 226. LOEWENSCHUSS, H. und G. SCHMUCKLER, Talanta 11, 1399 (1964). — 227. SIEGEL, A. und E. T. DEGENS, Science Washington 151, 1098 (1966). — 228. HELFFERICH, F., „Ion Exchange“ McGraw-Hill, New York (1962). — 228a. OEPEN, H., I. OEPEN und N. LANGBEIN, Klin. Wschr. 43, 622 (1965). — 229. GERRITSEN, T., M. L. REHBERG und H. A. WAISMAN, Analytic. Biochem. 11, 460 (1965). — 230. GERRITSEN, T., Privatmitteilung. — 231. KHACHADURIAN, A., W. KNOX und A. CULLEN, J. Laborat. Clin. Med. S. Louis 56, 321 (1960). — 231a. DE MARCO, C., M. COLETTA und C. CAVALINI, J. Chromatog. 20, 500 (1965). — 232. HAMILTON, P. B., Analytic. Chem. 35, 2055 (1963). — 233. ANDERS, P. W., Firma Bio-Cal, München, Privatmitteilung. — 234. SPACKMAN, D. H., in „Methods in Enzymology“ (Editors: S. P. Colowick, N. O. Kaplan), Vol. 11, S. 3—15 (Editor: C. H. W. Hirs), Academic Press, New York (1967). — 235. ORTEN, A. U., H. J. DOPPKE und H. H. SPURRIER, Analytic. Chem. 37, 623 (1965). — 236. CURTIUS, H.-CH., A. C. MARTENET und P. W. ANDERS, Clin. Chim. Acta Amsterdam 19, 469 (1968). — 237. BENSON, J. V., J. CORMICK und J. A. PATTERSON, Analytic. Biochem. 18, 481 (1967). — 238. SHIH, V. E., M. L. EFRON und G. L. MECHANIC, Analytic. Biochem. 20, 299 (1967). — 239. SCHROEDER, W. A., W. R. HOLMQUIST und J. R. SHELTON, Analytic. Chem. 38, 1281 (1966). 240. YONDA, A., D. L. FILMER, H. PATE, N. ALONZO und C. H. W. HIRS, Analytic. Biochem. 10, 53 (1965). — 241. STARBUCK, W. C., C. M. MAURITZEN, C. MCCLIMANS und H. BUSCH, Analytic. Biochem. 20, 439 (1967). — 242. COULTER, J. R. und C. S. HANN, in „New Techniques in Amino Acid, Peptide and Protein Analysis“ (Editors: A. Niederwieser und G. Pataki), Ann Arbor Science Publ. Inc., Ann Arbor, Michigan (im Druck). — 243. GEHRKE, CH. W., D. ROACH, R. W. ZUMWALT, D. L. STALLING und L. L. WALL, „Quantitative Gas-Liquid Chromatography of Amino Acids in Proteins and Biological Substances“, Analytical Biochemistry Laboratories, Inc., Columbia, Missouri (1968). — 244. BLAU, K., in „Biomedical Applications of Gas Chromatography“ (Editor: H. A. Szymanski), Plenum Press (1968). — 245. WEINSTEIN, B., Meth. Biochem. Analysis 14, 203 (1966). — 246. COULTER, J. R. und C. S. HANN, J. Chromatog. 36, 42 (1968). — 247. DARBRE, A. und A. ISLAM, Biochem. J., 106, 923 (1968). — 248. STEFANOVIC, M. und B. L. WALKER, Analytic. Chem. 39, 710 (1967). — 249. BREUER, J., G. KAESE und H. BREUER, diese Z. 6, 298 (1968). — 250. RYAN, W. L. und A. B. LORINZ, Nebraska State Med. J. 49, 321 (1964). — 251. PEISAKHOV, B. I., Klin. med. Moskva 43, 83 (1964). — 252. BLOCK, W. D. und M. H. WESTHOFF, Metabolism Baltimore 15, 46 (1966). — 253. DUS, K., M. DEKKER und R. M. SMITH, Analytic. Biochem. 11, 312 (1965). — 254. HACKET, N., A. P. MATHIAS und F. PENNINGTON, Analytic. Biochem. 12, 367 (1965). — 255. DRAWERT, F. und O. BACHMANN, Angew. Chem. 75, 717 (1963). — 256. SIMON, H., G. MÜLLHOFER und R. MEDINA, „Radioisotope Sample Measurement Techniques in Medicine and Biology“, S. 317, International Atomic Energy Agency Vienna (1965). — 257. HOLMES, J. C. und F. A. MORELL, Appl. Spectroscopy 11, 86 (1957). — 258. GOHLKE, R. S., Analytic. Chem. 31, 535 (1959). — 259. BEYNON, J. H., R. A. SAUNDERS und A. E. WILLIAMS, J. Sci. Instr. 36, 375 (1959). — 260. BIEMANN, K. und J. T. WATSON, Analytic. Chem. 36, 1135 (1964). — 261. RYHAGE, R., Analytic. Chem. 36, 959 (1964). — 262. CURTIUS, H.-CH., diese Z. 6, 122 (1968). — 263. HARPER, H. A., M. E. HUTCHIN und J. R. KIMMEL, Proc. Soc. Exper. Biol. Med. N. Y. 80, 768 (1952). — 264. WHELAN, D. T. und CH. R. SCRIVER, Pediat. Res. 2, 525 (1968). — 265. AMBROSE, J. A., A. CRIMM, J. BURTON, K. PAULLIN und CH. ROSS, Clin. Chem. New York 15, 361 (1969). — 266. SHORE, P. A., A. BURKHALTER und V. H. COHN, J. Pharmacol. Exper. Therap. Baltimore 127, 182 (1959). — 267. STUBER, A., Clin. Chim. Acta, Amsterdam 24, 221 (1969). — 268. KOEVOET, A. L. und J. D. BAARS, Clin. Chim. Acta Amsterdam 25, 39 (1969). — 269. WADMAN, S. K., H. FABERY DE JONGE und P. K. DE BREE, Clin. Chim. Acta Amsterdam 25, 87 (1969). — 270. PERRY, TH. L., D. STEDMAN und S. HANSEN, J. Chromatog. 38, 460—466 (1968). — 271. BENSON, J. V., M. J. GORDON und J. A. PATTERSON, Analytic. Biochem. 18, 228 (1967). — 272. PERRY, TH. L. und S. HANSEN, Clin. Chim. Acta Amsterdam 25, 53 (1969).

Dr. A. Niederwieser und
Priv.-Doz. Dr. H.-Ch. Curtius
CH 8032 Zürich
Steinwiesstr. 75