

Die Bestimmung von Gallensäuren in Rattenexkrementen führen H. G. ROSCOE und M. J. FAHRENBACH¹ durch, nachdem sie die störenden Pigmente durch Aktivkohle entfernt haben. — *Prinzip der Durchführung.* Man extrahiert eine 24 Std.-Probe der Exkremente zunächst mit 96%igem Äthanol, dampft den Extrakt ein und extrahiert den Rückstand mit n-Hexan, um die neutralen Lipide zu entfernen. Dann löst man den Rückstand in Wasser, säuert an und extrahiert die Lösung mit Chloroform. Die Chloroformauszüge dampft man zur Trockne ein, löst den Rückstand in Benzol-Methanol (1:1) und gibt Aktivkohle (siehe unten) zu. Man filtriert durch Glaswolle, dampft die Lösungen unter Stickstoff bei 35 bis 40°C ein und extrahiert den Rückstand mit Hexan, um die freien Fettsäuren zu entfernen. Den so gereinigten Rückstand, der die Gallensäuren enthält, löst man in Äthanol und titriert einen aliquoten Teil dieser Lösung mit 0,01 n Natronlauge und Bromthymolblau als Indicator. Einzelheiten der Methode sind dem Original zu entnehmen. — *Aktivkohle.* Man wäscht Darco G-60 mit konz. Salzsäure, bis die Waschflüssigkeit farblos ist. Dann wäscht man nacheinander je dreimal mit Wasser, absol. Methanol und Methanol-Benzol (1:1) nach und trocknet über Nacht bei 110°C.

¹ Anal. Biochem. 6, 520—529 (1963). Biochem. Res. Dept., Biochem. Res. Section, Lederle Lab. Div., American Cyanamid Co., Pearl River, N. Y. (USA).

URSULA BAUMANN

Bestimmung von d-Tubocurarin in Gewebe und Körperflüssigkeiten. E. N. COHEN¹ gibt für die in einer früheren Arbeit² beschriebene *fluorimetrische Bestimmung von d-Tubocurarin (Tc) durch Bildung eines fluoreszierenden Tc-Bengalrosa-Farbkomplexes* folgende Anweisungen zur *Extraktion des biologischen Untersuchungsmaterials.* Von *Cerebrospinalliquor* pipettiert man 1 ml in ein mit Schliffstopfen versehenes 15 ml-Zentrifugenglas und gibt 5 ml Äthylendichlorid, frisch destilliert, KP 83°C, (Äd) und 1 ml Kaliumjodid-Glycid-Pufferlösung (KJG) zu [hergestellt durch Auflösen von 12,8 g Kaliumjodid in einer Mischung von 4 ml 0,1 n Natronlauge und 6 ml einer Lösung von 7,505 g Glycin (0,1 m) und 5,85 g Natriumchlorid in Wasser zu 1000 ml]. Dann mischt man den Ansatz 2 min lang mechanisch und zentrifugiert 10 min lang mit 2500 U/min. Nach Abgießen der wäßrigen Phase bricht man die Emulsion der organischen Phase durch Rühren mit einem Glasstab, überführt 3 ml in ein zweites, mit 1,5 ml 0,01 n Salzsäure beschicktes Zentrifugenglas, mischt und zentrifugiert 2 min lang. Dann pipettiert man 1 ml der Säureschicht in ein 5 ml-Zentrifugenglas, in welchem man die Bildung des Tc-Farbkomplexes ausführt. — *Urin.* 2 ml frischen Harn extrahiert man nach Zugabe von 1 ml KJG mit 7 ml Äd, dann schüttelt man 4 ml der Äd-Schicht mit 1,5 ml 0,01 n Salzsäure und entnimmt von dieser nach dem Zentrifugieren 1 ml zur Farbstoffbildung. Zur Tc-Bestimmung in *Plasma* bringt man von diesem 5 ml in ein konisches 50 ml-Zentrifugenglas, gibt 7 ml Äd und 1 ml KJG zu und zentrifugiert nach gutem Durchschütteln. Dann pipettiert man 3 ml der Äd-Schicht in ein 1,5 ml 0,01 n Salzsäure enthaltendes Glas und verfährt weiter wie beschrieben. Aus Plasma läßt sich jedoch Tc auch spektrophotometrisch bestimmen, indem man 3 ml der Äd-Schicht mit 0,5 ml 0,01 n Salzsäure extrahiert, diese nach dem Zentrifugieren sorgfältig abtrennt und ihre Extinktion bei 280,5 nm bestimmt. Soll *Leber- oder Nierengewebe* analysiert werden, so zerkleinert man etwa 1 g, genau gewogen, preßt es in einer Gewebepresse (Harvard Apparatus Co., Dover, Mass.) aus, spült den Rückstand 2mal mit je 4 ml Wasser unter Verrühren in ein Becherglas, schüttelt die wäßrige Flüssigkeit nach Zugabe von 2 ml KJG mit 20 ml Äd 3 min lang in einem Mixer durch und zentrifugiert 10 min mit 3000 U/min. 15 ml der Äd-Schicht schüttelt man mit 1,5 ml 0,01 n Salzsäure aus und verwendet

