

Résumé

Une modification de la méthode Loomis pour calibrer le manomètre Warburg est proposée. Cette modification rend la méthode plus rapide et plus exacte et, par conséquent, facilite la calibration. Dans cette modification les niveaux du mercure s'ajustent par action mécanique et il n'est donc pas nécessaire d'incliner le manomètre à la position désirée.

PRO EXPERIMENTIS

Zur Technik des histochemischen Nachweises von Esterasen

GOMORI¹ publizierte als erster eine Technik zur histiotopen Erfassung von Lipasen. Da sie wegen ihrer Einfachheit geeignet schien, entschlossen wir uns, die Reaktion einer Prüfung zu unterziehen und sie gegebenenfalls zu verbessern.

Auf Grund zahlreicher Zweifel (Literatur bei NACHLAS und SELIGMAN²) an der Spezifität der Reaktion untersuchten wir die Spaltung des beim histochemischen Nachweis verwendeten Substrates – Tween 60 – durch eine unspezifische Esterase (Leber) und eine Lipase (Pankreas) mit Hilfe elektropotentiometrischer Titrationen. Aus diesen Bestimmungen ging eindeutig hervor, daß die Reaktion nicht nur für Lipasen spezifisch ist, sondern auch unspezifische Esterasen erfaßt, weshalb wir für diesen Nachweis die richtigere Bezeichnung einer «Esterasenreaktion» vorschlagen.

Mit der gleichen Methode (elektropotentiometrische Titration der Tween-60-Spaltung) untersuchten wir den Einfluß verschiedener Reaktionsbedingungen auf die Spaltung des Tween 60 und kamen zum Teil zu neuen Resultaten, die zu einer Verbesserung der histochemischen Methode ausgenützt werden konnten. So verzichteten wir unter anderem im Inkubationsgemisch auf den von GOMORI¹ angegebenen Zusatz von Glycerin und setzten die Inkubationstemperatur von 37°C auf 45°C hinauf. Durch diese Änderungen konnten wir die Inkubationszeit wesentlich verkürzen.

Wir bestimmten ferner mit demselben Verfahren die Aktivitätsverluste bei den verschiedenen Manipulationen, die zur Herstellung histologischer Präparate unumgänglich sind. So fanden wir zum Beispiel, daß bei dem von uns empfohlenen Paraffinschnittverfahren die erwähnten Aktivitätsverluste bis zu Beginn der Reaktion 25 % der ursprünglichen Aktivität betragen.

Bei histochemischen Reaktionen ist als wichtige Fehlerquelle stets die Möglichkeit von Diffusionsvorgängen zu berücksichtigen. Wir konnten eine solche bei vorschriftsgemäßer Durchführung der Methode ausschließen, doch machten wir die Beobachtung, daß das Enzym bei unsorgfältigem Aufziehen und Trocknen der Schnitte sehr stark diffundieren kann.

Das ursprünglich von GOMORI vorgeschlagene Überziehen der Schnitte mit einem Kollodiumfilm¹ oder Durchtränken der ganzen Blöcke mit Azetylzellulose³ erwies sich als ungenügender Schutz vor Diffusion. Als sicherstes Verfahren fanden wir die Inkubation der nicht entparaffinierten Schnitte.

Außer dem Paraffinschnittverfahren bewährte sich für bestimmte Objekte auch das zuerst von SCHULTZ-BRAUNS¹ angegebene Messertiefkühlverfahren, das nach unserer Ansicht auch für andere histochemische Nachweisreaktionen geeignet sein dürfte.

Wir² bestimmten ferner mit einem neuen Verfahren die Sensibilitätsgrenze unserer Methode, die bei 20–25 µM Tween-60-Spaltung liegt (vgl. GOMORI³).

Des weiteren konnten wir eine Methode entwickeln⁴, die eine quantitative Auswertung der Reaktion erlaubt. Das Prinzip dieses Verfahrens besteht in einem kolorimetrischen Vergleich der Reaktionsintensität im Präparat unbekannter Aktivität mit derjenigen eines Präparates bekannter Aktivität.

