

Triols $[\alpha]_D = +52^\circ$ ($c = 1,10$) stimmt mit unseren Angaben für das aus Echinocystsäure gewonnene Triol überein¹).

Der *Rockefeller Foundation* in New York danken wir für die Unterstützung dieser Arbeit.

Zusammenfassung.

Es wurde die Identität des Genins A ($C_{30}H_{50}O_3$) aus Wurzeln der *Primula officinalis Jacquin* und der *Primula elatior Jacquin* mit dem aus Echinocystsäure zugänglichen 2,16 (oder 22), 28-Trioxo-oleanen bewiesen.

Organisch-chemisches Laboratorium
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich.

234. Zur Methodik der Nierenphosphatase-Bestimmung

von Hugo Aebi.

(2. IX. 48.)

Die Fähigkeit von Geweben, insbesondere von Knochen, Darm und Niere, Phosphat von Phosphorsäureestern abzuspalten, ist bedingt durch das in ihnen enthaltene Ferment Phosphatase. Zur Bestimmung der sog. Phosphatase-Aktivität — darunter soll im folgenden stets die Wirkung der im alkalischen Gebiet aktiven Phosphomonoesterase verstanden werden — wurden bisher die verschiedensten Methoden angewendet. Hierbei muss zwar ein Unterschied gemacht werden zwischen den Verfahren, die eine Reinigung des gewonnenen Rohenzym zum Ziele haben, und den hier besprochenen Methoden, mit welchen man die Phosphatase-Aktivität eines Gewebes zu Vergleichszwecken quantitativ erfassen will.

Während die japanische Schule (z. B. *Umeno*)² die Bestimmung in Aufschwemmungen des pulverisierten, luftgetrockneten Organs ausführte, fand die von *Kay*³) empfohlene Methodik in den angelsächsischen Ländern weiteste Verbreitung. Darnach wird das frisch entnommene Organ (oder Organstück) mit Sand verrieben, mit 10 oder 20 Teilen chloroformgesättigtem Wasser versetzt und unter öfterem Umschütteln 24 oder 48 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen und filtriert, worauf die Aktivität eines aliquoten Teiles

¹) Vgl. *O. Jeger, Cl. Nisoli und L. Ruzicka, Helv.* **29**, 1183 (1946); wir haben die spezifische Drehung des Triols aus Echinocystsäure wiederholt und finden nun $[\alpha]_D = +52^\circ$ ($c = 0,601$ in Chloroform) und $[\alpha]_D = +15^\circ$ ($c = 0,736$ in Pyridin), gemessen in einem Rohr von 1 dm Länge.

²) *Bioch. Z.* **231**, 317, 328 (1931).

³) *Biochem. J.* **20**, 791 (1926) und **22**, 855 (1928).

des Filtrates bestimmt wird. Andererseits sind *Marsh* und *Drabkin* 1947¹⁾ dazu übergegangen, die Phosphatase-Aktivität nicht mehr im filtrierten wässrigen Auszug zu bestimmen, sondern im Homogenat unter Verwendung des Homogenizers vom *Potter-Elvehjem*-Typ²⁾. Dieses Vorgehen, das eine Vereinfachung gegenüber obiger Methodik darstellt, birgt zudem den Vorteil in sich, dass man bereits ca. 2 Stunden nach der Entnahme des Organs bzw. Organstücks das Ergebnis der Bestimmung erhalten kann. Auf einige weitere, weniger gebräuchliche Methoden (z. B. Mikromethodik, ausgehend von vakuumgetrockneten Organstücken, oder Methoden unter Verwendung von mit Aceton getrockneten Organpulvern) soll hier nicht näher eingegangen werden.

In der vorliegenden Arbeit haben wir uns zum Ziel gesetzt, die von *Marsh* und *Drabkin* (loc. cit.) angegebene Methodik zu prüfen und mit derjenigen von *Kay* (loc. cit.) zu vergleichen. Ersteres, weil uns die bei der Ausführung dieser Bestimmungsmethode gemachten Erfahrungen veranlassten, davon abzuweichen, letzteres weil wir es als einen Mangel empfanden, in der Literatur keine diesbezüglichen Angaben gefunden zu haben. Vergleiche zwischen den in der Literatur zu findenden Resultaten werden auch noch dadurch erschwert, dass als Mass für die Phosphatase-Aktivität viele verschiedene Einheiten vorgeschlagen worden sind und nebeneinander verwendet werden. Obwohl die von *A. Bodansky*³⁾ vorgeschlagene Einheit der Phosphatase-Aktivität⁴⁾, die klinisch zur Angabe der Serum-Phosphatase-Aktivität allgemeine Verwendung findet und z. B. auch von *Marsh* und *Drabkin* gebraucht wird, den Anforderungen der Enzymkinetik der Phosphatase nicht ganz gerecht wird, haben wir aus rein praktischen Gründen die Phosphatase-Einheit von *A. Bodansky* übernommen. Wir anerkennen die von *O. Bodansky*⁵⁾ dagegen erhobenen Einwände durchaus und behalten uns vor, auf die Frage betreffend Wahl der Phosphatase-Einheit zurückzukommen.

Beim Vergleich der verschiedenen Methoden haben wir — was die Inkubierung der verdünnten Gewebssuspensionen anbelangt — die Versuchsbedingungen bezüglich Zeit, Temperatur und Substrat von der von *A. Bodansky* (loc. cit.) angegebenen Technik für Serum übernommen. Unser Hauptaugenmerk in diesem Teil der Bestimmung gilt der p_H -Einstellung bzw. deren Konstanz während des Versuches, da angesichts des steilen und spitzen Verlaufes der p_H -

¹⁾ J. Biol. Chem. **168**, 61 (1947).

²⁾ J. Biol. Chem. **114**, 495 (1936).

³⁾ J. Biol. Chem. **101**, 93 (1933) und **120**, 167 (1937).

⁴⁾ Nach *A. Bodansky* ist 1 Phosphatase-Einheit diejenige Menge Enzym, die in 1 Stunde bei 37° C 1 mg Phosphor (als Phosphat) von Na- β -Glycerophosphat (als 0,5-proz. Lösung vorliegend) abspaltet: Lösung durch 0,02-m. Veronal-Na gepuffert; z. B. bei Serum $p_H = 8,6$.

⁵⁾ J. Biol. Chem. **120**, 555 (1937).

Aktivitätskurve der Gewebsphosphatase diesem Faktor entscheidende Bedeutung zukommt. An Hand der vergleichenden Untersuchungen der verschiedenen dafür empfohlenen Puffergemische soll ferner auf charakteristische Unterschiede im Verlauf und Optimum der p_H -Wirkungskurve hingewiesen werden. Eine genaue Beschreibung der von uns angewandten Bestimmungsmethodik findet sich am Ende des experimentellen Teiles.

