Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
9. Jg., S. 215—219, Mai 1971

Bestimmung von Ornithin-Carbamyl-Transferase mittels FEARON-Reaktion¹⁾

I. Mitteilung: Citrullinbestimmung

Von K. LORENTZ und H. KOCH²⁾

Aus der I. Medizinischen Klinik (Direktor: Prof. Dr. U. Ritter) der Medizinischen Akademie Lübeck

(Eingegangen am 13. Januar 1971)

Es werden optimale Bedingungen für die Bestimmung von Citrullin mit der Diacetyl-Carbamidoreaktion ermittelt und diskutiert. Die Methode vereinigt hohe Empfindlichkeit (ϵ_{465} 34,9 · 10⁶ cm²/Mol. für Citrullin und ϵ_{460} 37,0 · 10⁶ cm²/Mol. für Harnstoff), einfache Durchführung, gute Reproduzierbarkeit und Stabilität des Farbstoffs. Neben Citrullin und Harnstoff reagieren Alloxan, Allantoin, Thioharnstoff, Harnsäure, Carbutamid, Carbamylglycin und Barbitat. Protein stört die Reaktion und muß entfernt werden.

Determination of ornithine-carbamyl-transferase by the Fearon reaction. I, Determination of citrulline

Optimal conditions are reported for the determination of citrulline by the carbamido-diacetyl reaction. The method combines high sensitivity (ϵ_{465} citrulline 34,9 · 10⁶ cm²/mol; ϵ_{460} urea 37,0 · 10⁶ cm²/mol), simplicity of operation, good reproducibility and stable colour. Alloxan, allantoin, thiourea, uric acid, carbutamide, carbamyl glycine and barbitol also give a colour. Serum interferes and must be removed.

Citrullin kann mit Ninhydrin und durch die FEARON-Reaktion bestimmt werden. Mit Ninhydrin reagieren bei pH 1,0 neben Citrullin auch Ornithin, Lysin, Prolin und — schwächer — Glycin (1—4), während Glutamin diese Farbentwicklung hemmt (5). Die zur Substratsättigung von Ornithin-Carbamyl-Transferase nötigen Ornithinkonzentrationen machen diese Methode daher unbrauchbar.

Die FEARON-Reaktion beruht auf der Kondensation von Carbamidoverbindungen R₁-NH-CO-NH-R₂ mit Diacetyl CH₃-CO-CO-CH₃ und dessen Derivaten (6). Dabei kommt es in Gegenwart konzentrierter Säuren zur Bildung von (Hydantoin- oder) Imidazolidinonverbindungen (A), die sich mit einem zweiten Molekül des Carbamidoderivats zu Glycolurilen (B) umsetzen (7).

Glycolurile sind wegen des Fehlens chromophorer Gruppen lediglich Chromogene, die im UV-Bereich zwischen 250 und 290 nm maximal absorbieren, durch Erhitzen mit Fe³⁺ und Säure bei Gegenwart von Sauerstoff jedoch in gelbe Farbstoffe mit einem Absorptionsmaxi-

mum zwischen 450 und 490 nm übergehen, deren Struktur noch unbekannt ist. Außerdem kommt es zu einer Nebenreaktion durch hydrolytische Spaltung der Glycolurile mit Auftreten farbloser Imidazolone (7), so daß die Ausbeute von den Reaktionsbedingungen abhängt:

Der gelbe Farbstoff ist lichtempfindlich und kann abblässen, sofern nicht Semidin (8) oder Thiosemicarbazid (9) als terminale Elektronenfänger zugesetzt werden. Die Bildung von FEARON-Farbstoffen durch alkalische Umsetzung von substituierten Guanidinen mit Thymol und Hypobromit ist dagegen durch Auftreten von Chinonsemicarbazonen bedingt (10, 11).

Die Diacetyl-Carbamido-Reaktion ist gegenüber dem beschriebenen Mechanismus noch komplizierter, da statt der reaktionsträgen α -Diketone die entsprechenden Oxime — neben selten verwendeten cyclischen Oximen (12) — eingesetzt werden (Tab. 1).

