

Oxaloacetic acid: the Straub reaction and the determination as phenylhydrazone gave always negative results.

Acetaldehyde: by distillation of the medium with pyruvic acid in a Vigreux column and precipitation of the distillate with 2,4-dinitrophenylhydrazine, yellow precipitates are obtained which do not prove to be acetaldehyde.

At the end of the experience the acetic acid consumption resulted in 80% of the added acid and the p_H changed from 5.5 to 7.7.2, while the oxalic acid of the OP salt was slightly decreased. Under our conditions no citric acid was formed from the acetate.

Oxidation of the sodium succinate, fumarate and malate: 4000 ml of the suspension of yeast impoverished, as explained above, were divided into four fractions, each of 1000 ml to three of them were added 0.5 g of succinate, fumarate and malate respectively and 0.5 g of OP salt each. To the fourth fraction used as a blank test only 0.5 g of OP salt were added. In all fractions the p_H was 5.5. After 24 hours aeration at 30° a further addition of 0.5 g of the respective salt and 0.5 g of the OP salt was made to each of the three tests and only 0.5 g of the OP salt was added to the blank test. The OP salt was dissolved in 100 ml of distilled water in presence of 0.25 g of Na_2HPO_4 . After 24 hours additional aeration the contents of the flasks were centrifuged and the clear liquids analysed for intermediates by the given methods.

Pyruvic acid (as phenylhydrazone)
from dicarboxylic acids (mixed)

m.p.	Calculated N %	Found
188°	15.73	15.87

Amount produced: 0.35 g per mille, i.e. about 30% of the acid which can be obtained on the basis of phenylhydrazine present in the OP salt.

In the blank test no pyruvic acid was fixed.

Both in the oxidation of acetate and dicarboxylic acids no contamination was never observed.

Acknowledgements

The author's thanks are due to the Società Eridania Z.N. di Genova for their support of this work.

V. BOLCATO, M. E. SCEVOLA, and M. Bosso

Institute of pharmaceutical Chemistry, University of Pavia, July 30, 1950.

Riassunto

Da respirazioni dell'acetato, succinato, fumarato e malato di sodio con il lievito, in presenza di ossalato di fenildrazina, è stato possibile captare l'acido piruvico come prodotto intermedio della reazione.

wohl an nativem Extrakt wie an gewaschenem AM untersucht. Eine Modifikation der Extraktionsmethode von A. SZENT-GYÖRGYI¹ ermöglichte es, lange Zeit hindurch mit einem identischen Extrakt zu arbeiten. Es wurden einfache Ostwald-Viskosimeter verwendet.

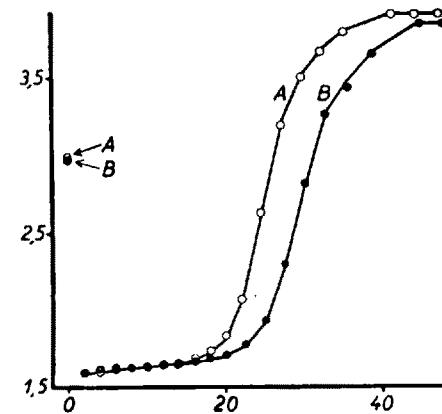


Abb. 1. Wirkung von Ouabain in einer Konzentration von 10^{-5} M auf nativem Aktomyosinextrakt von Rinderherzen.

Ordinate: Relative Viskosität. Abszisse: Zeit in Minuten nach ATP-Zugabe. Kreise: Ohne Ouabain. Punkte: Mit Ouabain.

Untersuchung an nativem Muskelextrakt. Die Ouabainwirkung wurde für Konzentrationen von 10^{-4} M bis 10^{-7} M untersucht, und der Effekt macht sich in diesen Fällen in einem hemmenden Einfluß auf die ATP-ase bemerkbar. Für die Konzentrationen 10^{-4} M und 10^{-5} M beträgt die Hemmung der ATP-ase-Wirkung ca. 20% (Abb. 1). Ouabain in einer Konzentration von 10^{-6} M gibt eine ca. 8%ige Hemmung der Enzymaktivität. In einem Falle, der jedoch nicht reproduziert werden konnte, ergab sich für diese Konzentration eine 45%ige Hemmung. Die Konzentration 10^{-7} M ergab keine feststellbare Wirkung.

Am Wiederaufbau - die spontane Viskositätssteigerung nach Spaltung des ATP - übt das Ouabain eine schwache hemmende Wirkung aus, aber eine Veränderung der Form der Kurve entsteht nicht.