Experimenteller Teil.

1. Organverarbeitung; Gewinnung des Gewebehomogenats (Niere).

Bei der Wahl einer geeigneten Verarbeitungsweise hat man die Tatsache zu berücksichtigen, dass die im alkalischen Milieu wirksame Gewebsphosphatase ein Ferment ist, welches wenigstens teilweise fest an die Zellstruktur gebunden ist und das bei nur wenig vom Neutralpunkt abweichender Reaktion recht stabil ist. Während die Lyoanteile sich natürlich leicht aus dem Gewebe herauslösen lassen, gelingt eine völlige Freilegung der Desmoanteile selbst unter Zuhilfenahme der Autolyse nur sehr schwer. So wird bei dem von Kay (loc. cit.) geübten Verfahren, bei welchem die Aktivität eines nach 24 oder 48 Stunden filtrierten wässrigen Auszuges bestimmt wird, nach den Angaben des Autors selbst nur 90% der darin vorhandenen Enzymmenge erfasst, bzw. 96% bei Wiederholung der Extraktion. Das wäre nicht so schlimm, wenn nicht der Grad der Herauslösbarkeit des Enzyms ein variabler wäre. Zur Umgehung dieser Schwierigkeit wie auch aus Gründen der Zeitersparnis geben wir der Bestimmung der Phosphatase-Aktivität im frisch gewonnenen Homogenat den Vorzug. Ob man nun das Gewebe zur Erzielung einer feinen Suspension mit dem Homogenizer nach Potter und Elvehjem zerkleinert oder ob man dazu das alte Verfahren des Verreibens mit Quarzsand und nachfolgenden kurzen Abzentrifugierens des Sandes und gröberer Bindegewebspartikel verwendet, ergibt praktisch gleichlautende Resultate, wie z. B. das folgende Versuchsergebnis zeigt:

Tabelle 1.

Vergleichende Bestimmungen der Phosphatase-Aktivität in der Rattenniere nach den Methoden von Kay (A), Marsh und Drabkin (B) und der unten beschriebenen (C). Resultat nach Methode C = 100%. Doppelbestimmungen. Ph.-E. = Phosphatase-Einheiten pro 1 g Frischgewebe.

Vers.-Nr.	A		B		C	
	Ph.-E.	%	Ph.-E.	%	Ph.-E.	%
1	25,2	96,2	25,4	97,0	26,2	
2	31,6	109,3	28,8	99,8	28,9	
3	15,1	77,5	19,2	98,5	19,5	100%
4	24,2	101,7	22,1	93,0	23,8	
5	17,8	88,1	20,2	100,0	20,2	
6	20,0	99,0	19,5	96,6	20,2	
	—	95,3	—	97,5	—	100

Technik: Die beiden Nieren wurden nach dem Töten entnommen, von Bindegewebe, Fett und Blut befreit, zur Eliminierung der ungleichen örtlichen Verteilung des Enzyms in der Niere fein zerschnitten und das Material in 3 Teile geteilt.

A) Methode nach *Kay*: Verreiben mit Sand. Zugabe von 20 Teilen Wasser (mit Chloroform gesättigt), unter öfterem Umschütteln 24 Stunden bei Zimmertemperatur stehen gelassen; tags darauf Filtration und Aktivitätsbestimmung des Filtrats.

B) Methode nach *Marsh* und *Drabkin*: Homogenisieren des Gewebes. Sofortige Aktivitätsbestimmung in der erhaltenen Suspension.

C) Verreiben mit Quarzsand, kurzes Abzentrifugieren (20 Sekunden), Aktivitätsbestimmung der Suspension. Überall gleiche Verdünnung der Enzymlösung (1 cm^3 entspricht $12,5\text{ mg}$ Frischgewebe), übrige Versuchsbedingungen siehe unten.

Abgesehen von den übereinstimmenden Resultaten der Methoden B und C fallen die schwankenden Ergebnisse der Methode A auf; der Durchschnitt beträgt 95% (vgl. den von *Kay* selbst gegebenen Wert von 90%). Weitere vergleichende Versuche zeigen die Unnötigkeit des raschen Abtötens des Gewebes durch Werfen in flüssige Luft. Dies ist angesichts der oben erwähnten Stabilität der Gewebsphosphatase nicht verwunderlich. Da *Marsh* und *Drabkin* selbst dieses Verfahren inzwischen aufgegeben haben¹⁾, wollen wir uns auf die Wiedergabe des Resultats einer diesbezüglichen Versuchsreihe beschränken; diese wurde zu einem Zeitpunkt durchgeführt, als wir von der letzteren Mitteilung dieser Autoren noch keine Kenntnis hatten. Bei der Messung der Phosphatase-Aktivität an 5 verschiedenen Ratten bestimmten wir bei der Niere der einen Seite, die sofort nach dem Töten in flüssige Luft geworfen worden war, im Mittel eine Phosphatase-Aktivität von 19,4 Phosphatase-Einheiten, bei der Niere der andern Seite, die wir ohne besondere Vorsichtsmassnahmen innert 5 Minuten entnommen hatten, eine solche von 19,3 Phosphatase-Einheiten. Die bei den einzelnen Bestimmungen beobachteten Differenzen liegen innerhalb der Fehlerbreite ($\pm 3\%$).

2. Wahl der zum Versuchsansatz zuzusetzenden Enzymmenge.

Die absoluten Mengenverhältnisse haben wir wie *Marsh* und *Drabkin* von der bekannten, für Serum ausgearbeiteten Vorschrift von *A. Bodansky* übernommen, nämlich 1 cm^3 Enzymlösung (Serum oder Gewebssuspension) auf 9 cm^3 Substrat-Puffer-Lösung (Substrat = Na- β -Glycerophosphat $0,5\% = 0,0016\text{ molar}$). Die zu wählende Verdünnung hängt in erster Linie von der Art des zu untersuchenden Organs und der Tierart ab, wobei zu berücksichtigen ist, dass die Phosphatase-Aktivität beim selben Organ je nach Tierart beträchtliche Unterschiede aufweist (vgl. die Tabellen von *Kay*²⁾). Da die Spaltung des Na-Glycerophosphats durch die Phosphatase wenigstens zu Beginn eine monomolekulare Reaktion darstellt, ist zu fordern, dass die Substratkonzentration während des Versuches möglichst konstant bleibt; es sollen sich andererseits möglichst wenig hemmende Spaltungsprodukte (Phosphat!) anreichern. *A. Bodansky* zieht die Grenze bei 10%; wir halten eine Spaltung von 3%–5% ($135\text{--}225\gamma\text{ P}$) des im Ansatz vorhandenen Substrates (total 45 mg Glycerophosphat, entsprechend $4,5\text{ mg}$ Phosphor) für tragbar.