Tab. 1
 α -Diketonderivate zur FEARON-Reaktion

Verbindung (Lit.)	Struktur
1-Phenyl-2,3-dion-3-monoxim (Isonitrosopropiophenon, (13))	C ₆ H ₅ -CO-C(NOH)-CH ₃
Butan-2,3-dion-2-monoxim (Diacetylmonoxim, (6, 8, 14—19))	CH ₃ -CO-C(NOH)-CH ₃
Butan-2,3-dioxim (Dimethylglyoxim, (20))	CH ₃ -C(NOH)-C(NOH)-CH ₃

Es entstehen dabei im Reaktionsschritt (A) 1 oder 2 Moleküle Hydroxylamin (14), das als Reduktionsmittel die in (C) notwendige Oxydation von Glycoluril stört.

¹⁾ Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

²⁾ Die Arbeit enthält wesentliche Teile der Inauguraldissertation von H. Koch.

Hydroxylamin muß daher durch Persulfat (15) bzw. Arsenat (16) oder Zugabe eines Acceptors wie Phenazon (16) zerstört werden. Zusätze von Fe^{3+} (17) oder Mn^{2+} (18) beschleunigen die Reaktion. Zum Schutz gegen Thiole wird ein Redox-System aus $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ benutzt (19).

Bei Variation der einzelnen Parameter resultieren für Harnstoff, Citrullin und andere Carbamidverbindungen wechselnde relative und absolute Ausbeuten an Farbstoff. SIEST und VIGNERON (21) haben durch vergleichende Prüfung Diacetylmonoxim, Phosphorsäure-Schwefelsäure, Arsenat und Phenazon als optimale Reaktionspartner ermitteln können. Es war daher die Aufgabe der folgenden Untersuchung, diese Ergebnisse unter Berücksichtigung der genannten Reaktionen für die Citrullinbestimmung im Serum zu optimieren.

Methodik

Reagenzien

Die verwendeten Reagenzien waren mit Ausnahme von Polyäthylenglykol 300 von p. a.-Reinheit oder wurden (Benzidin, Cyclohexylamin, Hydrazinsulfat, 1,3-Phenylendiamin, Sulfonylharnstoffe, Carbamylphosphat) umkristallisiert. N-Carbamidoglycin wurde nach (22) synthetisiert, Acetylierung und Reinigung von Proteinen erfolgten nach (23). Alle Lösungen wurden, sofern nicht anders bezeichnet, mit demin. Wasser angesetzt.

Antipyrimreagenz: 4,0 g Phenazon (Antipyrin) und 10,0 g $3 \text{ As}_2\text{O}_5 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$ in 250 ml 98proz. H_2SO_4 ($D = 1,84$) lösen und mit demin. Wasser ad 1000 ml auffüllen (Eisbad!). 1 Jahr haltbar. Diacetylmonoxim 1proz., 4 Wochen haltbar.

Vorgehen

0,5 ml Probe (Leerwert = Wasser) wurden mit 0,3 ml Diacetylmonoxim und 2,2 ml Antipyrinreagenz in einem Reagenzglas gemischt und 30 Min. bei 100° erhitzt (Wasserbad, Abzug). Nach kurzem Abkühlen in Leitungswasser wurde in der 1 cm-Küvette ohne Bezugsküvette bei 436 nm innerhalb von 20 Min. photometriert und der Leerwert abgezogen.

Die systematische Prüfung aller Parameter erfolgte unter Volumenkonstanz durch Zugabe von Proteinen und organischen Verbindungen mit der Probe, während das Antipyrinreagenz zum Austausch der Säuren und Oxydationsmittel (As_2O_5 , SeO_2 , $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2$, H_2O_2 , $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, Phenazon, Aminophenazon) sowie zur evtl. Aufnahme organischer Lösungsmittel diente. Die angegebenen Mengen beziehen sich immer auf das Endvolumen von 3,0 ml (Standardansatz: Diacetylmonoxim 30 μMol , Phenazon 46,5 μMol , As_2O_5 85 μMol , H_2SO_4 10 mMol).

Zur Messung benutzten wir die Photometer 1100 „Eppendorf“ und PMQ II „Zeiss“.

