

specific reaction is involved which terminates before visible clotting occurs and which differs distinctly from the slow but general proteolytic breakdown effected by the enzyme.

Crystalline rennin acts in the same manner as commercial rennet products. Suspensions of native calcium phosphocaseinate and solutions of sodium caseinate of pH 6.8 (from acid casein) give similar curves. The maximum yield of NPN depends somewhat upon the substrate and its concentration, especially however upon the TCE concentration during the precipitation. The influence of this latter factor on the shape of the NPN/time curves has been investigated. On decreasing the TCE concentration from 12% to 2%, the NPN yield rises from 1.5–2% to approximately 4%. This figure agrees fairly well with those given for the so-called „Molkenalbumose“, the formation of which has also been quantitatively followed.

The NPN consists of more than one peptide. By varying the TCE concentration, a fractional precipitation is achieved. The NPN stems from the  $\alpha$ -casein. None is split off from  $\beta$ -casein under the same conditions.

It is shown that the process which sets free the NPN is very probably (though not certainly) identical with the primary reaction of the rennet curdling of milk. This seems to open a way to directly measure the reaction velocity of the latter.

Bern, Theodor-Kocher-Institut und  
Institut für organische Chemie der Universität;  
Paris, Institut National de la Recherche Agronomique.

---

## 242. Untersuchungen über Ausscheidung und Retention von Oxalat bei der Ratte mit Hilfe $^{14}\text{C}$ -signierter Oxalsäure

von Karl Bernhard, G. Brubacher<sup>1)</sup> und H. Jaquet.

(13. X. 53.)

Menschlicher Harn enthält als normalen Bestandteil 2–6 mg% Oxalsäure. Sie wird vielfach als ein Produkt des intermediären Stoffwechsels aufgefasst, aus den Fetten, den Kohlenhydraten oder dem Eiweiss herkommend.

Im Pflanzenreich ist diese einfachste Dicarbonsäure verbreitet. Sie kann daher mit der Nahrung aufgenommen werden. Grössere Mengen sind giftig. Es ist anzunehmen, dass leicht lösliche Oxalate im Darm zum Teil in Calciumoxalat umgewandelt werden und mit

<sup>1)</sup> Stipendiat der „Stiftung für Stipendien auf dem Gebiete der Chemie“.

den Faeces zur Ausscheidung gelangen. Auch sind Bildung und Zerstörung von Oxalsäure durch die Darmflora nicht auszuschliessen<sup>1)</sup>.

Vor kurzem haben *Weinhouse & Friedmann*<sup>2)</sup> im Zusammenhang mit Untersuchungen über den Stoffwechsel von Säuren mit 2 C-Atomen unter Anwendung der Isotopentechnik auch die Oxalsäure auf ihr Verhalten im Tierkörper geprüft. Durch Erhitzen von <sup>14</sup>C-signiertem Formiat erhaltenes radioaktives Oxalat wurde zwei Ratten injiziert. Da im Harn nur 18,5 bzw. 35,5% der applizierten Menge vorlagen, wurde bei einem weiteren Versuch das Tier aufgearbeitet. Insgesamt 78,7% der Aktivität konnten dabei wieder aufgefunden werden, wobei 39,3% auf den Harn, 13,8% auf die Knochen und 16,7% auf die Muskulatur entfielen. Herz, Lunge, Nieren, Milz und Haut enthielten keine aktive Oxalsäure. Auf Grund der sehr geringen Aktivität der während der ersten 5 Std. erhaltenen Ausatmungskohlensäure wird Oxalsäure nicht als ein Intermediärprodukt des Allgemeinstoffwechsels aufgefasst.

Es schien uns angezeigt, Ausscheidung und Retention der Oxalsäure auf breiterer Basis zu verfolgen, denn die im Harn enthaltene Menge von 20–40 mg müsste im Hinblick auf die festgestellte Ausscheidung ja nur einen Drittel der täglich gebildeten oder aufgenommenen Oxalsäure darstellen.

