

THIAMINE ET DITHIOPROPYLTHIAMINE*

ÉTUDE DE LEUR METABOLISME PAR MARQUAGE AU SOUFRE 35 CHEZ LA SOURIS ET LE RAT

YVES COHEN, ANDRÉ UZAN et GUILLAUME VALETTE

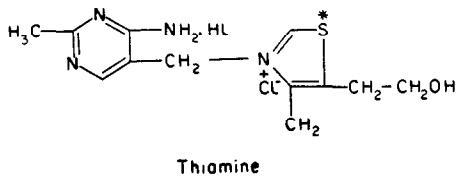
Commissariat à l'Energie Atomique et Faculté de Pharmacie de Paris Laboratoire de
Pharmacodynamie

(Received 19 March 1962; accepted 12 April 1962)

Abstract—The comparative study of the metabolism of thiamine and dithiopropylthiamine in mice and rats has been carried out using ^{35}S -labelled tracers and autoradiographic methods.

A comparison of the metabolism of these compounds with vitamin B_1 activity suggests that there is only a quantitative difference between their biological properties.

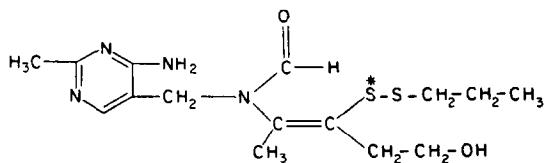
IL EST connu que la thiamine est douée de propriétés antinévritiques dont les applications thérapeutiques sont limitées par suite d'une faible absorption intestinale liée au caractère hydrosoluble de cette vitamine.



Thiamine

La distribution et l'élimination de la thiamine ont été étudiées par des méthodes chimiques qui font appel à la réaction du thiochrome,¹⁻³ et tout récemment par des méthodes radioactives à l'aide de soufre 35.⁴⁻⁷

La dithiopropylthiamine synthétisée par Matsukawa^{8, 9}, est un dérivé liposoluble de la vitamine B_1 qui conserve les mêmes propriétés vitaminiques.



Dithiopropylthiamine

* Communicated to the First International Pharmacological Meeting, Stockholm, August 22-25, 1961.

La dithiopropylthiamine se distingue de la thiamine par l'ouverture du cycle thiazolique avec fixation sur l'atome de soufre d'un radical sulfure de propyle. Cependant, administrée par voie orale, elle entraîne l'apparition dans le sang d'un composé dosable par la réaction du thiochrome, et une élévation de l'activité cocarbaxylasique du foie, que l'un de nous a montré être bien plus importante que celle provoquée par la thiamine.¹⁰

Il nous a paru intéressant de rechercher la cause de cette différence d'activité, par l'étude comparative du métabolisme de la thiamine et de la dithiopropylthiamine. Celle-ci ne pouvait se faire de façon étroite que grâce à l'utilisation de molécules marquées au soufre 35.

L'utilisation de thiamine ³⁵S et de dithiopropylthiamine ³⁵S nous a permis de suivre le cheminement des deux molécules dans tous les organes de la Souris, de mesurer leur concentration dans les principaux organes du Rat, d'évaluer l'importance de l'élimination urinaire, et enfin, d'identifier la molécule dont on suivait le métabolisme.

METHODES

Préparation des molécules marquées

Le chlorhydrate de thiamine ³⁵S est préparé par le procédé de Wursch,¹¹ avec une activité spécifique initiale de 74,4 μ c/mg à la date de son utilisation. Sa pureté est contrôlée par chromatographie sur papier.

Une partie de ce produit est utilisée pour la préparation de dithiopropylthiamine ³⁵S par microsynthèse.¹² Le produit obtenu présente une activité spécifique de 50,2 μ c/mg.

Les deux substances marquées sont conservées sous vide au réfrigérateur. Compte tenu de la décroissance du soufre 35, leur activité est contrôlée régulièrement de façon à préparer, au moment de l'emploi, par dilution isotopique, des solutions ayant un même titre et une même activité spécifique.

Étude chez la Souris

Nous avons comparé, de façon qualitative, la répartition, chez la Souris, du soufre 35, après administration orale de thiamine et de dithiopropylthiamine marquées.

La méthode utilisée est la méthode d'autoradiographie sur coupes de souris entières^{13, 15}. Notre étude porte sur plus de 48 souris et 360 autoradiographies.

