

Sigmund · Körber · Dietsch
Praktikum der Physiologischen Chemie

Peter Siegmund · Friedrich Körber · Peter Dietsch

Praktikum der Physiologischen Chemie

für Mediziner und Naturwissenschaftler

3. Auflage



Walter de Gruyter Berlin · New York 1976

Autoren

Dr. rer. nat. Peter Siegmund
Professor an der Freien Universität Berlin

Dr. med. Friedrich Körber
Professor an der Freien Universität Berlin

Dr. rer. nat. Peter Dietsch
Universitätsrat an der Freien Universität Berlin

Das Buch enthält 78 Abbildungen

CIP-Kurztitelaufnahme der Deutschen Bibliothek

Siegmund, Peter

Praktikum der physiologischen Chemie für Mediziner und
Naturwissenschaftler/Peter Siegmund; Friedrich Körber;
Peter Dietsch. – 3. Aufl. – Berlin, New York: de Gruyter, 1976.
ISBN 3-11-006719-6

NE: Körber, Friedrich.; Dietsch, Peter:

© Copyright 1976 by Walter de Gruyter & Co., vormals G.J. Göschen'sche Verlags-
handlung; J. Guttentag, Verlagsbuchhandlung Georg Reimer, Karl J. Trübner,
Veit & Comp., Berlin 30.

Alle Rechte, insbesondere das Recht der Vervielfältigung und Verbreitung sowie
der Übersetzung, vorbehalten. Kein Teil dieses Werkes darf in irgendeiner Form
(durch Photokopie, Mikrofilm oder ein anderes Verfahren) ohne schriftliche
Genehmigung des Verlages reproduziert oder unter Verwendung elektronischer
Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Druck: Karl Gerike, Berlin. – Bindearbeiten: Dieter Mikolai, Berlin.

Printed in Germany.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen und
dergleichen berechtigt nicht zu der Annahme, daß solche Namen ohne weiteres
von jedermann benutzt werden dürfen. Vielmehr handelt es sich häufig um gesetz-
lich geschützte, eingetragene Warenzeichen, auch wenn sie nicht als solche gekenn-
zeichnet sind.

Vorwort

Die dritte Auflage unserer Anleitung zum physiologisch-chemischen Praktikum wurde entsprechend der Weiterentwicklung der Methoden in der Biochemie gründlich überarbeitet und zum Teil neu gefaßt. Auch die jetzt wohl allgemein bessere apparative Ausstattung der Praktika ist berücksichtigt worden.

Um den Umfang des Buches durch die neuen Versuchsbeschreibungen nicht allzusehr zu erweitern, sind zahlreiche Reagenzglasversuche und maßanalytische Methoden weggefallen. Dies scheint uns gerechtfertigt, da heute bei allen biochemischen Arbeiten instrumentelle Verfahren im Vordergrund stehen.

Die in dem physiologisch-chemischen Praktikum für Studenten der Medizin zur Verfügung stehende Zeit erlaubt nicht, sämtliche hier beschriebenen Aufgaben durchzuführen. Wir halten den Umfang dieser Anleitung aber trotzdem für nützlich, damit aus einer größeren Anzahl von Versuchen eine für das jeweilige Praktikum spezifische Auswahl getroffen werden kann. Eine ausführliche Beschreibung, Abbildungen und Diagramme sollen dem Benutzer auch von Versuchen, die er nicht durchführt, eine anschauliche Vorstellung vermitteln.

Einige Rezensenten der zweiten Auflage haben betont, daß das Buch nicht nur eine Hilfe bei der Gestaltung von Praktika, sondern darüberhinaus ein Ratgeber im klinischen und ärztlichen Laboratorium ist. Das hat uns veranlaßt, gerade die Kapitel zu erweitern, in denen die heute in der Praxis so wichtigen photometrischen Bestimmungen und immunchemischen Methoden beschrieben sind, und diese Methoden nicht nur an einzelnen Beispielen zu erläutern. Die theoretischen Erläuterungen wurden erweitert; Hinweise auf die Bedeutung der beschriebenen Versuche in der Praxis entsprechen dem Wunsch der Studierenden nach einer Motivierung.

Die wichtigsten Neuaufnahmen sollen kurz erwähnt werden: Dem Teil Potentiometrie wurde ein Kapitel über pH-Stat-Metho-

den zugefügt. In den Teil Optische Methoden wurden u. a. die vollenzymatischen Bestimmungen von Harnsäure, Cholesterin, Kreatinin und Triglyceriden im Serum aufgenommen. Diese auf komplizierten Reaktionsfolgen beruhenden Bestimmungen sind mit den im Handel befindlichen Reagenziensätzen auch im ärztlichen Laboratorium sicher durchzuführen.

Kapitel über die Bestimmung von Enzymen mit chromogenen Substraten, photometrische Versuche mit Nucleinsäuren, Glucosebestimmungen mit Remissionsphotometrie wurden hinzugefügt. Unter Substanztrennungen wird die isoelektrische Fokussierung und die Affinitätschromatographie an Beispielen beschrieben. Im Kapitel Dünnschichtchromatographie wird die Biosynthese von Cholesterin aus ^{14}C -Acetat gezeigt. Die immunchemischen Methoden wurden um die Immunelektrophorese und die Elektromunddiffusion erweitert.

Die Gliederung des Buches nach Methoden - und nicht nach Stoffklassen - haben wir beibehalten. Diese Gliederung unterscheidet sich von der im "Gegenstandskatalog für die Fächer der Ärztlichen Vorprüfung", indessen findet sich kaum ein Versuch, der nicht in unmittelbarer Beziehung zu den in diesem Katalog erwähnten Substanzen oder Reaktionen steht.

Um die technische Durchführung des Praktikums zu erleichtern, ist dem Buch wieder ein ausführliches, überarbeitetes Verzeichnis der zur Durchführung der Versuche benötigten Apparate, Substanzen und Lösungen beigefügt.

Wir haben zahlreichen am Praktikum beteiligten Kollegen für Vorschläge und Diskussionen zu danken. Insbesondere danken wir Herrn Privatdozent Dr. K. Pollow für den Vorschlag und die Erprobung des Versuchs zur Biosynthese der Sterine aus ^{14}C -Acetat und Frau Apothekerin M. Reuter-Smerdka für die Erprobung von radioimmunchemischen Methoden hinsichtlich der Eignung als Praktikumsversuche.

Für ihre zuverlässige Assistenz bei der experimentellen und technischen Bearbeitung dieser Auflage danken wir Fräulein R. Günther, Fräulein P. Ott sowie Frau C. Grumm. Frau L. Buttenstedt danken wir für die Anfertigung der Abbildungen und Formelschemata, Frau A. Witte und Frau A. Nebel für das Schreiben des Manuskripts.