Wir haben unter Vermeidung von Formiat radioaktive Oxalsäure auf einem anderen Wege hergestellt, um jegliche schwer zu beseitigende Verunreinigung derselben durch das aktive Ausgangsmaterial auszuschliessen. Gesunden, normal ernährten männlichen und weiblichen weissen Ratten mittleren Gewichtes injizierten wir je 9,55 mg  $H_2C_2O_4, H_2O$  von bekannter Aktivität, sammelten nach 15 Std. den Harn und töteten die Tiere nach 30 Std. Es wurden Leber und Niere in toto herausgenommen und wieder der Harn quantitativ aufgehoben. Die Aktivitätsmessungen der nach Zugabe von Trägeroxalat aus letzterem und aus den Organen isolierten Oxalsäure ergaben die aus der Tabelle 1 ersichtlichen Werte.

Darnach gelangten im Verlaufe von 30 Std. 19,5–38,8% oder im Mittel von 8 Versuchen 28,7% der injizierten Säure mit dem Harn zur Ausscheidung. Eine nahezu gleiche Menge, nämlich 16,0–36,8% oder im Mittel 25,2% wurde indessen von der Niere zurückgehalten. Die Leber trat als Speicherungsorgan nicht in Erscheinung.

Während *Weinhouse & Friedmann* in der Niere keinerlei aktive Oxalsäure auffanden, geht aus unseren Befunden ein ausgeprägtes Retentionsvermögen dieses Organs für Oxalsäure hervor, eine Feststellung, die im Zusammenhang mit der Beteiligung dieser Dicarbonsäure am Aufbau von Nieren- und Harnsteinen zu interessieren ver-

<sup>1)</sup> *B. Flaschenträger & P. B. Müller*, Z. physiol. Ch. **251**, 52 (1938); *P. B. Müller*, *ibid.* **256**, 75 (1938); **266**, 149 (1940).

<sup>2)</sup> *S. Weinhouse & B. Friedmann*, J. Biol. Chem. **191**, 707 (1951).

mag. Wir werden durch andere Versuche solche Beobachtungen zu erweitern trachten. *G. Hammarsten*<sup>1)</sup> hat dieses klinisch sehr wichtige Problem ausführlich bearbeitet und bei Versuchstieren mit höchster Frequenz der Steinbildung verringerte Magnesium-, aber erhöhte Calcium- und Oxalsäureausscheidungen festgestellt.

Tabelle 1.

Ausscheidung und Retention von Oxalsäure nach Injektion von sig. Oxalat an Ratten.

Tier			Aktivität in % der applizierten Aktivität				
Nr.	Geschlecht	Gewicht g	Harn			Niere	Leber
			nach 15 Std.	nach 15—30 Std.	total		
1	m	167	15,9	15,0	30,9	23,2	0,65
2	m	144	13,3	13,8	27,1	34,1	0,31
3	w	124	15,5	20,7	36,2	24,7	0,46
4	w	137	18,4	12,1	30,5	23,0	0,18
5	m	166	15,4	23,4	38,8	16,0	0,96
6	m	165	5,8	15,5	21,3	36,8	1,30
7	w	137	11,3	8,2	19,5	20,6	0,25
8	w	146	6,5	18,6	25,1	22,9	2,20

### Experimenteller Teil.

Herstellung der signierten Oxalsäure. Die Synthese der 1,2-<sup>14</sup>C-Oxalsäure erfolgte in Anlehnung an die Angaben von *Lemarchands & Roman*<sup>2)</sup>. Wir erhitzen 50 g feinen Sand in einem 500-ml-Rundkolben unter Einleitung von Kohlensäure auf 150°, gaben rasch 4 g gereinigtes Kalium hinzu und erhielten durch kräftiges Umschütteln eine graue teigige Masse. Darauf schlossen wir den Kolben an ein CO<sub>2</sub>-Entwicklungsapparat aufweisendes System an, evakuierten auf 0,03 mm Hg, entwickelten aus 3,381 g BaCO<sub>3</sub> (Aktivität 2,6 mC) radioaktive Kohlensäure und erhitzen erneut. Bei 190° setzte eine lebhaft CO<sub>2</sub>-Aufnahme ein, welche bei langsamem Erhitzen auf 240° abflaute, bei 260° wieder einsetzte und bei 270° sehr rasch verlief. Eine weitere Temperatursteigerung führte bereits zu beginnender Verkohlung. Wir brachten das Reaktionsgefäß in eine feuchte Atmosphäre und fügten nach 8 Tagen zur Zersetzung des Kolbeninhaltes 10 ml H<sub>2</sub>O hinzu. Das gebildete Oxalat wurde mit 100 ml heissem Wasser herausgelöst; diese Lösung wurde mit 60 ml 2-n. HCl versetzt, wobei wir die entweichende aktive Kohlensäure in Natronlauge absorbierten. Nach Abstumpfung mit Acetat und Behandlung mit Tierkohle fällten wir mit CaCl<sub>2</sub> Calciumoxalat, lösten dieses in 20 ml 20-proz. HCl und extrahierten 52 Std. mit Äther. Wir erhielten daraus 724,8 mg Kristalle, die bei 90—130° (0,05 mm Hg) sublimiert 490 mg wasserfreie Oxalsäure (Ausbeute 63%) ergaben.

