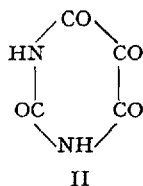
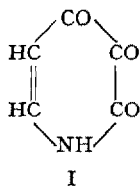


Behandlung	Gesamt- zahl der Ratten	Blutzuckerwerte	Zahl der Ratten			
			Nüchtern	Nach der Behandlung		
				24 h	48 h	72 h
Alloxan 40 mg pro kg Körpergewicht	9	< 70 mg/100 cm <sup>3</sup> 70–140 mg/100 cm <sup>3</sup> 140–200 mg/100 cm <sup>3</sup> > 200 mg/100 cm <sup>3</sup>	6 3 0 0	0 4 3 2	0 5 3 1	0 4 2 3
Alloxan 80 mg pro kg Körpergewicht	3	< 70 mg/100 cm <sup>3</sup> 70–140 mg/100 cm <sup>3</sup> 140–200 mg/100 cm <sup>3</sup> > 200 mg/100 cm <sup>3</sup>	3 0 0 0	0 0 1 2	0 0 0 2	– – – –
Pyromekazon 40 mg pro kg Körpergewicht	9	< 70 mg/100 cm <sup>3</sup> 70–140 mg/100 cm <sup>3</sup> 140–200 mg/100 cm <sup>3</sup> > 200 mg/100 cm <sup>3</sup>	8 1 0 0	6 3 0 0	1 8 0 0	4 3 1 0
Pyromekazon 80 mg pro kg Körpergewicht	9	< 70 mg/100 cm <sup>3</sup> 70–140 mg/100 cm <sup>3</sup> 140–200 mg/100 cm <sup>3</sup> > 200 mg/100 cm <sup>3</sup>	2 7 0 0	0 4 3 2	0 4 3 2	0 3 3 3

pyridins (I) hat und damit dem Alloxan (II) sehr ähnlich ist.



Wir haben die diabetogene Wirkung des Pyromekazons geprüft und mit dem bekannten Effekt des Alloxans verglichen. Beide Substanzen wurden männlichen Ratten in Mengen von 40 und 80 mg pro Kilogramm Körpergewicht intravenös injiziert. Die Ergebnisse sind in der Tabelle dargestellt.

Bei allen Ratten, die 80 mg Pyromekazon pro Kilogramm Körpergewicht bekommen haben, trat Apnoe ein, die aber leicht durch künstliche Atmung zu entfernen war. Dieser Effekt fehlte bei derselben Alloxandosis. Ratten, bei denen Diabetes mit Pyromekazon hervorgerufen wurde, gingen nach etwa vier Tagen zugrunde, obwohl die Blutzuckerwerte diejenigen der alloxandiatetischen Tiere nicht überschritten. Histologische Befunde werden in der ausführlichen Arbeit veröffentlicht.

Da viele in struktureller Hinsicht dem Alloxan sehr ähnliche Verbindungen nicht diabetogen sind, ist die diabetogene Wirkung des (I) bemerkenswert. Aus dieser Tatsache und zusammen mit dem Befund, dass Monoalkylalloxane diabetogen sind, Dialkylalloxane aber nicht<sup>1</sup>, kann der Schluss gezogen werden, dass für die diabetogene Wirkung die Teilstruktur – NHCOCOCO – besonders wichtig ist. Wir beabsichtigen des weiteren, azyklische Verbindungen mit dieser Teilstruktur auf diabetogene Wirkung zu prüfen.

N. ALLEGRETTI, K. BALENOVIĆ,  
V. FIŠTER und R. MUNK.

Chemisches Institut und Physiologisches Institut der  
Universität Zagreb, Jugoslawien, den 6. Juli 1953.