Bei den mit Rattennieren durchgeführten Versuchen suspendieren wir 1 g Organ (Frischgewicht) in 80 cm^3 Wasser bzw. Pufferlösung und setzen 1 cm^3 dieser verdünnten Suspension zur Substrat-Puffer-Mischung zu (= Verdünnung 1:80; $12,5\text{ mg}$ Gewebe pro Ansatz). Wenn bei einer Versuchsserie untereinander vergleichbare Resultate erhalten werden sollen, so muss die Verdünnung, das heisst die pro Ansatz untersuchte Menge Frischgewebe, unbedingt konstant gehalten werden. Dies hat seinen Grund in der schon von *Bawkin* und *O. Bodansky*³⁾ gemachten Beobachtung, dass die Phosphatase-Aktivität bei zunehmender Konzentration der Gewebssuspension (oder des Auszuges) relativ abnimmt und umgekehrt, bei Konstanz aller andern Versuchsbedingungen. Um Aufschluss über die Grösse der bei unsern Versuchsbedingungen auftretenden Änderung der Phosphatase-Aktivität zu erhalten, untersuchten wir den praktisch in Frage kommenden Bereich von Verdünnung 1:10 bis 1:160, d. h. 100 mg bis $6,25\text{ mg}$ Niere (Frischgewicht) pro Ansatz in verschiedenen Puffergemischen.

¹⁾ J. Biol. Chem. **171**, 461 (1947).

²⁾ Biochem. J. **22**, 855, 1446 (1928).

³⁾ J. Biol. Chem. **101**, 641 (1933).

Wie aus Fig. 1 zu ersehen ist, sind bei der relativen Aktivitätsabnahme bei Verwendung konzentrierterer Organsuspensionen zumindest 2 Faktoren beteiligt: Erstens die fortschreitende Anhäufung von hemmendem Phosphat als Spaltprodukt (betreffend Phosphathemmung siehe *Jacobsen*¹⁾), sowie die zum Teil bedeutende Abnahme der Substratkonzentration während des Versuches, die beide eine Verzögerung der Reaktion bewirken. Zweitens ist eine Hemmung zu beobachten, die ganz oder teilweise bedingt wird durch die in der Rohenzymlösung ebenfalls vorkommenden Aminosäuren und andere Rest-N-Stoffe.

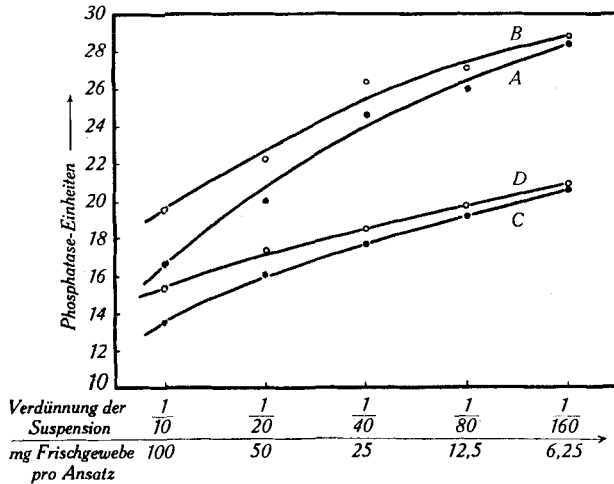


Fig. 1.

Abhängigkeit der Phosphatase-Aktivität der Rattenniere von der pro Ansatz vorhandenen Enzymmenge. Phosphatase-Einheiten nach *Bodansky* auf 1 g Frischgewebe bezogen. Inkubation 1 Stunde bei 37° C und p_H -Optimum. Kurven A und B: Veronal-Na 0,02-m. als Puffer; $p_H = 9,4$. Kurven C und D: Veronal-Na-Carbonat/HCl-Puffer ($\sim 0,05$ -m.) $p_H = 9,15$. Kurven A und C: beobachtete Werte; Kurven B und D: nach Formel (1) korrigierte Werte.

Während die beiden steileren Kurven (A und C) die beobachteten Aktivitäten darstellen, resultieren die Kurven B und D aus den nach der Formel (1) von *A. Bodansky* korrigierten Werten. Die Korrektur bezweckt die näherungsweise Berücksichtigung der unter 1. angeführten reaktionsverzögernden Faktoren (Phosphathemmung + Abnahme der Substratkonz.); dies ist besonders bei den Versuchen unerlässlich, in welchen ein relativ grosser Prozentsatz des vorhandenen Substrats im Verlauf des Versuches gespalten wird. Die durch die Formel

$$\text{Phosphatase-Aktivität}_{\text{korr.}} = \text{Phosphatase-Aktivität}_{\text{beob.}} + \frac{(\text{nach Versuch total vorhandener P in } \gamma \times 10)^2}{1000} \quad (1)$$

erzielte Korrektur entspricht ungefähr +0,1% des beobachteten Wertes für jede 10 γ während des Versuches als anorganisches Phosphat abgespaltenen Phosphor. Die Kurven B und D geben somit Aufschluss über die den Aminosäuren und andern Eiweisspaltprodukten zuzuschreibende Hemmung.

Im Bestreben, einerseits die Substratkonzentration konstant zu halten und die beobachteten Hemmungsmechanismen möglichst auszuschalten, andererseits eine zur photometrischen Phosphor-Bestimmung hinreichende Menge von abgespaltenem anor-

¹⁾ Bioch. Z. **249**, 21 (1932) und **267**, 89 (1933).

ganischem Phosphat zu erhalten, wählten wir für die Arbeiten mit Rattenniere die Verdünnung von 1:80 und verkürzten aus denselben Gründen die Inkubationszeit auf nur 30 Minuten.

3. Untersuchung verschiedener Puffergemische.

Da wir in der Literatur keine vergleichenden Untersuchungen über die Abhängigkeit der Phosphatase-Aktivität von der Art des Puffers finden konnten, prüften wir orientierungshalber die meisten der von früheren Autoren für diesen Zweck empfohlenen Puffergemische. Die dabei erhaltenen Resultate sind in Fig. 2 und 3 dargestellt. Es ist daraus deutlich zu ersehen, wie sehr der Verlauf und das Optimum der p_H -Aktivitätskurve von der Art des Mediums abhängt, wie wichtig folglich die Untersuchung dieses Versuchsfaktors ist.