Ergebnisse

Extinktionskoeffizient, Meßbereich, Reproduzierbarkeit

Unter Standardbedingungen (Vol. 3,0 ml, $t = 30$ Min., $T = 100^\circ$, $\lambda = 436$ nm, $d = 1$ cm) liefern 100 nMol Citrullin Δ_E 0,600 und 100 nMol Harnstoff Δ_E 0,764 gegenüber dem Leerwert. Im Maximum werden 1,162

Abb. 1

Spektren von je 100 nMol Harnstoff (— — —) bzw. Citrullin (—) im Vergleich mit dem Leerwert (· · · · ·). Vol. 3,0 ml, $d = 1$ cm

(Citrullin, 465 nm) bzw. 1,234 (Harnstoff, 460 nm) gemessen (Abb. 1).

Daraus errechnen sich folgende molare Extinktionskoeffizienten:

Citrullin ϵ_{465} $34,9 \cdot 10^6$ und ϵ_{436} $18,0 \cdot 10^6$ cm^2/Mol ,
Harnstoff ϵ_{460} $37,0 \cdot 10^6$ und ϵ_{436} $22,9 \cdot 10^6$ cm^2/Mol .

Für den Bereich bis zu 200 nMol pro Ansatz ist das LAMBERT-BEERSche Gesetz erfüllt. Extinktionen über 1,0 müssen vor der Messung mit Reagenz (Leerwertansatz) verdünnt werden. Danach lassen sich bei 436 nm noch 5 nMol exakt bestimmen. Der Variationskoeffizient beträgt 1,3% (50 nMol Citrullin, Mittelwert: Δ_E 0,300, $n = 15$).

Die Farbstoffbildung erreicht bei 100° nach 20 Min. ihr Maximum, bleibt 10 Min. konstant und fällt bei 40 Min. langem Erhitzen wieder um 8% ab. Die Extinktion von 100 nMol Citrullin verändert sich bei Lichtzutritt und Raumtemperatur innerhalb von 60 Min. um $\pm 0,6\%$, die Werte für Leerwert und Harnstoff nehmen um 4% ab.

Spezifität

Da Diacetylderivate mit allen Ureiden kondensieren, ist eine Störung der Citrullin- und Harnstoffbestimmung durch Purine, Barbiturate und Sulfonylharnstoffe zu erwarten. Deren Eigenreaktion beeinflusst nur die absoluten Werte der Harnstoff- und Citrullinbestimmung, während sie bei Enzymtests, in denen diese Verbindungen entstehen, durch Abzug des Leerwertes zu eliminieren ist. Dagegen kann ihr hemmender oder potenzierender Einfluß auf die Chromogenität von Harnstoff und Citrullin zu erheblichen Verfälschungen dieser durch Enzymreaktion gebildeten Meßgrößen führen. Eine Darstellung dieser Faktoren gibt Tabelle 2.

Danach zeigen die cyclischen Ureide Barbitol, Alloxan, Allantoin und Harnsäure nach Carbutamid (abgesehen von Carbamylglycin) die stärkste Eigenreaktion, während Aminophenazon die Diacetyl-Carbamidoreaktion fast vollständig, Tolbutamid und Glybenclamid stark hemmen. Citrullin und Harnstoff weisen keinen poten-

Disk- Elektrophorese

• analytische Anwendung

mit Trennkammer DEA 90 und allem nötigen Zubehör
incl. An- und Entfärbung, Auswertung mittels

• Densitometer TRD 3

240—700 $m\mu$, Spaltvarianten, Registriervorrichtung mit
Integrator, regulierbare Bandenhöhe, Messung von Ex-
tinktion, Durchlässigkeit, Reflexion

• präparativ mit Discophor

programmierter Synchronablauf von Trennvorgang,
Elution, Aufzeichnung. Resultat: Konzentrationsrichtige
Fraktionen im Fraktionssammler.

• bioanalytische Apparaturen

Thermoblock TB 4 mit variablen Temperaturvarianten
30—330°C und das halbautomatische Zählgerät BZG 24
für Bakterienkulturen.

• Gesamtprogramm

pH/mV — Meßtechnik und Potentiometrie, Kondukto-
metrie, Oximetrie, Dekametrie, Hochohm-Meßtechnik.

Wir führen Meßgeräte aller Geräte-
klassen und Elektroden für fast alle
Sonderprobleme.