Die weitere Reinigung erfolgte chromatographisch mit Hilfe einer Dowex-1-Säule in ihrer Formiat-Form<sup>3)</sup>. Zur Eluierung verwendeten wir zuerst Ameisensäure steigender Konzentration, dann ein Gemisch von 6-n. Ameisensäure und 6-n. Salzsäure. Die Hauptmenge der Oxalsäure fand sich in den Fraktionen folgender Zusammensetzung:

<sup>1)</sup> *G. Hammarsten*, Calciumoxalat als Steinbildner in den Harnwegen, Lund 1937, C. W. K. Gleerup.

<sup>2)</sup> *M. Lemarchands & H. L. Roman*, C. r. **192**, 1381 (1931).

<sup>3)</sup> *H. Busch, R. B. Hurlbert & V. R. Potter*, J. Biol. Chem. **196**, 717 (1952).

HCl:HCOOH = 1:9, 2:8 und 3:7. Das Äquivalentgewicht betrug 63,4 (ber. 63,02), die spezifische Aktivität  $3,41 \cdot 10^6$  c/min. mg.

Tierversuche. Die Injektionen erfolgten subcutan in den oberen Teil der hinteren Extremität. Tötung mit Leuchtgas. Die Organe haben wir zerkleinert und daraus durch Behandlung mit Salzsäure die Oxalsäure herausgelöst. Analog behandelten wir auch den Harn. Nach Zugabe von Trägeroxalat zu den filtrierten Auszügen fällten wir mit  $\text{CaCl}_2$  das Calciumoxalat. Seine Aktivität bestimmten wir nach Überführung in Bariumcarbonat<sup>1)</sup> nach den Angaben von *H. Schmid & K. Schmid*<sup>2)</sup>.

Wir sind Herrn Prof. Dr. *H. Schmid* und Herrn cand. phil. *K. Schmid*, Universität Zürich, für ihre wertvolle Beratung sehr zu Dank verpflichtet.

#### SUMMARY.

Retention and excretion of small amounts of oxalic acid with radioactive  $^{14}\text{C}$  in rats have been investigated. It has been found that on an average 28.7% of the oxalic acid was excreted in the urine, while 25.2% was retained in the kidney. The liver showed only small activities. These results are of clinical interest with regard to the participation of oxalic acid in the formation of stones in the bladder and the kidney.

Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Basel.

### 243. Contribution à l'étude du système quinaire

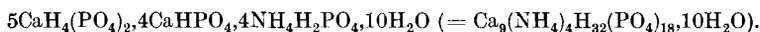


### VIII. La polytherme de la saturation simultanée en phosphate monocalcique, phosphate monoammonique et phosphate double de calcium et d'ammonium (sel double D<sup>1</sup>)

par *R. Flatt, G. Brunisholz et E. Lauber.*

(13 X 53)

Dans une publication antérieure<sup>3)</sup>, nous avons montré qu'il existe un phosphate double de calcium et d'ammonium de la formule



Ce sel, qui cristallise en aiguilles ou en plaques, peut apparaître comme phase solide dans des solutions aqueuses contenant de l'acide phosphorique libre, du phosphate monocalcique et du phosphate monoammonique. La surface de saturation de ce sel double a été établie, à 25°, dans le diagramme de solubilité du système quaternaire  $\text{Ca}^{++} - \text{NH}_4^+ - \text{H}^+ - \text{PO}_4^{---} - \text{H}_2\text{O}$ .

<sup>1)</sup> *D. D. van Slyke, J. Plazin & J. R. Weisiger*, *J. Biol. Chem.* **191**, 299 (1951).

<sup>2)</sup> *H. Schmid & K. Schmid*, *Helv.* **36**, 489 (1953).

<sup>3)</sup> *R. Flatt, G. Brunisholz & S. Chapuis-Gottreux*, *Helv.* **34**, 844 (1951).