Die Herren Dr. Becker (Behringwerke), Dr. Gruber und Dr. Rittersdorf (Boehringer Mannheim), Dr. H. Lang (E. Merck Darmstadt) und Frau Dr. Janitschke (Bayer AG) haben uns mit Ratschlägen, die genannten Firmen mit Sachzuwendungen geholfen, wofür wir danken.

Dem Verlag Walter de Gruyter & Co. gebührt besonderer Dank für die gute Zusammenarbeit und das verständnisvolle Eingehen auf unsere Wünsche.

Berlin, im März 1976

P. Siegmund, F. Körber, P. Dietsch

Inhalt

A	NACHWEISE UND HALBQUANTITATIVE BESTIMMUNGEN VON SERUM- UND HARNBESTANDTEILEN	
I.	Kohlenhydrate	3
	Reduktionsproben: Fehling 4, Clinitest-Tabletten 4, Glucoseoxidase 5, Enzymatische Hydrolyse von Disacchariden 7, Schnelle Identifizierung von Zuckern 8, Alkoholische Gärung 8, Hydrolyse von Stärke 9	
II.	Aminosäuren und Proteine	12
	Isoelektrischer Punkt und Löslichkeit 12, Komplexbildung 12, Reaktion mit Ninhydrin 13, Sulfhydrylgruppen 14, Löslichkeit und Aussalzen 15, Schwermetallionen 16, Enteiweißung 17, Reaktion mit pH-Indikatoren 17, Proteinnachweis mit Reagenzpapieren 18	
III.	Andere Bestandteile von Körperflüssigkeiten	19
	Harnstoff: Enzymatische Hydrolyse 19, Halbquantitative Bestimmung im Serum 19, Streifenfenteste 21, Harnsäure: Murexidprobe 21, Ketonkörper: Reaktion mit Nitroprussidnatrium 22, Ketostix-Stäbchen 23, Bilirubin 23, Harnindikan 24, Blutnachweis: Heglostix-Stäbchen 25, Benzidinprobe 26, Saure Phosphatase 26, Alkalische Phosphatase 27, Xanthinoxidase 28	

B MASSANALYTISCHE METHODEN

IV. Allgemeines zur Maßanalyse 33
Normallösungen 33, Ausrechnung der Analysen 34, Meßgeräte 34, Äquivalenzpunkt 37

V. Neutralisationstitrationsen 38
Theoretische Grundlagen: Allgemeines 38, Indikatoren 38,
Versuche: Aminosäuren 40, Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl 40, Gesamt-N im Serum 41, Glycin 41

VI. Komplexbildungstitrationsen 44
Chlorid 44, Bestimmungen mit EDTA: Allgemeines 44, Calcium und Magnesium 46

VII. Manganometrische Titrationsen 48
Wasserstoffperoxid 48, Katalase: Aktivität und pH-Optimum 48, Hemmung durch Cyanid und Azid 50

C POTENTIOMETRIE

VIII. Bestimmung der Dissoziationskonstanten von Säuren, Basen und Aminosäuren, pH-Messung 55
Gleichgewichtskonstante 55, Dissoziationskonstante 55, Henderson-Hasselbalch'sche Gleichung 56, Berechnung von Titrationskurven 56,
Theorie: Glaselektrode 58, Unpolarisierbare Elektroden 61, Ionenstärke 63,
Versuche: pK_a -Werte von Essigsäure 64, Imidazolium- und Ammoniumionen 64, Histidin 65

Inhaltsübersicht	XI
IX.	Bestimmung der Stabilitätskonstanten von Chelaten 67
	Theorie 67, Versuche: Stabilitätskonstante von Magnesium-Nitrilotriacetat 70
X.	pH-Stat-Methoden 72
	Theorie: Prinzip der Methode 72, Enzymeinheiten 73, Versuche: Bestimmung und pH-Optimum von Lipase 74, Bestimmung von Acetylcholinesterase 75, Bestimmung von Hexokinase 77
XI.	Redoxpotentiale 80
	Theorie: Gleichgewichtskonstante und freie Energie 80, Freie Energie und Redoxpotentiale 84, Einzelpotentiale 86, Einfluß von Komplexbildnern und pH 88, Versuche: Konzentrationsabhängigkeit der Redoxpotentiale in $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ - und Hydrochinon/Chinonlösungen 89, pH-Abhängigkeit der Redoxpotentiale in Hydrochinon/Chinonlösungen 90
D	OPTISCHE METHODEN
XII.	Absorptionsspektren von Cytochrom c im sichtbaren Licht 95
	Theorie: Zerlegung von weißem Licht 95, Spektralphotometer 96, Messung der Lichtabsorption 97, Lambert-Beer'sches Gesetz 98, Extinktion 99, Wellenlängen-Justierung des Gerätes 100, Spektralphotometer 101, Versuche: Oxidiertes und reduziertes Cytochrom c 103, Oxidation von Cytochrom c mit Cytochrom c-Oxidase und Luftsauerstoff 104, Vergiftung der Cytochrom c-Oxidase mit Kaliumcyanid 107, Oxidation des Cytochrom c mit Kaliumhexacyanoferrat (III) 107

XIII.	Photometrische Bestimmungen I: Substrate in Blut und Harn	110
	Theorie: Spektrallinienphotometer 110, Filterphotometer 112, Küvetten 112, Abmes- sen von Mikrolitermengen 112, Farbentwick- lungsreaktionen 114, Standardkurve und Ein- zelstandard 114, Versuche: Prüfung des Lambert-Beer'schen Gesetzes und Extinktionskoeffizient von p-Nitrophenol 115, Bestimmungen: Hämoglobin als Hämiglobin- cyanid 116, Blutzucker mit Glucoseoxidase 117, Serumprotein mit der Biuretreaktion 118, Harnsäure 119, UV- und Farbttest 121, Cholesterin 123	
XIV.	Photometrische Bestimmungen II: Enzymbestimmungen mit chromogenen Substraten	126
	Theorie: Chromogene Substrate 126, Micha- eliskonstante 129, Versuche: pH-Optimum und K_m von alkali- scher Phosphatase 132, Bestimmungen: Cholinesterase 134, Prote- ase 134, Proteaseinhibitoren 135, β -Galak- tosidase nach Induktion 137	
XV.	Photometrische Bestimmungen III: Bestimmungen, die auf der UV-Absorption der hydrierten Pyridinnucleotide beruhen (Optischer Test)	141
	Theorie: Optischer Test 141, Extinktions- koeffizienten von NADH, NADPH und APADH 142, Photometer 142, Substrat- und Enzymbestimmungen 143, Substratbestimmungen: Pyruvat 147, Lactat 148, Äthanol 149, Glucose und Galaktose 151, Kreatinin 154, Triglyceride 155, Enzymbestimmungen: Bedeutung 158, Lac- tatdehydrogenase 159, Aspartattransamina- se 162, Kreatinkinase 164, Versuche: K_m von Lactatdehydrogenase 165	

