

Table I

Number of experiment	Nitrogen content of the system			Change in nitrogen content after			
	mg% after			24 hours		48 hours	
	0 hour	24 hours	48 hours	mg	%	mg	%
I	5.8	12.6	—	+ 6.8	+ 117	—	—
II	6.4	14.0	—	+ 7.6	+ 118	—	—
III	7.6	14.0	—	+ 6.4	+ 84	—	—
IV	12.4	18.4	—	+ 6.0	+ 48	—	—
V	18.2	22.8	28.8	+ 4.6	+ 25	+ 10.6	+ 58
VI	23.0	26.6	31.0	+ 3.6	+ 16	+ 8.0	+ 35
VII	32.4	38.4	—	+ 6.0	+ 18	—	—

Table II

Number of experiment	Nitrogen content of the system			Change in nitrogen content after			
	mg% after			24 hours		48 hours	
	0 hour	24 hours	48 hours	mg	%	mg	%
I	79.6	76.4	75.2	— 3.2	— 4.0	— 4.4	— 5.5
II	104.6	102.6	101.6	— 2.0	— 2.0	— 3.0	— 3.0

Table III

Number of experiment	Nitrogen in the nutrient solution	Nitrogen content of the cultures			Change in nitrogen content after			
		mg% after			24 hours		48 hours	
		0 hour	24 hours	48 hours	mg	%	mg	%
I	—	0.3	0.4	0.7	+ 0.1	+ 33	+ 0.4	+ 133
II	—	0.3	0.4	0.5	+ 0.1	+ 33	+ 0.2	+ 67
III	—	0.3	0.3	0.7	0.0	0	+ 0.4	+ 133
IV	0.5 % peptone	10.1	—	6.3	—	—	— 3.8	— 38
V	0.5 % peptone	8.7	—	6.3	—	—	— 2.4	— 28
VI	0.5 % peptone	9.1	6.3	—	— 2.8	— 31	—	—
VII	0.5 % peptone	10.0	6.7	—	— 3.3	— 33	—	—
VIII	0.5 % ammonium sulfate	15.1	—	12.6	—	—	— 2.5	— 17
IX	0.5 % ammonium sulfate	14.8	—	12.4	—	—	— 2.4	— 16
X	0.5 % ammonium sulfate	10.2	5.6	—	— 4.6	— 46	—	—
XI	0.5 % ammonium sulfate	11.0	6.5	—	— 4.5	— 41	—	—

this amount was not higher than 5 % of the nitrogen which had disappeared from the system.

T. Z. CsÁKY and L. TÓTH

Hungarian Biological Research Institute, Tihany, and Biological Laboratory of the Hungarian National Museum, Natural History, Budapest, October 18, 1947.

Zusammenfassung

Die Intensität der Stickstoffbildung aus der Luft im überlebenden System der Blattläuse steht mit dem Stickstoffgehalt des Systems in Zusammenhang. Je niedriger der Ausgangswert des Gesamtstickstoffes, desto energischer ist die Stickstoffbindung. Bei hohem Stickstoffgehalt kann — anstatt einer Anreicherung — ein Verlust an Stickstoff festgestellt werden (Tabelle I und II).

Diese Erscheinung konnte auch bei den gezüchteten Bakterien der Blattläuse bestätigt werden (Tabelle III).

Es ist wahrscheinlich, daß es sich hier um einen reversiblen enzymatischen Prozeß handelt. Das Endprodukt des Abbauprozesses dürfte eine niedrige Stickstoffverbindung sein. Wie aus unseren Experimenten hervorgeht, kann es sich aber nicht um Ammoniak handeln.

Some new Substrates for Determinations of Phosphatase

For determining the activity of phosphomonoesterase glycerophosphoric acid often has been used. For that purpose the amount of phosphate that has been split is measured.

KING and ARMSTRONG choose phenylphosphoric acid for the substrate and determine the amount of phenol that has been liberated. Of late it has been attempted to simplify the determination of phosphatase by using other esters of phosphoric acid. Thus HUGGINS and

TALALAY¹ utilized the phosphoric acid ester of phenolphthalein. After the phosphatase reaction is over the phenolphthalein is immediately determined photometrically. BESSEY, LOWRY, and BROCK² use *p*-nitrophenylphosphate and determine photometrically the *p*-nitrophenol that has been formed.

Sometimes it is necessary to use very small concentrations of the substrate. As fluorescence can be observed in a much smaller concentration than colour, investigators have been looking for phosphoric acid esters that produce fluorescing compounds after decomposition.

Personally I have prepared the phosphoric acid ester of: fluorescein, eosin, and 4-methyl-7-oxycumarin.

Fluorescein was dissolved in pyridine. This solution was dropped into an excess of POCl₃. Then for some hours it was hydrolysed with water and salted down with NaCl. The ester is dissolved in alkali and freed from pyridine by shaking it with ether. The unchanged fluorescein is eliminated by shaking the solution at $p_H = 3$ with isobutanol. The phosphoric acid ester of eosin was prepared analogously. 4-methyl-7-oxycumarin was dissolved in pyridine. This solution was dropped into a mixture of CHCl₃ and POCl₃ (1:1). After hydrolysis with water the ester precipitated. The further process is analogous to that used in case of the ester of fluorescein.

