

Die hier beobachteten Effekte sind jedenfalls viel geringer als die von *Gulland* und Mitarbeitern beobachteten und legen den Schluss nahe, dass bei den hohen Konzentrationen Änderungen der Teilchen-Wechselwirkung eine Hauptrolle spielen, und dass auf eine starke Depolymerisation nicht geschlossen werden darf.

Herrn Prof. *Ch. Sadron* und Herrn Prof. *R. Signer* sei auch an dieser Stelle für das grosse Interesse gedankt, das sie dieser Arbeit entgegenbrachten.

Zusammenfassung.

Es werden die Viskositäten sehr verdünnter Natrium-thymonucleinatlösungen in Abhängigkeit des Gradienten bei p_H 6,60 und p_H 3,70 gemessen. Beim Übergang von p_H 6,60 zu p_H 3,70 erfolgt eine Viskositätsabnahme um ca. 10–30%, wobei die Gradientenabhängigkeit der Viskosität erhalten bleibt. Starke Depolymerisation scheint als Erklärung für die Viskositätsabnahme nicht in Frage zu kommen.

Strasbourg, Centre d'Etudes de Physique Macromoléculaire.

326. Über Phosphatasen I.

Apparat zur Bestimmung von anorganischem Phosphat

von **E. A. Zeller.**

(20. X. 49.)

Reduzierende Agentien führen Molybdat in einen blauen Farbstoff über, ein Vorgang, der durch anorganisches Phosphat beschleunigt wird. Diese Reaktion, die die Grundlage für die klassischen kolorimetrischen Phosphat-Bestimmungsmethoden bildet, wird durch zahlreiche Stoffe gestört, die entweder dem zu untersuchenden biologischen Material entstammen oder zum Studium von Fermentreaktionen dem System zugesetzt worden sind.

Ein Weg, um Verbindungen letzterer Art unschädlich zu machen, wurde durch *I. Berenblum* und *E. Chain* gewiesen: Diese Autoren führen Phosphat und Molybdat aus verdünnter Schwefelsäure in Isobutanol über und reduzieren das Molybdat mit Stannochlorid im gewaschenen Isobutanolextrakt¹⁾. Damit wurden nicht nur interferierende Substanzen ausgeschaltet, sondern das System gegenüber Änderungen in der Konzentration der Reaktionsteilnehmer unabhängiger gemacht. Dieses Prinzip fand wohl deshalb nicht allgemeinere Anwendung, weil seine praktische Ausführungsform für Serienver-

¹⁾ *I. Berenblum* und *E. Chain*, *Biochem. J.* **32**, 295 (1938).

suche weniger gut geeignet ist. Die Ausschüttelungen und Waschungen im Scheidetrichter nehmen viel Zeit und Kraft in Anspruch.

Um diesen hemmenden Umstand zu überwinden, wurde die Extraktion in einem bürettenartigen Gefäss und mit Hilfe eines Gasstromes ausgeführt. Auf diese Weise wird eine gründliche Durchmischung erreicht, ohne dass die Lösung mehr als nur einige Millimeter oberhalb des Flüssigkeitsspiegels an die Gefässwand verspritzt wird. In wenigen Sekunden fliessen daher die Tropfen herunter und tritt eine Entmischung der wässerigen und alkoholischen Phase ein.

Damit war auch die Möglichkeit der Vereinigung mehrerer Extraktionsgefässe (units) zu einem Apparat gegeben, der durch ständigen Gebrauch während über anderthalb Jahren mehr und mehr zu einem routinemässig verwendbaren Instrument entwickelt wurde.

1. Beschreibung des Apparats.

a) Units.