Fordern Sie bitte Prospekte bei Ihrem
Fachhändler an oder direkt bei uns.

Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH
Dr. hab. K. Slevogt · 812 Weilheim · Tel. (0881) 26 38/27 84

Büros: 43 Essen K. Akemann, Lönsberg 22, Ruf: (02141) 51 00 19
7407 Dusslingen b. Tübingen W. Bohn, Farrenbergweg 5,
Ruf (07128) 7809
58 Hagen H. Duckstein, Hesterstr. 64, Ruf: (02331) 458 57
635 Bad Nauheim H. Ballauff, Frankfurter Str 39,
Ruf: (06032) 48 60

**Sie
brauchen Kipp
wenn Sie
messen und
registrieren**

Zum Beispiel den leichten
vielseitig verwendbaren
Kipp Flachsreiber

Sehr hohe Eingangsimpedanz
Hohe Quellwiderstände zulässig
Völlig potentiometrische Wirkung für alle
Messbereiche unter 0,1 V
17 Messbereiche von 0,5 mV bis 100 V
Nullpunkt einstellbar über die ganze
Skalenbreite
10 Papiertransport-Geschwindigkeiten
vorwärts und rückwärts

Fordern Sie bitte ausführliche
Unterlagen an

KIPP & ZONEN

6242 Schönberg/Ts.
Wiesenau 5 · Telefon 06173-5071

...zum Beispiel die Cholinesteraseaktivität im Blut

können Sie mit dem METROHM-Combitrator exakt und reproduzierbar bestimmen. Mit dieser modernen Bausteingruppe bestehend aus pH-Meter, Impulsomat und Dosigraph erhalten Sie ein variables Gerät, das gleichzeitig Regler, Endpunktstitrator und pH-Meter ist.

Sagen Sie uns Ihr Problem.

Technische Büros in: Hamburg, Hannover, Steinhagen, Essen, Ingelheim, Mannheim, Freiburg, München

DEUTSCHE METHROM GMBH & CO.

Elektronische Messgeräte

7024 BERNHAUSEN · Schulstr. 23 · Postfach 1160

Telefon: (0711) 7970 26 · Telex: 721 470

Unser Lieferprogramm:

pH-, Redox-, Leitwert-Meßgeräte, Titrier-Automaten, Polarographen, Coulometer, Spektalkolorimeter, Laborschreiber, Meßverstärker und elektronische Regler, Elektroden, Kolbenbüretten, Magnetrührer.

Sie sollten sich auf jeden Fall informieren durch:

- ☐ Prospekte
- ☐ Angebot
- ☐ Besuch Ihres Ingenieurs oder

auf der *Diagnostica*, Halle 2, Stand 2000

PRÄZISIONSPUMPEN TYP LDP

Zur Ultralinenaren Förderung von Flüssigkeiten.

0,05 ml/h - 80 ml/h bis 35 atü.
Diskontinuierlich oder kontinuierlich.

**Zum Saugen und Fördern.
Programmierbar mit Mehrwegeventilen.**

Ein Präzisionsbauteil von

Labotron

LABOTRON MESSTECHNIK GMBH 8191 GELTING WOLFRATSHAUSER STR. 2

Picomol-Analysen · Aminosäureanalysatoren · Mehrwege-Ventile · Photometer

Tab. 2

Extinktionen von 3 μ Mol (*36 nMol, **30 μ Mol) verschiedener organischer Verbindungen allein und in Gegenwart von Harnstoff. Vol = 3,0 ml, λ = 436 nm, d = 1 cm

Verbindung	ΔE	$\epsilon \cdot 10^4$ [cm ² /Mol]	ΔE + Harnstoff*	ΔE — Abweichung
Harnstoff*	0,275	22,9	0,550	0
Semicarbazid	0,122	0,12	0,200	—0,200
Carbamylglycin*	0,210	12,6	0,480	0
Citrullin*	0,216	18,0	0,491	0
Tolbutamid	0	0	0,125	—0,150
Carbutamid	0,448	0,45	0,723	0
Glybenclamid	0,173	0,17	0,288	—0,160
Barbital	0,848	0,85	1,050	—0,073
Alloxan	1,080	1,08	1,355	0
Allantoin	1,480	1,48	1,700	—0,055
Harnsäure	1,350	1,35	1,630	+0,005
Arginin	0,025	0,03	0,300	0
Kreatin	0,010	0,01	0,290	+0,005
Kreatinin	0	0	0,275	0
Cyclohexylamin	0	0	0,275	0
Glycylglycin	0	0	0,275	0
Tris	0	0	0,275	0
Adenosin	0,006	0	0,290	+0,009
Aminophenazon	0	0	0,010	—0,265
Diäthanolamin	0	0	0,275	0
Triäthanolamin	0	0	0,275	0
Hydrazinsulfat	0	0	0,275	0
Carbamylphosphat**	0,140	0,01	0,250	—0,025