#### Summary

It is shown that 2,3,4-triketo-tetrahydropyridine (I) exercises a diabetogenic activity on white rats when

<sup>1</sup> Vergleiche zum Beispiel G. BRÜCKMANN und E. WERTHEIMER, J. Biol. Chem. 168, 241 (1947).

given in a dose of 80 mg/kg body weight. It is suggested that the group –COCOCNH– is responsible for this activity. This is in accordance with the observation that monoalkyl derivatives of alloxane show diabetogenic activity, while dialkyl derivatives show none.

#### Der Einfluss minimaler Mengen Sauerstoff auf die Vergärung der Glukose durch die Kulturweihenfe "Fendant"

Seit der Entdeckung PASTEURS<sup>1</sup>, dass sich gewisse Hefen in Abwesenheit der Luft vermehren können, ist die Korrelation zwischen dem Wachstum bzw. der Vermehrung und der Atmung bzw. Gärung (Dissimilation des Zuckers mit bzw. ohne O<sub>2</sub>-Aufnahme) der Hefezellen in ihrer Abhängigkeit von der Konzentration bzw. Zufuhr des gasförmigen Sauerstoffs der Gegenstand zahlreicher Untersuchungen gewesen. Es konnte dabei festgestellt werden, dass die Assimilation der Glukose in Gegenwart geeigneter Stickstoffverbindungen unter Bildung von Plasma und Zellwandsubstanz (Wachstum bzw. Vermehrung der Hefe) sowie die Speicherung des Zuckers in Abwesenheit verwertbarer Stickstoffquellen unter Synthese von höheren Kohlehydraten (Trocken- substanzzunahme ohne Erhöhung der Zellenzahl der Hefe) durch reichliche Sauerstoffzufuhr gefördert werden<sup>2</sup>. Bekanntlich gewinnt man heutzutage sowohl die Bäckerei- als auch die Futterhefe durch Züchtung nach dem Lüftungs- und Zulaufverfahren, wobei allerdings der günstige Einfluss der Lüftung auf die Vermehrungsgeschwindigkeit der Hefe nicht nur auf die reichliche Zufuhr von fein und gleichmäßig verteiltem Sauerstoff zurückzuführen ist, sondern auch dadurch bedingt ist,

<sup>1</sup> L. PASTEUR, C. r. Acad. Sci. Paris 52, 1260 (1861); *Etudes sur la bière* (Gauthier-Villars, Paris 1876); *Œuvres de Pasteur*, Bd. 5 (Masson et Cie, Paris 1928), S. 206.

<sup>2</sup> H. EULER und P. LINDNER, *Chemie der Hefe und der alkoholischen Gärung* (Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig 1915). – H. LUNDIN, *Biochem. Z.* 141, 310, 342 (1923); 142, 454, 463 (1923). – H. LÜERS, *Die wissenschaftlichen Grundlagen von Mälzerei und Brauerei* (Verlag Hans Carl, Nürnberg 1950). – H. HAEHN, *Biochemie der Gärungen* (Walter de Gruyter & Co., Berlin 1952). – A. RIPPENBALDES, *Grundriss der Mikrobiologie* (Verlag Springer, Berlin 1952).

dass die Anreicherung von Äthylalkohol und Kohlendioxyd im Substrat verhindert wird<sup>1</sup>.

In der Weinkelterei konnte festgestellt werden, dass die Lüftung des mit Hefe geimpften Traubensafts im frühen Stadium der Gärung eine günstige Wirkung auf den Zuckerabbau ausübt. Diese beruht nach RIBÉREAU-GAYON und Mitarbeitern<sup>2</sup> sowie AMERINE und JOSLYN<sup>3</sup> auf der Steigerung der Vermehrungsgeschwindigkeit der Hefe in Anwesenheit von Sauerstoff.