Der Figur 1 können Form und Abmessungen einer „Unit“ entnommen werden. Diese wurden auf Grund mancher Versuche so gewählt, dass eine gute Durchmischung des Inhalts ohne grosses Verspritzen von Flüssigkeitstropfen und eine genügende Ablesegenauigkeit an den (ringförmigen) Marken verbunden werden. Der Glasstopfen wird benötigt, wenn nach Bildung des blauen Farbstoffs die Isobutanolschicht in verdünnter Schwefelsäure gelöst wird (vgl. Abschnitt 3). Von Wichtigkeit für ein richtiges Funktionieren des Apparates ist die Form des eintauchenden Endes des Glasrohres, durch das der Gasstrom geleitet wird. Die Öffnung ist so eng zu halten, dass genügend Gasdruck erhalten bleibt, um eine Durchströmung der Reaktionsflüssigkeit zu bewirken, auch wenn die übrigen, mit der gleichen Gasleitung verbundenen Gaseinleitungsrohre offen, d. h. nicht eingetaucht sind. Bei der Herstellung werden die Glasrohre nur wenig ausgezogen und die Öffnung durch Rundschmelzen bis zu der gewünschten Grösse verkleinert. Auf diese Weise geformte Ausflussöffnungen werden beim Gebrauch nicht so leicht beschädigt. Als Kontrolle für die richtige Ausführung werden der Reihe nach je eine der Kapillaren eingetaucht, wobei sofort eine Durchperlung der in der Unit enthaltenen Flüssigkeit erfolgt.

b) Apparat.

Die Units werden am besten in sogenannte Thermometerklammern gesteckt, die sowohl einen sichern Halt gewähren als auch die Möglichkeit bieten, mit einer Hand diese Gefässe zu befestigen und zu entfernen (Fig. 2). Ein durchbohrter und in eine gewöhnliche Stativklammer eingeklemmter Kork kann ebenfalls als Halter dienen. Oberhalb der Units wird eine entsprechende Serie von Klammern angebracht, in die die Stopfen eingehängt werden können, so dass die Gasleitungsrohre nicht mehr in die Flüssigkeit eintauchen

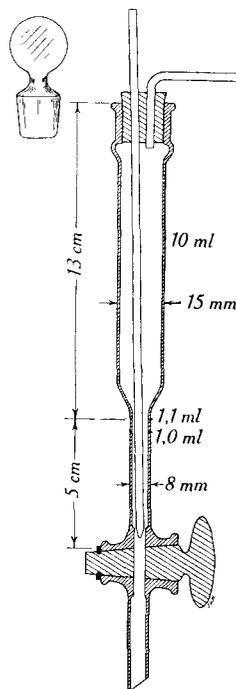


Fig. 1.
Extraktionsgefäss
(„Unit“).
(Beschreibung im Text.)

(Rohrende ungefähr 10 cm oberhalb Spiegel). Unterhalb der Gefässe befindet sich eine Reihe von Trichtern, die die Waschflüssigkeiten aufnehmen. Aus einer zuoberst auf dem Stativ angebrachten Flasche mit destilliertem Wasser werden mit Hilfe von Gummischlauch, Quetschhahn und gebogenem Glasrohr die Units gespült.

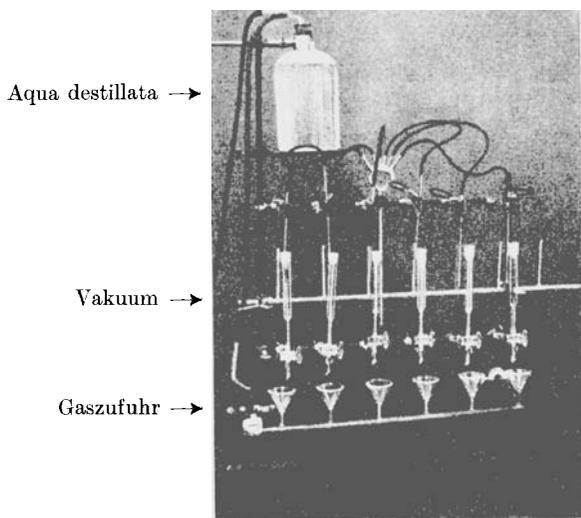


Fig. 2.

Apparat für die Bestimmung von anorganischem Phosphat.
(Beschreibung im Text.)

Bei Verwendung von 6 und mehr Units werden bei andauerndem Gebrauch erhebliche Mengen von Isobutanol verdampft, die zu einer Belästigung des Experimentators führen können. Durch Aufstellen des Apparates in der Nähe eines offenen Fensters oder in einem Abzug wird dieser Nachteil leicht behoben. Das Entweichen des Lösungsmittels in die Atemluft kann erheblich reduziert werden, wenn eine leichte Saugwirkung an die Units angesetzt wird. — Weitere Einzelheiten über den Aufbau des Apparates können der Figur 2 entnommen werden.

c) Zubehör.