- XVI.** **Photometrische Bestimmungen IV:**
Photometrische Versuche an Nucleinsäure-
lösungen (thermische Denaturierung, Renatu-
rierung, Spaltung mit Desoxyribonuclease) 168
- Theorie: Doppelhelix 168, T_m -Wert 168,
Versuche: Denaturierung und Renaturierung
von DNA 169, Hydrolyse mit Desoxyribonu-
clease 171, Denaturierung und Renaturie-
rung von RNA 173
- XVII.** **Photometrische Bestimmungen V:**
Glucosebestimmung, die auf der Messung von
reflektiertem Licht beruht (Remissionsphoto-
metrie). Wirkung der Atmung auf die Gärung 174
- Theorie: Remissionsphotometrie 174, Reflo-
testsystem 174, Pasteureffekt 177,
Versuche: Justieren des Gerätes 176, Gluco-
sebestimmung 177, Wirkung der Atmung auf
die Gärung (Geschwindigkeit des Glucose-
verbrauchs von Hefesuspensionen), Pasteur-
effekt 177
- XVIII.** **Photometrische Bestimmungen VI:**
Emissions- und Absorptions-Flammenphoto-
metrie 180
- Theorie 180,
Versuche: Standardkurve für Kalium und
Natrium 182, Standardkurve für Magnesium
183,
Bestimmungen: Kalium, Natrium und Ma-
gnesium im Serum 182, 183
- XIX.** **Polarimetrie** 184
- Theorie 184, Polarimeter 186,
Versuche: Bestimmung der Michaeliskon-
stanten von Invertase 187, Mutarotation von
Glucose 189, Schmelzkurve von Desoxyribo-
nucleinsäure 190

E SUBSTANZTRENNUNGEN

- XX.** Dünnschichtchromatographie 195
 Theorie 195, R_F -Werte 195,
 Versuche: Proteinspaltung, Aminosäuren
 196, Hexokinasereaktion 199, Serumlipide
 200, Milchlipide 202, Vitamine 203, DNA-
 Spaltung, Purin- und Pyrimidinbasen 204,
 Steroidbiosynthese, Sterine 205
- XXI.** Gelfiltration (-chromatographie) 207
 Theorie 207,
 Versuch: Proteintrennung 209
- XXII.** Affinitätschromatographie und Bestimmung von
 Carboanhydrase 211
 Theorie 211,
 Versuche: Carboanhydrase-affines Gel 213,
 Isolierung von Carboanhydrase, Hemm-
 ung von Carboanhydrase, Bestimmung
 215, Andere Carboanhydrase-Präparationen
 218
- XXIII.** Elektrophorese
 auf Cellulose-Acetat-Membranen 220
 Theorie 220,
 Versuche: pH-Abhängigkeit, Isoelektrischer
 Punkt 221, Trennung von Serumproteinen
 223, Isoenzyme der Lactatdehydrogenase
 224
- XXIV.** Disc-Elektrophorese 227
 Theorie 227,
 Versuch: Trennung der Proteine eines
 Hämolysats 230
- XXV.** Isoelektrische Fokussierung 234
 Theorie 234,
 Versuch: Hämoglobine aus Hämolysat 236

Inhaltsübersicht		XV
F	IMMUN- UND RADIOIMMUN- CHEMISCHE METHODEN	
XXVI.	Quantitative Bestimmung von Plasmaproteinen durch Immundiffusion	241
	Theorie 241, Radiale Immundiffusion 241, Elektroimmundiffusion 246, Versuche: Radiale Immundiffusion 243, Elektroimmundiffusion 246	
XXVII.	Immunelektrophorese	249
	Theorie 249, Versuch: Trennung und Identifizierung von Serumproteinen 250	
XXVIII.	Radio-Immun- Technik: Bestimmung von Insulin im Blutserum	253
	Theorie: Strahlenmessung 253, Szintillator und Photomultiplier 254, Zählgeräte 255, Kennlinie und Arbeitsspannung 255, Insulin- bestimmung 259, Gewinnung von Antiserum 259, Markierung des Antigens 259, Antigen- Antikörper-Reaktion 260, Trennung von freiem Antigen und Antigen-Antikörper- Komplex 261, Sicherheitsvorschriften 263, Versuche: Kennlinie 256, Insulinbestimmung vor und nach Glucosebelastung 263, Blut- zuckerbestimmung 264, Insulin Monotest 267	
G	REAGENZIEEN UND GERÄTE	271
	TABELLEN	307
	SACHREGISTER	321

**A Nachweise und halbquantitative
Bestimmungen von Serum- und Harn-
Bestandteilen**

1. Versuch

Probe nach Fehling

In einem Reagenzglas werden ca. 1 ml Kupfersulfatlösung (Fehling I) und 1 ml alkalische Tartratlösung (Fehling II) gemischt und zum Sieden erhitzt. In einem zweiten Reagenzglas werden etwa 2 ml Glucoselösung ebenfalls zum Sieden erhitzt und die beiden heißen Lösungen zusammengegeben.

Die Probe wird mit Lösungen von Fructozucker (Fructose), Milchzucker (Lactose), Rohrzucker (Saccharose) und löslicher Stärke (Amylose) wiederholt.

Je 2 ml Rohrzucker- und Amyloselösung werden mit einigen Tropfen konzentrierter Salzsäure versetzt und in ein siedendes Wasserbad gestellt. Rohrzucker ist in wenigen Minuten gespalten, Amyloselösung muß mindestens 15 Minuten im siedenden Wasserbad bleiben. Nach dem Abkühlen wird mit einigen Tropfen Natronlauge neutralisiert und die Probe nach Fehling durchgeführt.

Zu der nicht erhitzten Mischung von ca. 1 ml Fehling I und 1 ml Fehling II wird eine reiskorngroße Probe Ascorbinsäure gegeben.

Clinitest-Tabletten

Die Probe auf reduzierende Zucker ist in den Clinitest-Tabletten modifiziert. Diese enthalten (in fester Form) Kupfersulfat, Natriumhydroxid und Citronensäure. Bei Zugabe der zu prüfenden Lösung (einige Tropfen) findet durch die Lösungs- und Neutralisationswärme ein Aufsieden der Mischung statt. Ein Erhitzen über dem Bunsenbrenner entfällt, und man kann mit diesen Reagenztabletten ohne Laborgeräte Zucker (im Harn) nachweisen.

