

zweite Methode, von der vielfach Gebrauch gemacht wurde, besteht darin, die löslichen Kohlenhydrate durch Hefen vergären zu lassen. Als Mass für die Menge vorhandener Zucker kann dabei entweder das entwickelte Volumen Kohlendioxyd oder der Unterschied des Reduktionswertes der Lösung vor und nach Vergärung genommen werden. Zur Unterscheidung verschiedener Zucker wird von der Beobachtung Gebrauch gemacht, dass bestimmte Hefearten selektiv nur einzelne Zucker oder diese mit verschiedener Geschwindigkeit vergären. Angesichts der zahlreichen Fehlermöglichkeiten, die auch hier bestehen, ist es nicht verwunderlich, dass man zwischen den Werten, die durch Vergärung ermittelt wurden, und den massanalytisch bestimmten meist grosse Unterschiede erhielt. Dazu kommt nun noch als weitere Schwierigkeit bei den auf dem Reduktionsvermögen der Hexosen beruhenden Verfahren, dass häufig verschiedene Resultate gefunden werden, je nach dem verwendeten Oxydationsmittel. Kupfersulfat in alkalischer Lösung und Ferricyanid, welche bisher am meisten gebraucht wurden, haben ein merklich verschiedenes Oxydationsvermögen. Dementsprechend erfassen die Ferricyanid-Methoden bedeutend mehr reduzierende nichtzuckerartige Stoffe als die Kupferreduktionsmethoden. Wir konnten das an Extrakten aus gekeimten Erbsen feststellen, aber auch bei der klinisch so wichtigen Blutzuckerbestimmung zeigte es sich, dass 2—4mal mehr Ferricyanid reduziert werden kann als Kupfer¹). Da eine alkalische Kupfersulfatlösung imstande ist, unter bestimmten Bedingungen Hexosen quantitativ zu oxydieren, ist es klar, dass die zusätzliche Reduktion von Ferricyanid nicht durch reduzierende Zucker verursacht sein kann. Aus diesem Grunde werden für Zuckerbestimmungen in natürlichen Flüssigkeiten meist die Kupferreduktionsmethoden vorgezogen. Wie lässt sich nun aber kontrollieren, ob die Reduktion von Cu^{++} in solchen Fällen tatsächlich nur auf dem Vorhandensein von Zuckern beruht? Die Frage ist nicht leicht zu beantworten, und es gibt nur wenige Arbeiten, bei denen versucht wurde, dieses Problem zu lösen. Die Methode von *van der Plank*²) zur Kontrolle des Vorhandenseins von reduzierenden nichtzuckerartigen Substanzen stützt sich darauf, dass unter gewissen Bedingungen Hypojodit von den Hexosen nur Aldosen zu oxydieren vermag, während Ketosen nicht angegriffen werden. Die Differenz der Kupfer-Reduktionswerte vor und nach Oxydation mit Hypojodit müsste also theoretisch dem Verbrauch an Hypojodit entsprechen. Da dieses und Cu^{++} in alkalischer Lösung selber verschieden stark oxydieren, ist zu erwarten, dass eine Übereinstimmung nur erzielt werden kann, wenn keine fremden zusätzlichen reduzierenden Substanzen im Extrakt oder in dessen Reinigungsprodukt vorhanden sind. Durch eine sorgfältige Reinigung der von ihm untersuchten Extrakte von Mangoldblättern (Fällung der Eiweisse und anderer störender Stoffe durch basisches Bleiacetat, Entbleiung mit Phosphat) konnte *van der Plank* eine gute Übereinstimmung erzielen. Abgesehen davon, dass sich auch bei einer solchen Kontrolle noch Möglichkeiten für die Erfassung fremder Substanzen finden, nämlich dann, wenn diese gleiches oder ähnliches Reduktionsvermögen wie die Zucker (die ja selbst verschieden stark reduzieren!) besitzen, wachsen die Schwierigkeiten enorm, wenn es sich darum handelt, nicht nur etwa Glucose, sondern ein Gemisch von verschiedenen Hexosen und Disacchariden in einem Extrakt zu analysieren. Diese Aufgabe blieb im Grunde trotz ihrer grossen Bedeutung für die Physiologie ungelöst bis zur Ausarbeitung brauchbarer Methoden der qualitativen und quantitativen Papierchromatographie von Zuckern³⁾⁴⁾⁵).

