

On the Determination of P³¹ and P³² in Biological Material

LARS ERNSTER, ROLF ZETTERSTROM and OLOV LINDBERG

Department of metabolic research, Wenner Gren Institute, University of Stockholm, Sweden

Two years ago, an adaptation of the Martin and Doty method for the determination of phosphate¹, to be applied for metabolic studies with P³², was published from this laboratory². The method is based upon the fact that phosphomolybdic acid, formed in acid solution, can be quantitatively extracted by shaking the sample for 15 seconds with a mixture of equal parts of isobutanol and benzene. P³¹ and P³² can then be determined in aliquots of the organic phase.

Since that time, the method has been used for routine analyses in this laboratory in a very large number of experiments³⁻⁵. It has proved to be especially advantageous as it is not necessary to deproteinise samples with relatively low protein content, e.g. samples from enzymatic tests or incubation mixtures. Recently, in a series of experiments⁵ on mitochondria suspensions, it was possible to follow the phosphate uptake during incubation, due to the fact that the phosphate determination can be performed very rapidly.

On the other hand, deproteinizing agents commonly used for tissue extractions, i.e. trichloroacetic and perchloric acids interfere with the determination. In the case of TCA, however, this difficulty may be easily overcome by removing the TCA from the extract with ether. Traces of ether can then be expelled from the extract by aeration.

In a recent publication⁶, Ennor and Rosenberg raised the objection that organic phosphate compounds which are highly labile to acid may be hydrolyzed during

the time of contact between the aqueous and organic phases. The accompanying table shows the influence on the resulting phosphate value of the time of contact between the two layers. The table clearly indicates that in spite of the fact that, as pointed out earlier², creatine phosphate undergoes rather rapid hydrolysis in the presence of molybdate and sulfuric acid, no significant part of the liberated orthophosphate migrates spontaneously into the organic layer in a standing sample. In general, there is no reason why the upper layer should not be removed immediately after separation, but even if a short time interval elapses between separation and removal no appreciable error ensues. In the case of creatine phosphate (*cf.* table), this error amounts to less than one per cent after one minute, and about four per cent after half an hour at room temperature. In the case of adenosine polyphosphates, it is evidently still lower.

Another objection raised against the present method by the authors mentioned above is the etching effect of the SnCl₂-sulfuric acid-ethanol mixture on glassware. During the past two years, several thousands of such samples have been handled in this laboratory in glass vessels of the most varying types, *i.e.* Pyrex (American, British and French), Jena glass, standard Klett tubings and Beckman Corex cells, and no signs of etching whatsoever have been noticed.

Table 1.

| Time min. | Series A | | Series B |
|--------------|------------------|--|----------|
| | Ext. 730 m μ | | |
| 0 | .158 | | .158 |
| 1 | .167 | | .315 |
| 5 | .178 | | .730 |
| 10 | .187 | | 1.050 |
| 15 | .205 | | 1.075 |
| 20 | .215 | | 1.150 |
| 30 | .193 | | 1.250 |

3 ml-samples of a solution of creatine phosphate (Ca-salt) were shaken, in the presence of 0.5 ml of 10 N H₂SO₄ and 0.5 ml of 10 % (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O, with 5 ml of isobutanol-benzene mixture (1 : 1), for 15 sec. Temp. 22° C. — Series A: shaken immediately after the addition of the creatine phosphate, whereafter the samples were allowed to stand for various periods of time. — Series B: shaken after the addition of creatine phosphate, and again after various periods of time. — At the end of each period, a 1.0 ml sample of the organic layer was removed for the phosphate determination. Colour intensity was measured in a Beckman spectrophotometer at 730 m μ .

1. Martin, J. M., and Doty, D. M. *Anal. Chem.* **21** (1949) 965.
2. Ernster, L., Zetterström, R., and Lindberg, O. *Acta Chem. Scand.* **4** (1950) 942.
3. Zetterström, R., Ernster, L., and Lindberg, O. *Arch. Biochem. Biophys.* **31** (1951) 113.
4. Zetterström, R., and Engfeldt, B. *Nature* **168** (1951) 81.
5. Lindberg, O., and Ernster, L. *Exp. Cell Research* **3** (1952) 209.
6. Ennor, A. H., and Rosenberg, H. *Biochem. J.* **50** (1952) 524.

Received March 22, 1952.

Aminosäuren in Meeresalgen

L.-E. ERICSON und A. G. M. SJÖSTROM

*Institutionen für Livsmedelskemi, Kungl.
Tekniska Högskolan, Stockholm, Schweden*

Die Aminosäuren in Meeresalgen sind früher schon Gegenstand von Untersuchungen von Mazur und Clarke^{1,2} sowie von Lugg³ gewesen. Haas⁴ wie auch Dekker, Stone und Fruton⁵ haben gewisse in Algen vorkommende Peptide isoliert. Roche und Lafon⁶ haben das Vorkommen von Dijodtyrosin in *Laminaria flexicaulis* und *Laminaria saccharina* nachgewiesen. Die Aminosäurezusammensetzung in gewissen einzelligen Grünalgen ist von Fowden^{7,8} und Stepka, Benson und Calvin⁹ ermittelt worden.

In der vorliegenden Arbeit sind drei Braunalgen (*Phaeophyceae*) — *Sphaerelaria arctica* (*Sphaerelariales*), *Laminaria saccharina* (*Laminariales*) *Fucus vesiculosus* (*Fucales*) — hinsichtlich ihres Aminosäureinhaltes qualitativ untersucht worden. Die letztgenannte Alge ist in der Nähe von Fiskebäckskil im Skagerrak im Monat November 1951 geerntet worden, die zwei übrigen im Oktober desselben Jahres ausserhalb Simpnäs in der Ostsee. Zur Identifizierung der Aminosäuren haben wir ein- und zweidimensionale Papierchromatographie angewandt¹⁰.

Zur Verminderung des Salzgehaltes wurden die Algenproben vor der Hydrolyse ca. 12 Stunden mit Wasser bei gewöhnlicher Temperatur behandelt; auch dieses Wasser wurde nach Eindampfen auf kleineres Volumen chromatographiert. Die entsalzenen Algenproben — ungefähr 1 Gramm — wurden dann mit 6 N HCl oder mit 14 % Ba(OH)₂ 24 Stunden lang bei 100° C hydrolysiert. Die Salzsäure wurde vor dem Chromatographieren durch Eindampfen im Vakuum entfernt, das Bariumhydroxyd mit Schwefelsäure gefällt. Eine qualitative Veränderung der Aminosäurezusammensetzung konnte nicht festgestellt werden, wenn die Hydrolyse auf 48 Stunden ausgedehnt wurde. Das Entsalzen der Algenproben führte zu einem besser aufgeteilten Chromatogramm, bewirkte aber keine qualitative Veränderung. Das zur Entsalzung verwendete Wasser enthielt keine Aminosäuren, die nicht auch im Hydrolysat nachweisbar waren.

Bei zweidimensionaler Chromatographie wurde in der einen Richtung mit Wasser gesättigtes Phenol, in der anderen ein Gemisch von Pyridin (35), Isoamylalkohol (35) und Wasser (30) verwendet; für ein-dimensionale Chromatographie bedienten wir uns eines Gemisches von *n*-Butanol (50), Essigsäure (15) und Wasser (50). Die angewandte Papiersorte war Whatman Nr. 1, die Probemengen entsprachen 10 bis 50 μ Aminostickstoff. Die zweidimensio-