1 ml für die Farbstoffbildung. Zur Extraktion von *Muskelgewebe* homogenisiert man von diesem 1–2 g mit 10 ml Wasser 2 min lang mit 15000 U/min, schüttelt das Homogenat unter Nachwaschen mit 5 ml Wasser und nach Zusatz von 2 ml KJG mit 30 ml Äd 20 min lang aus, extrahiert von der Äd-Schicht 25 ml mit 0,01 n Salzsäure und verfährt weiter wie beschrieben. Von *Gehirn* und *Fett* maceriert man etwa 1 g mit 2 ml KJG, spült den Brei mit 2 ml Wasser in einen Schütteltrichter, extrahiert ihn nach weiterem Zusatz von 5 ml Wasser mit 30 ml Äd und verfährt weiter wie beschrieben. Da Te bei Lagerung der Organe bei Raumtemperatur rasch zersetzt wird (25–33% innerhalb von 4 Std), müssen alle nicht sofort verarbeiteten Analysenproben in gefrorenem Zustand aufbewahrt werden. (Diagramme und Wertetabellen im Original.)

¹ J. Lab. Clin. Med. **62**, 979–984 (1963). Dept. Anesthesia, Stanford Univ. School Med., Palo Alto, Calif. (USA). — ² COHEN, E. N.: J. Lab. Clin. Med. **61**, 338 (1963).

K. SÖLLNER

Über Resorufinbutyrat und Indoxylacetat als fluoreszenzerzeugende Substrate für Cholinesterase berichten G. G. GUILBAULT und D. N. KRAMER¹. — *Ausführung der Enzymbestimmung.* Zu 2,85 ml Trispuffer (0,01 m, pH 7,4) werden 0,15 ml 10^{-3} m Resorufinbutyrat zugesetzt. Bei Anwendung von Indoxylacetat, das in Dioxan gelöst ist, werden 0,1 ml 0,083 m Lösung mit 2,9 ml 0,1 m Phosphatpufferlösung vom pH 6,5 vereinigt. In einem Aminco-Bowman-Spektrofluorimeter mit einer Anregungslinie von 540–570 nm und einer Emissionslinie von 580 für Resorufin bzw. 395 nm und 470 nm für Indoxyl oder Indigoweiß werden zum Substratgemisch 0,1 ml Enzymlösung gegeben (0,0009–0,5 E Cholinesterase). Nach der Zugabe des Fermentes wird die Fluoreszenzänderung gemessen. Aus der Steigung der Kurven kann durch Vergleich mit Eichkurven die unbekannte Enzymmenge bestimmt werden. — Mit geringerer Geschwindigkeit spalten auch Acylase, saure Phosphatase und Chymotrypsin. Die Empfindlichkeit der Methode reicht bis zu $2,5 \cdot 10^{-8}$ m Substrat und bis zu 0,0003 E Ferment/ml. Der Fehler der Standardabweichung beträgt nur 1%.

¹ Analyt. Chemistry **37**, 120–123 (1965). Defensive Res. Div., Chem. Res. and Dev. Lab., Edgewood Arsenal, Md. (USA).

U. GERHARDT

Die automatische Bestimmung von alkalischer Phosphatase durch Anwendung von p-Nitrophenolphosphat haben R. E. STERLING, A. A. WILCOX, A. G. WARE und M. K. UMEHARA¹ durchgeführt. Diese Methode gestattet es, innerhalb 1 Std 60 Bestimmungen mit nur jeweils 0,2 ml Serum durchzuführen. Durch das Substrat p-Nitrophenolphosphat entfallen die sonst notwendigen Leerwerte. In einem Autoanalyzer werden 0,2 ml Serum mit 1,7 ml Substratlösung (siehe unten) versetzt. Dann wird 7 min bei 37°C inkubiert. Das während der Reaktion entstandene p-Nitrophenol wird gegen dest. Wasser dialysiert und in das stetig abfließende Dialysewasser 0,1 n Natronlauge eingeleitet. Die Konzentration des entstandenen Natrium-p-nitrophenolats wird in einem Durchflußcolorimeter in einer 6 mm-Zelle bei 420 nm gemessen. Die enzymatische Aktivität kann direkt an Hand von aufgestellten Eichkurven mit inaktiviertem Serum und bekannten Mengen an gereinigter alkalischer Phosphatase abgelesen werden. — *Substratlösung.* Zu 500 ml bidest. Wasser, das 0,05 m Glycin und 0,001 m Magnesiumchlorid enthält, werden 42,5 ml 1 n Natronlauge gegeben und nach vollständiger Lösung mit 1 g Dinatrium-p-nitrophenolphosphat versetzt. Nach dem Verdünnen auf 1 l wird der pH-Wert mit 6 n Natronlauge oder Salzsäure auf 10,4 eingestellt.

¹ Clin. Chemistry **10**, 1112–1116 (1964). Main Lab. Los Angeles County Gen. Hosp. and Dept. of Biochem., Univ. Los Angeles, Calif. (USA).

U. GERHARDT