Die Reagentien werden (mit Ausnahme von Äthylalkohol) in Reagensgläser eingefüllt und diese in geradwandigen Thermosflaschen (Durchmesser 7 cm, Höhe 21 cm) aufbewahrt, die eisgekühltes Wasser enthalten. Der Grund für diese Massnahme ist ein dreifacher: Einhaltung gleichmässiger Versuchsbedingungen, Schutz säureempfindlicher Phosphorsäure-Ester und Haltbarmachung von unbeständigen Reagentien (verdünnte Stannochlorid-Lösung).

Durchmesser und Form der Pipetten und Abmessung und Füllungsgrad der Reagensgläser werden so gewählt, dass beim Herausheben der Pipetten der Flüssigkeitsspiegel in denselben über der gewünschten Marke steht (Ausnahme: 10-n. H_2SO_4). Auf diese Weise ist ein rasches Pipettieren möglich. Zu dem gleichen Behufe werden die Pipetten für die Abmessung von 1 ml normaler Schwefelsäure aus einem Glasrohr und mit weiter Ausflussöffnung behelfsmässig hergestellt.

d) Reinigung der Units.

Eine Voraussetzung für die Gewinnung zuverlässiger Ergebnisse bildet die gewissenhafte Reinhaltung der Reaktionsgefässe. Unmittelbar nach der Entleerung der Units wer-

den diese dreimal mit aqua destillata gewaschen. Mindestens einmal täglich wird der Waschflüssigkeit einige Tropfen gesättigte Pottaschelösung zugefügt und ein Gasstrom durchgeleitet. Nachher wird mit Wasser gründlich nachgespült. Die Gefässe werden einmal wöchentlich mit Dichromat-Schwefelsäure gereinigt. Auf die Dauer werden die Wände der Units angeätzt. Wenn dieser Prozess weit genug fortgeschritten ist, reagiert das Molybdat mit der Glaswand, was zu Störung der Bestimmung führt. Derartige Units müssen ausgeschaltet werden.

2. Reagentien.

- a) ungefähr 10-n. Schwefelsäure.
- b) n. H_2SO_4 , aus a hergestellt.
- c) 2,5-proz. Ammoniummolybdat. Vorratslösung wird in paraffinierter Flasche aufbewahrt und ein ungefährer Tagesbedarf in das Thermosflaschen-Reagensglas abgefüllt.
- d) Isobutanol.
- e) Stannochlorid: 10 g Stannochlorid werden in 25 ml konzentrierter Salzsäure gelöst und in einer dunkeln Glasstöpselflasche aufbewahrt. Diese Stammlösung wird für den Gebrauch 50fach mit destilliertem Wasser verdünnt. Diese Gebrauchslösung ist 24 Stunden unter den angegebenen Bedingungen haltbar.
- f) (ungefähr) 95-proz. Äthylalkohol.

3. Durchführung einer Bestimmung.

In die Units werden folgende Lösungen einpipettiert:

0,7 ml der auf Phosphat zu untersuchenden Lösung; wenn kleinere Mengen zur Bestimmung gelangen, wird mit aq. dest. (wie die übrigen Flüssigkeiten in Eiswasser gekühlt) auf dieses Volumen aufgefüllt;

0,05 ml 10-n. H_2SO_4 (Endkonzentration 0,5-n.);

0,25 ml Ammoniummolybdat (Endkonzentration 0,63%);

1 ml Isobutanol.