2. Versuch

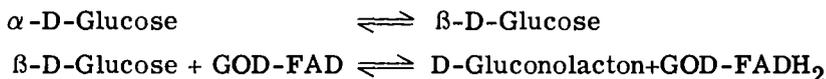
Eine Glucoselösung (20 g/l) wird wie folgt verdünnt: Man gibt in 5 Reagenzgläser je 1 ml destilliertes Wasser und fügt zu dem ersten Reagenzglas 1 ml der Glucoselösung. Nach dem Mischen entnimmt man 1 ml (Pipette) und gibt diesen in das zweite Reagenzglas. Man mischt und überführt wieder 1 ml mit der gleichen Pipette in das dritte Reagenzglas usw. Die Konzentrationen der Glucoselösungen sind jetzt 10; 5; 2,5; 1,25 und 0,625 g/l. Fünf entsprechend beschriftete Reagenzgläser werden mit je 5 Tropfen einer

dieser Glucoselösungen und 5 Tropfen (Pipette) destilliertem Wasser beschickt. In ein 6. Reagenzglas werden 10 Tropfen destilliertes Wasser gegeben (Leerwert). Dann wird je eine Clinitest-Tablette zugegeben, etwa 15 Sekunden nach Beendigung des spontanen Aufsiedens geschüttelt und die entstandene Farbe mit der Farbskala verglichen. Clinitest-Tabletten sind stark ätzend (Natriumhydroxid!). Die Glucoseverdünnungen werden noch zum Glucosenachweis mit Glucoseoxidase benötigt.

Glucoseoxidase (Notatin, GOD, EC 1.1.3.4)

Glucoseoxidase ist ein "Gelbes Ferment", das aus Schimmelpilzen gewonnen wird und pro Mol Protein 2 Mol FAD enthält. Es dehydriert die nicht phosphorylierte (!) β -D-Glucose, die in wässriger Lösung im Gleichgewicht mit der α -Form steht, zum Gluconolacton. FAD wird dabei zu FADH_2 hydriert; dieses reagiert (in Abwesenheit anderer Oxidationsmittel) langsam mit Luftsauerstoff unter Bildung von Wasserstoffperoxid und Regeneration von FAD-Enzym. Das entstandene Wasserstoffperoxid oxidiert unter der katalytischen Wirkung von Peroxidase (POD) ein Benzidinderivat (o-Tolidin) zu einem Farbstoff, der als gefärbtes Radikalkation oder als Molekülverbindung von Tolidin und seinem Chinonimin aufgefaßt werden kann:

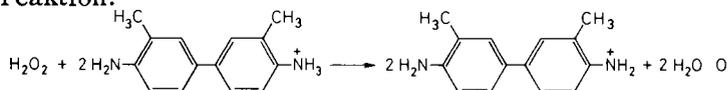
Substratreaktionen:



Hilfsreaktion:



Indikatorreaktion:



Die Substanzen sind in den Reagenzpapieren bzw. Teststäbchen (Glukotest, Clinistix, Dextrostix) enthalten. Bei Dextrostix verhindert außerdem eine Membran die Diffusion hochmolekularer Stoffe, so daß auch der Glucosegehalt von Blut mit diesem Reagenzpapier geschätzt werden kann. Es diffundieren dabei nur die kleinen Moleküle (wie Glucose) in das Papier hinein. Das durch seine Farbe störende Hämoglobin kann nach der Reaktion abgespült werden.

Glucoseoxidase reagiert zwar nur mit Glucose, Störungen des Tests können aber gelegentlich auftreten. Einmal kann durch Wasserstoffperoxid oder andere Oxidationsmittel (die aus Reinigungsmitteln stammen mögen) o-Tolidin zum Farbstoff oxidiert werden; zweitens können Reduktionsmittel, wie Ascorbinsäure, das bei der Oxidation von FADH_2 mit Luftsauerstoff entstehende Wasserstoffperoxid reduzieren. Das hat praktische Bedeutung: Nach Vitamin-C-Gaben kann ein Glucosegehalt im Harn übersehen werden. Weiter können Enzyminhibitoren, besonders der Peroxidase, wie Azid und Fluorid (Fluorid wird gelegentlich zur Gerinnungshemmung von Blutproben benutzt, insbesondere, um gleichzeitig die Enolase und damit die Glykolyse zu hemmen), trotz Wasserstoffperoxidbildung die Indikatorreaktion verhindern.

Wenn Glucose in Oligo- oder Polysacchariden mit Glucoseoxidase nachgewiesen werden soll, müssen die glykosidischen Bindungen vorher durch Erhitzen mit Säuren oder enzymatisch gespalten werden. Beim Glucosenachweis in den stark sauren Hydrolysaten muß dann vor der Anwendung des Teststreifens für eine Abpufferung gesorgt werden, da die Enzyme nicht bei extremen pH-Werten wirken.

In alkalischen Lösungen wandeln sich 1,2-epimere Zucker z. T. ineinander um. So bildet sich in alkalischer Fructoselösung beim Erhitzen u. a. Glucose, die dann mit diesem Test nachgewiesen werden kann. Dies kann zur Identifizierung von Fructose (im Harn) benutzt werden.

3. Versuch

a) Spezifität

Lösungen von Glucose, Fructose, Saccharose, Lactose und Amylose werden mit Glukotestpapier oder Clinistix geprüft. Bei negativem Ausfall der Probe werden 2 ml der Lösungen mit einigen Tropfen konzentrierter Salzsäure versetzt und für einige Minuten in ein siedendes Wasserbad gestellt (vgl. I, 1). Nach dem Abkühlen wird die Salzsäure mit einigen Tropfen Natriumacetatlösung (500 g/kg) abgepuffert und die Lösung erneut geprüft. Eine neue Probe Fructoselösung wird mit einigen Tropfen ca. 0,1 M Natronlauge zum Sieden erhitzt, unter fließendem Wasser abgekühlt und erneut geprüft.

b) Empfindlichkeit

Die Glucoseverdünnungen, die bereits mit Clinitesttabletten untersucht wurden (I, 2), werden mit Glukotestpapier geprüft. Je 1 Tropfen der Lösung wird auf einen kleinen Streifen des Testpapiers gegeben und die Färbung nach 3 - 5 Minuten mit der Farbskala verglichen. Glukoteststreifen sind mit einem gelben Farbstoff imprägniert, der mit dem entstehenden blauen Farbstoff grüne Mischfarben gibt, um einen besseren quantitativen Vergleich zu ermöglichen.

c) Störungen

Auf einen Teststreifen wird 1 Tropfen verdünnter Wasserstoffperoxidlösung (0,3 g/l) gegeben.
In je ein Reagenzglas mit etwa 1 ml Glucose- bzw. Wasserstoffperoxidlösung werden vor der Prüfung einige Tropfen Natriumfluoridlösung (5 g/l) gegeben.

Glucoselösung wird vor der Prüfung mit einer Spatelspitze Ascorbinsäure versetzt und mit Natriumacetat abgepuffert.

Enzymatische Hydrolyse von Disacchariden

Saccharose (Rohrzucker) wird von β -Fructofuranosidase (Invertase), Lactose (Milchzucker) von β -Galaktosidase zu Glucose und Fructose bzw. Galaktose hydrolysiert. Die entstandene Glucose läßt sich zum Beispiel mit Glukotestpapier, das vorher mit den Disacchariden keine Reaktion gibt, nachweisen. Diese Reaktion kann zur Identifizierung von Saccharose bzw. Lactose im Harn sowie Lactose in Milch (nach Fällung des Caseins) dienen.