Ca^{++} stimuliert die Myosin-ATP-ase¹ und hemmt das wasserlösliche Enzymsystem². Ein Extrazuschuß von 0,001 M Ca^{++} verursacht in diesem nativen Extrakt sowohl eine Hemmung der Enzymaktivität wie des Wiederaufbaues. Die hinzugefügte Menge Ca^{++} scheint jedoch keinen Einfluß auf die Wirkung des Ouabains zu haben.

Untersuchung an gewaschenem AM. Die Reinigung geschah durch drei in schneller Folge vorgenommene Waschungen. Die ATP-ase-Aktivität ist in dem gewaschenen AM schwächer als in dem nativen Extrakt. Die Form der Kurve ist in den beiden Fällen ebenfalls verschieden. Ouabain verursacht in einer Konzentration von 10^{-5} M und 10^{-6} M eine Stimulation der Myosin-ATP-ase (Abb. 2). Die hemmende Wirkung am Wiederaufbau, die für den nativen Extrakt beobachtet wurde, tritt bedeutend stärker in dem gewaschenen AM hervor. In der Konzentration 10^{-7} M zeigt das Ouabain keine Wirkung. Interessant ist die Veränderung, die nach einer Sonderzugabe von 0,001 M Ca^{++} entsteht. Das Ouabain verursacht jetzt einen Wiederaufbau, welcher

¹ A. SZENT-GYÖRGYI, Acta Physiol. Scand. 9, Suppl. 25 (1945).

² W. W. KIELLEY und O. MEYERHOF, J. Biol. Chem. 174, 387 (1948).

den entsprechenden Wert in der Kontrollkurve übersteigt. Die Ouabainwirkung auf die ATP-ase wird bei gewissen Konzentrationen von Ca^{++} beeinflußt. Der die ATP-ase stimulierende Effekt von Ouabain in einer Konzentration 10^{-6} M wird durch das Extra- Ca^{++} verstärkt. Demgegenüber findet man bei Ouabain 10^{-6} M keine sichere Potenzierung durch $0,001$ M Ca^{++} .

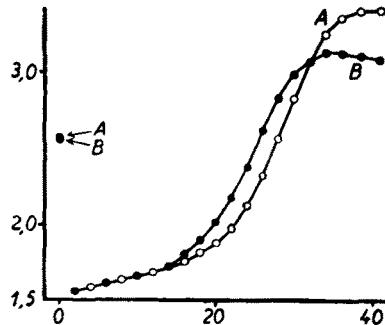


Abb. 2. Wirkung von Ouabain in einer Konzentration von 10^{-6} M auf gewaschenes Aktomyosin von Rinderherzen.

Die Arbeit wird in dieser Richtung fortgesetzt, und eine mehr auf Einzelheiten eingehende Beschreibung soll in *Acta Physiol. Scand.* veröffentlicht werden.

K. A. P. EDMAN

Pharmakologisches Institut der Universität Uppsala,
den 19. April 1950.

Summary

The action of ouabain in concentrations from 10^{-4} M to 10^{-7} M on the reaction between actomyosin and ATP has been investigated in both native extract and washed actomyosin from beef heart. The glycoside has a stimulating effect on myosin-ATP-ase, but inhibits the activity of ATP-ase in native muscle extract containing both water soluble and myosinbound ATP-ase. Furthermore, ouabain causes a change in the recovery phase of the viscosity curve, the extent of which depends on the Ca^{++} concentration.

Über einen Di-Cholinester mit hoher Curarewirksamkeit

Im Rahmen einer größeren Untersuchungsreihe wurde uns von den Österreichischen Stickstoffwerken AG. der Bis-Cholinester der Adipinsäure (M111) als Jodsalz zur Verfügung gestellt, dessen Ähnlichkeit mit Bis-trimethylammonium-decan-jodid (C 10) muskellähmende Wirkungen erwarten ließ. Diese Ähnlichkeit ist durch die aliphatische Natur und die 10 Kohlenstoffatome enthaltende Kette beider bis-quaternären Ammoniumsalze gegeben.

Am isolierten Zwerchfellpräparat der Ratte nach BÜLBRING¹ erniedrigt im Mittel 1 mg M 111 (in 60 cm^3 Tyrode) ebenso wie $100 \mu\text{g}$ Tubocurarinchlorid und 1 mg C 10 die Kontraktionshöhe auf die Hälfte. Diese «curareähnliche» Wirkung des M 111 weist die Besonderheit auf, durch Zusatz von Eserin² zur Badeflüssigkeit wesentlich verstärkt zu werden. Die dazu erforderlichen Dosen von Eserin liegen in der Größenordnung jener, die die Wirkung von Tubocurarin voll antagonisieren. Vorbehandlung des Zwerchfells mit $10 \mu\text{g}$ Eserin durch

10 Minuten setzt die 50 % lähmende Dosis von M 111 auf $80 \mu\text{g}$ herab (Abb. 1). Derselbe Effekt kann durch $10 \mu\text{g}$ TEPP erzielt werden. Unter denselben Bedingungen liegt bei 1 μg Eserin die 50 % lähmende Dosis von M 111 bei $350 \mu\text{g}$, bei $80 \mu\text{g}$ Eserin hingegen erniedrigt sich die 50 % lähmende Dosis von M 111 auf $30 \mu\text{g}$.