Méthode autoradiographique. Différents temps après administration du corps marqué, les souris de 15 à 20 g sont tuées par immersion dans l'azote liquide à — 195 °C puis débitées au microtome à congélation en coupes de 30 μ d'épaisseur, parallèles au plan sagittal du corps du rongeur. Ces coupes, collées sur un support adhésif, sont desséchées au froid à — 20 °C, puis appliquées sur film radiographique (Kodirex ou Définix) dont le noircissement correspond aux aires de radioactivité. On choisit les coupes de façon qu'elles passent systématiquement au niveau des principaux organes.

Nous avons effectué des expériences préliminaires ayant pour but de déterminer, pour l'isotope employé, les conditions les plus favorables à préparation d'autoradiographies. Nous avons repris, pour cela, la technique décrite par l'un de nous¹⁴ à propos du radiosulfate de sodium marqué au ³⁵S.

Par sondage gastrique, les souris reçoivent 12 μc de produit marqué (thiamine ou dithiopropylthiamine), en solution aqueuse. Elles sont tuées à des temps échelonnés : 30 minutes, 1 heure, 2 heures, 4 heures, 5 heures, 6 heures, 24 heures, 48 heures, 72 heures, 120 heures.

Chacun de ces temps fait l'objet d'une expérience au cours de laquelle on administre, simultanément à des souris de même poids, la thiamine ^{35}S d'une part, la dithiopropylthiamine d'autre part, à raison de deux souris par produit et par temps.

Pour rendre plus encore les résultats comparatifs, nous réalisons au moment de l'application des coupes sur les films, des films mixtes comprenant à la fois des coupes de souris ayant reçu la thiamine et des coupes de souris ayant reçu la dithiopropylthiamine.

Le temps de contact, déterminé au cours des expériences préliminaires, est de 40 heures pour les films Kodirex et de 7 jours pour les films Définix.

Cette étude qualitative permet de retracer l'évolution dans l'organisme de la souris, des substances étudiées, par échelonnement de la durée de survie des animaux.

L'emploi simultané des deux produits, permet de comparer l'importance de leur absorption, de leur fixation et de leur élimination chez la souris.

Méthode analytique du soufre 35 repéré par autoradiographie. Il convient de chercher à savoir sous quelle forme se retrouve, dans les organes, le soufre 35 de la thiamine et de la dithiopropylthiamine, repéré précédemment par autoradiographie.

C'est au niveau du foie que se situe l'aire de noircissement optimal des autoradiogrammes pour l'un et l'autre des deux produits.

Des foies de souris, ayant reçu respectivement la thiamine et la dithiopropylthiamine marquées, sont prélevés et broyés en milieu trichloracétique dans des conditions déjà précisées par l'un de nous pour la détermination du taux de cocarboxylase hépatique.¹⁰

Le mélange de chromatographie *n*-butanol, tampon acétate de sodium 1 M pH 5, eau distillée (65 : 15 : 20) est utilisé comme phase solvante en chromatographie descendante avec du papier Whatman No. 2.

Le développement du chromatogramme se fait en 10 heures. L'isotope est repéré par enregistrement des chromatogrammes.

Cette étude analytique permet de savoir à quelles molécules correspondent les images autoradiographiques obtenues précédemment.

Étude chez le Rat

Cette étude porte sur des rats Whistar de sexe mâle pesant entre 150 et 200 g.

La thiamine et la dithiopropylthiamine sont administrées par sondage gastrique, en solution aqueuse. Ces solutions titrent 1 mg par ml et ont une concentration radioactive égale à 30 μc par ml, pour la première série, d'expériences, et 23 μc par ml, pour la série suivante.

Les animaux sont tués par saignées à des temps échelonnés : 5 heures, 7 heures, 24 heures, 192 heures.

Chaque expérience comporte, pour un même temps, l'administration simultanée de thiamine et de dithiopropylthiamine à des rats de même poids, à raison de deux rats par produit et par temps.

Les organes sont prélevés, pesés à l'état frais et broyés finement dans un volume connu d'eau distillée.

Un poids déterminé de broyat est étalé sur des coupelles tarées. La radioactivité est mesurée ensuite à l'aide d'un compteur de Geiger-Müller à fenêtre de masse superficielle inférieure à 2 mg/cm^2 . Les mesures sont effectuées au même compteur et dans la même journée.

Cette étude quantitative permet de connaître la quantité de soufre 35 fixée au bout d'un certain temps, dans chaque organe.

