

phoretisch gereinigten Phosphatasepräparates bewirkt worden sein.

Frl. Ingenieur BARBRO EK danken wir für wertvolle Mitarbeit.

H. V. EULER und L. HAHN

Institut für organisch-chemische Forschung der Universität Stockholm, den 14. August 1947.

### Summary

$\beta$ -Glycerophosphatase prepared from the intestinal mucosa of the calf was purified by fractionated precipitation with alcohol. A further concentration of the enzyme activity was attained by electrophoresis.

The activity of the purified enzyme solution was reduced to  $\frac{1}{5}$  of its original value when dialysed for 48 hours at  $p_H$  4.5. At  $p_H$  6 and at  $p_H$  10.5 only a less pronounced decrease of the activity occurred.

By addition of heat-inactivated  $\beta$ -glycerophosphatase to the enzyme solution which was partly inactivated by dialysis at  $p_H$  4.5 the activity of the latter was increased by about 100%.

### In-vitro-Versuche über die Methämoglobinbildung durch Chinonderivate

HEUBNER<sup>1</sup> führt die Reaktion des Hämoglobins bzw. Oxyhämoglobins mit chinoiden Substanzen auf das Bestehen einer Spannung zwischen zwei Oxydations-Reduktions-Systemen zurück.

Da bei den Chinonen nach DIMROTH<sup>2</sup> eine annähernd «dynamisch homologe Reihe» vorliegt, müßten die Chinone untereinander in ihrer Fähigkeit zur Methämoglobinbildung der von DIMROTH angegebenen Formel

$$\log \frac{k_2}{k_1} = m (E_2 - E_1)$$

entsprechen, wenn diese Fähigkeit tatsächlich nur vom Oxydations-Reduktions-Potential der beteiligten Systeme abhängig wäre. In der Formel bedeuten  $k_1$  und  $k_2$  die Gleichgewichtskonstanten

$$k = \frac{[\text{Methämoglobin}] \cdot [\text{Hydrochinon}]}{[\text{Hämoglobin}] \cdot [\text{Chinon}]}$$

für die beiden zu vergleichenden Chinone,  $E_1$  und  $E_2$  die Oxydations-Reduktions-Potentiale, die ja für die meisten Chinone bekannt sind, und schließlich  $m$  einen konstanten Proportionalitätsfaktor.

Im Rahmen unserer Untersuchungen über die biochemischen Eigenschaften der Chinone erschien uns eine Prüfung dieser Verhältnisse als notwendig. Bei den Versuchen verwendeten wir Hundeblood, das aus einer Beinvene entnommen wurde. Die Wirkung der Chinone wurde sowohl an durch Hämolyse freigesetztem Hämoglobin als auch an unversehrten Erythrozyten untersucht. Die Methämoglobinbestimmung wurde im Havemann-Kolorimeter<sup>3</sup> nach einer Vorschrift von HAVEMANN, JUNG und v. ISSEKUTZ jun.<sup>4</sup> gemessen. Die Messungen wurden nach verschiedenen Zeitabständen vorgenommen; nach 5 Stunden wurden die Versuche abgebrochen, da etwa nach dieser Zeit mit störenden Neben-

reaktionen zu rechnen ist. Die kolorimetrische Messung ist nur mit hämolysiertem Blute möglich, weshalb wir bei den Messungen an unversehrten Erythrozyten diese nachträglich hämolysieren mußten. Zur Ausschaltung einer Einwirkung der Chinone mit dem freigesetzten Hämoglobin wurden die Erythrozyten vor der Hämolyse dreimal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen.

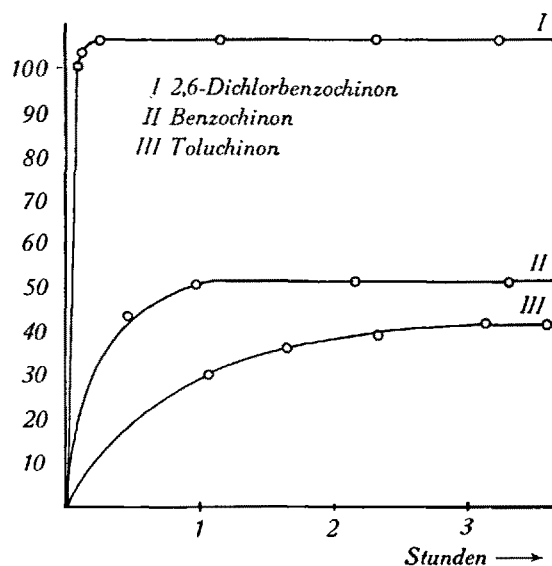


Fig. 1. Ordinate: mg Methämoglobin/100 cm<sup>3</sup>.

