

Tabelle I

Adsorbend		Lösungsmittel	% adsorbiert durch			geprüfte Pektine (vgl. Tabelle II)
Substanz	Verdünnung		Tierkohle	Bolus	Pektine	
Anilin	10 ⁻³	Äthanol	29	1,5	0,7–1,5	7, 9, 12
Anilin	10 ⁻³	Benzol	40	6	1,4–4,1	1–12
Auramin	10 ⁻⁵	Äthanol	100	22	0	1–12
Benzoessäure	10 ⁻³	Äthanol	17	0	0	7, 9
Benzoessäure	10 ⁻³	Benzol	64	16	0	7, 9
Chinalizarin	10 ⁻⁵	Essigester	100	58	0	7, 9
Eosin	10 ⁻⁵	Eisessig	100	0	0	7, 9
Fettrot	10 ⁻⁵	Acetessigester	100	3	0	7, 9
Fettrot	10 ⁻⁵	Aceton	100	0	0	7, 9
Fettrot	10 ⁻⁵	Benzol	100	0	0	7, 9
Fettrot	10 ⁻⁵	Tetrachlorkohlenstoff	100	26	0	1–12
Gentianaviolett	10 ⁻⁵	Äthanol	100	47	0	9
Methylenblau	10 ⁻⁴	Äthanol	100	70	0	9
Methylviolett	10 ⁻⁵	Aceton	100	13	0	1–12
Pikrinsäure	10 ⁻⁴	Äthanol	100	—	0	1, 7, 9
Pikrinsäure	10 ⁻⁵	Äthanol	100	—	0	9, 11
Pikrinsäure	10 ⁻⁵	Xylol	100	100	0	7, 9
Safranin	10 ⁻⁵	Äthanol	100	70	0	7, 9
Safranin	10 ⁻⁵	Isobutanol	100	88	0	7, 9
Salizylsäure	3 · 10 ⁻⁴	Chloroform-Petrol-äthergemisch (2:3)	100	25	0	9

Tabelle II

(Adsorption von Anilin in Benzol (ca. 1:1000) durch verschiedene Pektine)

Nr.	Pektinart	Äqui- valent- gewicht	η_r (½%)	% Anilin adsorbiert
1	Apfelpektin	1500	4,5	1,4
2	Apfelpektin	1200	4,5	1,6
3	Apfelpektin	1100	7,0	1,6
4	Citruspektin	1000	5,4	1,9
5	Apfelpektin	1000	9,6	2,0
6	Citruspektin	800	6,2	2,2
7	Citruspektin	800	4,6	2,2
8	Apfelpektin	800	2,3	2,2
9	Apfelpektin	590	6,2	2,7
10	Apfelpektin	460	4,1	3,2
11	Apfelpektin	400	1,3	3,7
12	Citruspektin	380	1,4	4,1
Bolus alba				6,0
Tierkohle				40,0

Die Versuchsanordnung gestaltete sich wie folgt: 3 g Adsorbens wurden mit 100 cm³ Lösung 10 Minuten geschüttelt und anschließend filtriert. Die Konzentrationsänderung des gelösten Stoffes im Filtrat ermittelten wir durch Vergleich mit einer filtrierten Stammlösung. Die Messungen erfolgten im allgemeinen auf kolorimetrischem Wege; Benzoessäure wurde alkalimetrisch und Anilin durch Bromid/Bromat-Titration bestimmt.

Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle I zusammengefaßt, deren letzte Spalte die untersuchten Pektine gemäß Tabelle II wiedergibt.

Aus Tabelle I geht klar hervor, daß die Pektine aus organischen Solventien im Gegensatz zu Tierkohle und Bolus alba *weder Farbstoffe noch Säuren adsorbieren*. Hingegen vermögen Pektine Anilin aus Alkohol oder Benzol in geringem Maße aufzunehmen. Diese Anilinadsorption ist, wie Tabelle II zeigt, umgekehrt proportional dem Äquivalentgewicht des Pektins bzw. proportional dem Gehalt an freien Carboxylgruppen, während Viskosität resp. Kettenlänge sowie Herkunft ohne Einfluß sind. Daraus geht deutlich hervor, daß diese adsorptive Wirkung nicht auf einer Oberflächenaktivität des Pektins beruht, sondern eine Folge *chemischer Affinität* ist: es sind die sauren Carboxylgruppen, welche das basische Anilin zu binden vermögen.