Hierauf wird der Gasstrom eingeschaltet (Luft, Kohlensäure, Stickstoff). Dies geschieht einfach dadurch, dass die Stopfen aufgesetzt werden, da der Gasstrom während der ganzen Zeit, solange der Apparat in Betrieb ist, laufen gelassen wird. Dank der kleinen Austrittsöffnung sind die Gasverluste minim. Dieses Verfahren besitzt neben dem Vorteil, die Gaszufuhr durch Aufsetzen und Entfernen (Aufhängen) des Stopfens ein- und ausschalten zu können, den weiteren Vorteil, dass die Gaszufuhr nur einmal im Verlaufe einer Bestimmungsperiode einreguliert werden muss. Die mit der Stoppuhr¹⁾ kontrollierte Extraktionsdauer beträgt 60 Sekunden. Nach Ausschaltung des Gaseinleitungsrohres wird die wässrige Phase entleert und 1 ml n. Schwefelsäure eingefüllt und während 30 Sekunden der Gasstrom durch das Reaktionsgemisch geführt. Dieser Waschprozess wird, nach Entfernung der Waschflüssigkeit, in genau gleicher Weise wiederholt. Nach diesem Reinigungsschritt wird die wässrige Phase mit besonderer Sorgfalt entfernt; wenn dies für die ganze Reihe der Units durchgeführt worden ist, werden die allenfalls erneut sich abscheidenden wässrigen Tropfen ablaufen gelassen. Schliesslich wird der Isobutanolextrakt mit dem Stannochlorid versetzt und nochmals während 30 Sekunden durchperlt. In dieser Zeit wird die Entwicklung des blauen Farbstoffs vollendet. Das Gaseinleitungsrohr wird aufgehängt, mit ein paar Tropfen n. Schwefelsäure abgespült und schliesslich ganz aus dem Gefäss entfernt (durch Einstecken in die darüber angebrachte Stativklammer). Nach Entfernung der wässrigen Phase wird mit Alkohol zur Marke 1,1 ml und mit n. Schwefelsäure bis zur Marke 10 ml aufgefüllt²⁾. Mit aufgesetztem Glasstopfen wird das Gemisch kräftig geschüttelt und damit Isobutanol und Farbstoff in Lösung gebracht.

¹⁾ Als Stoppuhr wird mit Vorteil ein Instrument verwendet, dessen Zeiger nach einmaligem Stechen auf die Nullmarke springt und sofort wieder zu laufen beginnt.

²⁾ Dieses Auffüllen mit n. Schwefelsäure kann in gleicher Weise wie die Zufuhr des destillierten Wassers erfolgen, d.h. aus einer zuoberst am Stativ angebrachten Flasche (in Fig. 2 nicht dargestellt).

Der Gasstrom ist so zu regulieren, dass eine kräftige Durchmischung erfolgt, anderseits aber die Isobutanol-Verdampfung und die Verspritzung von Flüssigkeit an die Wand des Gefässes minimal bleiben. Wenn die Abmessungen der Units und die Öffnung der Gas-einleitungsrohre nicht gleich gross sind, ist die Verdampfung von Isobutanol in den verschiedenen Gefässen ungleich gross, was nach Entfernung der überschüssigen Stannochloridlösung leicht kontrolliert werden kann. Derartige Unterschiede in der Verdampfungsgeschwindigkeit sind durch Ausprobieren verschiedener Ausflussöffnungen der Gas-einleitungsrohre usw. auszuschalten, weil damit die Gaszufuhr verhältnismässig niedrig gehalten werden kann, was sich auf die Genauigkeit des Verfahrens günstig auswirkt. Bei einiger Übung erfolgen Abtrennung der Waschflüssigkeit, Einfüllen des nächsten Agens und Ingangsetzen des Gasstromes in weniger als 30 Sekunden seit Unterbrechung der Gaszufuhr. Wenn alle 6 Units im Betrieb sind, werden für eine Bestimmung einer entweisssten Lösung 3—4 Minuten benötigt.

Varianten: Das oben geschilderte Verfahren wird angewandt, wenn die optische Messung in den Makro-Küvetten des *Evelyn*'-Photometers erfolgt. Wenn das Stufen-Photometer an dessen Stelle tritt, dann wird mit Äthylalkohol auf die Marke 1 ml aufgefüllt. Dieser Zusatz erfolgt zum Zwecke, um etwaige emulgierte Wassertropfchen in Lösung zu bringen. Das Isobutanol-Äthanol-Gemisch wird als solches für die Messung in die Küvette eingefüllt. Dasselbe gilt, wenn die Mikro-Küvette des *Evelyn*-Apparates verwendet wird. Da aber in diesem Fall mindestens 1 ml Lösung benötigt wird, füllt man bis zur Marke 1,1 ml mit Äthanol auf.

