

4. Die Dissoziationskonstante K_s der Enzym-Substratverbindung bei der gereinigten Nieren-Phosphatase hängt vom p_H und von der Pufferlösung ab. K_s ist unterhalb $p_H = 9,0$ klein und steigt nach der alkalischen Seite stark an. Bei gleichem p_H ist K_s in NH_3/NH_4Cl kleiner und in Veronal-Na-Soda/HCl grösser als in Veronal-Na/HCl.

5. Die Variabilität von K_s erklärt die hier bestätigte Verschiebung des p_H -Optimums nach dem Neutralpunkt zu bei abnehmender Substratkonzentration.

6. Die Analyse der p_H -Aktivitätskurve, betrachtet als Ampholyt-Dissoziationsrestkurve, ergibt für die Säure- und Basen-Dissoziationskonstante, welche den Verlauf bestimmen, näherungsweise folgende Werte:

Nieren-phosphatase gereinigt: $p_{K_a} = 9,33—9,42$, $p_{K_b} = 8,99—9,07$. Serumphosphatase $p_{K_a} = 9,56—9,62$, $p_{K_b} = 9,03—9,08$ (in Veronal-Na-Soda/HCl). Der von obiger Annahme abweichende, asymmetrische experimentelle Kurvenverlauf wird auf Grund der Variabilität von K_s zu deuten versucht.

Herrn Prof. *I. Abelin*, der diese Untersuchungen mit Ratschlägen und Wohlwollen gefördert hat, sei an dieser Stelle herzlich gedankt. Herrn Prof. *W. Wilbrandt* schulde ich Dank für Rat und Kritik, insbesondere für die bereitwillige Überlassung der auf Seite 2278 wiedergegebenen Ableitung.

Bern, Medizinisch-chemisches Institut der Universität.

294. Nachweis der Citrullinbildung in Mitochondriensuspensionen und Gewebsschnitten aus Leber durch Papierchromatographie¹⁾

von **A. F. Müller** und **F. Leuthardt**.

(23. IX. 49.)

Im Verlaufe unserer Untersuchungen über die biologische Citrullinsynthese²⁾ versuchten wir, das Citrullin auch mittels der Papierchromatographie nachzuweisen³⁾. Wir hielten uns dabei vor allem an die Angaben von *C. E. Dent*⁴⁾. Wir verwendeten eine mit Wasser gesättigte Phenollösung. Es zeigte sich aber, dass auch ziemlich beträchtliche Citrullinmengen auf dem Chromatogramm nicht in Erscheinung treten. In Versuchen mit Mitochondriensuspensionen, in

¹⁾ Diese Arbeit wurde mit Hilfe der *Fritz Hoffmann-La Roche-Stiftung zur Förderung wissenschaftlicher Arbeitsgemeinschaften in der Schweiz* ausgeführt, der wir für ihre Unterstützung den besten Dank aussprechen.

²⁾ *F. Leuthardt* und *A. F. Müller*, *Exper.* **4**, 478 (1948); *F. Leuthardt*, *A. F. Müller* und *H. Nielsen*, *Helv.* **32**, 744 (1949).

³⁾ *R. Conden*, *A. H. Gordon* und *A. J. P. Martin*, *Biochem. J.* **38**, 224 (1944).

⁴⁾ *C. E. Dent*, *Biochem. J.* **43**, 169 (1948).

denen besonders viel Citrullin in der Versuchslösung angehäuft wird, ist es uns aber dennoch gelungen, das Citrullin eindeutig auf dem Chromatogramm nachzuweisen. Die genauere Untersuchung zeigte, dass das Citrullin bei der Papierchromatographie mit Phenol und besonders bei Gegenwart von Elektrolyten derart verändert wird, dass es mit Ninhydrin nicht mehr reagiert. Der aus dem Citrullin entstehende Körper (oder eines der Reaktionsprodukte) gibt aber noch die Reaktion mit dem *Ehrlich'schen* Aldehydreagens (p-Dimethyl-aminobenzaldehyd)¹⁾. Wir konstatierten in unseren Versuchen ebenfalls die bereits bekannte Tatsache, dass bei Gegenwart von Salzen die Abgrenzung der Ninhydrinflecken schlechter ist und dass Tendenz zur Bildung langgezogener Schlieren („tailing“) besteht.