Wir haben die Papierchromatographie von Zuckern in ausgedehntem Masse für Untersuchungen über den Kohlehydrattransport in Pflanzen und andere Stoffwechselprobleme benutzt und dabei Gelegenheit gehabt, die früher auch von uns angewandten massanalytischen Methoden auf ihre Zuverlässigkeit bezüglich der Erfassung

1) *M. Somogyi & H. V. Kramer*, *J. Biol. Chem.* **80**, 733 (1928).

2) *J. E. van der Plank*, *Biochem. J.* **30**, 457 (1936).

3) *S. M. Partridge*, *Biochem. J.* **42**, 238 (1948).

4) *A. E. Flood, E. L. Hirst & J. K. N. Jones*, *Soc.* **1948**, 1679.

5) *M. A. Jermyn & F. A. Isherwood*, *Biochem. J.* **44**, 402 (1949).

fremder Stoffe zu prüfen. Im Hinblick darauf, dass diese Methoden noch viel gebraucht werden, halten wir es für gerechtfertigt, unsere Vergleichsresultate an dieser Stelle zu veröffentlichen.

2. An einem Extrakt aus angekeimten Erbsensamen wurden folgende Bestimmungen durchgeführt:

a) Titration der reduzierenden Zucker nach *Hagedorn-Jensen*¹⁾ (Ferricyanid-Reduktionsmethode);

b) Titration und kolorimetrische Bestimmung der reduzierenden Zucker nach *Somogyi*²⁾ und *Nelson*³⁾;

c) Bestimmung der nichtreduzierenden Zucker im hydrolysierten Extrakt nach a) und b);

d) papierchromatographische Trennung der Zucker und Bestimmung derselben nach *Somogyi-Nelson*.

Die Resultate waren sehr aufschlussreich. Die papierchromatographische Analyse ergab qualitativ das Vorhandensein von Glucose, Fructose, Rohrzucker und einer gegenüber diesen drei Zuckern sehr kleinen Menge von Oligosacchariden, die nicht näher bestimmt wurden. Bezeichnet man die papierchromatographisch ermittelte Menge an Hexosen (Glucose und Fructose zusammen) mit 100%, so wird mit der Kupfer-Reduktionsmethode im Extrakt 144%, mit der Ferricyanidmethode 355% reduzierender Zucker, berechnet als Glucose gefunden! Auch die Rohrzuckerbestimmung ergibt nach beiden Verfahren zu hohe Werte (etwa 150%), was offenbar auf die Hydrolyse von andern Substanzen zurückzuführen ist, die bei der Spaltung reduzierenden Zucker oder andere reduzierende Stoffe liefern. Es zeigt sich somit, dass hier nicht nur die Ferricyanid-Methode grob verfälschte Resultate liefert, sondern es wird auch mehr Cu^{++} reduziert, als der vorhandenen Menge Hexosen entsprechen würde. Die Differenzen zwischen dem wirklichen, papierchromatographisch ermittelten und dem durch die klassischen Reduktionsmethoden erhaltenen Zuckergehalt sind bei diesem Erbsenextrakt besonders gross. An Extrakten aus Kartoffeln z. B. haben wir geringere Unterschiede gefunden. Da deren Grösse aber nicht vorausgesehen werden kann, erscheint es nach unsern Erfahrungen unumgänglich, alle Zuckeranalysen in biologischen Flüssigkeiten zum mindesten chromatographisch zu kontrollieren. Sobald mehr als ein Zucker vorliegt, kommt eine andere Bestimmungsmethode, sowohl in bezug auf Zuverlässigkeit wie Arbeitsaufwand, nicht in Frage. Es liesse sich bei der papierchromatographischen Methode höchstens noch der Einwand erheben, auch hier könnten möglicherweise noch andere reduzierende Substanzen als Zucker erfasst werden. Durch Variation des Lösungsmittels kann aber einwandfrei bewiesen werden,

¹⁾ H. C. Hagedorn & B. N. Jensen, *Bioch. Z.* **135**, 46 (1923).