zierenden Effekt bei gleichzeitiger Bestimmung auf. Die gemessenen Eigen- und Störreaktionen sind für Untersuchungen des menschlichen Serums und toxikologische Studien am Tier ohne Bedeutung, da sie erst bei 60fachem (Carbamylphosphat 600fachem) Über-

Tab. 3

Extinktionen von 3—15 mg Biuretprotein, Glucose und Saccharose allein und in Gegenwart von 36 nMol Harnstoff. Vol. 3,0 ml, λ = 436 nm, d = 1 cm

Substanz	Menge	ΔE	ΔE + Harnstoff	ΔE — Abweichung
Gelatine	3 mg	0,733	1,007	0
Acetylgelatine	3 mg	0,063	0,338	0
Fibrinogen	3 mg	0,210	0,212	—0,273
Casein	3 mg	0,333	0,340	—0,268
Rinderalbumin	3 mg	0,126	0,201	—0,200
Humanaalbumin	3 mg	0,122	0,265	—0,132
	6 mg	0,350	0,420	—0,205
Glucose	15 mg	1,460	1,500	—0,235
Saccharose	3 μ Mol	0,010	0,260	—0,025
		0,187	0,280	—0,182

schoß auftreten. Alloxan wird durch Enteiweißung bei saurem pH (Trichloressigsäure, Perchlorsäure) zerstört, Barbital, Allantoin, Harnsäure und Sulfonylharnstoffe fallen dabei mit dem Protein aus.

Während Guanidinderivate und Amine die FEARON-Reaktion nicht beeinflussen, führt die Gegenwart von Proteinen zu erheblichen Störungen (Tab. 3).

Gelatine und acetylierte Gelatine interferieren als einzige Proteine nicht mit der Harnstoffbestimmung, während alle anderen die Extinktion von 50 nMol Harnstoff (= 0,275) fast auslöschen. Die Eigenreaktion der Eiweißkörper ist konzentrationsabhängig und führt zur Verschiebung des Extinktionsmaximums in den Bereich um 485 nm. Mehr als 15 mg Protein trüben den Ansatz. Blutzucker stört erst ab 500 mg/100 ml (1,5 mg im Ansatz), während die Verwendung von Saccharose zur Extraktion von Homogenaten nicht allein falsch positive Resultate (24), sondern zu niedrige Harnstoffwerte liefert.

Bei Zusatz von 50 μ l Serum, das durch Behandlung mit Urease von Harnstoff befreit wurde, tritt keine gelbe, sondern rosa bis rote Färbung auf, deren Spektrum neben der Abflachung des Harnstoffpeaks bei 460 nm eine Schulter bei 550 nm aufweist. Vorgängige Extraktion der Lipide mit Äther hat keinen Einfluß auf diese Reaktion, Cholesterinlösungen geben neben schwacher Gelbfärbung trübe Ansätze.

Optimierung

Da die Oxydation der Glycolurile durch Thiole gehemmt wird, und Fe³⁺-Zugabe nur in einem bestimmten Verhältnis zum eingesetzten Citrullin (0,25 μ Mol auf 0,2 μ Mol) maximale Farbausbeute garantiert, haben GUTHÖRLEIN und KNAPPE (19) die Verwendung eines Redoxpuffers von Fe²⁺/Fe³⁺ vorgeschlagen. Allein durch Variation der Phenazon- und As₂O₅-Konzentration lassen sich bereits optimale Bedingungen herstel-