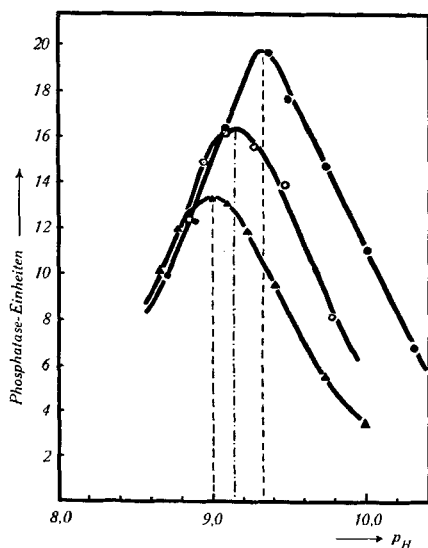


Fig. 2.

- a) ● Veronal-Na/HCl resp. NaOH $\sim 0,02$ m.
 b) ○ Veronal-Na + Carbonat/HCl $\sim 0,05$ m.
 c) ▲ Soda/Hydrogencarbonat $\sim 0,1$ m.

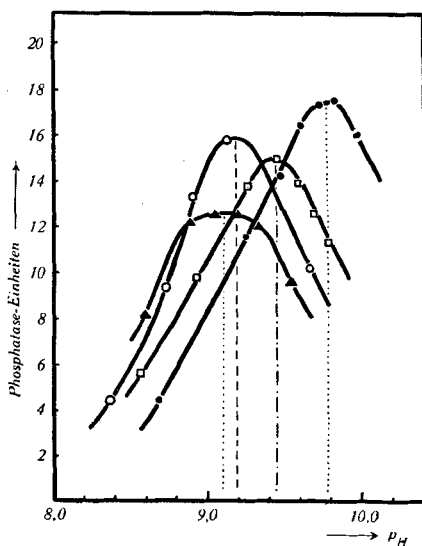


Fig. 3.

- d) ○ Veronal-Na + Carbonat/HCl $\sim 0,05$ m.
 e) □ Glykokoll/NaOH $\sim 0,1$ m.
 f) ● NH_3/NH_4Cl $\sim 0,05$ -n.
 g) ▲ Borsäure/NaOH $\sim 0,05$ -n.

Fig. 2 und 3: Verlauf der p_H -Wirkungskurven von Nierenphosphatase (Ratte) in verschiedenen Puffergemischen. 12,5 mg fein suspendiertes Frischgewebe pro Ansatz. Substrat 0,5% ($\approx 0,016$ molar) Na- β -Glycerophosphat. Inkubation 30 Minuten bei 37° C. Alle p_H -Bestimmungen mittels Glaselektrode bei 20° C (p_H -Meter der Cambridge Instrument Co.).

Diese Versuche bestätigen die hemmende Wirkung des Borat- und des Glykokollpuffers auf die Phosphatase-Aktivität, andererseits zeigen die Phosphatase- p_H -Wirkungskurven in dem von King und Delory¹⁾ empfohlenen Carbonat-Hydrogencarbonat-Puffer (c) und in dem Veronal-Na-Carbonat/HCl-Puffer (b) eine Beziehung zu jener in Veronal-Na/HCl bzw. NaOH (a), die eines weiteren Studiums wert scheint.

Noch wesentlicher als die absolute Grösse der Phosphatase-Aktivität ist die genügende Grösse der Pufferungskapazität, die eine gute p_H -Konstanz während des

¹⁾ Biochem. J. **39**, 245 (1945).

Versuches garantiert. Während sich dies beim Arbeiten mit Serum zum Beispiel nach der verfeinerten Technik von *Shinowara et al.*¹⁾ selbst mit dem nur schwach puffernden 0,02 m. Veronal-Na/HCl bzw. NaOH gut erzielen lässt, stiessen wir bei der Übertragung dieser Methodik auf Gewebephosphatase — wie dies *Marsh* und *Drabkin* getan haben — bezüglich Konstanthaltung des p_H auf Schwierigkeiten. Selbst bei Einhaltung aller Kautelen zur Verhinderung des störenden Einflusses der CO_2 der Luft, beobachteten wir eine — nach unserem Dafürhalten — erhebliche Änderung des p_H während des Versuches, die wir neben der Phosphatabspaltung vor allem der Glykolyse und der CO_2 -Produktion des Gewebes zuschreiben. Tabelle 2 gibt Aufschluss über die Pufferungskapazität und die während der Versuche beobachteten p_H -Änderungen bei den verschiedenen Puffergemischen.

Tabelle 2.

Veronal-Carbonat/HCl-Puffer nach <i>King</i> u. <i>Delory</i> (ca. 0,05 m.)			Veronal-Na/NaOH resp. HCl nach <i>Bodansky</i> (ca. 0,02 m.)		
p_H 20° C	Puffer- kapazität $\pi =$	Bereich der im Versuch beobach- teten p_H -Änderung	p_H 20° C	Puffer- kapazität $\pi =$	Bereich der im Versuch beobach- teten p_H -Änderung
9,9	0,28	0,01—0,09	9,9	0,0016	0,16—0,36
9,6	0,25	0,01—0,06	9,6	0,0010	0,10—0,33
9,3	0,19	0 —0,04	9,3	0,0016	0,07—0,28
9,0	0,16	0 —0,05	9,0	0,0038	0,04—0,15
8,8	0,17	0 —0,05	8,8	0,0083	0,01—0,15
8,6	0,24	0,01—0,06	8,6	0,015	0,01—0,10
8,4	0,29	0,01—0,05	8,4	0,015	0,03—0,05

Auf Grund dieser Resultate geben wir dem Veronal-Na-Carbonat/HCl-Puffer den Vorzug. Wir sind zur Verwendung dieses Puffers übergegangen, weil er dank seinem guten Pufferungsvermögen ($\pi \sim 0,2$) über den Bereich von 7,2 bis 10,8 eine befriedigende Konstanz der Wasserstoffkonzentration während des Versuches von $\pm 0,03$ garantiert. Sein grosser Bereich ist ein weiterer Vorteil, der bei der Verfolgung von p_H -Wirkungskurven angenehm ist.