Weiter versuchten wir, das Citrullin nachzuweisen (ohne Ninhydrinbehandlung), indem wir aus Blindchromatogrammen die dem Citrullin entsprechende Stelle ausschneiden, das Phenol aus den Papierstreifen durch 10-stündige kontinuierliche Extraktion mit Benzol entfernten, das Citrullin durch Wasser in Lösung brachten und anschliessend die Bestimmung mit dem Diacetylmonoxim (Methode von *Gornall* und *Hunter*²⁾, modifiziert von *Archibald*³⁾) ausführten. Es gelang uns nicht, die dem Citrullin entsprechende typische rosarote Farbe zu erhalten, sondern unsere Lösung war gelb, was möglicherweise auf der Gegenwart von Spuren von Phenol oder einem Reaktionsprodukt des Citrullins beruht, das mit dem Diacetylmonoxim nicht mehr die typische rosarote, sondern eine gelbe Färbung gibt, wie z. B. der Harnstoff. Ob es sich tatsächlich um Harnstoff handelt, der im Verlaufe des Chromatographierens aus dem Citrullin entstanden sein könnte, ist nicht leicht zu entscheiden, da Harnstoff denselben R_f -Wert wie Citrullin besitzt.

Auf der Suche nach anderen Lösungsmitteln fanden wir, dass mit Wasser gesättigte iso-Buttersäure Citrullin, Ornithin und Glutaminsäure genügend trennt, und dass in diesem Lösungsmittel Citrullin auch bei Gegenwart von Elektrolyten nicht zerstört wird. Die Flecken werden aber in salzhaltigen Lösungen so stark in die Länge gezogen („tailing“), dass eine eindeutige Trennung auch nicht mehr möglich ist.

Angeregt durch eine Diskussion mit Dr. *Gornall* haben wir kürzlich diese Versuche wieder aufgenommen und versucht, auch die kleinen Citrullinmengen chromatographisch nachzuweisen, die bei Versuchen mit Gewebsschnitten in die Suspensionsflüssigkeit diffundieren. Wir gingen dazu über, vorgängig der Chromatographie die Elektrolyte durch Elektrodialyse aus der Lösung zu entfernen. Citrullin bleibt als amphotere Substanz in der Mittelkammer, wenn

¹⁾ *C. E. Dent*, *Biochem. J.* **43**, 169 (1948).

²⁾ *A. G. Gornall* und *A. Hunter*, *Biochem. J.* **35**, 650 (1941).

³⁾ *R. M. Archibald*, *J. Biol. Chem.* **156**, 121 (1944).

die Dimensionen des Anoden- und Kathodenraumes geeignet gewählt werden.

Man kann auf diese Weise tatsächlich die Salze so weit entfernen, dass sich auch kleine Mengen Citrullin sowohl im iso-Buttersäure- wie auch im Phenol-chromatogramm noch nachweisen lassen. Es ist uns mit dieser Methode gelungen, das Citrullin in Versuchen mit Gewebsschnitten eindeutig im Chromatogramm zur Darstellung zu bringen.

Figur 1 und 2 zeigen zwei typische Chromatogramme. Man erkennt in Figur 1 neben dem Citrullin leicht das im Überschuss zugeetzte Ornithin. Man erhält die gleichen Bilder, wenn man statt der Ureidoglutarsäure die Glutaminsäure verwendet.

