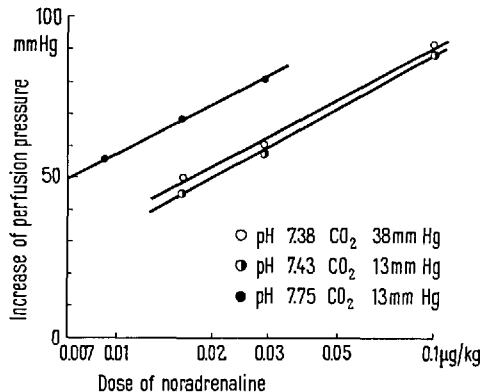


to elicit a 50 mm Hg response could at the same time be decreased to 0.71 and 0.45 of the control dose. The mean carbon dioxide tension in the end tidal air decreased from 40 to 19 and 13 mm Hg respectively. A corresponding fall in carbon dioxide tension at a constant pH, on the other hand, caused a decrease of the noradrenaline effect in 4 cats and an increase in three cats. Only in 1 of these 3 cats was the increase similar to that obtained during a subsequent alkalosis.

Dose-response curves in a typical experiment are given in the Figure. Only uncompensated respiratory alkalosis was accompanied by a significant change. The control response of 50 mm Hg increased during the alkalotic



Cat 4.3 kg. Increase of perfusion pressure following i.a. injections of noradrenaline to the skinned hind leg perfused at a constant rate of flow (7.2 ml/min). o—o normal acid-base balance; —•— compensated metabolic acidosis; •—• uncompensated respiratory alkalosis.

period to 68 mm Hg and the dose producing a 50 mm Hg increase of the perfusion pressure could be decreased from 0.018 μg/kg to 0.0076 μg/kg.

The average increase of the pressure responses during alkalosis appeared to be of the same magnitude per pH unit as the decrease earlier described during respiratory acidosis<sup>5</sup>.

**Conclusions.** Respiratory alkalosis increases the overall response of skeletal muscle vessels to noradrenaline. An average pH change of 0.2 units is required to induce a noticeable change. The present results also suggest that the increase is primarily due to the pH change and not to the concomitant decrease in carbon dioxide tension.

A more detailed report of these studies will appear elsewhere<sup>6,7</sup>.

**Zusammenfassung.** Die respiratorische Alkalose steigert den Effekt des Noradrenalins auf Skelettmuskelgefäße. Eine durchschnittliche Steigerung des pH von 0.2 Einheiten wird benötigt, um eine merkliche Änderung herbeizuführen. Die vorliegenden Resultate lassen vermuten, dass die Steigerung in erster Linie auf die pH-Veränderung zurückzuführen ist und nicht auf die gleichzeitige Senkung der CO<sub>2</sub>-Spannung.

S. BYGDEMAN

Department of Physiology, Karolinska Institutet, Stockholm (Sweden), March 25, 1963.

<sup>5</sup> S. BYGDEMAN, *Nature (London)* 198, 491 (1963).

<sup>6</sup> *Acta physiol. scand.*

<sup>7</sup> Research grants from The Swedish National Association for Heart and Chest Diseases and from Knut and Alice Wallenbergs Foundation are gratefully acknowledged.

## Einfluss der Temperatur auf den Vitamin-C-Gehalt während des Wachstums von englischem Spinat (*Rumex patientia* L.)

Zur Frage der Abhängigkeit des Vitamin-C-Gehaltes verschiedener Spinatsorten von Jahreszeit und Vegetationsperiode konnten in Freilandversuchen für die Praxis der menschlichen Ernährung zwar aufschlussreiche Ergebnisse gewonnen werden; infolge der sich dauernd ändernden Umweltbedingungen ist es jedoch hierbei praktisch unmöglich, alle die Faktoren zu ermitteln, die für eine Veränderung des Vitamin-C-Gehaltes während des Wachstums der Pflanze verantwortlich sind. Das Arbeiten in Klimakammern (Phytotron) gestattet, alle Aussenbedingungen bis auf eine konstant zu halten und das Pflanzenmaterial so unter einem ganz bestimmten Gesichtspunkt während einer Vegetationsperiode zu untersuchen. Die Ergebnisse von Versuchen dieser Art gelten natürlich nur für die jeweils eingehaltenen Versuchsbedingungen und lassen sich nicht ohne weiteres auf praktische Verhältnisse übertragen. Nachfolgend wird über Ergebnisse von Versuchen berichtet, in denen der Einfluss der Temperatur auf den Gehalt an Vitamin C in Englischem Spinat überprüft wurde.