4. Optische Messung.

Die Bestimmung der Extinktion der Farbstofflösung kann unmittelbar nach der Gewinnung derselben erfolgen. Mit dem *Evelyn*'schen Photometer konnte innerhalb der ersten halben Stunde keine sichere Änderung der Extinktion registriert werden.

Evelyn-Photometer (Makro-Küvette, Filter 660): Wenn bei dem im vorangehenden Abschnitt beschriebenen Verfahren an Stelle einer Phosphatlösung destilliertes Wasser verwendet wird, dann sollte der auf diese Weise erhaltene Blindwert bei der photometrischen Bestimmung den Wert von 98 Prozent Durchlässigkeit nicht unterschreiten. Ursprünglich wurde diese Lösung zur Einstellung des Instruments verwendet. Da die Lösung nach 1 bis 2 Stunden sich zu trüben anfängt, wurde sie später einfach durch destilliertes Wasser ersetzt und der damit verbundene kleine Fehler in Kauf genommen.

Eine Standardkurve, die mit diesem Instrument gewonnen wurde, ist in Figur 3 dargestellt. Die Punkte stellen den Mittelwert von vier Einzelbestimmungen dar. Um einen Eindruck über die Streuung der Werte zu vermitteln, werden einige der der Figur 3 zugrunde liegenden Messungen nachstehend angeführt:

1,24 γ P	2,48 γ P	3,72 γ P	4,96 γ P
0,092	0,181	0,260	0,347
92	168	260	347
90	174	252	352
81	179	252	347

Die Zahlen und die Kurve geben auch Auskunft über die Ausdehnung des Bereiches, in dem eine lineare Beziehung zwischen Phosphat-Konzentration und Extinktion besteht. Im übrigen gelten für die erwähnten Instrumente die Vorschriften für den optimalen Messbereich. Bei Berücksichtigung aller dieser Faktoren kann der günstige Konzentrationsbereich als zwischen 2 und 15 γ Phosphat-Phosphor per ml liegend angegeben werden.

Analoge Kurven wurden mit den Mikro-Küvetten des gleichen Apparates, mit dem Zeiss'schen Stufenphotometer (Schichtdicke 1 Millimeter, Filter S 75) und mit dem Coleman-Junior-Photometer (Wellenlänge 700 μ) erhalten.

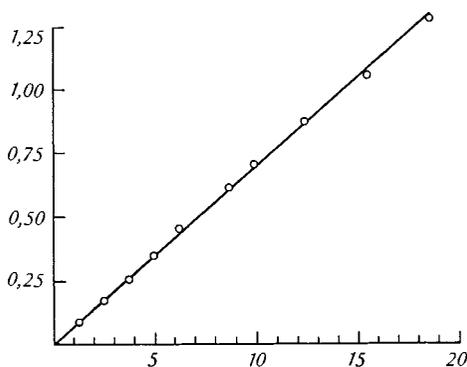


Fig. 3.

Phosphatstandard.

Abszisse: γ Phosphat-P per 0,7 ml. Ordinate: Extinktion (Filter 660 des Evelyn-Photometers).

5. Einfluss von Organextrakten und reduzierenden Agentien.

Nach den Angaben von *I. Berenblum* und *E. Chain*¹⁾ gibt es drei Gruppen von Substanzen, die die Reduktion von Phosphormolybdänsäure beeinflussen:

a) Stoffe, die die Azidität des Mediums verändern, wie Säuren, Laugen, Puffer-substanzen.

b) Stoffe, die mit Molybdänsäure leicht Komplexe bilden, wie Fluoride und Citrate.

c) Stoffe, die an die reduzierende Kraft des Mediums einen Beitrag leisten, wie Nitrite und Hypochlorite.

Diesen Gruppen ist noch eine vierte anzufügen:

d) Gewebsextrakte, Körperflüssigkeiten und andere biologische Materialien, die in nicht genau bekannter Weise auf die Bildung des blauen Farbstoffs aus Phosphormolybdänsäure einwirken²⁾.

Für die ersten drei Gruppen wurde von den erwähnten Autoren gezeigt, dass deren Einfluss durch die Zwischenschaltung der Isobutanolextraktion weitgehend ausgeschaltet werden kann. Es blieb daher noch übrig, das Verhalten der Gruppe d zu untersuchen.