De façon à exprimer ce résultat en proportion de la dose administrée, nous étalonons le compteur par la mesure de son rendement dans les conditions expérimentales. Pour cela, nous réalisons des broyats inactifs de foie, de cœur, de cerveau et de reins, et nous y incorporons des activités connues de la solution de thiamine et de dithiopropylthiamine à administrer aux rats.

L'étude de l'élimination urinaire du soufre 35 permet de mesurer l'importance de l'absorption intestinale ainsi que la rapidité d'élimination des produits administrés.

Pour recueillir les urines, les rats sont placés dans des cages à métabolisme en verre. Le volume urinaire de 24 heures est noté et une partie aliquote sert à la mesure de la radioactivité.

L'étude quantitative de la répartition chez le rat, du soufre 35 de la thiamine et de la dithiopropylthiamine, permet de vérifier les images autoradiographiques obtenues chez la souris.

RESULTATS

Étude chez la Souris

(a) *Autoradiographie.* L'aspect des autoradiogrammes des souris ayant ingéré la thiamine et la dithiopropylthiamine marquées au soufre 35, montre que ces produits se distribuent dans l'organisme de façon comparable, mais avec un échelonnement et une intensité différentes.

Les Tableaux 1 et 2 décrivent les images radiographiques obtenues.

Le soufre 35 de la thiamine est partiellement absorbé par la muqueuse intestinale et éliminé par les urines. Il apparaît précocement dans la glande hépatique qui est constamment la plus marquée. C'est au bout de 24 heures que le myocarde et les graisses brunes interscapulaires des rongeurs deviennent actifs.

Quant à l'axe cérébrospinal, son noircissement est très léger et se confond dans la plupart des clichés avec le fond des images.

Le soufre 35 de la dithiopropylthiamine est également absorbé par la muqueuse intestinale et éliminée par les urines; le foie est très marqué.

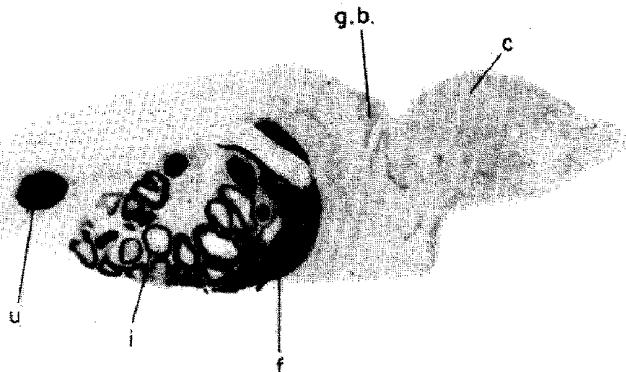
Dès la première heure après l'ingestion, le poumon et le sang sont actifs, mais leur noircissement s'atténue rapidement.

Vers la cinquième heure, le myocarde et les graisses interscapulaires deviennent actifs.

La moelle et le cerveau commencent à se marquer vers la cinquième heure, pour atteindre un maximum vers la vingtquatrième heure.

Dans Fig. 1, sont groupées les autoradiographies de souris tuées cinq heures et vingt quatre heures après ingestion de thiamine d'une part, de dithiopropylthiamine d'autre part.

(a)



(b)