4. Versuch

2 ml Rohrzuckerlösung (20 g/l) werden mit 0,5 ml Invertaselösung versetzt und diese Mischung sofort und nach Inkubation (10 Minuten, 40°C) mit Glukotestpapier geprüft.

5. Versuch

2 ml Lactoselösung (20 g/l) bzw. Molke werden mit 0,5 ml β -Galaktosidaselösung versetzt und diese Mischung sofort und nach Inkubation (10 Minuten, 40°C) mit Glukotestpapier geprüft.

Zur Gewinnung von Molke werden 4 ml Milch unter Schütteln mit 2 ml ca. 1 M Essigsäure versetzt. Der aus Casein und Milchfett bestehende Niederschlag wird nach ca. 10 Minuten abfiltriert, das Filtrat heißt Molke.

Schnelle Identifizierung von Zuckern

Die Tabelle faßt Reaktionen zusammen, die Zucker, die im Harn auftreten können, mit Glucose-Testpapier schnell unterscheiden lassen, wenn einfache Hilfsreaktionen vorausgegangen sind. Eine Erhärtung der Resultate ist durch Dünnschichtchromatographie möglich.

Reaktion mit Glucose-Testpapier nach Vorbehandlung mit					
	---	NaOH	HCl	Invertase	β -Galaktosidase
Glucose	+	+	+	+	+
Fructose	-	+	-	-	-
Lactose	-	-	+	-	+
Saccharose	-	-	+	+	-
Pentose	-	-	-	-	-
Galaktose	-	-	-	-	-

6. Versuch

Lösungen der sechs Zucker sind entsprechend der Tabelle zu prüfen. Die Durchführung ist unter Versuch 3, 4 und 5 beschrieben. Reduktionsproben sind bei diesen Zuckern mit Ausnahme von Saccharose positiv.

Alkoholische Gärung

Bäcker- und Brauereihefe können Glucose, Fructose und Disaccharide, die von diesen Hefen enzymatisch gespalten werden, vergären. Um eine schwach saure Reaktion einzuhalten und so das die Gärung anzeigende Kohlendioxid möglichst vollständig auszutreiben, gibt man zur Probe etwas Weinsäure. Die Versuche werden in sogenannten Gärröhrchen durchgeführt, bei denen das Entstehen von Kohlendioxid unmittelbar beobachtet werden kann. Durch Laugenzusatz kann das entstandene Gas als Kohlendioxid identifiziert werden.

7. Versuch

Etwa 10 g Hefe werden in 100 ml Wasser suspendiert und mit 2 ml Weinsäurelösung (10 g/l) versetzt. Je 5 ml dieser Hefesuspension werden mit 10 ml der folgenden Lösungen in

ein Gärröhrchen gefüllt:

1. Glucoselösung
2. Rohrzuckerlösung
3. Milchzuckerlösung
4. destilliertes Wasser (Leerprobe)

Durch Neigen des Röhrchens muß die Luft aus dem geschlossenen Schenkel entfernt werden. Die Proben werden dann für 60 Minuten in einen Brutschrank (30 - 40° C) gestellt. Nach dem Versuch wird in Probe 1 oder 2 das entstandene Gas als Kohlendioxid identifiziert, indem man einige Milliliter konzentrierter Natronlauge (250 g/kg) und soviel Wasser zugibt, daß der offene Schenkel vollständig gefüllt ist. Durch vorsichtiges Umschwenken kann man die Natronlauge in den geschlossenen Schenkel bringen, das Kohlendioxid wird absorbiert, und die Flüssigkeit steigt in dem geschlossenen Schenkel hoch.

Hydrolyse von Stärke durch Amylase

Die Hydrolyse von Stärke durch Amylase kann mit der Jod-Stärke-Reaktion (Abnahme der Farbintensität) verfolgt werden. Der Stärkenachweis beruht auf der Bildung einer tiefblauen Einschlussverbindung mit elementarem Jod, die in der Hitze reversibel dissoziiert.

Als Amylasequelle kann Speichel oder ein käufliches Hydrolasengemisch aus *Aspergillus oryzae* verwendet werden. pH- und Temperaturabhängigkeit dieser Enzymkatalyse werden geprüft.

Die Enzymaktivität (Enzym-Konzentration) einer Lösung kann durch Herstellung einer Verdünnungsreihe und Inkubation der verschiedenen Verdünnungen mit der gleichen Substratmenge unter konstanten Bedingungen ungefähr ermittelt werden. Die größtmögliche Verdünnung, bei der nach einer festgesetzten Zeit noch eine vollständige Substratspaltung erfolgt ist (keine Blaufärbung mehr bei Zusatz von Jod), ist ein Anhalt für die Enzymkonzentration der Probe.

3. Versuch

a) Stärkenachweis

Amyloselösung wird mit Jod-Kaliumjodid-Lösung versetzt. Dann wird bis zum Verschwinden der Blaufärbung erhitzt und wieder abgekühlt. Die Probe wird mit einer Suspension

von wenig Kartoffelstärke in einigen ml kaltem Wasser wiederholt. Einige ml der Amylozelösung werden mit einigen Tropfen konzentrierter Salzsäure versetzt und für 15 Minuten in ein siedendes Wasserbad gestellt. Nach dem Abkühlen wird erneut mit Jodlösung geprüft.

b) Temperaturabhängigkeit

In 4 Erlenmeyerkolben werden je 5 ml einer Amylose-Puffer-Lösung (15 mM Natriumchlorid, 40 mM Phosphat-Puffer pH 7, 1 und 0, 2 g/l Amylose) gegeben. Der erste Kolben wird in ein Eis-Wasserbad, der zweite in ein Wasserbad von Raumtemperatur (ca. 25°C), der dritte in eines von 40°C und der vierte in eines von 90°C gestellt.

Nach dem Temperatúrausgleich - wenn der Inhalt der Gläser die Temperatur des jeweiligen Bades angenommen hat, was ca. 5 Minuten dauert - wird in jeden der Erlenmeyerkolben 0,1 ml einer Amylase-Lösung (Lösungen von Pankreasextrakt oder Hydrolasengemisch) gegeben, gemischt und weiter inkubiert.