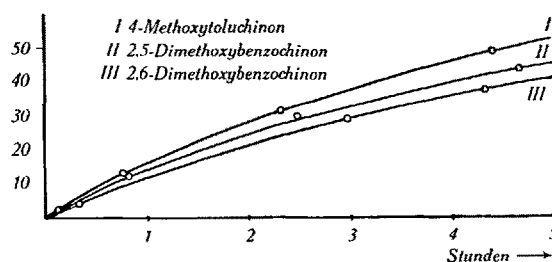


Fig. 2. Ordinate: mg Methämoglobin/100 cm<sup>3</sup>.

Die Standardblutlösung, die in der Hauptversuchsreihe zur Anwendung gelangte, enthielt  $0,8 \cdot 10^{-4}$  Äquivalente Hämoglobin im Liter. Zur Erreichung von Gleichgewichten erwies es sich am günstigsten, die Chinone im dreifachen Überschuß zuzusetzen. Da 1 Mol Chinon theoretisch imstande ist, 2 Äquivalente Hämoglobin zu oxydieren, wurde eine Chinonkonzentration von  $1,2 \cdot 10^{-4}$  Mol/l angewandt. Wir arbeiteten bei 9° und  $p_H = 6,8$  (Phosphatpufferlösung). Wegen der geringen Wasserlöslichkeit mancher Chinone enthielten sämtliche Versuchsansätze 12% Äthylalkohol. Vergleichsversuche mit rein wäßrigen Lösungen ergaben nur geringe Unterschiede gegenüber unserer Hauptversuchsreihe.

Unsere Absicht, gut vergleichbare Gleichgewichte zu erhalten, ließ sich nicht überall verwirklichen. Einige Chinone mit niedrigem Oxydations-Reduktions-Potential ergaben keine Gleichgewichtseinstellung; die Zeit-Konzentrationsdiagramme zeigen in diesen Fällen ein stetes Ansteigen der Methämoglobinkonzentration ohne Erreichung eines stationären Zustandes. In den anderen Fällen wurden ausgezeichnet reproduzierbare Gleichgewichte erhalten. Die Ergebnisse der Hauptversuchsreihe sind in Zeit-Konzentrationsdiagrammen in den Figuren 1–4 dargestellt.

<sup>1</sup> W. HEUBNER, *Erg. Physiol.* **43**, 9 (1940).

<sup>2</sup> O. DIMROTH, *Z. angew. Chem.* **46**, 571 (1933).

<sup>3</sup> P. HAVEMANN, *Biochem. Z.* **301**, 105 (1939).

<sup>4</sup> P. HAVEMANN, F. JUNG und B. v. ISSEKUTZ jun., *ib.* **306**, 224 (1940).

Bei Errechnung der Gleichgewichtskonstanten läßt sich in den Fällen, wo Gleichgewichte erreicht wurden, keine Konstanz des Proportionalitätsfaktors  $m$  der Gleichung von DIMROTH erhalten. Im Falle des 1,2-Naphthochinons sind die Verhältnisse besonders kraß, weil das Redoxpotential dieser Substanz niedriger ist als das des *p*-Benzochinons und das gemessene Gleichgewicht hingegen höher liegt als das der letztgenannten

Versuche über die Temperaturabhängigkeit der durch Chinone verursachten Methämoglobinbildung ergaben gute Übereinstimmung mit der VAN 'T HOFF'schen Regel.

Ein ausführlicher Bericht über die durchgeführten Arbeiten wird in den «Monatsheften für Chemie» (Wien) erscheinen.

O. HOFFMANN-OSTENHOF,  
W. WEIS und O. KRAUPP

I. Chemisches Laboratorium und Pharmakologisches Institut der Universität Wien, den 12. Mai 1947.

### Summary

HEUBNER states that the oxidation of haemoglobin to methaemoglobin by quinones should be due to a tension between two oxidation-reduction systems, the quinone-hydroquinone system and the haemoglobin-methaemoglobin system. The authors tried to prove this statement by using various quinones with different oxidation-reduction potentials. An analysis of the results obtained suggests, however, that the oxidation-reduction potential is not the only factor determining the equilibrium. It seems that some other constitutionally conditioned factors also play an important role in this process.

Experiments with non-haemolyzed erythrocytes show that all quinones tested are able to pass through the cellular membrane of the erythrocytes without undergoing any chemical reaction. Thus, the experiments with haemolyzed solutions and those with intact erythrocytes gave identical results.