4. Ausführung der Bestimmung der Phosphatase-Aktivität, z. B. der Niere (Ratte).

Dem durch Kopfschlag getöteten Tier werden die Nieren entnommen; von diesen wird das anhaftende Bindegewebe und Fett abpräpariert und Blut mit Wasser abgespült. Das mit Filtrierpapier sorgfältig abgetrocknete Organ wird gewogen. Es genügt schon eine Niere, wobei das andere Organ für einen andern Zweck verwendet werden kann (z. B. Trockengewichtsbestimmung); bei gesunden Tieren haben wir keine signifikanten Seitenunterschiede (rechts und links) gefunden. Die Niere(n) wird nun in einem kleinen eisgekühlten Mörser mit ca. derselben Menge Quarzsand²⁾ zu einem homogenen Brei gut verrieben und mit der zehnfachen Menge dest. Wasser versetzt, unter Abzug der dem Organgewicht entsprechenden Anzahl cm^3 Flüssigkeit (z. B. eine Niere $G = 0,875$ g wird versetzt mit $8,75 - 0,88 = 7,87 \sim 7,9$ cm^3 aq. dest.). Nach nochmaligem Verreiben und gutem Vermischen wird die Gewebssuspension zur Beseitigung des Quarzsandes und eventuell größerer Bindegewebspartikel 20 Sekunden zentrifugiert und die überstehende homogene Suspension in ein kleines Gefäss abgegossen. Diese konzentrierte Suspension (Verdünnung 1:10, 1 cm^3 entsprechend 100 mg Frischgewebe) wird erst unmittelbar vor

¹⁾ J. Biol. Chem. **142**, 921 (1942).

²⁾ Quarzsand pro analysi; mit Säure gereinigt und geglüht.

dem Zusetzen zur Substrat-Puffer-Lösung ein zweites Mal 1:8 verdünnt, und zwar direkt mit der gleichen wie im Versuch verwendeten Pufferlösung (ohne Substratzusatz), in unserem Falle Veronal-Na-Carbonat/HCl-Puffer von $p_H = 9,2$. Dadurch wird einerseits bewirkt, dass eine Aktivitätsabnahme bereits vor dem Versuchsbeginn, womit bei einem p_H über 9 gerechnet werden muss, nach Möglichkeit vermieden wird. Andererseits lässt sich durch dieses Vorgehen die beträchtliche Eigenpufferung der Enzymsuspension ausgleichen, ohne dass dadurch die Pufferungskapazität der Substrat-Puffer-Lösung in Anspruch genommen würde.

1 cm³ der verdünnten Suspension (1 cm³ = 12,5 mg Frischgewebe) wird nun zu 9 cm³ der auf 37° C vorgewärmten Substrat-Puffer-Lösung pipettiert, vorsichtig gemischt und das Reagensglas (150 × 24 mm) mit einem Stopfen verschlossen. Nach genau 30 Minuten wird die Reaktion durch Zugabe von 5 cm³ 10-proz. Trichloressigsäure unterbrochen und die Probe in Eiswasser gestellt. Nach fünf Minuten wird durch ein Faltenfilter filtriert und im Filtrat unter Verwendung von 1–2 cm³ das vorhandene Phosphat nach der Methode von A. Bodansky¹⁾ bestimmt. Zur Bestimmung des Blindwertes werden 5 cm³ 10-proz. Trichloressigsäure unmittelbar nach Zufügen von 1 cm³ Enzymlösung zur Substrat-Puffer-Lösung gegeben und diese nach Filtration wie die Phosphataseproben weiterbehandelt.

Um bezüglich p_H -Einstellung und Konstanz während des Versuches sicher zu sein, beschränken wir uns nicht nur auf eine genaue Einstellung der Substrat-Puffer-Lösung vor dem Versuch, sondern messen in einer mit dem Versuch parallel laufenden, unter genau gleichen Bedingungen gehaltenen p_H -Kontrolle (1 cm³ Enzym + 9 cm³ Substrat-Puffer-Lösung) das p_H zu Beginn und am Ende des Versuches. Sämtliche p_H -Bestimmungen werden bei 20° C vorgenommen. Eine Anzahl solcher Kontrollresultate, wie wir sie bei der Ausführung von p_H -Wirkungskurven gemessen haben, sind in der Tabelle 2 verwertet worden.

Zur Herstellung der Substrat-Puffer-Lösung sind erforderlich: 0,1-n. Sodalösung (10,60 g Na₂CO₃ sicc./1 Liter aq. dest. CO₂-frei), 0,1-n. Veronal-Na-Lösung (20,6 g/1 Liter aq. dest. CO₂-frei), 0,1-n. HCl, Na(β)-Glycerophosphat (*Eastman-Kodak*, pro analysi).

Der fertige Puffer von gewünschtem p_H wird erhalten, indem man zu einem aus gleichen Teilen Soda- und Veronal-Na-Lösung bestehenden Gemisch (z. B. 20 cm³) eine bestimmte Menge 0,1-n. HCl, die sich aus der leicht auszuführenden Titrationskurve oder aus Tabellen²⁾ ablesen lässt, zufügt und nach Zugabe von 4 cm³ einer frisch zubereiteten 5-proz. Na-Glycerophosphat-Lösung mit aq. dest. auf 40 cm³ auffüllt. Die so erhaltene Substrat-Puffer-Lösung enthält 0,5% Na-Glycerophosphat und reicht zur Durchführung einer Doppelbestimmung + p_H -Kontrolle + Blindwert. Da man bei routinemässiger Durchführung viele Bestimmungen gleichzeitig durchführen wird, stellt man sich ein entsprechendes Vielfaches der Substrat-Puffer-Lösung, jedoch immer frisch, her.

Tabelle 3.

Herstellung der Veronal-Na-Carbonat/HCl-Puffergemische.

Zu je 10 cm³ 0,1-n. Soda — 0,1-n. Veronal-Na-Gemisch zuzusetzende Anzahl cm³ 0,1-n. HCl; mit CO₂-freiem dest. Wasser auf 20 cm³ auffüllen. T = 20° C.

p_H	cm ³ 0,1-n. HCl	p_H	cm ³ 0,1-n. HCl
9,8	3,3	9,0	4,8
9,6	3,8	8,8	5,2
9,4	4,2	8,6	5,5
9,2	4,5	8,4	6,0

¹⁾ J. Biol. Chem. **99**, 197 (1932).

²⁾ Enzymologia **8**, 278 (1940).

Diese Werte gelten als Anhaltspunkte für die Grobeinstellung. Die Feineinstellung erfolgt im fertigen Substrat-Puffer-Gemisch mittels p_H -Meter durch tropfenweise Zugabe von 0,1-n. HCl bzw. NaOH. Soll z. B. das Substrat-Puffer-Gemisch auf das zur Bestimmung der alkalischen Phosphatase bei p_H -Optimum meist verwendete $p_H = 9,2$ gebracht werden, so sind z. B. pro 10 cm³ Soda-Veronal-Na-Gemisch 4,5 cm³ 0,1-n. HCl zuzufügen. Die jeweilige Steigung der Titrationskurve, die als direktes Mass für die Pufferkapazität (π) beim betreffenden p_H genommen werden kann, zeigt um p_H 9,0 einen Sattel, bei welchem π ein Minimum von 0,15 erreicht, während π in der Nähe der beiden benachbarten p_K Werte von 0,25–0,28 aufweist; es besteht indessen im ganzen Bereich eine gute Pufferungskapazität.