R. RICHTERICH

Anatomisches Institut der Universität Basel, den 15. Mai 1951.

Summary

A method for the demonstration of lipase activity *in situ* was given by GOMORI. The author examined the specificity of the reaction, the loss of lipolytic activity during the necessary manipulations (fixation, dehydration, etc.) and the various sources of error (diffusion, unspecific reactions, threshold value of the method). A few modifications of the original technique, e. g. the incubation of the non-deparaffined sections, were necessary for obtaining optimal results. Furthermore, a method for the quantitative estimation of lipolytic activity was developed.

¹ O. SCHULTZ-BRAUNS, Zbl. Path. 50, 273 (1931).

² R. RICHTERICH, Acta Anat. (im Druck).

³ G. GOMORI, J. Lab. and Clin. Med. 34, 275 (1949).

⁴ R. RICHTERICH, Exp. Cell Res. (im Druck); Enzymologia (im Druck).

PRO EXPERIMENTIS

Osservazioni sul dosaggio colorimetrico della chinurenina e di altri derivati del triptofano

Per il dosaggio colorimetrico della chinurenina e di altri derivati del triptofano OTANI, NISHINO e IMAI¹ hanno impiegato la reazione con *p*-dimetilaminobenzaldeide. Dopo aggiunta di H₂O₂ si ha sviluppo di una colorazione per un limitato numero di composti: nelle prove di OTANI e coll. soltanto per chinurenina, *o*-aminoacetofenone, acido antranilico, acido *p*-aminobenzoico.

Il colore ottenuto con la chinurenina rimane però nella fase acquosa anche dopo ripetute estrazioni con butanolo, mentre le altre colorazioni vengono estratte da detto solvente. Si ottiene così una reazione specifica e applicabile per un metodo di dosaggio colorimetrico, in quanto il colore segue la legge di LAMBERT BEER.

Noi abbiamo controllato tale metodica e confermato le conclusioni di OTANI e coll.; questi Autori avevano determinato la chinurenina nel plasma e in poltiglie di organi di animali trattati con triptofano, trovando sempre una buona rispondenza del metodo impiegato.

Proseguendo queste nostre ricerche dal 1947² e dovendo estendere l'indagine alla determinazione di altri metaboliti del triptofano, abbiamo dovuto saggiare con la sud-

¹ G. GOMORI, Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 58, 362 (1945).

² M. M. NACHLAS and A. M. SELIGMAN, Anat. Rec. 105, 677 (1949).

³ G. GOMORI, Arch. Path. 41, 121 (1946).

¹ S. OTANI, N. NISHINO e K. IMAI, Z. Physiol. Chem. 270, 41 (1941).

² E. GINOUHAC, Acta Vitaminol. 1, 12 (1947).

N°	Sostanze sottoposte alla reazione	Colorazione sviluppata dopo 15 h di termostato a 37° C	Colorazione passata nella fase butanolica	Colorazione della fase acquosa
1	chinurenina	violetto	giallo-bruno	violetto
2	<i>o</i> -aminoacetofenone	violetto	violetto	incoloro
3	acido antranilico	violetto	violetto	incoloro
4	triptofano	bruno-rossastro	giallo-bruno	incoloro
5	acido chinurenico	giallo-bruno	giallo-bruno	incoloro
6	acido xanturenico	bruno-rossastro	giallo-bruno	incoloro
7	3-ossi-chinurenina	giallo-bruno	giallo-bruno	incoloro
8	acido 3-ossi-antranilico	giallo-bruno	giallo-bruno	incoloro
9	3-ossi-aminoacetofenone	giallo-bruno	giallo-bruno	incoloro
10	1 + 6	violetto-bruno	giallo-bruno	violetto
11	1 + 7	violetto-bruno	giallo-bruno	violetto
12	1 + 2	violetto	violetto, poi incoloro	violetto
13	1 + 3	violetto	violetto, poi incoloro	violetto
14	1 + 8	violetto	giallo-bruno	violetto
15	1 + 9	violetto	giallo-bruno	violetto
16	1 + 7 + 2 + 3	violetto	violetto, poi incoloro	violetto