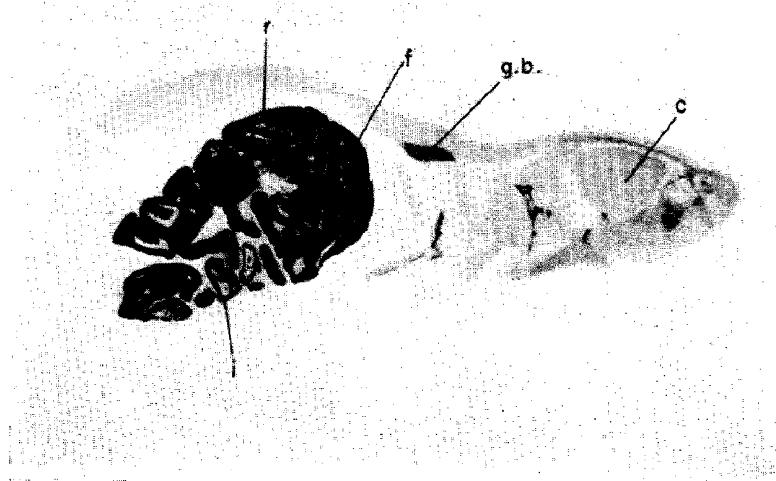


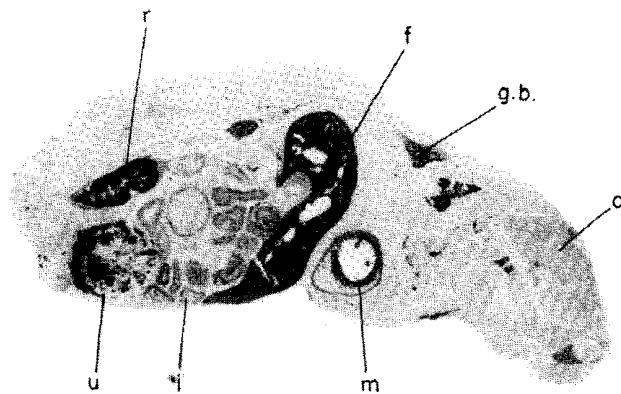
FIG. 1. Autoradiographies de coupes de souris entières. Répartition de la radioactivité après administration orale de thiamine ou de dithiopropylthiamine.

A. Thiamine—5 heures après ingestion.

B. Dithiopropylthiamine—5 heures après ingestion.

c, cerveau; f, foie; g.b., graisse brune interscapulaire; i, intestin; m, myocarde; r, reins; u, urine.

(c)



(d)

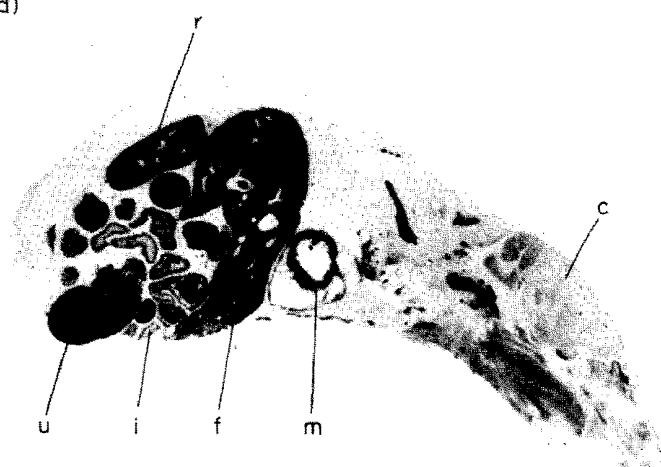


FIG. 1. (contd.)

C. Thiamine—24 heures après ingestion.

D. Dithiopropylthiamine—24 heures après ingestion.

c, cerveau; f, foie; g.b., graisse brune interscapulaire; i, intestin; m, myocarde; r, reins; u, urine.

Les images obtenues avec la dithiopropylthiamine montrent une activité dans l'organisme, plus importante que pour la série homologue des animaux ayant reçu la thiamine.

TABLEAU 1. AUTORADIOGRAPHIES DE SOURIS APRÈS ADMINISTRATION PAR VOIE ORALE DE THIAMINE ^{35}S

Souris No.	Temps de survie	Dose administrée (μc)	Description de l'image radiographique		
			Noircissement nul	Noircissement faible	Noircissement net
a b	30 min	12	Squelette. Cerveau Myocarde	Poumon	Foie-reins-intestins matières fécales
a b	1 hr	12	Squelette. Cerveau Myocarde		Foie-reins-intestin urine-mat. féc.
a b	2 hr	12	Squelette. Cerveau Myocarde		Foie-reins-intestins urine-mat. féc.
a b	4 hr	12	Squelette. Cerveau Myocarde	Graisse interscapulaire	Foie-reins-intestins
a b c	5 hr	12	Squelette. Cerveau	Graisse interscapulaire Myocarde	Foie-reins-intestins urine
a b	6 hr	12	Squelette	Graisse interscapulaire Myocarde	Foie-reins-intestins -urine
a b c d e	24 hr	12	Squelette	Cerveau	Foie-reins-urine- urine Myocarde- Graisse interscapulaire
a	48 hr	12	Squelette	Cerveau	Foie-rein- myocarde graisse
a b c	72 hr	12	Squelette	Cerveau	Foie-reins- myocarde- graisse interscapulaire
a b	120 hr	12	Squelette	Cerveau Graisse interscapulaire	Foie-reins- myocarde

(b) *Identification de la molécule radioactive.* Les chromatogrammes obtenus à partir de foies de souris ayant reçu la thiamine et la dithiopropylthiamine, donnent tous deux un seul pic dont le R_f est le même que celui de la thiamine (Fig. 2).