²⁾ M. Somogyi, *J. Biol. Chem.* **160**, 62 (1945).

³⁾ N. Nelson, *J. Biol. Chem.* **153**, 375 (1944).

dass das nicht der Fall ist. Eine andere, ebenso wirksame und einfache Kontrolle lässt sich dadurch erzielen, dass zum Extrakt eine bekannte Menge eines in diesem nicht vorhandenen Zuckers zugegeben wird.

Experimenteller Teil.

500 grüne Auskernerbsen „Express“ mit einem Lufttrockengewicht von 93,25 g wurden 65 Std. bei 23° eingequollen. Die Extraktion der löslichen Zucker geschah unter gleichzeitigem Zerkleinern im Turmix mit 150 ml heissem Äthylalkohol (70-proz.), unter Zusatz von etwas Magnesiumcarbonat zur Neutralisation von Säuren. Die Flüssigkeit wurde hydraulisch abgepresst und mit 70-proz. Alkohol auf 200 ml gebracht. In Aliquoten des entsprechend verdünnten Extraktes erfolgte die Bestimmung reduzierender „Zucker“ als „Glucose“ durch Titration nach *Hagedorn-Jensen*¹⁾ und nach *Somogyi*²⁾. In einem weiteren Aliquot wurden wieder mit dem Reagens von *Somogyi*²⁾ die reduzierenden Zucker kolorimetrisch ermittelt (*Nelson*³⁾). Wie zu erwarten, ergaben die beiden letzteren Methoden praktisch das gleiche Resultat (158 bzw. 160 mg „Glucose“). Nichtreduzierender Zucker (qualitativ papierchromatographisch: nur Rohrzucker) wurde als Zunahme des Reduktionsvermögens nach Hydrolyse mit 1-n. HCl (30 Min. bei 100°) bestimmt. Für die quantitative papierchromatographische Analyse versetzten wir entsprechend dem Vorschlag von *Flood, Hirst & Jones*⁴⁾ ein Aliquot des Extraktes mit einem in diesem nicht vorhandenen Zucker. Im vorliegenden Fall lösten wir 125 mg Arabinose auf 25 ml Extrakt, so dass auf den gesamten Extrakt 1,00 g Arabinose kam. Es wurde absteigend chromatographiert mit Äthylacetat-Essigsäure als Lösungsmittel⁵⁾. Die getrennten Zucker wurden mit Wasser bei Raumtemperatur aus dem getrockneten Chromatogramm eluiert. Im Eluat bestimmten wir Glucose und Fructose direkt kolorimetrisch nach *Somogyi-Nelson*, Saccharose nach Hydrolyse wie Glucose. In letzterem Falle wurde eine kleine Konzentrationsreihe von Saccharoselösungen unter gleichen Bedingungen mit hydrolysiert und kolorimetriert. Aus den im Chromatogramm gefundenen Zuckermengen können unter Berücksichtigung der Einwaage des Bezugszuckers die Zuckerkonzentrationen des Extraktes berechnet werden. Die Verwendung eines Bezugszuckers hat den Vorteil, dass die auf das Chromatogramm aufzutragenden Extraktmengen nicht genau bekannt sein müssen. Wir haben aber in vielen Analysen festgestellt, dass unter Verwendung von gut geeichten Mikropipetten auch bei aufgetragenen Volumina von nur 5–10 µl der Bezugszucker in der zu erwartenden Menge mit guter Genauigkeit wieder gefunden wird: z. B. Ribose eingewogen 97,3; 100,0 mg; gefunden 100,0; 103,9 mg.