Die Versuche wurden im Phytotron der landwirtschaftlichen Fakultät der Universität Giessen in Rauisch-Holzhausen<sup>1</sup> durchgeführt.

Durchführung der Versuche: Als Pflanzenmaterial wurde *Rumex patientia* L. gewählt, eine Gemüsepflanze aus der Familie der Polygonaceen, die sich einmal durch

eine kurze Keimdauer und zum anderen durch einen hohen Vitamin-C-Gehalt auszeichnet<sup>2</sup>. Die Aussaat erfolgte am 5. Juli 1962 in zwei verschiedenen Klimakammern unter den folgenden Bedingungen:

1. Belichtungszeit: 17 h am Tage. Belichtungsstärke: 14000 Lux maximal. Tagestemperatur: 20°C; Nachttemperatur: 5°C.

2. Belichtungszeit und Belichtungsstärke wie bei 1. Tages- und Nachttemperatur konstant 20°C.

Zum Vergleich wurde im Freiland eine dritte Versuchsreihe mit dem gleichen Pflanzenmaterial zur gleichen Zeit angesetzt.

Die Vitamin-C-Bestimmungen wurden bei den 3 Versuchsreihen zweimal pro Woche parallel durchgeführt. Etwa von der vierten Untersuchungswoche an wurden, als es die Menge des Untersuchungsmaterials zuließ, Blattstiel und Blattspreite getrennt untersucht. Um den Vitamin-C-Gehalt mit den einzelnen Stufen des Pflanzenwachstums vergleichen zu können, wurden während der

<sup>1</sup> Herrn Prof. Dr. v. BOGUSLAWSKI, dem Direktor des Instituts für Pflanzenbau und Pflanzenzüchtung der Universität Giessen, danke ich verbindlichst für die Möglichkeit, im Phytotron seines Instituts arbeiten zu dürfen, Herrn Kustos Dr. BRETTSCHEIDER-HERRMANN für die freundliche Beratung und Überwachung der Klimaversuche.

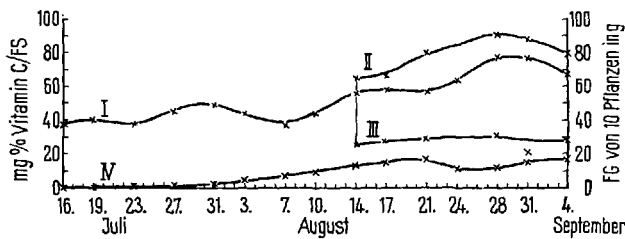
<sup>2</sup> A. SEYBOLD und H. MEHNER, *Über den Gehalt von Vitamin C in Pflanzen*. 10. Abhandlung, Tab. 27 (Springer Verlag, Heidelberg 1948).

ganzen Versuchsdauer die Durchschnittsgewichte von 10 bzw. 20 Pflanzen (ohne Wurzel) festgestellt, dazu der prozentuale Gewichtsanteil von Blattstiel und Blattspreite. Ferner wurde an den Untersuchungstagen die jeweilige maximale Länge von Blattstiel und Blattspreite sowie die Höhe der Gesamtpflanze und die Zahl ihrer Blätter ermittelt. Um eine eventuell aus der Tagesperiodizität stammende Schwankung der Vitamin-C-Werte auszuschalten, wurden die Ernteproben jeweils morgens um die gleiche Zeit entnommen. Für die Einzeluntersuchung wurden durchschnittlich 20 Pflanzen verarbeitet.

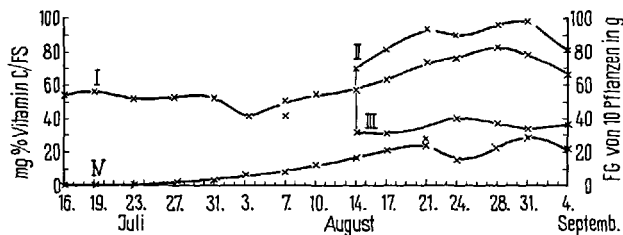
Die Bestimmung der Ascorbinsäure und Dehydroascorbinsäure erfolgte nach der Methode von TILLMANS<sup>3</sup> unter Zugabe von Metaphosphorsäure als Vitamin-C-Stabilisator.