Cinq heures après ingestion des produits marqués, l'isotope se trouve donc, dans le foie sous forme de thiamine.

Pour la thiamine comme pour la dithiopropylthiamine, le soufre 35 reste, chez la souris, incorporé à la molécule de vitamine B₁.

Ces résultats démontrent que, dans l'organisme, la thiamine n'est pas dégradée et que la dithiopropylthiamine se transforme en thiamine. Ils confirment la relation trouvée entre l'élévation du taux de thiamine et de cocarboxylase hépatique et l'ingestion de dithiopropylthiamine.¹⁰

On peut également remarquer que la répartition du soufre 35 est ici fort différente de celle observée par l'un de nous après ingestion de radiosulfate de sodium.¹¹

TABLEAU 2. AUTORADIOGRAPHIES DE SOURIS APRÈS ADMINISTRATION PAR VOIE ORALE DE DITHIOPROPYLTHIAMINE ^{35}S

Souris No.	Temps de survie	Dose administrée (μc)	Description de l'image radiographique		
			Noircissement nul	Noircissement faible	Noircissement net
a b	30 min	12	Squelette Cerveau Myocarde	Graisse interscapulaire	Poumons-foie-reins intestins
a b	1 hr	12	Squelette. Cerveau Myocarde	Sang-Graisse interscapulaire	Foie-rein-intestin urine-mat. féc.
a b	2 hr	12	Squelette. Cerveau Myocarde	Sang-graissse interscapulaire	Foie-rein-intestin urine
a b	4 hr	12	Squelette. Cerveau Myocarde		Foie-reins-intestin -vésicule biliaire -graissse inter-scapulaire
a b c	5 hr	12	Squelette	Cerveau	Myocarde- Foie-reins- intestins-urine graissse inter- scapulaire
a b	6 hr	12	Squelette	Cerveau	Myocarde- Foie-reins- intestins-urine graissse inter- scapulaire
a b c d e	24 hr	12	Squelette		Cerveau-myocarde foie-rein-urine graissse inter- scapulaire
a	48 hr	12	Squelette	Intestin	Cerveau-myocarde foie-reins- graissse
a b c	72 hr	12	Squelette	Intestin	Cerveau-myocarde Foie-reins- graissse
a b	120 hr	12	Squelette		Cerveau-myocarde Foie-rein- Graisse

Étude chez le Rat

(a) *Bilan dans l'organisme.* Les tableaux 3 et 4 indiquent le pourcentage de radioactivité dans les organes du rat, après ingestion de thiamine et de dithiopropylthiamine marquées.

La proportion de radioactivité retenue au total dans le foie, le cœur, le cerveau et les reins, ne dépasse jamais 10 p. 100 de la dose administrée et se situe le plus souvent entre 0,1 et 5 p. 100.

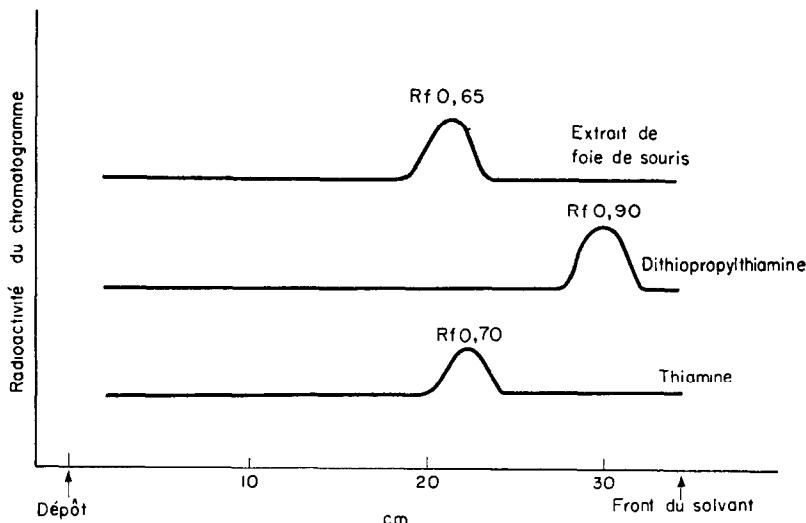


FIG. 2. Enregistrement de la radioactivité de chromatogrammes de thiamine³⁵S, de dithiopropylthiamine³⁵S, et d'extraits hépatiques provenant de souris ayant reçu soit de la thiamine³⁵S, soit de la dithiopropylthiamine³⁵S.