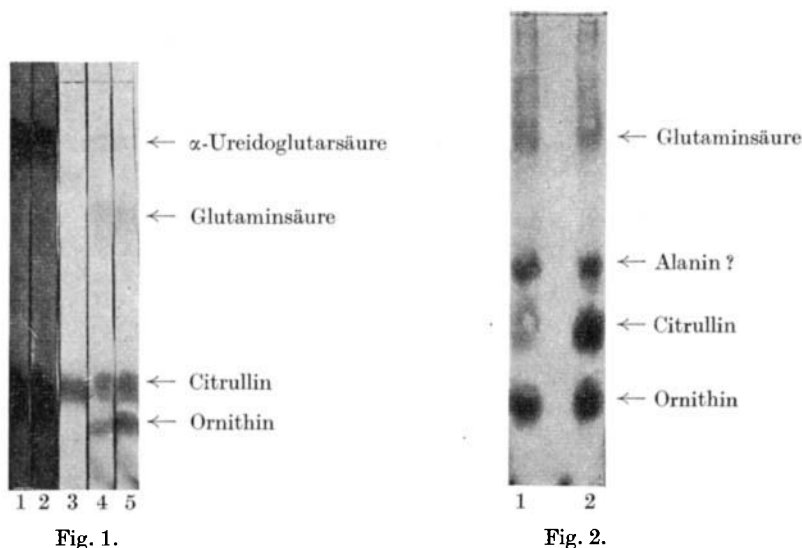


Fig. 1. Citrullinbildung in den Mitochondrien. Ornithin 0,0067-m., NH_3 0,067-m., α -Ureidoglutarsäure 0,013-m., Phosphatpuffer p_{H} 7,0, 0,02-m., Magnesiumsulfat 0,0067-m., A.T.P. 0,00033-m., Hydrogencarbonat 0,013-m. Ansätze 1 und 4 enthalten ausserdem noch Glutaminsäure 0,00033-m., Kaliumchlorid bis zur Isotonie. Mitochondriensuspension 3 mg N pro Ansatz (3 cm^3). Gasatmosphäre 95% O_2 und 5% CO_2 . Versuchsdauer 30 Minuten. Die colorimetrische Citrullinbestimmung ergab einen Wert von 13 μm pro Ansatz. Lösungen wie im Text angegeben mit Alkohol enteiwesst und mit Chloroform entmisch. 1 und 2: Chromatogramm mit Phenol. Reaktion mit p-Dimethylaminobenzaldehyd (Gelbfärbung). 3: Kontrollchromatogramm mit Citrullinlösung. 4 und 5: Reaktion mit Ninhydrin.

Fig. 2. Citrullinbildung in Gewebsschnitten. Ornithin 0,0067-m., NH_3 0,0667-m., Natriumpyruvat 0,27-m., Hydrogencarbonatmilieu nach Krebs¹). Gesamtvolumen 3 cm^3 . (Im ganzen 8 parallele Ansätze.) Gasatmosphäre 95% O_2 und 5% CO_2 . Versuchsdauer 90 Minuten. Die colorimetrische Citrullinbestimmung ergab einen Wert von 1 μm pro Ansatz. Alle Ansätze wurden nach der Inkubation vermischt, die Lösung wie im Text angegeben mit Alkohol enteiwesst und mit Chloroform entmisch, die wässrige Phase neutralisiert, im Vakuum eingengt und dann elektrodialysiert. 1: Chromatogramm mit Phenol.

2: Chromatogramm der gleichen Lösung mit Zusatz von Citrullin.

¹) H. A. Krebs und K. Henseleit, Z. physiol. Ch. 210, 33 (1932).

Bei den Versuchen mit Gewebsschnitten treten im Chromatogramm verschiedene Flecken auf, welche die Identifizierung des Citrullins erschweren. Teilweise handelt es sich um Substanzen, die im Gewebe präformiert sind, teilweise um solche, die während der Inkubation der Schnitte entstehen. Wir haben sie im einzelnen nicht identifiziert. In den meisten Chromatogrammen ist Glutaminsäure erkennbar, die, sofern sie nicht im Gewebe vorgebildet ist, aus dem zugesetzten Pyruvat entstehen kann¹). Sie verbleibt bei der Elektrodialyse in der Mittelkammer, sofern die Reaktion im Anodenraum genügend sauer gehalten wird. Bei dem in Figur 2 über dem Citrullin erkennbaren Flecken handelt es sich wahrscheinlich um Alanin, das leicht aus dem zugesetzten Pyruvat entstehen kann.

Experimenteller Teil.

Methodik.

Tiermaterial. Mit Fleisch ernährte Albinoratten im Gewicht von 100—180 g. Die Tiere wurden in der Verdauungsperiode getötet, weil es sich zeigte, dass unter diesen Bedingungen die höchsten Citrullinwerte erhalten werden.

Gewebsschnitte. Diese wurden freihändig mit dem Rasiermesser hergestellt und pro Ansatz eine Menge von 30—40 mg Trockengewicht verwendet und vor dem Versuch viermal mit der Salzlösung gewaschen. Wir arbeiteten mit dem Hydrogencarbonatpuffer nach Krebs und Henseleit²), sättigten mit Sauerstoff, der 5% CO₂ enthielt und schüttelten die Schnitte während 90 Minuten bei 38°.

Darstellung der Mitochondriensuspension, Milieu, Versuchsdauer. Wir verweisen auf unsere frühere Mitteilung³).