**Versuchsergebnisse:** (A) Phytotronversuch bei 20°C Tag- und Nachttemperatur. (B) Phytotronversuch bei 20°C Tag- und 5°C Nachttemperatur. (C) Freilandversuch.

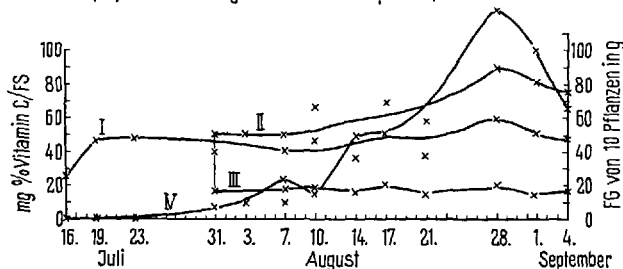
Das Gewicht der Einzelpflanzen nimmt bei beiden Phytotronversuchen von der Keimung bis zur siebten Wachstumswoche kontinuierlich zu. Von diesem Zeitpunkt an machen sich physiologische Alterungsprozesse verstärkt bemerkbar. Die Wachstumsrate nimmt ab, der Gewichtszuwachs der Einzelpflanzen wird teilweise dadurch rückläufig, dass die ältesten Blätter an der Basis der Pflanze absterben. Von den beiden Versuchsvarianten im Phytotron zeigt sich bei Versuch A infolge der höheren Bodenwärme eine schnellere Keimung der Samen als bei B, die in den ersten Tagen in einem größeren Gewichtszuwachs der Pflanzen resultiert. Dieser Vorsprung wird jedoch von den Pflanzen in Versuch B in ca. 10 Tagen ein-



Versuch A: (Phytotron 20°C Tag- und Nachttemperatur)



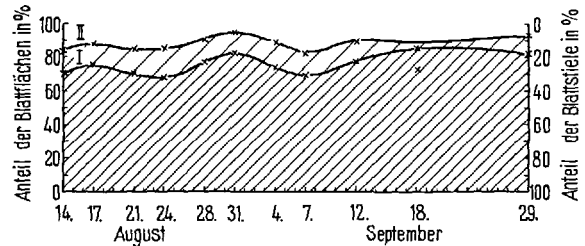
Versuch B: (Phytotron 20°C Tag- und 5°C Nachttemperatur)



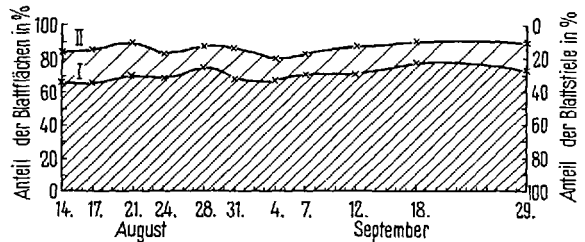
Versuch C: (Freilandversuch)

Fig. 1. (I) mg% Vitamin C in den Blättern, (II) in den Blattspreiten, (III) in den Blattstielen, (IV) Frischgewicht der Blätter von 10 Pflanzen in g.

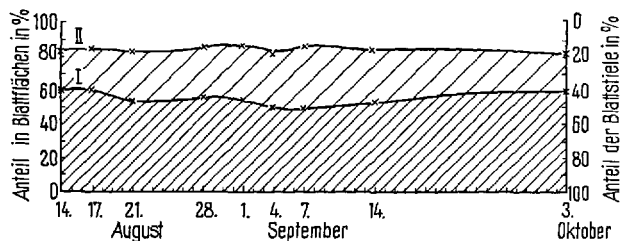
geholt und dann überschritten. Der Spinat aus Versuch B zeigt sich auch in der Folgezeit nicht nur gewichtsmässig, sondern auch in Bezug auf das Wachstum dem Versuch A überlegen.



Versuch A: (Phytotron 20°C Tag- und Nachttemperatur)



Versuch B: (Phytotron 20°C Tag- und 5°C Nachttemperatur)



Versuch C: (Freilandversuch)

Fig. 2. Beispiel: Versuch A. Am 14. August entfallen 70 Gewichtsprozente des Blattes auf die Blattspreite (Kurve I); darin sind 84% des gesamten Vitamin-C-Gehaltes enthalten (Kurve II). Die gleiche Abbildung zeigt von oben nach unten gelesen, dass in 30% Blattstielen nur 16% des Vitamin-C-Gehaltes enthalten sind.