La radioactivité du foie est très nettement supérieure à celle des autres organes. Elle décroît dans le temps pour la thiamine, et la dithiopropylthiamine. Au contraire, dans le cœur et le cerveau, le phénomène est différent pour la thiamine et la dithiopropylthiamine:

(a) Pour la thiamine, la radioactivité est minime et presque négligeable au début pour croître très légèrement après 24 heures, jusqu'à une proportion de 1 à 2 pour mille.

(b) Pour le dithiopropylthiamine, cette proportion de 1 à 2 pour mille est atteinte dès les premières heures et se maintient d'une façon prolongée.

La figure 3 montre que si l'on compare à chaque temps, les deux substances, on constate que:

(a) À la cinquième et la septième heures, la proportion de radioactivité est nettement plus élevée avec la dithiopropylthiamine, pour tous les organes, 30 à 50 p. 100 en moyenne, de plus, dans le foie, et 50 à 100 p. 100 pour le cœur et le cerveau.

(b) Après 24 heures, la proportion reste toujours élevée en faveur de la dithiopropylthiamine, de l'ordre de 25 p. 100 en moyenne pour le foie, et de 30 à 50 p. 100 pour le cœur et le cerveau.

TABLEAU 3. RÉPARTITION DANS LES ORGANES DU RAT, DE LA RADIOACTIVITÉ EXPRIMÉE EN P. 100 DE LA DOSE ADMINISTRÉE,
APRÈS INGESTION DE THIAMINE MARQUÉE AU SOUFRE 35

Temps	Doses administrées	Rats	Activité totale par organe	Foie		Cœur		Cerveau		Réin
				(mg)	(μ C)	No.	Activité gramme d'organe frais	Activité totale	Activité gramme	
5 hr	1	23	a b	2,2 1,4	0,30 0,21	0,058	0,098	0,062 0,041	0,030 0,030	0,51 0,38
	1	27	a b	4,2 3,8	0,58 0,39	0,097 0,036	0,15 0,050	0,086 0,062	0,055 0,038	0,54 0,21
	7 hr	1	30	a	2,2	0,37	0,059	0,098	0,088	0,063
24 hr	1	30	a b c	1,5 1,36 1,61	0,27 0,15 0,25	0,091 0,107 0,045	0,20 0,12 0,064	0,092 0,036 0,066	0,060 0,033 0,043	0,34 0,20 0,27
	1	23	a b	2,1 3,02	0,36 0,64	0,22 0,12	0,36 0,23	0,18 0,23	0,13 0,44	0,49 0,58
	1	30	a	1,28	0,20	0,13	0,17	0,12	0,094	0,33 0,52
8 j.	1	23	a b	0,77 1,2	0,09 0,11	0,12 0,08	0,24 0,14	0,10 0,12	0,067 0,076	

TABLEAU 4. RÉPARTITION DANS LES ORGANES DE RAT, DE LA RADIODACTIVITÉ EXPRIMÉE EN P. 100 DE LA DOSE ADMINISTRÉE, APRÈS INGESTION DE DITHIOPROPYLTHIAMINE MARQUÉE AU SOUFRE 35

Temps	Doses administrées (mg)	Rats	Activité totale par organe	Activité gramme d'organe frais	Foie		Cœur		Cerveau		Rein	
					No.		Activité totale gramme	Activité gramme	Activité totale gramme	Activité gramme	Activité totale gramme	Activité gramme
5 hr	1	23 a	3,8	0,60		0,204	0,29	0,12	0,080	0,84	0,57	
		b	4,05	0,59				0,23	0,13			
	1	27 a	5,4	0,79		0,11	0,20	0,14	0,099	0,64	0,26	
7 hr	1	30 a	3,7	0,60		0,17	0,30	0,10	0,072			
		b	7	0,69		0,098	0,17	0,11	0,074	0,75	0,60	
	1	30 a	1,3	0,19		0,13	0,20	0,10	0,073	0,39	0,28	
24 hr		b	2,7	0,29		0,17	0,23	0,12	0,074	0,37	0,24	
	1	c	1,8	0,24		0,14	0,21	0,096	0,10	0,42	0,29	
	1	23 a	2,7	0,61		0,19	0,48	0,20	0,13	0,70	0,24	
8 j.	1	30 a	1,6	0,28		0,15	0,25	0,17	0,11			
		b	2,9	0,71		0,22	0,35	0,34	0,21			
	1	23 a	2	0,25		0,099	0,16	0,12	0,098			
		b	0,88	0,11		0,14	0,25	0,19	0,12			

L'identification par chromatographie de la molécule radioactive qui se trouve dans le foie du Rat après ingestion des deux produits, confirme l'observation faite chez la Souris: la dithiopropylthiamine est transformée dans l'organisme du Rat en thiamine.

