

6.0 NaOH and g 20 NaCl)¹. The red spot of G was eluted from the paper with 5 ml of NH_3 /acetone mixture (4/1) and read at 530 nm against a blank obtained by eluting an equal piece of sprayed paper where no colour was present. Recoveries of G added to normal and uremic serum and urine in amounts from 5 to 30 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$, ranged from 76 % to 94 % (mean 84 %) and the minimal amount which could be detected (by using 100 ml of fluid) was 0.5 μg . The measurements in muscle tissue and in solid foods were performed on the water extracts obtained with the procedure we had previously used for MG². Eggs and milk were dialyzed in Visking cellophane bags against distilled water for 48 h at 4 °C and measurements were made on the dialyzate. CR was measured with an Auto-Analyzer and MG using the procedure previously described³.

Results. The mean serum G concentration in 8 normal persons was $1.41 \pm 0.49\text{ }\mu\text{g}/100\text{ ml}$ and its daily urinary excretion, $382 \pm 221\text{ }\mu\text{g}$. In 28 chronic renal patients the serum G levels increased in accordance with the severity of renal impairment, as indicated by the serum CR concentrations (Figure), while daily urinary output was $459 \pm 229\text{ }\mu\text{g}$, which is not significantly different from that of normal subjects. The serum G levels in 7 dogs on their 3rd day anuria following the ligation of the ureters, was $8.4 \pm 1.9\text{ }\mu\text{g}/100\text{ ml}$ and the content in their crude fresh muscle tissue was $21.0 \pm 6.8\text{ }\mu\text{g}/100\text{ g}$. The corresponding concentrations in 2 normal dogs were: 0.8–1.0 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$ and 3.2–3.5 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, respectively (Table). The 2 vegetable foods (wheat meal and potatoes) examined did not contain appreciable amounts of G and the uncooked animal foods (milk, eggs, meat) were found to contain traces of it (less than 5 $\mu\text{g}/100\text{ g}$); boiled meat and broths

on the contrary, contained amounts ranging from 20 to 50 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ or ml, respectively.

Discussion. The lack of specific colour reactions has been the main obstacle preventing G from being measured. We overcame this difficulty by using a combination of column and paper chromatography to isolate G from the other substances reacting to diacetyl. The procedure thus obtained, though requiring relatively large amounts of body fluids, is simple enough to be used in any clinical laboratory, and is absolutely specific. We can now state, therefore, that the accumulation of G in renal patients is in direct proportion to functional impairment and that it is preferentially retained in muscle tissue rather than in serum, as occurs for MG². High serum G levels had been previously found in anuric dogs by CARR et al.⁴ who employed, however, an unreliable procedure and, more recently in 7 renal patients, by STEIN et al.⁵ who did not describe the analytical method employed.

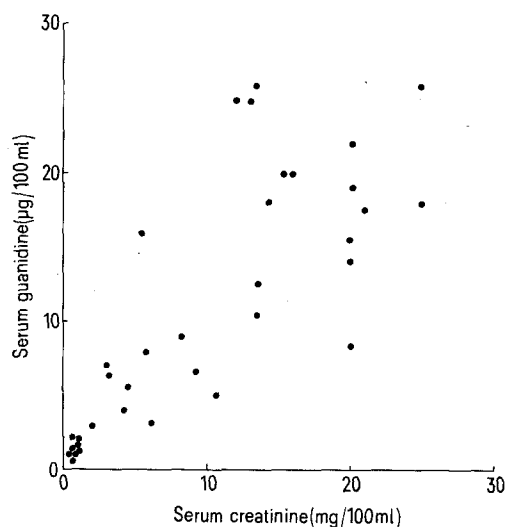
The importance of G as an uremic toxin cannot be established on the grounds of the present results. It can only be pointed out that its accumulation inside the cells, together with MG, is likely to be responsible for enzymatic inhibitions. Indeed, it is known that both these substances produce such an effect *in vitro*⁶.

As to the metabolic origin of G, its ingestion clearly cannot account for its urinary excretion even in the case of a diet rich in those foods which contain it in relatively large amounts (cooked meat, broth); it may therefore be concluded that the origin of G is largely endogenous.

Riassunto. Si descrive un metodo per la determinazione della guanidine nei liquidi biologici e si rileva che essa aumenta nel siero uremico fino a 30 volte la norma (valore medio normale: $1.41 \pm 0.49\text{ }\mu\text{g}/100\text{ ml}$) e che nei cani uremici la concentrazione muscolare è di quasi 3 volte superiore a quella plasmatica. La eliminazione urinaria non è diversa fra normali ed uremici: 382 ± 221 e $459 \pm 229\text{ }\mu\text{g}/24\text{ h}$, rispettivamente.

G. C. MENICHINI and S. GIOVANNETTI⁷, with the technical assistance of S. LUPETTI,

Cattedra di Semeiotica Medica, Università di Pisa, Ospedali S. Chiara, I-56100 Pisa (Italy), 28 August 1972.



