

methode p_H -Änderungen oder gar chemische Reaktionen erforderlich sind, da das Verhältnis zwischen Chalkon und Flavanon schon durch geringe physikalische oder chemische Einflüsse verändert wird.

Die Bildungsgeschwindigkeit eines Chalkons aus einem Azetophenon und einem Aldehyd ließ sich polarographisch gut verfolgen. Als Beispiel wurde das 2,2'-Dioxy-5-bromchalcon gewählt, da sich bei dieser Verbindung sowohl der Aldehyd, als auch das Azetophenon neben dem Chalkon eindeutig nachweisen ließen. Die erhaltenen Werte stimmen gut mit dem Ablauf einer Reaktion zweiter Ordnung überein. Nach 8 Stunden waren 79% des betreffenden Chalkons gebildet.

Die polarographische Bestimmung von Chalkonen und Flavanonen im Pflanzenmaterial wird derzeit durchgeführt.

E. SCHRAUFSTÄTTER

Erlangen, den 9. Januar 1948.

Summary

It has been found by polarographic analysis in neutral or acid solution that chalcones show two reduction potentials, while flavanones show only one.

It was possible to determine 2'-hydroxy-chalcone beside flavanone with a polarograph.

The formation rate of a chalcone from an aldehyde and a ketone could be followed polarographically.

Existence de sels biliaires et de cérébroside associés à des protéines chez *Moniezia expansa*

(Recherches biochimiques sur les Cestodes)

Nous avons déjà montré¹ que des acides biliaires accompagnaient certaines fractions protéiques extraites des vers. Nous poursuivons ici l'étude de la fraction la plus riche en sels biliaires.

Rappelons comment fut obtenue cette fraction: les Moniezias fraîchement récoltées à l'abattoir dès la mort des moutons, sont rapidement lavées par de l'eau salée isotonique, puis congelées et broyées à froid. On les délipide par de l'alcool absolu froid (au-dessous de 0° C), puis par de l'éther froid. La poudre délipidée est épuisée par de l'eau distillée (dans une glacière). On obtient de grands volumes de solution que l'on dialyse sous pression contre de l'eau distillée. La dialyse enlève des substances diffusibles. De plus, grâce à la pression (1 atm.); il se produit une considérable exosmose qui concentre les substances non diffusibles. On arrête la dialyse après huit jours, alors que le volume n'est plus que 0,6 ml par g de ver.

Au cours de la dialyse, il se forme progressivement un précipité blanc que l'on recueille et lave par de l'eau. La matière lavée est la fraction qui nous intéresse ici. Elle est insoluble dans l'eau, même si l'on ajoute du chlorure de sodium et même si l'on ramène le p_H à 7 par un peu de soude (pour dissoudre, il faudrait atteindre p_H 9). La précipitation pendant la dialyse n'est donc pas simplement due à la baisse de concentration saline, ni à l'évolution du p_H vers l'isoionique moyen des protéines.

Dans cette fraction, nous avions déjà décelé des sels biliaires et des protéines. Pour les séparer, il avait été nécessaire de pratiquer une longue alcoolysie par de l'alcool absolu bouillant. Après cette opération, nous avions laissé refroidir et recueilli la solution alcoolique dans la

quelle nous avions décelé les sels biliaires. La partie insoluble dans l'alcool était riche en protéines, mais sa teneur en azote était seulement 8,6%. Nous avions donc conclu qu'il ne s'agissait pas d'une protéine pure mais nous n'en avions pas poussé l'étude. Nous avons pu reprendre cette étude en opérant sur de copieux échantillons de vers qui nous ont fourni une masse importante de la fraction. Donnons immédiatement nos conclusions principales, il nous sera plus facile ensuite d'exposer la technique de séparation: la fraction se scinde par alcoolysie en 1^o des protéines; 2^o des acides biliaires; 3^o des cérébroside; 9^o du glycogène.

L'alcoolysie doit être effectuée par de l'alcool très fort et l'ébullition doit être maintenue une quarantaine d'heures. On filtre à chaud, puis on lave par de l'alcool bouillant. Nous reviendrons plus loin sur l'étude du résidu insoluble (il contient protéines et glycogène). Les solutions alcooliques sont placées dans une glacière, il s'y forme lentement un précipité N^o 1 que l'on recueille. La solution mère est concentrée au quart de son volume par distillation sous vide, puis refroidie à la glacière; il y apparaît un précipité N^o 2 dont la solution mère est encore une fois concentrée puis refroidie pour faire déposer le précipité N^o 3 que l'on sépare. Un traitement méthodique des précipités par l'alcool en élimine les parties les plus solubles qui viennent rejoindre les solutions mères. On finit par obtenir d'une part la partie la plus soluble à froid qui est constituée par des sels biliaires typiques et d'autre part la partie la moins soluble à froid qu'il faut identifier.