Tab. 4

ΔE für 72 nMol Harnstoff oder Citrullin mit verschiedenen Konzentrationen an As₂O₅ und Phenazon im Ansatz (obere Zahlen). Einem Teil der Ansätze wurden 500 μ g Cystein zugesetzt (untere Zahlen) Volumen 3,0 ml, λ = 436 nm, d = 1 cm

As ₂ O ₅ (μ Mol/Ansatz)	Testsubstanz	46,5		Phenazon (μ Mol/Ansatz) 116		233	
				Reaktionszeit (Min.)			
		20	30	20	30	20	30
0	Harnstoff	0,425 0,377	0,498 0,360	ΔE für 72 nMol Testsubstanz im Ansatz			
	Citrullin	0,420 0,382	0,421 0,389	0,350 —	0,392 —	0,349 —	0,294 —
38	Harnstoff	0,387 0,370	0,484 0,436	—	—	—	—
	Citrullin	0,390 0,378	0,415 0,395	—	—	—	—
85	Harnstoff	0,540 0,550	0,550 0,550	0,399 0,374	0,377 0,380	—	—
	Citrullin	0,437 0,436	0,437 0,434	0,391 0,385	0,357 0,340	—	—
190	Harnstoff	0,384 0,427	0,439 0,511	0,430 —	0,403 —	—	—
	Citrullin	0,314 0,357	0,366 0,396	0,377 —	0,343 —	—	—

len: Elimination des Thioeffekts bei Citrullin und Harnstoff, sowie maximale und nach 20 Min. vollständige Reaktion für Citrullin (Tab. 4). Variation der Diacetylmonoxim-Konzentration zwischen 20 und 50 μ Mol pro Ansatz ändert die Extinktionen nicht.

Die Aufstellung läßt ohne As_2O_5 einen Abfall von Farb-reaktion und Stabilität mit steigender Phenazonkonzentration nachweisen. Bei niedrigem Phenazoneinsatz von 46,5 μ Mol erreichen Stabilität gegen Cystein, Extinktionskonstanz und Chromogenität von Citrullin bei 85 μ Mol As_2O_5 ihr Maximum. Von allen untersuchten Säuren weist Schwefelsäure die höchste katalytische Aktivität auf (Tab. 5).

Tab. 5

Absolute und relative Extinktionen von 50 nMol Harnstoff bzw. Citrullin bei Erhitzen (30 Min., 100°) mit verschiedenen Säuren. As_2O_5 85 μ Mol, Phenazon 46,5 μ Mol, Vol. 3,0 ml, $\lambda = 436$ nm, d = 1 cm

Reagenz		ΔE Harn- stoff	rel.	ΔE Citrullin	rel.
H_2SO_4	(10 mMol)	0,382	1,0	0,300	1,0
H_2SO_4	(3,7 mMol)				
CH_3COOH	(33 mMol)	0,160	0,42	0,220	0,73
H_2SO_4	(3,7 mMol)				
H_3PO_4	(3,7 mMol)	0,335	0,88	0,260	0,87
H_3PO_4	(13,2 mMol)	0,355	0,93	0,295	0,98
H_3PO_4	(21 mMol)	0,335	0,88	0,216	0,72
H_3PO_4	(27 mMol)	0,237	0,62	0,215	0,72
HCl	(10 mMol)	0,305	0,80	0,270	0,90
HCOOH	(40 mMol)	0,034	0,09	0,040	0,13

Zusätzliche Oxydationsmittel (2 μ Mol $\text{FeNH}_4(\text{SO}_4)_2$, 17 μ Mol $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) steigern die Reaktion nicht. 1 mMol H_2O_2 trübt die schwefelsauren Ansätze unter Entwicklung von Diacetyl und führt bei Antipyrinreagenzien mit Phosphorsäure zur Mitreaktion des Leerwerts. SeO_2 (44 μ Mol) fällt beim Erhitzen aus. Ebenso wenig verbessert die gleichzeitige oder spätere Zugabe von 1 mMol eines Amins die Farbausbeute (Tris, Cyclohexylamin, Diäthanolamin); Aminophenazon produziert rote Leerwerte, Benzidin und 1,3-Phenylendiamin trüben das Gemisch. Die Reaktion läuft zwar in Gegenwart organischer Lösungsmittel (Polyäthylenglykol 300, 0,6—1,2 g; Dimethylsulfoxid, 110 mMol) mit gleicher Geschwindigkeit aber schwächer ab. In Gegenwart von Dimethylsulfoxid erreichen die Extinktionen nur 62% (Harnstoff) und 80% (Citrullin) der mit dem Standardreagenz erzielten Werte.