Zu diesem Zwecke wurden homogenisierte Rattenorgane mit einer bekannten Menge Phosphat versetzt und die enteweisste Lösung sowohl mit der „Extraktions“-Methode, so wie sie hier beschrieben wurde, und mit einer „direkten“, möglichst ähnlichen Methode auf ihren Phosphatgehalt geprüft. Die Versuchsdaten und Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengestellt³⁾.

Aus der nachstehenden Tabelle geht hervor, dass die hier beschriebene Methode gegenüber den Gewebsextrakten praktisch unempfindlich ist, während bei der „direkten“ Methode die gefundenen Werte erheblich unter den berechneten liegen, d. h. die Farbstoffbildung aus Phosphormolybdänsäure, verglichen mit den Kontrollen, durch die erwähnten Gewebsextrakte gehemmt wird.

¹⁾ L. c.

²⁾ *O. H. Lowry* und *J. A. Lopez*, *J. Biol. Chem.* **162**, 421 (1946).

³⁾ In ähnlichen Versuchen wurden für Rattenleber, -gehirn und Menschenserum Abweichungen von 0%, +1%, +5% (Extraktionsmethode) resp. –27%, –35%, –15% (direkte Methode) gefunden.

Tabelle 1.

Einfluss von Gewebsextrakten auf die „direkte“ und auf die „Extraktions“-Phosphatbestimmung.

Ansatz: 1,5 ml homogenisierte Rattenorgane (Leber und Muskel mit der zehnfachen, Hirn mit der zwanzigfachen Menge physiologischer Kochsalzlösung verdünnt); 1,5 ml 2-millim. KH_2PO_4 resp. aq. dest.; 3,0 ml 26-proz. Trichloressigsäure; 1,0 aq. dest.

Von der abzentrifugierten Lösung werden 0,4 bis 0,7 ml für die „Extraktions“-Methode verwendet.

Für die „direkte“ Methode wurde folgender Ansatz verwendet: 0,2 ml der zentrifugierten Lösung; 2,8 ml aq. dest.; 3,0 n. Schwefelsäure; 2,0 ml Ammoniummolybdat-Reagens (1 Volumen 5-proz. Ammoniummolybdat + 1 Volumen 10-n. Schwefelsäure + 2 Volumen aq. dest.); 2,0 ml 0,3-proz. Stannochlorid.

Beide Lösungen wurden im *Evelyn*-Photometer (Makro-Küvette) gemessen. Die angegebenen Zahlen stellen die Extinktion dar und bilden den Mittelwert von je drei Bestimmungen.

Organ	„Extraktions“-Methode				„direkte“ Methode			
	Extr. allein	Extr. + P berechn.	Extr. + P gefund.	Abweichung	Extr. allein	Extr. + P berechn.	Extr. + P gefund.	Abweichung
Leber. . . .	0,228	0,606	0,655	+ 8%	0,285	0,652	0,461	- 29%
Muskel . . .	348	725	755	+ 4%	283	650	447	- 31%
Gehirn . . .	274	651	651	+ 6%	210	577	417	- 28%
P-Standard .	377				367			

In ähnlicher Weise wurde nachgewiesen, dass Menschenserum und Schlangengifte die Bildung des blauen Farbstoffs nicht stören, wenn die Isobutanol-Extraktion dazwischengeschaltet wird.

In den nachfolgenden Mitteilungen dieser Publikationsreihe wird über Versuche berichtet werden, in denen mehrere zur Gruppe c gehörende Stoffe den Fermentlösungen zugesetzt werden. Es wurde deshalb geprüft, ob diese Substanzen die Bestimmung von anorganischem Phosphat in irgendeiner Weise zu ändern vermögen, wenn die Isobutanol-Extraktion dazwischengeschaltet wird.