In wäßrigem Medium können wesentlich andere Verhältnisse vorliegen. Noch nicht abgeschlossene Versuche, über die später berichtet wird, zeigen, daß Pektin in diesem Falle nur eine schwache, der Tierkohle weit unterlegene Oberflächenaktivität besitzt.

R. BECHER und S. LEYA

Wissenschaftliches Laboratorium der Aristopharm-Fabrikations-AG., Basel, den 21. Mai 1947.

Summary

Pectin does not present any surface activities in organic solvents. An eventual fixation of some substances is based on mutual chemical affinity.

Sur la nature de l'estérase
contenue dans le venin de cobra

Dans un travail antérieur¹ nous avons montré la possibilité d'appliquer la méthode manométrique de WARBURG à la mesure de l'action diastasique du venin de

¹ F. BOVET et D. BOVET, Ann. de l'Inst. Past. 69, 309 (1943)

Hydrolysés par le venin	Non hydrolysés par le venin	Inhibiteurs
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3-\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOCH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \\ \\ \text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3-\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{OCO}-\text{NH}_2 \\ \qquad \\ \text{CH}_3 \qquad \text{CH}_3 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3-\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCO}(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \\ \\ \text{OH} \end{array}$
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3-\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}-\text{CH}_2\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \\ \\ \text{OH} \end{array} \text{ 1*}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3-\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCO}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \\ \\ \text{OH} \end{array} \text{ (2207 F.)}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3-\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCO}(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \\ \\ \text{OH} \end{array}$
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3-\text{N}-\text{CH}_2\text{COO}-\text{CH}-\text{CH}_3 \\ \qquad \\ \text{CH}_3 \qquad \text{CH}_3 \end{array} \text{ 1*}$	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3-\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCO}(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \\ \\ \text{OH} \end{array} \text{ (2208 F.)}$ <p>Myristicylcholine Palmitylcholine Stéarylcholine</p>	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3-\text{N}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCO}(\text{CH}_2)_{16}\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \\ \\ \text{OH} \end{array}$

cobra et avons rapporté les résultats obtenus sur l'hydrolyse de l'acétylcholine.

D'après les recherches de certains auteurs^{2,3} la présence d'une cholinestérase dans la sécrétion venimeuse du cobra était un fait certain, bien que les opinions restaient très diverses sur le rôle que pouvait jouer^{2,3,4} cet enzyme au cours de l'intoxication provoquée par la morsure du cobra.

Depuis, la cholinestérase de la sécrétion venimeuse a été isolée⁵ et s'est avérée 15 fois plus active⁶ que le ferment purifié par STEDMAN⁷ à partir du sérum de cheval.

La suite de nos recherches devait nous amener à des résultats d'ordre plus général en ce qui concerne l'action très particulière de cette diastase.

Nous avons été amenés à constater en premier lieu que l'action de cette estérase sur les esters gras de la choline s'exerce d'autant plus énergiquement que le poids moléculaire de l'acide engagé est moins élevé. A partir des chaînes en C₄ il n'y a plus d'hydrolyse. Les très longues chaînes à partir de C₁₀ non seulement ne sont pas hydrolysées mais exercent même une action inhibitrice incontestable. La présence d'une fonction uréthane, comme dans le cas de la carbaminoyl-β-méthylcholine par exemple, fait que le venin n'a pas de prise. L'on peut résumer ces quelques résultats dans le tableau précédent.

En poursuivant notre travail nous avons cependant pu constater que l'action de cette estérase ne paraît pas s'exercer spécialement vis-à-vis des esters de la choline à poids moléculaire faible, mais qu'elle s'étend de façon bien plus générale aux esters d'acides et d'alcools renfermant le radical acétyl.