Die Bestimmung des als anorganisches Phosphat vorliegenden Phosphors in Blindwerten und Phosphataseproben erfolgt nach der Methode von *Bodansky*, Modifikation *Hawk*¹⁾, beruhend auf der Bildung von Phosphormolybdänsäure bzw. Reduktion derselben durch Zinn(II)-chlorid zu Molybdänblau. Dem abweichenden Verhalten des blauen Farbtons vom *Beer-Lambert*'schen Gesetz sowie der hemmenden Wirkung der Trichloressigsäure und des Na-Glycerophosphats tragen wir Rechnung, indem wir — analog den Korrekturtabellen von *A. Bodansky* (loc. cit.) für die colorimetrische Bestimmung — für unsere Bestimmung mit dem Stufenphotometer (0,5-cm-Cuvette; Filter S 61) für jede verwendete Filtratverdünnung eine besondere Eichkurve erstellt haben; zuerst eine solche zur Phosphor-Bestimmung im unverdünnten Filtrat für die Blindversuche. Da sich hier wegen der relativ grossen Konzentration von Trichloressigsäure (5 cm³ 10% Trichloressigsäure + 10 cm³ Ansatz \rightarrow 15 cm³ zu 3,3%) und Na-Glycerophosphat (9 cm³ zu 0,5% \rightarrow 15 cm³ zu 0,3%) die Hemmung am stärksten auswirkt, zeigt diese Kurve den flachsten Verlauf. Die Eichkurve für die Verwendung von 1 cm³ Filtrat (+ 5 cm³ H₂O) zeigt wegen der 1:6 erfolgten Verdünnung der Analysenflüssigkeit nur noch eine geringe Abweichung vom Verlauf der mit aq. dest. erhaltenen Kurve. Da wir die Phosphor-Bestimmungsmethode von *A. Bodansky* sonst unverändert übernommen haben, verzichten wir auf eine detaillierte Wiedergabe.

Die Berechnung der beobachteten Phosphatase-Aktivität erfolgt in der Weise, dass der pro Ansatz während des Versuches abgespaltene Phosphor auf 1 g Frischgewebe umgerechnet wird. Nach Abzug des Blindwertes kann das Ergebnis bei einer Versuchsdauer von 30 Minuten durch Multiplikation mit einem Konversions-Faktor — gegeben durch den Verlauf der Zeit-Umsatz-Kurve unter diesen Reaktionsbedingungen — auf 1 Stunde bezogen werden. Dieser Faktor wurde im Mittel zu $1/0,63 = 1,59$ gefunden, bei einer Streuung von 1/0,62–1/0,65.

Beispiel: In 1 cm³ Filtrat werden 12,8 γ Phosphor gefunden. In dem nach Zufügen von 5 cm³ Trichloressigsäure 15 cm³ messenden Ansatz waren somit $15 \times 12,8 \gamma$ Phosphor = 0,192 mg Phosphor als anorganisches Phosphat vorhanden. Bei der üblichen Enzym-Verdünnung von 1:800 (Endkonz.) wurde diese Menge von 12,5 mg Frischgewebe abgespalten. Auf 1 g Gewebe bezogen, erhält man daher $80 \times 0,192 \text{ mg} = 15,35$; 15,3 mg Phosphor, abzüglich Blindwert von 0,5 mg Phosphor/1 g Gewebe = 14,8 mg Phosphor. Zur Umrechnung auf 1 Stunde multipliziert man nun den für 30 Minuten gefundenen Wert von 14,8 mit dem Konversionsfaktor 1,59. Resultat = 23,5 Phosphatase-Einheiten pro 1 g Nierengewebe. Bei direkter Zugrundelegung des 30 min.-Versuches: Resultat = 14,8 Phosphatase-Einheiten.

5. Vergleichsdaten und beobachtete Normalwerte.

Um die Möglichkeit zu haben bei verschiedenem p_H , sonst aber unter gleichen Bedingungen ausgeführte Phosphatase-Bestimmungen miteinander vergleichen zu können, haben wir die p_H -Aktivitätskurve der Nierenphosphatase (Ratte) bezüglich Verlauf und Optimum bei 16 Tieren verfolgt. Es handelt sich um 3 Gruppen von Tieren verschiedener Herkunft, deren Resultate gesondert aufgeführt sind.

¹⁾ *Hawk-Bergheim*, Practical Physiological Chemistry, Philadelphia 1937 (S. 465).

Tabelle 4.

Verlauf der p_H -Wirkungskurve der Nierenphosphatase (Ratte) in Veronal-Na-Carbonat HCl-Puffer; $t = 30$ Minuten, Aktivität beim p_H -Optimum = 100%.

	Zahl der Tiere	p_H Optimum	relative Aktivität bei $p_H =$			
			8,5	9,0	9,5	10,0
A	7 ♂	9,13	52,3%	96,2%	78,2%	34,2%
B	3 ♂	9,20	45,2%	89,3%	79,3%	37,0%
C	6 ♀	9,18	42,5%	91,3%	78,0%	33,6%

Beim Vergleich der Phosphatase-Aktivität desselben Organs in verschiedenen Puffergemischen ergeben sich folgende Quotienten zwischen den beim jeweiligen p_H -Optimum gemessenen Aktivitäten:

Tabelle 5.

Vergleich der Phosphatase-Aktivität desselben Gewebes in verschiedenen Puffern bei optimalem p_H .

Art des Puffers	p_H -Optimum	Aktivität in Veronal-Na- Na_2CO_3 /HCl-Puffer bei p_H 9,2 = 1,0
Carbonat-Hydrogen-carbonat, 0,1 m. (<i>King</i> und <i>Delory</i>)	9,05 (9,0—9,1)	0,82
Veronal-Na/HCl resp. NaOH 0,02 m. (<i>A. Bodansky</i>)	9,3 (9,24—9,39)	1,16 (1,11—1,21)

Über die Streuung der Werte bei der Bestimmung der Phosphatase-Aktivität an einheitlichem Tiermaterial sowie über die mit Ratten verschiedenen Alters und Herkunft erhaltenen Durchschnittswerte gibt Tabelle 6 Aufschluss.

Tabelle 6.

Mittelwerte und Streuung bei Tiermaterial verschiedener Herkunft. Die im 30 Min.-Versuch erhaltenen Phosphatase-Einheiten sind zur besseren Ermöglichung von Vergleichen auf 1 Stunde umgerechnet worden.