Alle genannten Modifikationen unterlagen derselben Interferenz durch Proteine und zusätzlicher Trübung bei Einsatz von 50 μ l Serum. Zusätze von Dimethylsulfoxid (110 mMol), Polyäthylenglykol (1 g) und Gelatine (35 mg) sowie Acetylierung (33 mMol Essigsäure mit 2,3 mMol Acetanhydrid) verhindern allein die Trübung durch 50—100 μ l Serum, nicht dagegen Reaktionshemmung und Veränderung des Spektrums.

Zur Bestimmung der Ornithin-Carbamyl-Transferase ist daher die Entfernung der Serumproteine bei Gewinnung eines möglichst großen eiweißfreien Aliquots unumgänglich. Die höchste Wiederfindung von Citrullin ($88 \pm 6\%$) liefert die Enteiweißung mit Wolframsäure

(Technik s. II. Mitteil.). Bei der Fällung mit 4N HClO_4 werden nur 68%, bei der von SNODGRASS und PARRY (25) empfohlenen Methode (5proz. Trichloressigsäure mit 0,5% Phosphorwolframsäure) zwischen 78 und 86% des eingesetzten Citrullins wiedergefunden.

Diskussion

Das Verfahren ist etwas empfindlicher als die Methoden von CERIOTTI und SPANDRIO (16) sowie MOORE und KAUFFMAN (26) und übertrifft die Empfindlichkeit des Vorgehens nach SATOH und ITO (14) beträchtlich. Wie bei den genannten Autoren (16, 26) liegt das Maximum der Farbentwicklung für Citrullin bei einer höheren Wellenlänge als das des Harnstoffs, doch tritt im Gegensatz zu diesen (15, 27) kein potenzierender Effekt von Harnstoff auf die Citrullinbestimmung und umgekehrt auf. Da die Extinktion einer Mischung von beiden der Summe ihrer Einzelextinktionen entspricht, ist im Prinzip eine Bestimmung der Ornithin-Carbamyl-Transferase auch in Gegenwart von Harnstoff möglich. Weiterhin erhält man, gegenüber dem Verfahren von MOORE und KAUFFMAN (26) auch unterhalb von 50 nMol lineare Beziehungen zwischen Farbentwicklung und eingesetzter Carbamidoverbindung.

Im Vergleich zu den Befunden von KORITZ und COHEN (28) ist die Mitreaktion von Harnsäure stärker, die von Arginin weitaus geringer, so daß die Methode auch zur Arginasebestimmung geeignet erscheint. Die anderen Daten ergänzen Untersuchungen von SIEST und VIGNERON (21), die eine etwas geringere Arsenatkonzentration benutzen und das Antipyrinreagenz stärker durch die Probe verdünnen: 25proz. Schwefelsäure (v/v) produziert höhere Extinktionen als 40proz. (16) oder 20proz. (17) oder andere Säuren oder deren Mischungen (29); Anwendung von Phenazon macht weitere Oxydationsmittel (17: Fe^{3+} und Ce^{4+}) überflüssig; die Reaktion ist nach 20 Min. und nicht erst zu einem späteren Zeitpunkt (16: 50 Min., 17: 30 Min.) abgeschlossen. Die Gegenwart von Serum stört, sobald mehr als 5 μ l dem Ansatz zugefügt werden. Im Gegensatz zu ihren Beobachtungen (21) fanden wir jedoch nie eine Zunahme der Reaktion von Citrullin (oder Harnstoff) mit Diacetylmonoxim durch Proteine, sondern stets eine Hemmung. Nach unseren Untersuchungen bedingt der Eiweißgehalt des Serums die Interferenz, da alle Proteine außer Gelatine die FEARON-Reaktion hemmen, während Lipide, Stickstoffverbindungen und Glucose in physiologischer Konzentration bei Einsatz von 50—100 μ l Serum bedeutungslos sind.