Nous avons pu en effet hydrolyser par le venin de cobra des groupements acétiques variés comme par exemple:

- 1° Certains esters d'acides gras:
l'acétate d'éthyle,
l'acétate de méthyle,
l'acétate de propyle,
et de plus en plus faiblement, à mesure que le poids moléculaire s'élève
l'acétate de butyle,
l'acétate d'isoamyle
jusqu'à des termes très élevés comme le lactate d'amyle, le ricinoléate de méthyle etc. qui ne sont plus hydrolysés.

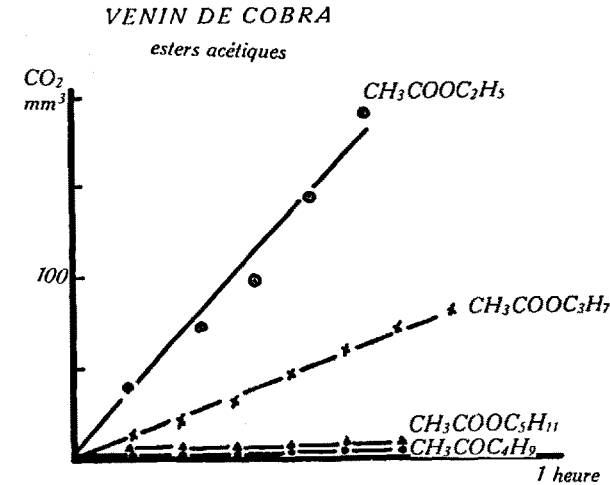


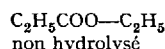
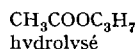
Fig. 1. Action du venin de cobra sur certains esters d'acides gras.

1* Nous remercions très vivement M. ERNEST KAHANE, Maître de Recherches au Centre National de la Recherche, qui nous a fourni les échantillons de propionylcholine et de isobutyrylcholine dont nous nous sommes servis pour nos essais.
2 N. K. JYNEGAR, K. B. SEHRA, B. MUKERJI et R. N. CHOPRA. Current Science 7, 51-53 (1938).
3 B. N. GOSH, Österr. Chem. Ztg. 43, 158-163 (1940).
4 R. N. CHOPRA et J. S. CHOWHAN, Ind. med. Gaz. 75, 69-75 (1940).
5 D. K. CHOWDHURI, Science and Culture 8, 238 (1942).
6 D. K. CHOWDHURI, Ann. Bioch. exp. Med. 4, 77, 86 (1944).
7 E. STEDMAN et L. H. EASSON, Bioch. J. 26, 2 (1932).

- 2° Les esters acétiques du glycol:
la monoacétine,
la diacétine.
- 3° Les esters acétiques de la glycérine:
la monoacétine,
la diacétine,
la triacétine.

Le cas de la tributyrine est un peu différent. Si l'on s'en tient à la technique manométrique, il s'avère que l'hydrolyse par le venin ne se fait pas dans les limites de temps que j'ai employées pour les autres produits. Quelques mesures stalagmométriques nous ont par contre permis de constater que la coupure de la tributyrine se fait tout de même, et qu'elle devient appréciable après trois heures environ de mise en contact.

L'importance du radical acétyl apparaît aussi dans le cas des esters acétiques d'acides gras. Nous voyons en effet que cette estérase hydrolyse l'acétate d'éthyle et reste sans action sur le propionate d'éthyle.



Substances inhibitrices de l'estérase contenue dans le venin de cobra

Les inhibiteurs de l'estérase du venin de cobra peuvent se ranger en deux catégories principales.

Il y a en premier lieu ceux qui altèrent le venin, comme le KMnO_4 ou le Bleu de Méthylène¹. Cette action ne mérite pas qu'on s'y attarde.