The relationship between the serum creatinine and the serum guanidine concentrations in 28 chronic renal patients ($r = 0.78$, $p > 0.01$). The figures concerning 8 normal subjects are also reported.

- ¹ M. C. GOLDSCHMIDT and B. M. LOCKHART, *Analyt. Chem.* 43, 1475 (1971).
- ² S. GIOVANNETTI P. L. BALESTRI and G. BARSOTTI, *Arch. intern. Med.*, in press.
- ³ G. C. MENICHINI, M. GONELLA, G. BARSOTTI and S. GIOVANNETTI, *Experientia* 27, 1157 (1971).
- ⁴ M. H. CARR and P. R. SHOERB, *Analyt. Biochem.* 7, 221 (1960).
- ⁵ I. M. STEIN, M. J. MICKLUS and H. S. FRAZIER, *Proc. 5th Annual Contractors' Conference, Artif. Kidney; Chronic Uremia Program* 5, 145 (1972).
- ⁶ G. HOLLUNGER, *Acta pharmac. tox.* 17 Suppl. 1 (1955).
- ⁷ Acknowledgments. This investigation was supported by Public Health Service, Research Contract No. PH-43-68-1466.

Verkürzte Methode zur Isolierung radiochemisch reinen Chlorophylls

Hydrophobe Verunreinigungen (Wachse, Fette, Karotenoide und andere), die bei der spektrophotometrischen Bestimmung der Chlorophylle nicht stören, beeinflussen die Messungen ihrer Radioaktivität, da sie selbst radioaktiv sind. Sie wurden bisher meist durch mehrfaches Chromatographieren auf Papier entfernt (SCHLYCK¹;

GAPONENKO²). In der vorgelegten Arbeit wird eine verkürzte Methode zur semipräparativen Gewinnung radiochemisch reinen Chlorophylls *a* und *b* beschrieben.

Als Versuchsmaterial wurde Sommergerste (*Hordeum sativum* L.) der Sorte «DonauMarkt» (Slovensky dunajský trh) verwendet, im Dreiblattstadium. Radioaktiver ¹⁴C-

Veränderungen der spezifischen Radioaktivität der Chlorophylle nach den einzelnen Reinigungsstufen

Reinigungsart (Stufe)	Spezifische Radioaktivität (dpm/ μ g Chlorophyll)		Chlorophyll <i>b</i> $X \pm s_x$
	Chlorophyll <i>a</i> + <i>b</i> $X \pm s_x$	Chlorophyll <i>a</i> $X \pm s_x$	
Azeton	1304 $\pm$ 13,4		
Hexan	757 $\pm$ 18,7		
Säulenchromatographie (Polyamid) Stufe I	457 $\pm$ 14,0		
Papierchromatographie I, Stufe II		310 $\pm$ 12,4	245 $\pm$ 11,72
Dünnschichtchromatographie (Kieselgel) Stufe III		313 $\pm$ 18,2	235 $\pm$ 10,5
Papierchromatographie II, Stufe IV		316 $\pm$ 14,5	239 $\pm$ 16,6
Papierchromatographie III, Stufe V		305 $\pm$ 11,3	268 $\pm$ 24,4*

* Chlorophyll *b* in sehr kleinen Mengen.

Kohlenstoff wurde in die intakten Pflanzen durch die photosynthetische Assimilation von markiertem $^{14}\text{CO}_2$ inkorporiert. Die Konzentration des $^{14}\text{CO}_2$ in der hermetisch abgeschlossenen Kammer betrug 0,5%, seine Gesamtkonzentration 0,5 mCi. Die Assimilation verlief bei einer Beleuchtung von 5000 Lux und bei einer Temperatur von $22 \pm 2^\circ\text{C}$, sowie bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60–65% für die Dauer von 90 min.

Die Pflanzen wurden 24 h nach der Inkorporation von $^{14}\text{CO}_2$ entnommen und nach der geläufigen Methode in wasserloses Azeton extrahiert. Nach mehrmaligem Auswaschen mit dest. Wasser wurden die Pigmente in *n*-Hexan übergeführt; durch diese Prozedur wird ein Grossteil der radioaktiven Ballaststoffe aus der Gesamtpigmentlösung entfernt. Die unerwünschten, gleichfalls radioaktiven Pigmente (Karotine und Xanthophylle, sowie eventuelle Degradationsprodukte der Chlorophylle) werden zusammen mit eventuell noch vorhandenen Ballaststoffen durch Chromatographie an einer Polyamidsäule abgetrennt (Reinigungsstufe I). Die Säulenchromatographie auf Polyamid (FRIČ und HASPEL-HORVATOVIČ³) hat ausser ihrer hohen Trennfähigkeit den weiteren Vorteil einer hohen Adsorptionskapazität, die es ermöglicht, verhältnismässig grosse Mengen von Chlorophylllösungen bis zu 10fach durch Elution in Methanol einzuengen.