### On the Acid Production during Cytolysis of Sea-Urchin Eggs

During the fertilization of sea-urchin eggs an acid is produced which can be measured by the evolution of  $\text{CO}_2$  from the medium<sup>1</sup>. Acidity is also increased by cytolysis (with distilled water)<sup>2</sup>, freezing and thawing<sup>3</sup> or saponin<sup>4</sup> and by heat damage<sup>5</sup> or hypertonic solutions<sup>2</sup>. During fertilization or when the cells are damaged by heat or hypertonic solutions, the amount of acid produced is greater in anaerobiosis than in aerobiosis. This means that the acid disappears under normal oxidative conditions. On the other hand, it is likely that these conditions do not exist in the case of cytolysis.

If the nature of the acid produced is the same in all of the above cases, it should be easier to study during cytolysis. Some observations have been made on this point. According to RUNNSTRÖM<sup>2</sup>, the adenosine-triphosphate (ATP) is quickly hydrolyzed during cytolysis by distilled water, while ROTHSCILD<sup>4</sup> found that phlorizin inhibited acid production during cytolysis by saponin.

Considering these facts, we took up again the hypothesis of RUNNSTRÖM<sup>1</sup>, originally proposed in the case of fertilization, that the acid is phosphoric acid. All three methods of cytolysis previously mentioned were tried and we found that ATP is quickly hydrolyzed. This is the only change in the distribution of the acid-soluble phosphorus. The M/400 phlorizin inhibits al-

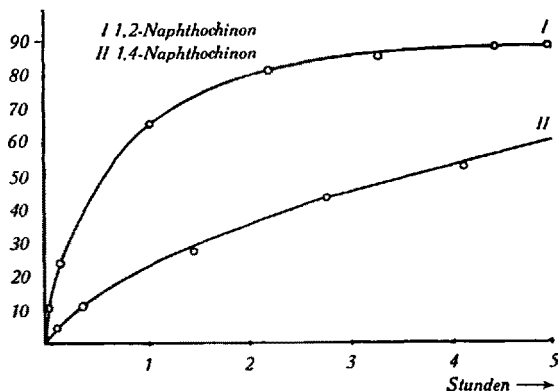


Fig. 3. Ordinate: mg Methämoglobin/100 cm³.

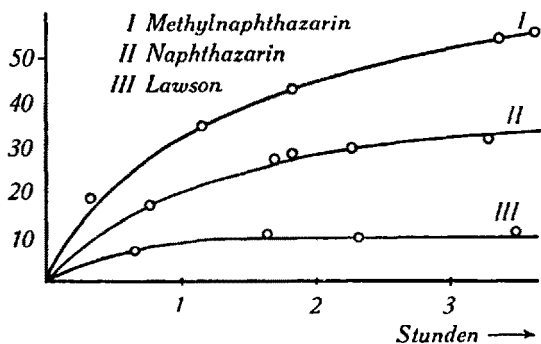


Fig. 4. Ordinate: mg Methämoglobin/100 cm³.

Substanz. Aber auch bei den Gleichgewichten, die qualitativ der Höhe der Redoxpotentiale entsprechen, ist von Übereinstimmung mit der DIMROTH'schen Formel keine Rede.

Bei den Substanzen, die unter den Versuchsbedingungen keine Gleichgewichtseinstellung verursachen, läßt sich ein qualitativer Vergleich durchführen, wenn man die Anfangsgeschwindigkeiten der Reaktion miteinander vergleicht. Wir konnten hier keine Reihung feststellen, die den Redoxpotentialen der untersuchten Substanzen entspricht.

Es scheint also, daß das Oxydations-Reduktions-Potential bei der Methämoglobinbildung durch Chinone nicht die einzig ausschlaggebende Rolle spielt; konstitutionsbedingte Faktoren, die noch nicht berechnet werden können, überlagern vermutlich seinen Einfluß. Die Bildung von Methämoglobin läßt sich anscheinend nicht mit Dehydrierungsreaktionen, wie sie DIMROTH anführt, vergleichen.

Die Versuche mit nichthämolysiertem Blut ergaben völlige Übereinstimmung mit den Resultaten bei den Hämolysaten. Man kann daher annehmen, daß sämtliche Chinone imstande sind, die Membranen der Erythrozyten unverändert zu passieren.

<sup>1</sup> J. RUNNSTRÖM, Arkiv för Zool. 21 (B), Nr. 8 (1930).

<sup>2</sup> J. RUNNSTRÖM, Bioch. Z. 258, 257 (1933).

<sup>3</sup> J. RUNNSTRÖM, Biol. Bull. 69, 345 (1935).

<sup>4</sup> LORD ROTHSCILD, J. exp. Biol. 16, 49 (1939).

<sup>5</sup> J. RUNNSTRÖM, Protoplasma 15, 532 (1932).