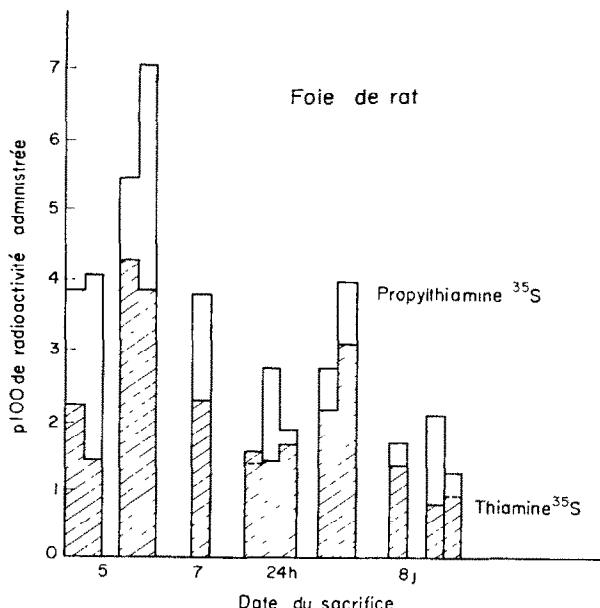


FIG. 3. Evolution de la répartition de la radioactivité dans le foie du Rat après administration par voie orale, d'une même dose de thiamine ³⁵S ou de dithiopropylthiamine ³⁵S.

(b) *Elimination urinaire.* L'élimination urinaire de la radioactivité (Tableau 5) est de 15 à 25 p. 100 de la dose administrée pour la thiamine, et de 40 à 60 p. 100 avec la dithiopropylthiamine, au cours des 24 premières heures.

Comme les expériences précédentes montrent que la teneur en traceur radioactif dans les organes est plus élevée pour la dithiopropylthiamine que pour la thiamine, il

TABLEAU 5. ELIMINATION URINAIRE, AU COURS DES 24 PREMIÈRES HEURES, CHEZ LE RAT, DE LA RADIOACTIVITÉ EXPRIMÉE EN P. 100 DE LA DOSE ADMINISTRÉE, APRÈS INGESTION DE THIAMINE ET DE DITHIOPROPYLTHIAMINE MARQUÉES AU SOUFRE 35

Produit administré	Dose administrée (μ c)	Rat no.	Volume urinaire des 24 heures (ml)	Activité totale exprimée en p. 100
Thiamine	30	a	4,5	26
		b	3	24
Dithiopropylthiamine	23	a	2,5	27
		b	3	15
	30	a	4	42
		b	5	48
	23	a	3	57
		b	4,5	38

est permis de penser que l'élimination urinaire est le reflet de l'absorption intestinale et par conséquent que la dithiopropylthiamine est plus fortement absorbée par voie digestive que la thiamine.

Cette étude quantitative confirme l'observation des images autoradiographiques chez la Souris et montre que chez le Rat, la dithiopropylthiamine entraîne une radioactivité des organes plus importante que dans la série homologue des animaux ayant reçu la thiamine.

CONCLUSION

L'étude comparative du métabolisme de la thiamine et de son dérivé la dithiopropylthiamine, administrées par voie orale chez la Souris et chez le Rat, a été effectuée à l'aide de traceurs marqués au soufre 35.