Es lassen sich somit auch ohne Bezugszucker quantitative chromatographische Analysen durchführen. Am zweckmässigsten erscheint uns eine Kombination beider Verfahren wegen der dadurch gegebenen Kontrollmöglichkeit: Chromatographieren der Extrakte mit Bezugszucker unter Verwendung von geeichten Pipetten. Resultate der Bestimmungen:

mg Zucker nach	Glucose	Fructose	Saccharose
<i>Hagedorn-Jensen</i>			
ohne Zinkhydroxydfällung . . .	393		2450
mit Zinkhydroxydfällung . . .	362		—
<i>Somogyi</i> , jodometrisch	158		—
<i>Somogyi-Nelson</i> , kolorimetrisch .	160		2610
papierchromatographisch	97,5	13,3	1650

Für die Durchführung der Analysen bin ich Frl. *E. Jucker* und Frl. *E. Perini* zu Dank verpflichtet.

¹⁾ *Hagedorn-Jensen*, loc. cit. ²⁾ *M. Somogyi*, loc. cit. ³⁾ *N. Nelson*, loc. cit.

⁴⁾ *A. E. Flood, E. L. Hirst & J. K. N. Jones*, loc. cit.

⁵⁾ *M. A. Jermyn & F. A. Isherwood*, loc. cit.

SUMMARY.

An extract from germinated peas was analyzed for sugars by the methods of *Somogyi*, *Hagedorn-Jensen* and by paper partition chromatography. While the last named method can be controlled and has been shown to give good and reliable results, both the reduction of copper in alkaline solution and the reduction of ferricyanide gave too high values for reducing sugar. The difference was especially great with ferricyanide as oxidising agent (more than 300% reducing sugar compared to the sum of the values for glucose and fructose obtained by paper chromatography). Determination of non-reducing sugar (only saccharose) by hydrolysis of the extract and measurement of its increase in reducing power by one of the first named methods was too unreliable as other substances were also hydrolyzed with liberation of reducing components. As the amount of surplus reduction by foreign substances cannot be foreseen and is different for different extracts the only reliable method for sugar analysis in biological fluids of varying composition is the separation of the soluble carbohydrates from the interfering substances by partition chromatography and determination of the isolated sugars by one of the classical methods.

Institut für allgemeine Botanik der Universität Zürich.

62. Über die Myokinase der Leber¹⁾

von F. Leuthardt und Hélène Bruttin.

(9. I. 52.)

Im Muskel haben *Colowick & Kalckar*²⁾ ein Ferment nachgewiesen, die Myokinase (oder ADP-Phosphomutase), welches die Dismutation von zwei Molekeln ADP (Adenosindiphosphat) zu einer Molekel AMP (Adenosinmonophosphat) und einer Molekel ATP (Adenosin-triphosphat) katalysiert: $2 \text{ ADP} \rightleftharpoons \text{AMP} + \text{ATP}$. Sie nahmen zunächst an, dass Myokinase in der Leber nicht vorkommt. Spätere Untersuchungen haben aber gezeigt, dass die obige Dismutation auch in der Leber möglich ist. *Barkulis & Lehninger*³⁾ sowie *Kielley & Kielley*⁴⁾ haben das Ferment in den Lebermitochondrien nachgewiesen. Nach *Kotel'nikova*⁵⁾ kommt es ausser im Skelettmuskel auch in Herz,

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⁾ *S. P. Colowick & H. M. Kalckar*, J. Biol. Chem. **148**, 117 (1943).

³⁾ *S. S. Barkulis & A. L. Lehninger*, J. Biol. Chem. **190**, 339 (1951).

⁴⁾ *W. W. Kielley & R. K. Kielley*, J. Biol. Chem. **191**, 485 (1951).

⁵⁾ *A. V. Kotel'nikova*, Biokhimiya **14**, 145 (1949), cit. nach Chem. Abstr. **1949**, 6263 i.