VENIN DE COBRA acétylcholine

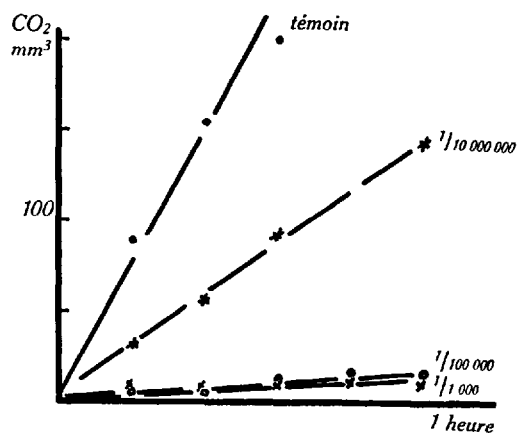
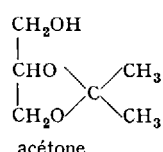
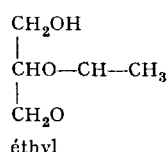
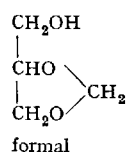


Fig. 2. Effet du di-isopropyl-fluorophosphate sur l'estérase du venin de cobra.

Une deuxième classe d'inhibiteurs groupe les substances ayant une analogie de formules avec les substrats employés, et cela peut être expliqué, si l'on admet l'hypothèse des réactions compétitives entre molécules de formules analogues, émise par ROEPKE². Nous avons vu que, dans le cas de l'action inhibitrice de la myristicylecholine cette théorie trouve une confirmation très élégante. Il en est de même, en ce qui concerne l'hydrolyse de la triacétine, des dérivés formol, éthyl et acétone de la glycérine qui exercent une véritable action inhibitrice.



¹ F. BOVET et D. BOVET, Ann. de l'Inst. Past. 69, 309 (1943).

² M. H. ROEPKE, J. Pharmacol. Exp. Ther. 59, 264 (1937).

L'on peut ranger dans cette même catégorie un certain nombre d'inhibiteurs spécifiques des cholinestérases qui empêchent également l'action de l'estérase du venin. L'ésérine exerce en effet ici son action inhibitrice classique encore très marquée à une dose de $2/1000000$ ¹.

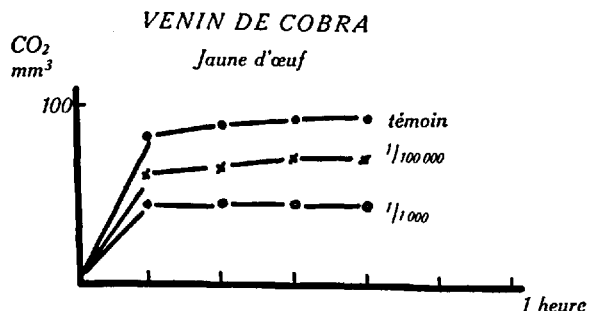


Fig. 3. Effet du di-isopropyl-fluorophosphate sur la lécithinase du venin de cobra.

Nous avons pu également essayer l'action inhibitrice du diisopropylfluorophosphate (D.F.P.) dont les travaux de MACKWORTH, puis de Mc COMBIE et SAUNDERS^{2,3} avaient mis en lumière l'action nettement anticholinestérasique.

Vis-à-vis de l'estérase contenue dans le venin de cobra le D.F.P. se montre environ 4 fois plus actif que l'ésérine (fig. 2) alors qu'il est sans action sur la lécithinase ou «hémolysine» de cette sécrétion (fig. 3) dont l'activité peut être également suivie par la méthode manométrique.