Betrachtet man die Durchschnittsfrischgewichte der Einzelpflanzen im Laufe von 7 Wochen, so zeigt sich, dass diese im Versuch B um 28,0% höher liegen als im Versuch A. Der Trockensubstanzgehalt steigt mit dem Wachstum der Pflanzen an und ist bei beiden Versuchsreihen praktisch gleich. Er beträgt in der ersten Woche rund 6% und in der siebten Woche rund 10–12%. Die Mittelwerte betragen für A 8,5% und für B 8,1% Trockensubstanz. Von Anfang an ist das Wachstum der Einzelpflanze in den Freilandversuchen zwar viel schneller als in dem Phytotronversuch, aber wesentlich unregelmässiger. Es steigt je nach den Witterungsverhältnissen von einer Untersuchung zur anderen oft sprunghaft an. Im Vergleich zu Versuch B liegt das Durchschnittsfrischgewicht der Freilandpflanzen bei 7 Wochen um 113% höher. Demgegenüber beträgt der mittlere Trockengehalt der Spinatpflanzen nur 6,8% gegenüber 8,5% bzw. 8,1% bei den beiden Phytotronversuchen.

Wie aus Figur 1 hervorgeht, steigt der Vitamin-C-Gehalt der 3 Versuchsvarianten mit zunehmendem Alter der Pflanzen an. Während der dritten Woche erfolgt trotz

<sup>3</sup> J. TILLMANS, Z. Unters. Lebensm. 54, 33 (1927).

zunehmenden Wachstums und Gewichtszunahme ein Rückgang des Vitamin-C-Gehaltes in die Nähe der Ausgangswerte. Von der vierten Woche ab erfolgt dann wieder ein kräftiger Anstieg, der sich bei den Blattspalten bis zum Ende der Versuchswoche fortsetzt, während die Blattstiele erstaunlicherweise ihren Vitamin-C-Gehalt während dieser Zeit, abgesehen von kleinen Schwankungen, beibehalten. Für die Gesamtpflanze (ohne Wurzel) ergibt sich so eine gegenüber den Blattspalten zwar abgeschwächte, im ganzen aber eine mit dem Wachstum und der Gewichtszunahme der Pflanzen parallel gehende ansteigende Tendenz. So zeigen sich die Pflanzen des Versuchs B mit einem Anfangsgehalt an Vitamin C von 54 mg% in der Frischsubstanz den beiden anderen Varianten überlegen, A = 35 mg%, C = 25,4 mg%. Im Durchschnitt der ersten sieben Wachstumswochen enthalten die Pflanzen des Versuchs A gegenüber B 17,4%, gegenüber dem Freilandspinat 24% mehr Vitamin C in der Frischsubstanz. Auf Trockensubstanz umgerechnet betragen die Zahlen entsprechend 21,4%, aber nur 8,5% bei dem Freilandspinat wegen des geringen Trockensubstanzgehaltes von durchschnittlich 6,8% (Figur 1).

Ein Vergleich der prozentualen Anteile von Blattstiel und Blattspalte mit der darin enthaltenen Vitamin-C-Menge zeigt besonders deutlich die unterschiedliche Verteilung des Vitamin C innerhalb des Pflanzenkörpers (Figur 2).

So liegt der Blattspaltenanteil im Durchschnitt im Versuch B bei 70,6%, im Versuch A bei 76,4% und im

Freilandversuch bei 55,8%. Dementsprechend enthalten die Blattspalten 86,5, 87,1 und 84,3% des Gesamt-vitamin-C-Gehaltes. Auffallend ist, dass – bezogen auf das Frischgewicht – bei allen 3 Versuchsreihen stets 86%  $\pm$  2% des Vitamin-C-Gehaltes in den Blattspalten gefunden werden.

Weitere Ergebnisse der Untersuchung, insbesondere der Vergleich mit den beiden anderen Spinatsorten Matador (*Spinacea oleracea* L.) und Neuseeländischer Spinat (*Tetragonia expansa* L.) sollen in einer späteren Veröffentlichung ausführlicher dargestellt werden.

**Summary.** Growth and ascorbic acid content of English spinach (*Rumex patientia* L.) were determined during a period of 7 weeks in the phytotron and also in the open field in relation to temperature. As compared with constant warm temperature, a low average temperature in the phytotron resulted in significantly increased plant weights and increased ascorbic acid contents. The results of the open field studies showed great deviations in plant weight and ascorbic acid content, due to meteorological conditions. Generally, the content of ascorbic acid in spinach increased with the growth of the plants.