Tiermaterial (Ratten)	Anzahl der Tiere	Körpergewicht	Gewicht der Nieren	Phosphatase-Aktivität ($p_H = 9,2$)		
				Streuung	Mittelwert	$\sqrt{\frac{\sum \alpha^2}{n(n-1)}}$
♂ Zucht V.Ba.	8	120—140 g	0,77—0,95 g	23,8—30,7	26,7	$\pm 0,88$
♂ Zucht W.Be.	3	150 g	0,93—1,04 g	23,6—24,2	23,9	$\pm 0,18$
♀ Zucht W.Be.	7	120—180 g	0,88—1,44 g	18,9—25,4	21,7	$\pm 0,80$
♂♀ Zucht M.Be.	5	95—110 g	0,83—0,93 g	25,6—34,2	29,5	$\pm 1,54$

Diskussion.

Die oben mitgeteilten Resultate sprechen dafür, dass die von uns angewandte Technik der Organverarbeitung und die Methode

von *Marsh* und *Drabkin* gleiche Werte ergeben, ebenso — aber weniger ausgeprägt — das Verfahren von *Kay*; hier fällt indessen die schwankende, im Durchschnitt etwas geringere Ausbeute auf. Hiefür sind wohl nicht nur die wechselnde Herauslösbarkeit des Enzyms, sondern auch die variierende Menge der bei der Autolyse gebildeten Eiweissabbauprodukte verantwortlich zu machen.

Es soll nun noch auf die Frage eingegangen werden, ob die vergleichenden Phosphatase-Bestimmungen mit oder ohne Zusatz von besonderen Aktivatoren ausgeführt werden sollen. Manche Autoren (z. B. *O. Bodansky*¹⁾) setzen zur Aktivierung Magnesiumsalze oder auch Aminosäuren zu und messen dann die sog. „voll aktivierte“ Phosphatase. Man kann natürlich, ohne sich bei der Wahl der Reaktionsbedingungen auch bezüglich Definition der Einheit irgendwie festlegen zu müssen, ohne weiteres beides tun. Immerhin ist dazu zu bemerken, dass heute eine ganze Reihe von Aktivatoren bekannt sind, von denen allerdings Magnesium der bekannteste und bestuntersuchte ist, doch steht diesem bezüglich aktivierender Wirkung z. B. das Mangano-ion in keiner Weise nach (*Bamann* und *Heumüller*²⁾). Es ist eine ganz willkürlich zu entscheidende Frage, welchen und wie viel dieser Aktivatoren man zusetzen will. Diese Tendenz ist nun in keiner Weise geeignet, das Streben nach Vereinfachung und besserer Übersehbarkeit der Versuchsbedingungen zu unterstützen. Wird kein Aktivator zugesetzt — wie in unserem Fall — so wird andererseits diejenige Phosphatase-Aktivität gemessen, die bei derjenigen Konzentration und denjenigen gegenseitigen Mengenverhältnissen an aktivierend oder hemmend wirkenden Begleitstoffen resultiert, wie diese im Organ tatsächlich vorhanden sind.

Diese Frage ist bei der Verwendung von nichtdialysierten und nichtgereinigten Organauszügen oder Suspensionen mehr von prinzipieller als von praktischer Bedeutung, weil hier die durchschnittliche Differenz ohne und mit optimalem Zusatz von Magnesiumsalzen nur relativ gering ist, nach eigenen Untersuchungen ca. 20—30% (vgl. die Werte von *Jenner* und *Kay*³⁾ + 14%; *Köhler*⁴⁾ 0 bis + 5%; *Bawkin* und *O. Bodansky*⁵⁾ + 12—25%); ebenso schwankt der Prozentsatz der Aktivierung nur wenig. Angesichts dieser Tatsachen erscheint uns die von *Bawkin* und *O. Bodansky*⁶⁾ gemachte Feststellung, wonach die Nichtbeachtung der jeweiligen Magnesiumkonzentration ebenso schlimm sei wie die Nichtbeachtung des p_H , als zu extrem. Wir möchten dieser Feststellung entgegenhalten, dass

¹⁾ J. Biol. Chem. **118**, 341 (1937).

²⁾ Naturwiss. **28**, 535 (1940).

³⁾ J. Biol. Chem. **93**, 733 (1931).

⁴⁾ Z. physiol. Ch. **223**, 98 (1933).

⁵⁾ J. Biol. Chem. **101**, 641 (1933).

⁶⁾ J. Biol. Chem. **101**, 654 (1933).

dem Erfordernis einer genauen und konstant bleibenden p_H -Einstellung bisher oft nicht diejenige Beachtung geschenkt worden ist, die sie verdient. Es besagen zudem in ihrem Endeffekt beide Verfahren ohne und mit Magnesium-Aktivierung gleich viel; sie erlauben beide die Feststellung von Differenzen zwischen verschiedene Phosphatase-Aktivitäten aufweisenden Gewebeproben. Beide vermögen aber die Frage nicht zu entscheiden, ob der beobachtete Unterschied auf einem ungleichen Gehalt an reinem Enzym beruht oder auf verschiedenen Mengen von begleitenden Aktivatoren oder Hemmkörpern.

Trotz sehr weit gediehenen Reinigungsversuchen ist die Reindarstellung von Phosphatase u. W. bis heute noch nicht gelungen. Die oben angegebenen Werte sind somit alle scheinbare Phosphatase-Einheiten, wobei wir uns von den vielen Vorschlägen, die heute dafür existieren, die einfache und für praktische Arbeiten geeignete Definition von *A. Bodansky* zu eigen gemacht haben, ohne auf dieses Problem zunächst einzugehen.

Beim Betrachten der vielen in der Literatur existierenden Angaben über die durchschnittliche Phosphatase-Aktivität von Geweben und deren p_H -Optimum¹⁾ fällt die relativ grosse Diskrepanz der beobachteten Werte auf. Abgesehen von der unterschiedlichen Organverarbeitung, der Wahl der Reaktionsbedingungen, spielt hier, wie gezeigt worden ist, die Art des Puffergemisches eine nicht geringe Rolle. Bei der Angabe des p_H -Optimums im besonderen ist — abgesehen von der Temperatur²⁾, bei welcher gemessen wurde — vor allem die Art des Substrates zu berücksichtigen, indem sich bei zunehmender Säurenatur des mit dem Phosphat veresterten Alkohols bzw. Phenols das p_H -Optimum nach der alkalischen Seite verschiebt. Wir haben nun diesen Untersuchungen über die Abhängigkeit des p_H -Optimums vom Substrat, die wir vor allem *Roche*³⁾ sowie *King* und *Delory*⁴⁾ verdanken, diejenige der Abhängigkeit vom puffernden Milieu zur Seite gestellt. Die oben gegebenen Kurven ermöglichen den Vergleich zwischen Resultaten, die bei Inkubation in verschiedenen Puffergemischen erhalten worden sind, allerdings nur dann, wenn alle andern Versuchsbedingungen übereinstimmen.