La reazione è stata eseguita su concentrazione di 250 γ /cc. per aggiunta di 0,30 cc. reattivo alla *p*-dimetilaminobenzaldeide 2% in HCl 15% + 0,15 cc. H₂O₂ 3% riportando il volume a 5 cc. con H₂O. Dopo 15 h di termostato a 37°C si fanno ripetute estrazioni con alcool butilico sino ad avere la fase alcoolica praticamente incolora. Sulla fase acquosa riportata a volume si esegue la lettura fotometrica (fotometro di Pulfrich filtro S₃₃) deducendo una prova in bianco con i soli reattivi.

detta metodica una serie di composti che non erano stati precedentemente esaminati.

La reazione è stata eseguita direttamente su soluzioni acquose di: chinurenina, *o*-aminoacetofenone, acido antranilico, triptofano, acido chinurenico (che erano già stati studiati), acido xanturenico, 3-ossichinurenina, acido 3-ossiantranilico, 3-ossi-2-aminoacetofenone e di miscele di chinurenina con alcuni degli altri prodotti indicati.

I risultati sono riferiti nella tabella.

Essi mostrano che:

1° Reagiscono con *p*-dimetilaminobenzaldeide ed H₂O₂ dando luogo a formazione di una colorazione violetta le seguenti sostanze: chinurenina, acido antranilico, *o*-aminoacetofenone; tutti gli altri composti esaminati non danno colorazione violetta.

2° La contemporanea presenza di: 3-ossichinurenina, acido xanturenico, acido chinurenico, acido 3-ossiantranilico, 3-ossi-2-aminoacetofenone non disturba la determinazione di chinurenina; la contemporanea presenza di *o*-aminoacetofenone ed acido antranilico non interferisce, in quanto il colore violetto sviluppato da questi due ultimi composti passa completamente nella fase butanolica mentre quello sviluppato dalla chinurenina resta, come si è detto, nella fase acquosa.

3° Per l'applicazione del dosaggio nelle urine restano validi i risultati di cui ai due punti precedenti; la chinurenina aggiunta alle urine a scopo di controllo del metodo viene recuperata quantitativamente.

Queste osservazioni fanno concludere per la specificità della metodica di dosaggio colorimetrico della chinurenina di fronte ai metaboliti del triptofano, anche a quelli non presi in considerazione dagli Autori giapponesi o posteriormente scoperti, e per l'applicabilità di tale metodica alla determinazione della chinurenina presente nei liquidi biologici insieme con quelli dei suddetti metaboliti che vi fossero presenti.

E. GINOULHIAC

Reparto Biologico dei Laboratori di Ricerche della «Lepetit S. p. A.», Milano, il 3 giugno 1951.

Summary

The reaction with *p*-aminobenzaldehyde and hydrogen peroxide has been tested on the known metabolic substances of tryptophane and its derivatives (kynurenine, *o*-aminoacetophenone, acid antranilic, acid kynurenic, acid xanthurenic, 3-oxykynurenine, acid 3-oxyantranilic, 3-oxyaminoacetophenone).

The colour reaction which is found with some of those, becomes specific in the case of kynurenine only, in the water phase after several extractions with butanol.

Nouveaux livres - Buchbesprechungen - Recensioni - Reviews

Lehrbuch der organischen Chemie

Von PAUL KARRER

1082 Seiten mit 6 Abbildungen und 1 Tafel
(Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart, 1950)
(Ganzleinen DM 45.-)

Das erstmalig 1928 erschienene Werk liegt bereits in seiner 11. Auflage vor. Es ist in viele Sprachen übersetzt

und heute wohl das führende, allen Studierenden und bereits berufstätigen Chemikern vertrauteste Lehrbuch der organischen Chemie. Zu seinem Lobe ist schlechthin nichts mehr hinzuzufügen. Prof. KARRER hat es wiederum nicht unterlassen, die neuesten Ergebnisse der Forschung weitgehend einzubeziehen, und der Verlag bemühte sich um eine tadellose Ausstattung.

K. BERNHARD