Il s'agit de substances blanches solubles dans l'alcool à chaud mais très peu solubles à froid, solubles dans la pyridine à froid et dans l'acétone à chaud, insolubles dans l'eau et très peu solubles dans l'éther. Elles contiennent 2,7% d'azote et pas de phosphore. Elles ne donnent plus les réactions des sels biliaires; la réaction de PETTENKOFER conduit à un anneau brun rougeâtre sans trace de violet. Pour identifier cette substance, nous l'avons soumise à une hydrolyse acide qui libéra lentement un ose et des acides gras. Nous avons donc pensé avoir affaire à des cérébroside et nous avons pratiqué leur décomposition en milieu alcoolique par de l'acide sulfurique à 10% dans de l'alcool absolu. Après chauffage pendant cinq heures, on refroidit à la glacière. Il se forme un précipité constitué par des esters éthyliques d'acides gras. La solution mère contient un ose et de la sphingosine. On lui ajoute un volume égal d'eau et l'on concentre sous vide jusqu'au tiers afin d'éliminer l'alcool. Le résidu est refroidi à la glacière, la sphingosine précipite à l'état de sulfate. Le liquide surnageant contient l'ose que nous avons identifié par microchromatographie sur papier¹. Il s'agit de galactose. Ayant ainsi déterminé les constituants du cérébroside, nous les avons dosés: 32 mg du cérébroside ont donné 14 mg d'esters d'acides gras (47% d'esters, donc 44% d'acide gras) 9,8 mg de sphingosine (32%) et 6,5 mg de galactose (21,7%). Les teneurs calculées pour un cérébroside tel que la cérasine seraient: acide gras 45,3%; sphingosine 36,8% et galactose 22,1%, ce qui correspond bien à nos résultats, étant donné que le sulfate de sphingosine n'est pas rigoureusement insoluble donc que notre dosage de sphingosine est entaché d'une erreur par défaut.

Nous avons ensuite étudié les constituants plus solubles dans l'alcool froid. Dans les solutions alcooliques, avant l'élimination du cérébroside, les réactions qualitatives des sels biliaires étaient troublées. Maintenant que les fractionnements par l'alcool ont éliminé la presque totalité du cérébroside, les réactions des sels

¹ N. KENT et M. MACHEBEUF, C. R. Acad. Sci. 225, 539 (1947); XI^e Congrès international de chimie (17 juillet 1947, Londres); Rev. suisse Bact. Pathol. 10, 464 (1947).

¹ S. M. PARTRIDGE, Nature 158, 270 (1946).

biliaires sont d'une parfaite netteté (réactions de PERTENKOFER, de URDANSKY et de JOLIES). De plus, le produit est soluble dans l'eau, et sa solution aqueuse mousse fortement. Nous avons séparé les acides biliaires de la solution aqueuse par mouillage (technique des moussettes essorées¹), et les résultats furent bien conformes à ce que l'on pouvait attendre d'une solution de sels biliaires. (La teneur en azote du produit purifié par mouillage fut 2%).) Nous avons donc bien affaire à des acides biliaires typiques. Ils ne contiennent pas de soufre en quantité décelable, il ne s'agit donc pas d'acide taurocholique. Pour confirmer nos conclusions, nous avons fait étudier leur absorption de la lumière ultra-violette en comparant les spectres à ceux obtenus pour de l'acide glycocholique. Nous remercions Mme GILMART qui a réalisé les spectres. Les courbes d'absorption sont pratiquement superposables dans la région spectrale comprise entre 1000 et 1100 Å. Mais notre acide n'est pas encore rigoureusement pur, et l'on note une petite bande d'absorption parasite dans la région avoisinant 750 Å. En somme, nous avons bien affaire à un acide bilaire, et il est possible qu'il s'agisse d'acide glycocholique.

Revenons au résidu d'alcoololyse resté insoluble dans l'alcool chaud. Ce résidu est bien un coagulum protéique, car l'hydrolyse acide libère une série d'aminoacides dont l'étude microchromatographique sur papier² n'a rien révélé d'anormal³. Mais la teneur en azote était seulement 13%. Il devait donc se trouver encore dans le coagulum des impuretés non protéiques que l'alcool chaud n'avait pas enlevées. Nous avons pu identifier ces impuretés, il s'agit de glycogène que l'on peut facilement extraire par de l'eau. Le coagulum lavé à l'eau, puis séché, contient maintenant 15% d'azote, comme il se doit pour une protéine.