Nach weiteren 15 Minuten verdünnt man mit 35 ml Wasser (Meßzylinder) und setzt 2 ml 4 mM Jodlösung hinzu. Aus der Intensität der Blaufärbungen kann man auf die Abbaugeschwindigkeit schließen.

c) pH-Abhängigkeit

Zu je 5 ml der Amylose-Puffer-Lösung (s. o.) werden je 0,5 ml der folgenden Lösungen gegeben:

1. 1 M Salzsäure (pH ca. 0)
2. 1 M Essigsäure (pH ca. 2,4)
3. 1 M Phosphatpuffer pH 7
4. 1 M Sodalösung pH>12

Die Proben werden in ein Wasserbad von 40°C gestellt. Nach 4 Minuten wird je 0,1 ml der Amylase-Lösung zugegeben und nach dem Mischen weitere 15 Minuten inkubiert. Nun wird wie oben auf unzersetzte Amylose geprüft (35 ml Wasser und 2 ml 4 mM Jodlösung); Probe 4 muß jedoch vor Zugabe der Jodlösung mit 1 ml 1 M Salzsäure neutralisiert werden.

d) Verdünnungsreihe

Aus der zu prüfenden Amylase-Lösung wird eine Verdünnungsreihe hergestellt. 11 Reagenzgläser werden von 0 - 10 nu-

meriert und wie folgt beschickt: in Glas 0 kommen 2 ml der AmylaseLösung, in die anderen wird je 1 ml Natriumchlorid-Lösung (9 g/l) gegeben. Aus Glas 0 wird mit einer 1-ml-Pipette 1 ml der AmylaseLösung entnommen und in Glas 1 gegeben. Nach dem Mischen pipettiert man mit derselben Pipette 1 ml in Glas 2 und so fort bis Glas 10.

Aus Glas 10 wird 1 ml entnommen und verworfen. Die relativen Enzymkonzentrationen in den einzelnen Gläsern entsprechen jetzt $1/2^n$, wenn n die Nummer des Glases ist.

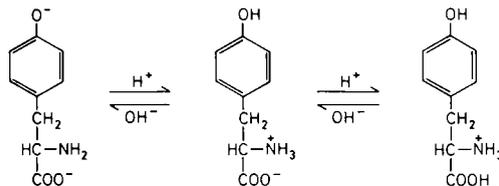
Jetzt werden in jedes Glas 2 ml der Amylose-Pufferlösung (s. o.) gegeben und alle Gläser in ein Wasserbad von 40°C gestellt. Nach 15 Minuten werden sämtliche Proben im Eisbad gekühlt und durch tropfenweise Zugabe von 4 mM Jodlösung auf unzersetzte Amylose geprüft. Bei den Verdünnungen, die noch zu einem vollständigen Abbau der Amylose ausreichen, tritt keine Blaufärbung, sondern nur eine rotgelbe oder bräunliche Farbe auf (Dextrine).

II. Aminosäuren und Proteine

α -Aminosäuren sind, verglichen mit anderen organischen Säuren, starke Elektrolyte, d.h. sie liegen in wässriger Lösung praktisch vollständig als Ionen vor. Die von den Carboxylgruppen abgegebenen Wasserstoffionen werden aber an die Aminogruppen gebunden (Zwitterionen), daher reagieren die Lösungen der einfachen Aminosäuren neutral. Die wichtigste Reaktion für Nachweis und Bestimmung von Aminosäuren ist ihre Farbbildung mit Ninhydrin.

Isoelektrischer Punkt und Löslichkeit

Bei schwer löslichen Aminosäuren (Tyrosin, Cystin) kann das amphotere Verhalten an der pH-Abhängigkeit der Löslichkeit gezeigt werden: Tyrosin ist in Wasser kaum löslich, es löst sich aber sowohl in Natronlauge wie in Salzsäure. Beim Neutralisieren fällt es wieder aus. Das Zwitterion von Tyrosin ist demnach schwer löslich, aber durch Abgabe oder Bindung von Protonen entstehen Anionen bzw. Kationen, die wegen der gegenseitigen elektrostatischen Abstoßung wesentlich besser löslich sind. Der isoelektrische Punkt von Ampholyten (Aminosäuren, Proteine) ist der pH-Wert, bei dem die meisten Moleküle gleich viele positive und negative Ladungen besitzen, die Bruttoladung also Null ist.



1. Versuch

Eine linsengroße Probe Tyrosin wird in 2 ml Wasser suspendiert. Unter Umschütteln gibt man tropfenweise 1 M Natronlauge hinzu, bis eine klare Lösung entstanden ist. Diese wird tropfenweise - wieder unter Umschütteln - mit 1 M Salzsäure versetzt. Es kommt zur Ausfällung und anschließend zur Wiederauflösung von Tyrosin.

Komplexbildung

Carboxyl- und Aminogruppen können nicht nur mit Protonen, sondern auch mit Schwermetall-Kationen assoziieren. Diese Eigenschaft besitzen auch die Proteine. Ihre Metallkomplexe haben als

Oxidation von Sulfhydryl-Gruppen

Die Sulfhydryl-Gruppe von Cystein wird in neutraler Lösung nach Zusatz kleiner Mengen von Eisen- oder Kupfersalzen oxidiert. Dabei entsteht Cystin. Die Reaktion läßt sich an einem Farbwechsel erkennen, da der Eisen(III)-cysteinkomplex violett, der Eisen(II)-komplex dagegen farblos ist. Die violette Farbe verschwindet beim Stehen und tritt beim Schütteln mit Luft durch Autoxidation des Eisen(II)-komplexes wieder auf. Dieser Farbwechsel ist erst dann nicht mehr zu beobachten, wenn alles Cystein oxidiert ist. Dieser Versuch zeigt die Bedeutung von Schwermetallkomplexen für die Reduktion von elementarem Sauerstoff: sowohl Cystein wie freie (hydratisierte) Eisen(II)-ionen sind gegen Sauerstoff wenig empfindlich, während der Komplex schnell reagiert.

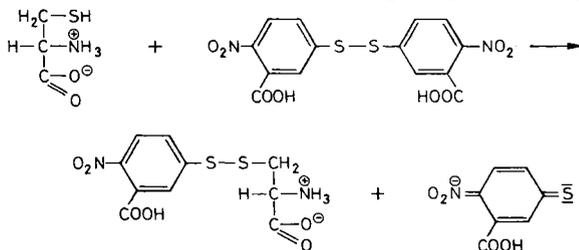
4. Versuch

Einige ml einer Cystein-hydrochloridlösung (10 g/l) - Cystein kristallisiert mit einem Mol Salzsäure - werden im Reagenzglas mit einigen Tropfen ca. 2 M Ammoniaklösung neutralisiert (tupfen auf Universalindikatorpapier). Dann wird ein Tropfen Eisen(III)-chloridlösung (10 g/l) zugegeben. Es entsteht eine violette Farbe, die beim Stehen verschwindet und beim Umschütteln mit Luft wieder auftritt. Nach mehrfachem Wiederholen entsteht ein Niederschlag von Cystin.

Nachweis von Sulfhydryl-Gruppen

Freie Sulfhydrylgruppen (Thiole), auch in Proteinen, können mit 5, 5' -Dithio-bis-(2-nitro-benzoesäure) (Ellmanns Reagenz) nachgewiesen und bestimmt werden.