Die einfache Zusammensetzung der haltbaren Reagenzien, ihre vollständige Reaktion mit Ureiden bei 20 Min. langem Erhitzen, die relative Stabilität des Farbstoffs und seine gute quantitative Reproduzierbarkeit lassen das Verfahren als Basis von Bestimmungen der Ornithin-Carbamyl-Transferase und Arginase geeignet erscheinen.

Literatur

1. CHINARD, F. P., *J. biol. Chemistry* 199, 91 (1952). — 2. SCHWEET, R. S., *J. biol. Chemistry* 208, 603 (1954). — 3. TROLL, W. und J. LINDSLEY, *J. biol. Chemistry* 215, 655 (1955). — 4. ROSENTHAL, G. A., *Analyt. Biochem. (New York)* 31, 251 (1969). — 5. KIMURA, Y., *Analyt. Chim. Acta* 37, 240 (1967). — 6. FEARON, W. R., *Biochem. J.* 33, 902 (1939). — 7. VENIAMIN, M. D. und C. VAKIRTZI-LEMONIAS, *Clin. Chem. (New York)* 16, 3 (1970). — 8. HUNNINGHAKE, D. und S. GRISOLIA, *Analyt. Biochem. (New York)* 16, 200 (1966). — 9. COULOMBE, J. J. und L. FAVREAU, *Clin. Chem. (New York)* 9, 102 (1963). — 10. HEESING, A. und K. HOPPE, *Chem. Ber.* 100, 3644 (1967). — 11. HEESING, A. und K. HOPPE, *Chem. Ber.* 100, 3649 (1967). — 12. SIEST, G., *Clin. Chim. Acta (Amsterdam)* 18, 155 (1967). — 13. VAN SLYKE, D. D. und R. M. ARCHIBALD, *J. biol. Chemistry* 165, 293 (1946). — 14. SATOH, P. S. und Y. ITO, *Analytic. Biochem. (New York)* 23, 219 (1968). — 15. GORNALL, A. G. und A. HUNTER, *Biochem. J.* 35, 650 (1941). — 16. CERIOTTI, G. und L. SPANDRIO, *Clin. Chim. Acta (Amsterdam)* 8, 295 (1963). — 17. CERIOTTI, G. und L. SPANDRIO, *Clin. Chim. Acta (Amsterdam)* 11, 519 (1965). — 18. SHAPER, J. und J. F. THOMPSON, *Phytochemistry* 7, 391 (1968). — 19. GUTHÖHRLEIN, G. und J. KNAPPE, *Analytic. Biochem. (New York)* 26, 188 (1968). — 20. KULHÁNEK, V., V. MADĚROVÁ, K. SINDELÁROVÁ und V. VOJTIŠKOVÁ, *Clin. Chim. Acta (Amsterdam)* 8, 579 (1963). — 21. SIEST, G. und C. VIGNERON, *Clin. Chim. Acta (Amsterdam)* 20, 373 (1968). — 22. FREYTAG, H., F. MÜLLER, G. PIEPER und H. SÖLL, in: *Methoden der organischen Chemie Bd. XI/2 (Houben-Weyl)*, Georg Thieme, Stuttgart (1958). — 23. LORENTZ, K., B. FLATTER und B. MUTSCHLER, in Vorbereitung. — 24. WATTS, D. C., R. L. WATTS, M. D. ALEXANDER und E. BALDWIN, *Biochem. J.* 96, 6c (1967). — 25. SNODGRASS, P. J. und D. J. PARRY, *J. Laborat. Clin. Med. (S. Louis)* 73, 940 (1969). — 26. MOORE, R. B. und N. J. KAUFFMAN, *Analytic. Biochem. (New York)* 33, 263 (1970). — 27. McLEAN, P., F. NOVELLO und N. W. GURNEY, *Biochem. J.* 94, 422 (1965). — 28. KORITZ, S. B. und P. P. COHEN, *J. biol. Chemistry* 209, 145 (1954). — 29. KULHÁNEK, V. und V. VOJTIŠKOVÁ, *Clin. Chim. Acta (Amsterdam)* 9, 95 (1964).

PD Dr. K. Lorentz
I. Medizin. Klinik der Medizin. Akademie
24 Lübeck
Kronsfordter Allee 71/73