Avant l'alcoololyse, la fraction primitive avait été abondamment lavée par de l'eau, et ceci n'avait pas éliminé le glycogène qui part maintenant si facilement après que les protéines aient été coagulées par l'alcool. Ce glycogène avait d'ailleurs précipité avec la fraction par dialyse. Il devait donc ne pas être libre, mais cénapsé avec les protéines.

Voici nos résultats quantitatifs en % de la fraction:

Protéines	Cérébrosides	Glycogène	Acides biliaires
74	10	15	1

Notons que ces chiffres n'ont rien d'absolu. En effet, les cérébrosides tels qu'ils furent pesés ici contenaient encore des sels biliaires dont la séparation est très difficile et ne fut obtenus que par des fractionnements non quantitatifs. Le chiffre de 1% donné pour les sels biliaires est donc trop faible, tandis que celui de 10% donné pour les cérébrosides est trop fort.

Conclusions. Les vers délipidés à basse température par l'alcool absolu et l'éther cèdent ensuite à l'eau distillée des protéines et diverses autres substances. Si l'on soumet la solution à une dialyse prolongée, on voit précipiter une fraction curieuse assez abondante qui n'est plus soluble dans l'eau, même si l'on ajoute du sel. Cette fraction contient: protéines, glycogène, cérébrosides et acides biliaires. Ces constituants ne sont pas indépen-

dants les uns des autres, car 1^o le glycogène et les acides biliaires ne se laissent pas extraire par l'eau tant que l'on n'a pas dénaturé les protéines; 2^o avant la dialyse, les cérébrosides étaient à l'état dissous dans l'eau qui ne les dissout plus lorsqu'ils sont isolés.

N. KENT et M. MACHEBŒUF,
avec la collaboration de B. NEJADAS.

Institut Pasteur, Paris, le 3 mars 1948.

Summary

The authors have already shown that bile acids existed associated with proteins in some protein fractions isolated from the tapeworm (*Moniezia expansa* of sheep).

The worms are delipidated at very low temperature (-15°C) by absolute alcohol and ether. The dry product is extracted with distilled water. When the solution thus obtained is dialysed for a long time against water (at 0°C) to eliminate the salts and other dialysable substances (such as puric and pyrimidic bases), a peculiar fraction of protein precipitates.

This fraction is no longer soluble in water even after addition of NaCl or at higher p_H . This fraction contains proteins (but only 8,6% nitrogen), glycogen, cerebrosides, and bile acids.

After hydrolysis, the aminoacids were identified using the microchromatographic technique of CONSDEN, MARTIN, and GORDON (1943).

Glycogen was identified and the quantity of sugar estimated as well as the glucosazone prepared after hydrolysis.

The cerebrosides were hydrolysed by a 10% alcoholic solution of H_2SO_4 , the fatty acid esters isolated and estimated. The sphingosine yield was also determined. The microchromatographic method of PARTRIDGE was used to identify the sugar in these cerebrosides. Results confirmed the presence of galactose. There is no doubt that the substance associated with the proteins is a cerebroside.

As stated above, the presence of bile acids in tape-worms has been established by the authors for the first time. These acids were estimated by different colorimetric and spectrographic methods.

Über ein Adenosintriphosphorsäure (ATP) spaltendes Enzym der Schlangengifte

Schon lange wurde auf die Ähnlichkeit eines Teils der Vergiftungserscheinungen nach Schlangenbiß mit dem anaphylaktischen Schock hingewiesen. In Übereinstimmung mit der Annahme, daß der letztere durch eine Histaminausschüttung bedingt sei, wurde gefunden, daß zahlreiche Schlangengifte die schlagartige Entleerung der Histamindepots der Säuger veranlassen¹.

Für die Ausbildung verschiedener Schockarten werden in zunehmendem Maß auch andere Reaktionen verantwortlich gemacht, beispielsweise das Verschwinden von ATP², die als eine der wichtigsten Energiequellen der Zellen gilt. Im Muskel spielt sie bekanntlich eine zentrale Rolle beim Zustandekommen der Kontraktion. Mit der Annahme eines ATP zerstörenden Enzyms in den Schlangengiften könnte somit die Auslösung von Schock und Muskellähmung als Folgen des Schlangenbisses dem Verständnis nähergebracht werden.

¹ Zusammenfassung: C. H. KELLAWAY, Animal Poisons, Ann. Rev. Biochem. 8, 541 (1939).

² G. A. LE PAGE, Am. J. Physiol. 147, 446 (1946).

¹ M. ABIBAT, C. R. Acad. Sci. 209, 244 (1939).

² R. CONSDEN, A. H. GORDON et P. MARTIN, Biochem. J. 38, 224 (1944).

³ Les clichés chromatographiques ont été publiés dans la thèse de doctorat de l'un de nous: N. KENT (Neuchâtel 1947).