Die weitere Purifikation, sowie auch die Trennung von Chlorophyll *a* und Chlorophyll *b* wurde mittels Papierchromatographie (Whatman No. 3) in einem Lösungsmittelsystem von Toluol, Methanol und *n*-Hexan (400:3:3) durchgeführt. Reinigungsstufe II; HASPEL-HORVATOVIČ⁴. Zur Kontrolle der radiochemischen Reinheit der so erhaltenen Lösungen von Chlorophyll *a* und Chlorophyll *b* wurden die Lösungen noch nacheinander in den folgenden Systemen chromatographiert: 1. Dünnschichtchromatographie auf Kieselgel im Lösungsmittelsystem Benzen, Isopropanol, Wasser (120:10:0,25). Reinigungsstufe III; HASPEL-HORVATOVIČ und FRIČ⁵. 2. Papierchromatographie (Whatman Nr. 3) im Lösungsmittelsystem Isopropanol. Petroläther (1:99). Reinigungsstufe IV; SCHLYCK¹. 3. Papierchromatographie (Whatman Nr. 3) im Lösungsmittelsystem Chloroform, Petroläther (1:3). Reinigungsstufe V; SCHLYCK¹.

Die Konzentration der Chlorophylle wurde in Azetonlösung im Verlauf der Purifikation spektrophotometrisch bestimmt (VERNON⁶; SMITH und BENITEZ⁷). Die Radioaktivität der Chlorophylle wurde in Azetonlösungen mittels des Scintillationsspektrometers «Liquid scintillation spectrometer TRI CARB, Typ 3375» der Fa. Packard gemessen. Vor der Messung wurden die Chlorophylllösungen durch die Einwirkung von UV-Licht 1–2 h, je nach Konzentration, dekoloriert (DEROCHE und DUFOUR⁸). Als Scintillationslösung wurde eine Lösung der folgenden Zusammensetzung verwendet: 4 g PPO

(2,5 Diphenyloxazol) und 50 mg POPOP (*p*-bis-2/5-Phenyloxazol/-Benzen in 1 l Toluol). Zu 5 ml der Scintillationslösung wurden genau 1,0 ml der dekolorierten Pigmentlösung in Azeton beigegeben, wobei der Chlorophyllgehalt zwischen 15 und 60 $\mu\text{g/ml}$ betrug.

Die Anzahl der gemessenen Impulse (cpm) wurde auf die absolute Aktivität (dpm) umgerechnet. Die Abhängigkeit der Wirksamkeit der Messungen der Chlorophylllösungen in Azeton (starkes Löschungsmittel) von der AES oder vom Kanalverhältnis stellten wir durch Beigabe einer Standardlösung von radioaktivem Toluol bekannter absoluter Aktivität fest.

Die Herabsetzung der spezifischen Aktivität im Verlauf der einzelnen Reinigungsstufen zeigt die Tabelle. Aus ihr ist ersichtlich, dass die Purifikation praktisch mit der Stufe II endet, da im Verlauf der weiteren Reinigungsstufen die spezifische Aktivität schon gleich bleibt. Trotzdem empfiehlt es sich, auch noch die Trennstufe III auf Kieselgeldünnschichten durchzuführen, vor allem um die Reinheit der Chlorophyllpräparate zu kontrollieren. Trennstufe IV und V zeigte sich in unseren Versuchsbedingungen als überflüssig.

Ausdrücklich sei bemerkt, dass sich die oben erwähnte Methode auf normalgrüne Gerstenblätter als Material bezieht. Für abweichendes Pflanzenmaterial muss die Anzahl der notwendigen Trennstufen jeweils experimentell ermittelt werden.

Summary. Radiochemically pure chlorophyll *a* and *b* have been separated from barley by a rapid two-step purification procedure. It is based on chromatographic separation of pigments on polyamide columns and by paper chromatography.

E. HASPEL-HORVATOVIČ, F. FRIČ and
B. HORIČKOVÁ

Botanisches Institut der Slowakischen Akademie
d. Wissenschaften, Dúbrovská cesta 26, Bratislava
(Tschechoslowakei), 21. August 1972.

¹ A. A. SCHLYCK, in *Metabolism chlorofyllav zelenom rastenij* (Verlag nauka i tehnika, Minsk 1965).

² V. I. GAPONENKO, in *Problemy biosyntheza chlorofillov* (Verlag nauka i tehnika, Minsk 1971).

³ F. FRIČ und E. HASPEL-HORVATOVIČ, J. Chromat. 68, 264 (1972).

⁴ E. HASPEL-HORVATOVIČ, Biologia, Bratislava 18, 334 (1963).

⁵ E. HASPEL-HORVATOVIČ und F. FRIČ, Biologia, Bratislava 19, 820 (1964).

⁶ P. VERNON, Analyt. Chem. 32, 1144 (1960).

⁷ J. H. C. SMITH und A. BENITEZ, in *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse* (Eds. K. PEACH und M. V. TRACEY; Verlag Springer 1955).

⁸ M. E. DEROCHÉ und Ph. DUFOUR, Bull. Soc. fr. Physiol. vég. 15, 71 (1969).