Substanzen. Die meisten verwendeten Produkte wurden von *F. Hoffmann-La Roche*, Basel, bezogen. α -Ureidoglutarsäure wurde aus L(+)-Glutaminsäure und Kaliumcyanat nach bekannten Methoden dargestellt, A.T.P. wurde nach *Needham* unter Berücksichtigung der Angaben von *Le Page* bereit⁴).

Analytische Methoden.

Extraktion der Aminosäuren. Nach den Angaben von *Awapara*⁵) wurde anschliessend an die Inkubation der Ansatz mit dem vierfachen Volumen kaltem Alkohol vermischt, zentrifugiert, dekantiert und das vierfache Volumen Chloroform zugegeben. Die überstehende wässrige Phase, welche die Aminosäuren enthält, wurde abpipettiert, durch Eindampfen konzentriert und dann eine kleine Menge (ca. 30—40 mm³) zur Chromatographie auf den Papierstreifen aufgetragen. In den Versuchen mit Gewebsschnitten wurde die abpipettierte wässrige Lösung zur Entfernung der Elektrolyte der Elektrodialyse unterworfen und dann konzentriert.

Chromatographie. Wir hielten uns im grossen und ganzen an die Angaben von *Dent*⁶). Es wurde eine mit Wasser gesättigte Phenollösung verwendet. Das Standgefäss enthielt in einer separaten Schale eine NaCN-Lösung und vor Beginn wurden 4 Tropfen

¹) *H. Fahrländer, H. Nielsen und F. Leuthardt*, *Helv.* **31**, 957 (1948).

²) *H. A. Krebs und K. Henseleit*, *Z. physiol. Ch.* **210**, 33 (1932).

³) *F. Leuthardt und A. F. Müller*, *Exper.* **4**, 478 (1948); *F. Leuthardt, A. F. Müller, und H. Nielsen*, *Helv.* **32**, 744 (1949).

⁴) *G. A. Le Page* in *W. W. Umbreit, R. H. Burris und J. F. Stauffer*, *Manometric techniques and related methods*. Burgess Publ. Comp., Minneapolis 1945.

⁵) *J. Awapara*, *Arch. Biochem.* **19**, 173 (1948).

⁶) *C. E. Dent*, *Biochem. J.* **43**, 169 (1948).

konzentrierten Ammoniaks den Wänden des Gefäßes entlang laufen gelassen. Wir arbeiteten mit *Whatman*-Papier Nr. 1 bei Zimmertemperatur und liessen im allgemeinen die Streifen zur Trennung der Aminosäuren während 12–14 Stunden in der Phenollösung. In anderen Versuchen verwendeten wir mit Wasser gesättigte iso-Buttersäure. Hier ist in vermehrtem Masse darauf zu achten, dass die Atmosphäre immer gut mit dem Lösungsmittelgemisch gesättigt ist. Als Reagens zum Nachweis der Aminosäuren bedienten wir uns einer 0,1-proz. Ninhydrinlösung in iso-Propylalkohol, zum Nachweis der Harnstoffgruppe des Citrullins ausserdem einer 5-proz. Lösung von p-Dimethylaminobenzaldehyd in normaler HCl¹⁾.

Elektrodialyse. Die Dimensionen des verwendeten einfachen Dialyseapparates sind aus Figur 3 ersichtlich. Er ist von dem von *Consdens* und Mitarbeitern beschriebenen Apparat etwas verschieden²⁾. Die drei Kammern waren durch Cellophanmembranen gegeneinander abgeschlossen. Der Kathodenraum enthielt zur Fixierung der Kationen etwas Quecksilber. Zu Beginn wurde die Flüssigkeit im Anodenraum öfters durch destilliertes Wasser ersetzt, wobei darauf geachtet wurde, dass die Reaktion genügend sauer blieb. Neuerdings sind wir dazu übergegangen, den Anodenraum kontinuierlich mit n/5000 HCl zu durchströmen. Im Verlauf der Dialyse wurde die angelegte Spannung bis auf 40 Volt erhöht.

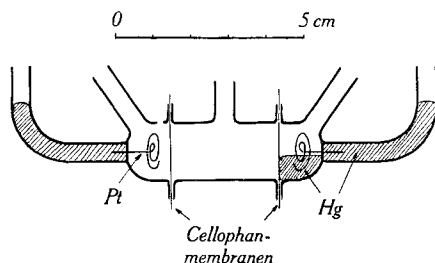


Fig. 3.
Elektrodialyseapparat.