Das nachzuweisende Thiol reagiert mit dem Reagenz zu einem gemischten Disulfid. Dabei wird eine dem Thiol äquivalente Menge 5-Thio-2-nitrobenzoesäure freigesetzt. Diese ist, bedingt durch eine chinoide Grenzstruktur, gelb gefärbt (vgl. Kap. XIV).



5. Versuch

1 ml Cystein-hydrochloridlösung (10 g/l) wird mit 1 ml Dinatriumhydrogenphosphatlösung (20 g/l) versetzt. Dann werden 1 - 2 Tropfen einer alkoholischen Lösung von 1 g/l 5, 5' -Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) zugegeben.

Die Sulfhydrylgruppe des Cysteins wird durch die entstehende Gelbfärbung nachgewiesen.

Lösliche Proteine werden nach ihrer Löslichkeit in reinem Wasser und ihrer Fällbarkeit mit Ammoniumsulfat in zwei Gruppen eingeteilt: Albumine und Globuline. Diese Einteilung ist entstanden, als man noch keine feineren Trennungsmethoden für Proteine kannte. Bei solchen Fällungen erhält man keine reinen Proteine.

Wichtige analytische Trennverfahren sind die Trägerelektrophorese, chromatographische Methoden und isoelektrische Fokussierung. Sie werden in nachfolgenden Kapiteln (Teil E) behandelt.

Löslichkeit und Aussalzen

Verdünnt man Eiklar mit destilliertem Wasser, so fällt ein Teil der Proteine aus, versetzt man Serum oder Eiklar mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung, so fallen ebenfalls Proteine aus.

Fast das gesamte Eiweiß fällt, wenn man mit festem Ammoniumsulfat sättigt. Beim Aussalzen erfolgt meist keine Denaturierung. Albumine sind auch in reinem Wasser löslich und werden erst bei Sättigung mit Ammoniumsulfat ausgefällt. Globuline sind nur in verdünnten Salzlösungen löslich und fallen daher bei starker Verdünnung mit destilliertem Wasser aus; andererseits fallen Globuline bereits bei Halbsättigung mit Ammoniumsulfat.

6. Versuch

Eine Reagenzglaskuppe unverdünntes Eiklar wird mit destilliertem Wasser versetzt, bis eine Trübung entsteht. Gemischt wird mit einem Glasstab, da sich beim Schütteln viel Schaum bilden würde. Nach Zugabe von etwas festem Natriumchlorid löst sich die Trübung wieder. Zu verdünnter Eiweißlösung (mit Natriumchloridlösung verdünntes Eiklar) wird das gleiche Volumen gesättigte Ammoniumsulfatlösung gegeben. Nach Umrühren mit einem Glasstab wird der Niederschlag abzentrifugiert und das klare Zentrifugat mit festem Ammoniumsulfat versetzt.

Dialyse

Proteine können als Makromoleküle nicht durch Cellophanmembranen diffundieren, wohl aber kleinere Moleküle und Ionen. Zu Trennungen aufgrund verschiedener Molekülgrößen dient auch die Gelfiltration (Kap. XXI).

7. Versuch

In einen Cellophanschlauch werden 2 ml verdünnte Eiweißlösung, 2 ml 0,15 M Natriumchloridlösung und 2 ml Glucoselösung (50 g/l) pipettiert. Der Cellophanschlauch wird in der Mitte geknickt, die beiden Enden werden nach Verdrillen mehrfach mit einem Bürogummi umwickelt. Der Schlauch wird an einem Glasstab in ein mit etwa 50 ml destilliertem Wasser gefülltes Becherglas gehängt. Die Enden sollen aus der Flüssigkeit herausragen. Nach einer Stunde prüft man das im Becherglas befindliche Wasser mit Glukotestpapier (I, 3) auf Glucose, mit Sulfosalicylsäurelösung (II, 8) auf Protein und nach dem Ansäuern mit Salpetersäure durch Zusatz von Silbernitrat auf Chlorid.

Schwermetallionen

Schwermetallsalze, wie Kupfersulfat und Quecksilberchlorid, geben mit Proteinen schwer lösliche Niederschläge (koordinative Bindung der Schwermetallionen). Bei einigen Schwermetallen ist der Niederschlag in einem Überschuß wieder löslich, da vermutlich durch vermehrte Absorption von Schwermetallkationen an die Proteinmoleküle diese positiv geladen werden und die elektrostatische Abstoßung die Löslichkeit wieder steigert.

In stark alkalischer Lösung werden die Peptidgruppen ionisiert, und die entstehenden Anionen bilden mit Kupferionen lösliche violette Komplexe. Das ist die Biuretreaktion, die auch zur quantitativen Proteinbestimmung benutzt wird. Die Probe hat ihren Namen von der Verbindung Biuret, die diese Reaktion ebenfalls gibt. Quantitative Durchführung s. Kap. XIII.

8. Versuch

Je eine Probe verdünnter Eiweißlösung wird tropfenweise mit Lösungen von Quecksilber-(II)-chlorid (75 g/l) bzw. Kupfersulfat (Fehling I) versetzt. Der mit Kupfersulfat entstandene Niederschlag ist im Überschuß löslich.

2 ml Eiweißlösung werden mit dem gleichen Volumen ca. 2 M Natronlauge versetzt. Dann wird tropfenweise unter Umschütteln Kupfersulfatlösung (1 : 10 verdünnt) zugefügt, bis eine Violettfärbung entsteht.

Enteiweißung

Einige große anorganische und organische Anionen geben bei saurer Reaktion mit Proteinen schwer lösliche Anlagerungsverbindungen. Dies dient zum Eiweißnachweis und zur Enteiweißung. Besonders schwer lösliche Niederschläge mit Eiweiß gibt 5-Sulfosalicylsäure, dies ermöglicht einen sehr empfindlichen Eiweißnachweis.

Die Enteiweißung mit Trichloressigsäure und Perchlorsäure wird oft angewandt, wenn biologisches Material auf Verbindungen von niederen Molekulargewichten geprüft werden soll. In den Zentrifugaten bzw. Filtraten dieser Proteinfällungen kann überschüssige Trichloressigsäure durch Ausäthern, überschüssige Perchlorsäure durch Neutralisation mit KHCO_3 , K_2HPO_4 oder KOH (Ausfällung als schwerlösliches KClO_4 im Eiswasserbad) entfernt werden.

9. Versuch

In Reagenzgläsern werden zu je 2 ml verdünnter Proteinlösung gleiche Volumina Trichloressigsäurelösung (100 g/kg) oder ca. 0,6 M Perchlorsäure gegeben. Eine dritte Probe wird mit einigen Tropfen Sulfosalicylsäurelösung versetzt (200 g/kg).