Da angesichts des steilen und spitzen Verlaufs der p_H -Wirkungskurve der alkalischen Gewebephosphatase eine genaue und während des Versuches konstant bleibende p_H -Einstellung gefordert werden muss, haben wir die in Serienversuchen erlaubte Toleranzbreite recht

¹⁾ Siehe Zusammenstellung in *Oppenheimer*, die Fermente und ihre Wirkungen; Supplement I, 1936, Den Haag (S. 138—139).

²⁾ Temperaturkoeffizient: 0,007 p_H -Einheiten/Grad C z. B. bei p_H 9,2.

³⁾ *Biochem. J.* **25**, 1724 (1931).

⁴⁾ *Biochem. J.* **33**, 1185 (1939).

eng bemessen; die Differenz vor und nach der Inkubation darf 0,06 p_H -Einheiten nicht übersteigen; die Einstellung des Substrat-Puffer-Gemisches erfolgt auf $\pm 0,03$ genau. *Shinowara* et al. (loc. cit.) geben für ihre Methode $\pm 0,15$ an. Dies mag beim Serum angehen, da dessen p_H -Aktivitätskurve nach den Daten obiger Autoren einen flacheren Verlauf zeigt; in diesem Falle darf aber ein solches Vorgehen nicht ohne weiteres auf Gewebe übertragen werden, wie es *Marsh* und *Drabkin* getan haben. Innerhalb welcher Grenzen sich ihre beobachtete Konstanz des p_H während des Versuches bewegt, ist uns nicht bekannt. Dass es in der Tat schwierig ist, mit einem Puffer von geringerer Kapazität (z. B. 0,025-m. Veronal-Na) genau beim p_H -Optimum zu messen, geht aus dem Vorgehen von *O. Bodansky*¹⁾ hervor, der 4 verschiedene Proben bei nur wenig differierendem p_H in der Nähe des Optimums gleichzeitig untersucht. Diese Schwierigkeiten treten nun gerade dann zutage, wenn ein Puffer von geringer Kapazität verwendet wird. Bei dem sehr oft verwendeten Veronal-Na (0,02—0,025 molar) liegen die Verhältnisse besonders ungünstig, weil dessen Pufferungsvermögen gerade in der Nähe des p_H -Optimums der Phosphatase ($p_H = 9,3$) ein Minimum zeigt (bei $p_H 9,6 \pi = 0,001$); die Anwendung von wesentlich konzentrierteren Veronal-Na-Lösungen wird indessen, wegen ihrer hemmenden Wirkung, von manchen Autoren gemieden. Bei dem von *King* und *Delory*²⁾ empfohlenen Carbonat-Hydrogencarbonat-Puffer liegen die Verhältnisse analog, indem das p_H -Optimum der Nierenphosphatase ($p_H = 9,05$) gerade in den Bereich zu liegen kommt, für den die Autoren den Puffer nicht mehr empfehlen können (unter $p_H = 9,2$).

Auf Grund der von uns bei der Verwendung der verschiedenen Puffer gemachten Erfahrungen geben wir dem unseres Wissens erstmals von *King* und *Delory*³⁾ verwendeten Veronal-Na-Carbonat/HCl-Puffer wegen seines guten Pufferungsvermögens, seines breiten Anwendungsbereiches und seiner einfachen Handhabung den Vorzug. Dass die im optimalen Bereich und im alkalischen Teil der Kurve resultierende Aktivität etwas geringer ist, verglichen mit derjenigen in 0,02-m. Veronal-Na-Lösung, schreiben wir der Wirkung der Carbonat-Hydrogencarbonat-Ionen zu. Wir nehmen diese geringe, prozentual konstante Aktivitätsverminderung beim Veronal-Na-Carbonat-HCl-Puffer um so lieber in Kauf, als beim Arbeiten mit diesem Puffer die störende Wirkung des CO_2 der Luft kaum ins Gewicht fällt. Im übrigen soll dieser hierbei beobachtete Effekt in weiteren Untersuchungen verfolgt werden.

¹⁾ J. Biol. Chem. **174**, 465 (1948).

²⁾ Biochem. J. **39**, 245 (1945).

³⁾ Biochem. J. **33**, 1185 (1939).

Zusammenfassung.

1. Es wird ein Verfahren zur Messung der Phosphatase-Aktivität von Geweben beschrieben, zu deren Bestimmung eine mit Pufferlösung stark verdünnte (bei der Rattenniere z. B. 1:80), feine Gewebssuspension verwendet wird.

2. Es werden die Reaktionsbedingungen bezüglich zuzusetzender Enzymmenge und Art des Puffers untersucht, wobei besonders auf die Abhängigkeit des p_H -Optimums und die Grösse der dabei beobachteten Aktivität von der Art des Puffers hingewiesen wird. Es muss zur Erzielung vergleichbarer Werte die zu untersuchende Enzymmenge unbedingt konstant gehalten werden.

3. Der Forderung nach guter Pufferungskapazität bzw. p_H -Konstanz während des Versuches wird durch Verwendung des von *King* und *Delory* empfohlenen Veronal-Na-Carbonat/HCl-Puffers Rechnung getragen.

4. Auf Grund vergleichender Untersuchungen ergibt sich, dass das von *Kay* angewandte Verfahren (Bestimmung im filtrierten, wässrigen Auszug nach 24 oder 48 Stunden Extraktion) sowie die von *Marsh* und *Drabkin* empfohlene Technik (Bestimmung im Homogenat) ungefähr dieselben Resultate wie die beschriebene Methode zeitigen.

Herrn Prof. *I. Abelin*, der mich zur Ausführung dieser Arbeit veranlasst hat, möchte ich an dieser Stelle für seine Anregungen und seinen Rat herzlich danken.

Bern, Medizinisch-chemisches Institut der Universität,
August 1948.

235. Der Einfluss enteral und parenteral verabreichter Glucose auf den Alaningehalt des Blutes.

von **O. Wiss** und **R. Krueger**.

(3. IX. 48.)

Aus den Arbeiten von *Van Slyke*¹⁾ ist bekannt, dass durch Verabreichung von Eiweiss der Gesamtaminosäuregehalt des Blutes, als Aminostickstoff gemessen, erhöht wird. In einer früheren Arbeit²⁾ wurde festgestellt, dass der Gehalt freier Aminosäuren im Blute von Ratten sich durch die Ernährung beeinflussen lässt. Es wurde dort untersucht, wie die einzelnen Aminosäuren durch verschiedene Kostformen beeinflusst werden, indem das Verhalten einer Anzahl

¹⁾ *D. D. Van Slyke* und *G. M. Meyer*, *J. Biol. Chem.* **16**, 197 (1913).

²⁾ *O. Wiss*, *Helv. physiol. acta* **6**, C 35 (1948).