Schwefelwasserstoff führt augenblicklich zu einer intensiven Farbstoffbildung. Wenn aber die Konzentration des Schwefelwasserstoffs vorgängig der Bestimmung mittels eines Luftstromes stark herabgesetzt wird, kann die Bestimmung ohne Störung durchgeführt werden. Kaliumcyanid (1 milli-m.) ist ohne Einfluss. Die Wirkung von Ascorbinsäure, Semicarbazid-hydrochlorid, Hydroxylamin-hydrochlorid und Cystein wurde mit drei verschiedenen Phosphatkonzentrationen (1,2 γ , 2,4 γ , 6,2 γ Phosphat-P. pro 0,7 ml) geprüft. Es gelangten ferner drei Konzentrationen der Zusätze zur Anwendung; für die drei ersten Agentien 0,05-m., 0,067-m. und 0,08-m. Lösungen, für Cystein zehnfach geringere Konzentrationen. Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf die fertigen in die Units pipettierten Lösungen. Mit Ausnahme der höchsten Ascorbinsäure- und Phosphatkonzentration, mit denen ein um 10 Prozent zu hoher Wert erhalten wurde, liess sich in allen diesen Versuchen kein signifikanter Unterschied gegenüber den Kontrollen erkennen.

Diskussion der Ergebnisse.

Die Reduktion von Molybdänsäure in Gegenwart von Phosphat wird durch zahlreiche Stoffe, die in Gewebsextrakten vorkommen oder die einem Fermentsystem zugesetzt werden, beeinflusst. Selbst kleine Änderungen der Konzentration der Reaktionsteilnehmer, des ent-

eiweissenden Agens, der Pufferlösung usw. machen sich geltend. Es muss deshalb für jede neue Versuchssituation ein neuer Standard bestimmt werden. Doch selbst dann sind die ermittelten Phosphatgehalte eines Organextraktes oft ungenau (vgl. Tabelle 1).

Durch Extraktion der Phosphormolybdänsäure mit Isobutanol und durch Waschen des Extrakts gelingt es, viele störende Substanzen zu entfernen, wie die Arbeiten von *I. Berenblum* und *E. Chain*¹⁾ und die hier beschriebenen Ergebnisse darlegen. Wie später gezeigt werden wird, kann selbst bei weitgehenden Änderungen der Zusammensetzung der zu untersuchenden Lösung stets dieselbe Standardkurve verwendet werden. Die zu einem Routineverfahren entwickelte Isobutanol-Extraktions-Methode eignet sich deshalb besonders zur Bestimmung von enzymatisch freigesetztem Phosphat.

Es wurden damit u.a. folgende Untersuchungen durchgeführt: Charakterisierung einer neuen Adenosintriphosphatase in Schlangengiften²⁾, Einfluss von Histamin und Adrenalin³⁾ und von Malariaheilmitteln⁴⁾ auf Adenosintriphosphatasen, Studium des enzymatischen Abbaues von Cozymase und Dihydrocozymase durch Schlangengifte, ein Vorgang, der in zwei Stufen erfolgt, wobei Phosphorsäure in der zweiten Reaktionsstufe frei wird⁵⁾.

Zusammenfassung.

1. Es wird ein Routineverfahren zur Bestimmung von enzymatisch freigesetztem Phosphat beschrieben, dessen Ausführung nach Enteiweissung 3–4 Minuten benötigt.

2. Extrakte von Rattenleber, -gehirn und -muskel, die bei andern Methoden sich störend bemerkbar machen, üben keinen Einfluss auf die vorliegende Bestimmung aus. Dasselbe gilt für Kaliumcyanid, Cystein, Ascorbinsäure, Hydroxylamin und Semicarbazid.

Ich danke Fräulein *June Ann Scanlan* für die zuverlässige Hilfe bei der Durchführung der Versuche und Herrn *Harry Nunamaker* für die verständnisvolle Ausführung der gläserischen Arbeiten.

Department of Biochemistry, Mayo Foundation,
Rochester (Minnesota), und Pathologisch-anatomische Anstalt
der Universität Basel.

¹⁾ *I. Berenblum* und *E. Chain*, *Biochem. J.* **32**, 286 (1938).

²⁾ *E. A. Zeller*, *Exper.* **4**, 194 (1948); *Am. J. Physiol.* **155**, 480 (1948).

³⁾ *E. A. Zeller*, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* **69**, 450 (1948).

⁴⁾ *E. A. Zeller*, *Federation Proc.* **8**, 267 (1949).

⁵⁾ *E. A. Zeller* und *D. P. Epperson*, unpublizierte Versuche.