E. MUSKAT

*Institut für Ernährungswissenschaft und Botanisches Institut der Justus-Liebig-Universität Giessen (Deutschland), 1. März 1963.*

### Chromatographic Separation of an Inhibitor Reversibly Associated with Fibrinolysin in the Serum of Guinea-Pig

It is widely accepted that activation of fibrinolytic activity from plasminogen is effected by a variety of enzymatic and non-enzymatic factors. The fibrinolytic system of serum of the guinea-pig can be activated by well defined substances such as acid polysaccharides, both natural and synthetic (SERAFINI-CESSI<sup>1</sup>, OLESEN<sup>2,3</sup>). Euglobulins precipitated from fresh serum at low ionic strength, pH 5.2, are usually inactive. In previous experiments it has been shown that after reaction with chondroitin sulphuric acid or hyaluronic acid at pH 5.2 they become fibrinolytic. Chondroitin sulphuric acid and hyaluronic acid<sup>1-3</sup> precipitate an additional globulin fraction otherwise soluble at pH 5.2 and enzymatically very active. Cellulose sulphate unlike other polysaccharides activates plasminogen of the guinea-pig outside the isoelectric precipitation, i.e. by simple addition to a neutral solution of euglobulins from serum.

One possible mechanism of activation effected by acid polysaccharides could be the removal of an inhibitor normally bound to the enzyme at some stage of the activation process. The experiments referred to in this paper support the view that activation by acidic polyelectrolytes rests upon the reversible dissociation of an inhibitor from the enzyme. Some evidence is offered that the polyacid binds the inhibitor releasing the enzyme in an active form. The inhibitor, separated by ion-exchange chromatography, still retains its power and inhibition of the active fraction can be obtained by simple addition of the former. The conditions of interaction between the system inhibitor-fibrinolytic enzyme and cellulose sulphates are also investigated.

Cellulose monosulphate was prepared according to RICKETTS<sup>4</sup>, contained 12% sulphur, the intrinsic viscosity

was  $[\eta] = 420$  and the molecular weight ( $M_w$ , determined by light scattering) 475,000. S<sup>35</sup>-labelled cellulose monosulphate at specific activity of 0.2  $\mu$ C per mg was obtained by addition of dry active sodium sulphate to chlorosulphonic acid before dissolving it in pyridine.

The globulin fraction containing the fibrinolytic enzyme in an inactive form (plasminogen) was separated from serum of guinea-pigs by addition of 20 vol distilled water and enough acetic acid to take pH 5.2. The precipitated globulins were redissolved in 0.05M phosphate buffer pH 7.0; the concentration of proteins was determined photometrically at 280 m $\mu$  and the fibrinolytic activity by measuring the areas of digestion on films of fibrin (SERAFINI-CESSI<sup>1</sup>). Only 15% of samples showed activity at this stage and were discarded. Samples without spontaneous activity were activated by addition of 1 to 50  $\mu$ g cellulose sulphate per ml of neutral solution and the activity determined on films of fibrin. Within narrow limits the degree of activation is proportional to the amount added. After maximum activation is reached, further addition of polyacid is ineffective (Figure 1).

One possible mechanism of activation of fibrinolysin by polyacids is the separation of an inhibitor from the enzyme. This hypothesis was checked by chromatographic fractionation of the euglobulins on a column (cm 1  $\times$  12) of Amberlite IRC-50 (200–400 mesh) washed with 1N HCl and then 0.05M phosphate pH 7.0. Approximately 20 mg of freshly precipitated globulins dissolved in 0.05M phosphate were adsorbed and elution carried out with 100 ml 0.05M phosphate pH 7.0 followed by 100 ml 0.2M phosphate pH 7.0. The rate of flow was adjusted at 1 ml

<sup>1</sup> F. SERAFINI-CESSI, Lo Sperimentale 109, 535 (1959).

<sup>2</sup> E. S. OLESEN, Acta pharmacol. toxicol. 15, 307 (1959).

<sup>3</sup> E. S. OLESEN, Acta pharmacol. toxicol. 16, 38 (1959).

<sup>4</sup> C. R. RICKETTS, Biochem. J. 51, 129 (1952).