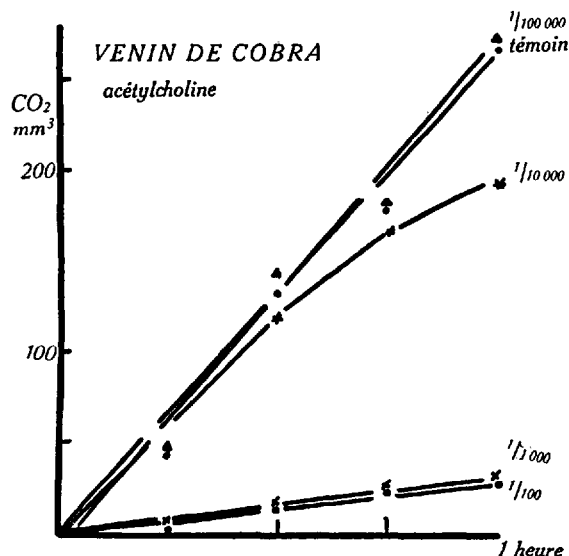


Fig. 4. Effet de la myristicylecholine sur l'estérase du venin de cobra.

Cette inhibition diastasique ne s'accompagne pas *in vivo* de la moindre protection vis-à-vis de l'intoxication par le venin de cobra, aussi bien chez la Souris que chez le Cobaye. Nos essais dans ce sens ont été tout à fait négatifs, ce qui paraît infirmer l'opinion exprimée

¹ F. BOVET et D. BOVET, Ann. de l'Inst. Past. 69, 309 (1943).

² McCOMBIE et SAUNDERS, Nature 157, 287 (1946).

³ C'est à l'obligeance de McCOMBIE et de SAUNDERS que nous devons d'avoir pu procéder à nos essais avec le D.F.P. Nous les remercions bien vivement ici.

par certains auteurs^{1,2} qui pensent pouvoir assimiler l'action estérasiqne à l'effet neurotoxique du venin de cobra.

De même que l'ésérine, le D.F.P. n'a aucunement protégé les souris et les cobayes intoxiqués par le venin et les animaux sont morts dans les mêmes délais que les témoins et en présentant des troubles tout à fait analogues.

En résumé, l'application de la méthode manométrique de WARBURG nous a permis de poursuivre une étude plus poussée de l'action estérasiqne du venin de cobra. Nous avons rapidement constaté que, contrairement à l'opinion généralement admise, ce ferment n'est pas une cholinestérase, car son action s'étend de façon bien plus générale aux esters d'acides et d'alcools renfermant le radical acétyl et de poids moléculaire peu élevé. Ce ferment pourrait donc être plutôt appelé une acétylase.

L'action inhibitrice de certaines substances caractérise bien le caractère propre de cette diastase: la my-

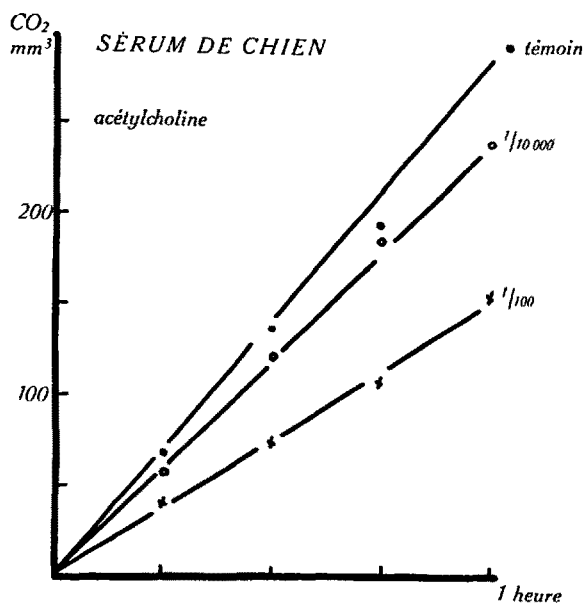


Fig. 5. Effet de la myristicyleholine sur la cholinestérase du sérum de Chien.

risticyleholine, par exemple, qui inhibe l'action estérasiqne du venin de cobra, reste sans action sur la cholinestérase contenue dans le sérum de Chien (fig. 4 et 5).

F. BOVET NITTI

Laboratoire de chimie thérapeutique, Institut Pasteur, Paris, le 12 mai 1947.