Citrullinbestimmung. Ein aliquoter Teil des Ansatzes wurde nach der Inkubation mit einem gleichen Teil 10-proz. Trichloressigsäure enteiwesst, zentrifugiert und im Überstehenden das Citrullin nach der Methode von *Gornall* und *Hunter*³⁾, Modifikation von *Archibald*⁴⁾, bestimmt.

Schlussfolgerungen und Zusammenfassung.

Suspensionen von Lebermitochondrien oder Gewebsschnitte aus Leber bilden bei Gegenwart der notwendigen Substrate eine Substanz, die bei der Papierchromatographie den gleichen R_f -Wert zeigt wie Citrullin. Diese Substanz gibt mit Ninhydrin die Reaktion der α -Aminosäuren und färbt sich (bei genügender Konzentration) mit p-Dimethylaminobenzaldehyd gelb. Soweit die Papierchromatographie die Identifizierung von Aminosäuren gestattet, müssen wir daher annehmen, dass es sich tatsächlich um Citrullin handelt.

¹⁾ *C. E. Dent*, *Biochem. J.* **43**, 169 (1948).

²⁾ *R. Consdens*, *A. H. Gordon* und *A. J. P. Martin*, *Biochem. J.* **41**, 590 (1947).

³⁾ *A. G. Gornall* und *A. Hunter*, *Biochem. J.* **35**, 650 (1941).

⁴⁾ *R. M. Archibald*, *J. Biol. Chem.* **156**, 121 (1944).

Der Nachweis durch Papierechromatographie ist sicher spezifischer als die Farbreaktion von *Fearon* (mit Diacetylmonoxim), auf der die Bestimmung von *Gornall* und *Hunter* beruht. Alle bisherigen Untersuchungen über die Citrullinsynthese basieren auf dieser Methode. Unsere Befunde bestätigen und sichern daher die Annahme, dass die farbgebende Substanz, welche in Gewebsschnitten, im Homogenat oder in isolierten Mitochondrien der Leber gebildet wird, Citrullin ist.

Es ist allerdings denkbar, dass in der intakten Zelle das Citrullin nicht in freier Form auftritt, sondern als labile Verbindung (z. B. mit Phosphat), die sofort weiterreagiert. Doch müsste eine derartige Verbindung sehr unbeständig sein, so dass sie bei der Aufarbeitung leicht in freies Citrullin übergeht.

Zürich, Physiologisch-chemisches Institut der Universität.

295. Zur Kenntnis des β -Zinkhydroxyds

von **W. Feitknecht**.

(4. X. 49.)

Bei geeigneter Herstellung und geeignetem Auswaschen des amorphen Zinkhydroxyds wandelt sich dieses in die β -Modifikation¹⁾ um. Es wurde seinerzeit darauf hingewiesen, dass die Ausbildungsform verschieden ist, je nachdem, ob die Umwandlung in neutralem oder alkalischem Milieu erfolgt. Im erstern Fall erhält man federartige Aggregationsformen, entstanden durch Zusammenlagerung dünner rhombischer Plättchen, im letztern erkennt man unter dem Mikroskop unregelmässig ovale oder rundliche Plättchen, die seinerzeit als Somatoide aufgefasst wurden. Die Röntgendiagramme zeigten vielfach nur bei den intensiven Linien mit kleinem Ablenkwinkel Übereinstimmung, während bei den schwächern Reflexen unter Umständen beträchtliche Abweichungen zu beobachten waren. β -Zinkhydroxyd tritt auch als Reaktionsprodukt bei der Korrosion von Zink in Natriumchloridlösung auf²⁾.

Vor einiger Zeit haben *Fricke* und *Meyring*³⁾ die Bildungswärme von zwei in neutralem Milieu gewonnenen Formen von β -Zinkhydroxyd mit derjenigen einiger anderer Zinkhydroxydmodifikationen verglichen.

¹⁾ *W. Feitknecht*, *Helv.* **13**, 314 (1930).

²⁾ *F. Aebi*, *Diss.* Bern 1946; *W. Feitknecht*, *Métaux et Corrosion* **23**, 192 (1947).

³⁾ *R. Fricke* und *K. Meyring*, *Z. anorg. Ch.* **230**, 357 (1937).