The 3 above-mentioned phosphoric acid esters, which themselves scarcely show any fluorescence in a solution, give after splitting by means of phosphatase a fluorescing product of which the fluorescence can be measured successfully.

According to this method small activities of phosphatase (e.g. in blood) can be determined easily. The concentration of the substrate may be extremely small (10⁻⁵ g/l). This is essential for the study of the kinetic behaviour of phosphatase and for experiments on living organisms. The latter experiments can now be taken in hand easily with the help of the fluorescence microscope.

H. NEUMANN

Histological Laboratory, University of Amsterdam, December 11, 1947.

Résumé

Pour doser l'activité de la phosphomonoestérase, on a fait récemment usage des esters de l'acide phosphorique qui, après hydrolyse par la phosphatase, donnent des produits colorés. L'auteur propose d'employer des esters de l'acide phosphorique dont les produits d'hydrolyse ont un pouvoir fluorescent et peuvent être de ce fait décelés et mesurés dans des solutions très diluées. Il attire tout particulièrement l'attention sur des esters de la fluorescéine, éosine et 4-méthyl-7-oxycumarine et montre leur importance dans les recherches histologiques sur la phosphatase.

¹ C. HUGGINS and P. TALALAY, J. biol. Chem. 159, 399 (1945).

² O. A. BESSEY, O. H. LOWRY, and M. J. BROCK, J. biol. Chem. 164, 321 (1946).

Sur la régénération des cholinestérases du sang

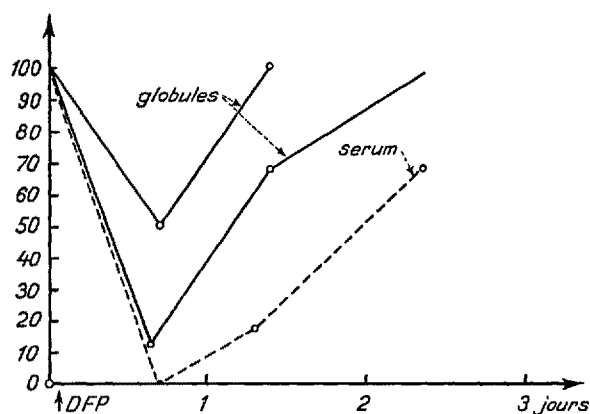
De nombreux travaux¹ ont mis en évidence que l'injection d'une dose appropriée de diisopropylfluorophosphate (DFP) inactive, d'une manière irréversible, les cholinestérases du plasma, des globules sanguins et des tissus. La régénération des cholinestérases est très lente

¹ C. HEYMANS, R. PANNIER, R. VERBEKE et J. JACOB, Arch intern. Pharmacodyn. 72, 405 (1946); 74, 233 (1947) avec bibliogr.

et exige, en général, plusieurs semaines. Afin d'inactiver uniquement les cholinestérases du sang et de pouvoir examiner, dans ces conditions, la régénération des cholinestérases du sang et le comportement de diverses fonctions physiologiques, nous avons effectué les expériences que voici.

Le chien est rendu exsangue par hémorragie. Chez ce chien, on transfuse ensuite du sang hépariné qui a été en contact avec du DFP et dont les cholinestérases ont été ainsi totalement inactivées. L'activité des cholinestérases du sang du chien ainsi transfusé est ensuite déterminée pendant les heures et les jours qui suivent la transfusion. Le comportement de différentes fonctions physiologiques (motricité, cœur, pression artérielle, pupille, intestin, etc.) est également examiné. La régénération des cholinestérases sanguines chez ces animaux est indiquée dans les courbes de la figure. Ces courbes montrent que la cholinestérase plasmatique se maintient à un niveau très bas après la transfusion de sang dont les cholinestérases ont été inactivées. La cholinestérase globulaire, dénommée la cholinestérase vraie, se relève rapidement dans l'organisme à un niveau de 50 % de la normale. Pendant les jours qui suivent la transfusion, le taux des cholinestérases sanguines se relève rapidement pour atteindre la normale 60 à 72 h après la transfusion du sang privé de ses cholinestérases.

Les diverses fonctions physiologiques de l'animal ne subissent, pendant ce temps, aucune modification pouvant entrer dans le cadre des réactions dites cholinergiques.



Ces expériences démontrent donc que les cholinestérases sanguines se régénèrent rapidement au dépens des cholinestérases des autres tissus et que le taux des cholinestérases sanguines est sans influence sur les activités, considérées jusqu'à présent comme cholinergiques, de différentes fonctions physiologiques.

Ce fait enlève donc leur signification aux travaux qui se sont efforcés d'établir une relation entre l'activité des cholinestérases sanguines, particulièrement de la cholinestérase sérique, et les fonctions physiologiques dites cholinergiques.

C. HEYMANS et H. CASIER

Institut de pharmacodynamie et de thérapie de l'Université de Gand et Ella Sachs Plotz Foundation, Gand, le 20 décembre 1947.

Summary

Blood deprived of the plasma and blood cells cholinesterases by DFP was transfused into a normal dog after total bleeding. The experiments showed that although the blood cholinesterases were at a very low level in the transfused animals, no so-called "cholinergic reactions" could be observed. However, the blood cholinesterases regenerate very fast from the tissue cholinesterases.