Zusammenfassung

Mit Hilfe der WARBURG-Methode wird die Esterase-wirkung von Kobragift geprüft. Das Ferment wirkt nicht nur auf Acetylcholin, sondern auch auf verschiedene andere Ester mit kleinerem Molekulargewicht, die die Acetylgruppe enthalten. Es ist demnach nicht als Cholinestérase, sondern als Acétylase zu bezeichnen. Myristicyleholin beeinflusst die Cholinestérase im Blutserum des Hundes nicht, hemmt dagegen die Acétylase im Kobragift.

¹ N. K. JYNEGER, K. B. SEHRA, B. MUKERJI et R. N. CHOPRA, *Current Science* 7, 51-53 (1938).

² R. N. CHOPRA et J. S. CHOWHAN, *Ind. med. Gaz.* 75, 69-75 (1940).

Failure of Increase of Bisulphite-binding Substances after Fat and Protein Intake during Pregnancy

The level of bisulphite-binding substances (B.B.S.) after fat and protein intake or protein intake increases in the blood of healthy persons¹. All substances containing the aldehyd- or keto-group bind bisulphites. The increase of these substances in our experiments are chiefly due to

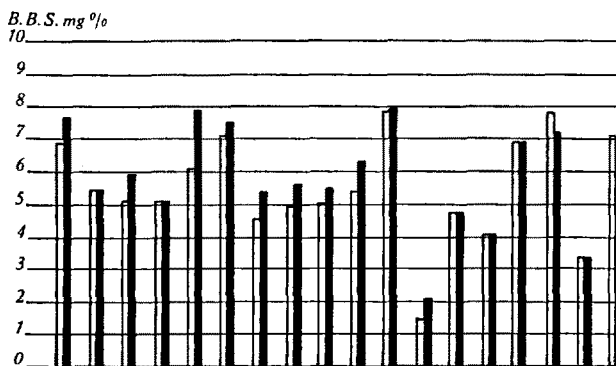


Fig. 1. Level of B.B.S. in blood before and after fat and protein intake in pregnancy after the IIIrd month.

the augmented quantity of keto-compounds, because we found acetonuria in cases with high B.B.S.-content of the blood following fat and protein intake. In one of our cases the B.B.S. failed to increase after administration of fat and protein. The person investigated was pregnant. Therefore we determined the B.B.S. after fat and protein intake in 21 cases of pregnancy.

Blood was taken from the pregnant women in the morning before breakfast, and 6 hours later they were given a meal consisting of 120 g of bacon and 100 g of cheese. (In two cases only 100 g of cheese was given.) In both specimens the quantity of B.B.S. was determined with the method of CLIFT and COOK². Out of 18 pregnant women, whose pregnancy was beyond the third month, in 17 the level of B.B.S. in blood remained unchanged, while in 27 of 32 non-pregnant women an increase from 1.1 mg per cent to 5.1 mg per cent was found after intake of the same amount of fat and protein. The average increase was 0.31 mg per cent in pregnant cases, a value not exceeding the limit of error, as against 1.92 mg per cent in non-pregnant cases. In three cases of early pregnancy (IInd-IIIrd month) the response was similar to that of non-pregnant cases.

Our results may be explained by the impaired hormone production of the anterior pituitary gland during pregnancy after the third month. PHILIPS observed that in pregnancy the gonadotrophic activity of the pituitary gland is reduced after the third month. YOUNG³ observed that pituitary extracts have no diabetogenic effect during pregnancy. The essential difference between our experiments and those of YOUNG consists in the fact that in his cases an extract administered was ineffective, whereas in our investigations the diabetogenic hormone production of the experimental subjects themselves was wanting. This could be explained by the early investigation of BURLANDO⁴, who found in the liver of pregnant animals

¹ GÖTH and BIKICH, *Nature* 159, 170 (1947).

² CLIFT and COOK, *Bioch. J.* 26, 1789 (1932).

³ YOUNG, *Schweiz. med. Wschr.* 76, 894 (1946).

⁴ BURLANDO, see MÖLLERSTRÖM, *Das Diabetesproblem*. Stockholm. Pag. 42.