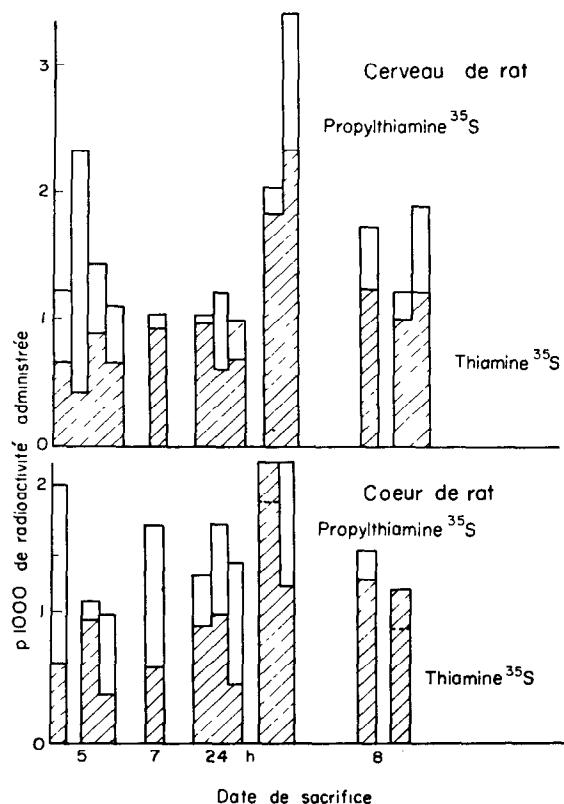


FIG. 4. Evolution de la répartition de la radioactivité dans le cerveau et le cœur du Rat après administration par voie orale d'une même dose de thiamine ^{35}S ou de dithiopropylthiamine ^{35}S .

Chez la Souris

(1) La méthode d'autoradiographie nous a permis de suivre la distribution de la radioactivité dans tous les organes dont quelques uns se chargent préférentiellement : le foie, le rein sont fortement actifs. Le myocarde, les graisses interscapulaires et le cerveau retiennent la radioactivité de façon moindre.

(2) La démonstration de la transformation de la dithiopropylthiamine en thiamine, est apportée par l'analyse chromatographique des substances radioactives trouvées dans le foie.

Chez le Rat

(1) La mesure de la radioactivité dans les organes suivants: foie, rein, cœur, cerveau, confirment les résultats qualitatifs obtenus chez la Souris par autoradiographie.

Dans le foie, la radioactivité tend à décroître; dans le rein, elle reste relativement basse; au contraire dans le cerveau et le cœur elle croît progressivement dans les vingt-quatre heures. Après administration de dithiopropylthiamine, la radioactivité est constamment plus élevée que par ingestion de thiamine.

(2) L'étude de l'élimination de la radioactivité dans les urines des premières vingt-quatre heures, montre une excréition plus importante pour la dithiopropylthiamine que pour la thiamine. Ce fait est à attribuer à une meilleure absorption intestinale de la dithiopropylthiamine.

La comparaison du métabolisme de ces deux dérivés à activité vitaminique B₁ nous conduit à penser que la différence de leurs propriétés biologiques est essentiellement d'ordre quantitatif.

BIBLIOGRAPHIE

1. T. MATSUKAWA, T. IWATSU et H. KAWASAKI, *J Pharm. Soc. Japan* **73**, 497 (1953).
2. M. FUJIWARA, H. WATANABE et K. MATSUI, *J. Biochem., Tokyo* **41**, 29 (1954).
3. M. FUJIWARA, H. NANJO, T. ARI et S. ZIRO, *J. Biochem., Tokyo* **41**, 273 (1954)
4. B. GASSMANN, D. LEXOW et D. EHRT, *Biochem. Z.* **332**, no. 5, 449-457 (1960).
5. J. V. KHMELEVSEIJ, *Ukrain Biokh. Zh.* **30**, no. 5, 732-741 (1958).
6. L. K. BAUMAN, *Vop. Mod. Klin.* 1, 323-326 (1955).
7. M. J. VERRETT et L. R. CERECEDO, *Proc. Soc. Exp. Biol., N. Y.* **98**, 509 (1958).
8. T. MATSUKAWA et S. YURUGI, *Proc. Jap. Acad.* **28**, 146 (1952).
9. T. MATSUKAWA, H. KAWASAKI, T. IWATSU et S. YURUGI, *J. Vitaminol. Japan*, **1**, 13 (1954).
10. D. HILO, R. TIXIER et A. UZAN, *Bull. Soc. Chim. Biol.* **41**, 1075 (1959).
11. J. WURSCH, *Helv. Chim. Acta* **16**, 8 (1958).
12. B. GAUTIER, A. UZAN et L. PICHAUD, *Bull. Soc. Chim., Fr.* 8/9, 1559 (1960)
13. Y. COHEN et H. DELASSUE, *C.R. Soc. Biol., Paris* **153**, 300 (1959).
14. Y. COHEN et H. DELASSUE, *C.R. Soc. Biol., Paris* **153**, 999 (1959).
15. S. ULLBERG, *Acta Radiol. Scand. suppl.* 118 (1954).