Reaktion mit pH-Indikatoren

Auf der Bindung großer Anionen an das Albuminmolekül beruht der Albuminnachweis mit pH-Indikatoren: Bromkresolgrün zeigt in verdünnter Essigsäure die gelbe Farbe der undissoziierten Indikatorsäure. Bei der Zugabe von Lauge bildet sich das blaugefärbte Anion. Die gleiche Farbänderung tritt auch beim Zusatz einer mit Essigsäure angesäuerten Albuminlösung auf, obwohl sich der pH-Wert nicht ändert. Das beruht darauf, daß der Indikator von den protonierten Aminogruppen des Albumins als Anion gebunden wird. Auf diesem Prinzip beruht der Proteinachweis im Urin mit Reagenzpapieren (Albustix, Uristix, Albym-Test). Die beiden ersten enthalten als Indikator Bromphenolblau (3,3',5,5'-Tetrabrom-phenolsulfonphthalein) und Puffersubstanzen, die beim Anfeuchten eine Lösung vom pH-

Wert 3 ergeben. Albym-Test enthält 3, 3', 5, 5' -Tetrabromphenolphthaleinäthylester. Eine Schätzung des Proteingehaltes ist durch Vergleich mit den beigefügten Farbskalen möglich. Der Test funktioniert nur, wenn die Hauptmenge des mit dem Urin ausgeschiedenen Proteins Albumin ist. Dies ist meist der Fall.

10. Versuch

2 ml ca. 0,1 M Essigsäure werden mit einigen Tropfen einer Bromkresolgrünlösung versetzt, bis die Lösung deutlich gelb ist. Zu einem Teil dieser Lösung wird tropfenweise ca. 0,1 M Natronlauge gegeben, bis der Indikator über grün nach blau umschlägt. Zu dem Rest wird eine Lösung von Albumin, die zuvor mit ca. 0,1 M Essigsäure angesäuert wurde, gegeben.

Die ausstehenden Albuminlösungen werden mit den Testpapieren geprüft. Nach Verdünnen der Lösungen wird erneut geprüft.

III. Andere Bestandteile von Körperflüssigkeiten

Harnstoff

Harnstoff, das Diamid der Kohlensäure, ist Endprodukt des Aminosäure-Stoffwechsels bei den Säugetieren. Es ist in Wasser sehr leicht löslich (1:1). Die Lösung reagiert neutral.

Die Amidbindungen im Harnstoff werden beim Erhitzen mit Lauge hydrolytisch gespalten. Das entweichende Ammoniak kann mit pH-Indikatorpapier nachgewiesen werden.

Die hydrolytische Spaltung kann enzymatisch mit Urease (kommt in Sojabohnen und Bakterien vor) erfolgen. Die Spaltung kann hier an der pH-Verschiebung in der Lösung erkannt werden, da die entstehende Ammoniumcarbonatlösung alkalisch reagiert.

1. Versuch

In einem Reagenzglas werden einige ml Harnstofflösung (20 g/l) mit 1 - 2 Tropfen Phenolphthalein- und einigen Tropfen Ureaselösung versetzt. Das Reagenzglas wird in ein Wasserbad von 40° gestellt und auf eintretende Farbänderungen geachtet. Durch Zusatz von einigen Tropfen 1 M Essigsäure kann die Lösung wieder entfärbt werden. Beim erneuten Inkubieren tritt wieder Rotfärbung auf.

Harnstoff im Serum

Die Spaltung von Harnstoff durch Urease wird in den Urastrastreifen bzw. Merkognost Harnstoff zu einer halbquantitativen Bestimmung von Harnstoff im Serum benutzt. Eine Erhöhung der Harnstoffkonzentration im Blutplasma ist ein wichtiger Hinweis auf eine gestörte Nierenfunktion.

Streifen aus Filtrierpapier enthalten in der ersten Zone (vgl. Abb.) unter einer Lackschicht Puffersubstanz und Urease. Hier wird der Harnstoff in dem durch Kapillarwirkung aufsteigenden Serum hydrolysiert. In der nächsten Zone befindet sich Kaliumcarbonat. Beim weiteren Aufsteigen wandern die entstandenen Ammoniumsalze in diese stark alkalische Zone. Hier wird der Dampfdruck von Ammoniak so groß, daß es durch den Luftraum zur Indikatorzone diffundiert. Unmittelbar über der Kaliumcarbonatzone ist der Reagenzstreifen mit einem Kunststoff imprägniert, der das weitere Aufsteigen von Serum und damit den Transport von Kaliumcarbonat zur Indikatorzone verhindert.

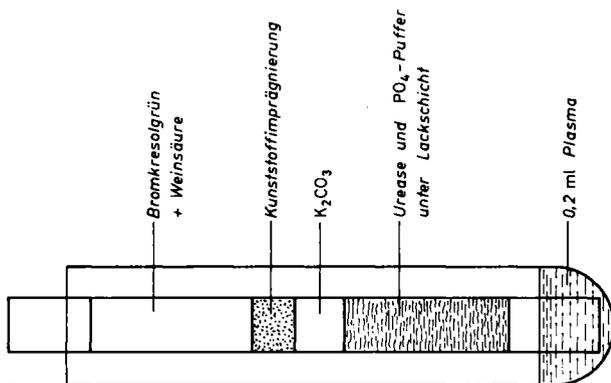


Abb. Harnstoff-Bestimmung mit Urastrat

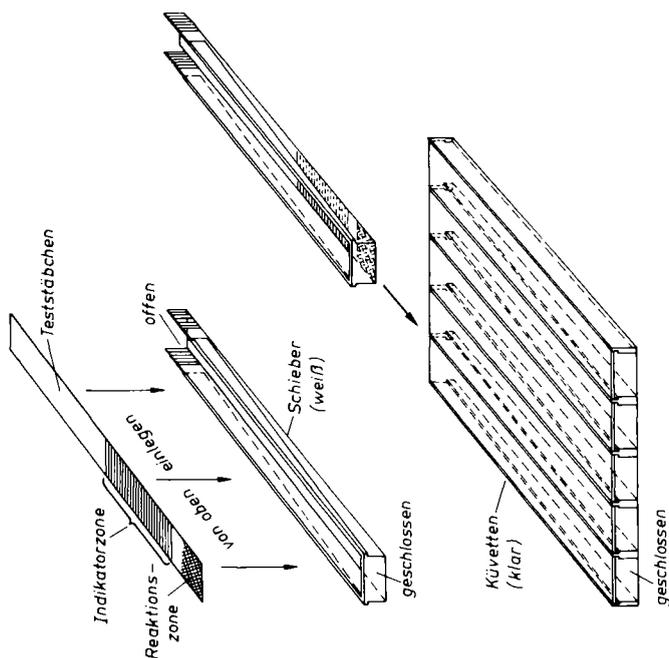


Abb. Harnstoff-Bestimmung mit Merckognost Harnstoff