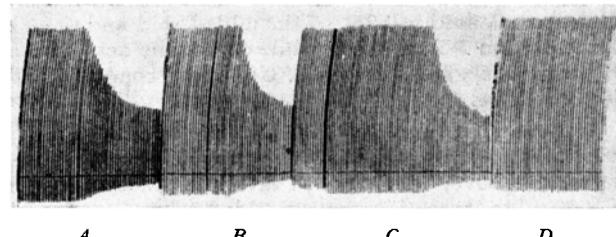


Abb. 1. Rattenzwerchfell. Zuckungen bei rhythmischer übermaximaler Reizung des N. phrenicus alle 10 Sekunden. Vergleich von M 111 und C 10, Verstärkung der M-111-Wirkung durch Eserin. Alle Dosen zu 60 cm^3 Badeflüssigkeit zugesetzt. Einwirkungsdauer 5 Minuten, dann Auswaschen.

A: 1 mg C 10

B: 1 mg M 111

C: 10 μg Eserin salicylicum

D: 80 μg M 111, 10 Minuten nach Eserin.

An dezerebrierten Katzen bewirken $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ M 111 bei intravenöser Injektion eine flüchtige, insgesamt 2 Minuten dauernde Senkung der Kontraktionshöhe des vom Nervus ischiadicus rhythmisch gereizten Musculus gastrocnemius um maximal 30 %. Das nach der Methode von GADDUM¹ fortlaufend registrierte Atemvolumen bleibt dabei unverändert. Blutdruck sowie Kontraktionshöhe der vom präganglionären Halssympathikus rhythmisch im Abstand von 2 Minuten gereizten Nickhaut werden nicht beeinflußt. Durch $300 \mu\text{g}/\text{kg}$ M 111 wird der M. gastrocnemius für indirekte Reizung durch 2 Minuten vollkommen gelähmt und erreicht erst nach etwa 10 Minuten die anfängliche Kontraktionshöhe. Die Atmung sistiert für ca. 30 Sekunden. Nach $25 \mu\text{g}/\text{kg}$ Eserin (intravenös) bewirken $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ M 111 durch 5 Minuten vollständige Lähmung des M. gastrocnemius bei gleichzeitigem Aussetzen der Spontanatmung. Nach weiteren 10 Minuten wird während künstlicher Beatmung der Muskel wieder normal erregbar. Die Kontraktionshöhe der Nickhaut bleibt während dieser Zeit unverändert.

Der Vergleich der Wirksamkeit von M 111 mit C 10 wurde am M. tibialis ant. von Katzen mittels der Methode der «close arterial injection» von G. L. BROWN² durchgeführt. $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ M 111 bewirken in dieser Versuchsanordnung eine kurze Muskelkontraktion wie $5 \mu\text{g}$ Azetylcholin. Die Kontraktion ist von einer flüchtigen Lähmung von etwa 3 Minuten Dauer gefolgt (Abb. 2). Intravenöse Injektion von $30 \mu\text{g}/\text{kg}$ Eserin steigert die Wirkung von M 111 so, daß $2 \mu\text{g}$ in gleichem Ausmaß wie $4 \mu\text{g}$ C 10 die Kontraktionshöhe auf 12 % herabsetzen. Dabei ist die Wirkung von M 111 mit 20 Minuten nicht ganz doppelt so lang wie die von C 10 (Abb. 3). Die lähmende Wirkung von M 111 auf den M. gastrocnemius nach intraarterieller Injektion in die Arteria ilica (Katze) wird durch Tetraäthylammonium (bis zu 3 mg) nicht antagonisiert. Dieselbe Dosis von TEA hebt prompt die Lähmung nach $500 \mu\text{g}$ Tubocurarin auf³.

¹ J. H. GADDUM, J. Physiol. 99, 257 (1941).

² G. L. BROWN, J. Physiol. 92, 22P (1938).

³ C. J. KENSLER, Brit. J. Pharmacol. 5, 204 (1950).

¹ E. BÜLBRING, Brit. J. Pharmacol. 1, 38 (1946).

² Alle Eserinangaben beziehen sich auf Eserinum salicylicum.