Zahlreiche Forscher haben sich mit der Umsteuerung des Zuckerdissimilationstypus der Hefen beschäftigt. In gewissen Fällen gelang es dabei, gärschwache Hefen durch Züchtung bei schlechtem Luftzutritt in gärstarke Hefen umzuwandeln. Andererseits konnte das kräftige Gärvermögen zymasereicher Rassen durch Züchtung unter starker Lüftung praktisch ganz zum Verschwinden gebracht werden<sup>4</sup>. Eine solche Verschiebung im Verhältnis der Atmung zur Gärung je nach der Grösse der Luftzufuhr während der Vermehrung der Hefen wird von einigen Forschern bestritten. Sie konnten zwar einen deutlichen Einfluss der Lüftungsbedingungen auf den Gasstoffwechsel der untersuchten Hefen feststellen, aber mit einer Steigerung des Gärvermögens lief immer eine Erhöhung der Atmungsintensität parallel. Eine Verminderung der Gärungsgeschwindigkeit war ferner stets mit einer Abnahme der Atmungsgeschwindigkeit verknüpft. Eine Umsteuerung oder Umstimmung des Kohlehydratstoffwechsels der Hefen in dem Sinne, dass einer von diesen Prozessen zugunsten des anderen zurücktritt, konnte nicht nachgewiesen werden. Das Verhältnis der Gärungsgeschwindigkeit zur Atmungsgeschwindigkeit stellte bei den betreffenden Hefen einen konstanten Wert dar<sup>5</sup>.

Die gärstärken Hefen, zum Beispiel untergärige Bierhefe, sind bekanntlich wesentlich reicher an Vitamin B<sub>1</sub> als die gärschwachen Typen, zum Beispiel die nach dem Lüftungsverfahren erzeugte *Torula*-Futterhefe. Werden die ersten unter reichlicher Luftzufuhr gezüchtet, so nimmt ihr Aneuringehalt beträchtlich ab, während bei den letzten durch Vermehrung unter schlechtem Luftzutritt eine erhebliche Steigerung des Aneuringehalts erzielt werden kann<sup>6</sup>.

Es konnte gezeigt werden, dass der Typus des Cytochromspektrums bei den Hefen sehr stark von den Lüftungsbedingungen, unter welchen die Züchtung stattfindet, abhängig ist<sup>7</sup>. Beispielsweise werden unter- und obergärige Brauereihefen, welche das zweibandige Cytochromspektrum (Gärungshefetypus) aufweisen, durch längere Fortzüchtung unter reichlichem Luftzutritt so verändert, dass sie das vierbandige Spektrum der nach dem Lüftungsverfahren erzeugten Bäckerhefe (Atmungshefetypus) annehmen. Diese Umwandlung des

Die Abhängigkeit der Gärgeschwindigkeit im approximativ geradlinigen Abschnitt der Gärkurve von der Dauer der N<sub>2</sub>-Gasung und vom Zusatz minimaler Mengen Sauerstoff unmittelbar vor dem Einkippen der Glukoselösung

Behandlung der Hefesuspension (Vgl. Abb. A und B)	Zeitspanne min	Gärgeschwindigkeit ml Kohlendioxyd pro 300 mg feuchte Hefe und Stunde
Zellen aus 17 h alten Kulturen		
1	30–160	15,2
2	60–200	13,0
3	30–160	14,9
4	130–320	8,9
5	70–210	13,1
6	200–450	6,6
7	120–260	11,2
8	240–600	5,1
9	140–320	9,6
Zellen aus 66 h alten Kulturen		
1	60–220	12,1
2	100–230	11,5
3	90–210	12,4
4	100–240	11,1
5	100–230	11,5
6	100–240	11,1
7	100–230	11,5
8	100–260	10,9
9	100–240	11,1

Spektraltypus ist aber nicht unbedingt an eine Vermehrung der Hefe gebunden, sondern kann auch in ruhenden Hefezellen (resting cells) stattfinden<sup>1</sup>.

In den obenerwähnten Untersuchungen über den Einfluss des Sauerstoffs auf die Wechselwirkung zwischen Vermehrung, Atmung und Gärung bei den Hefen enthielt die Gasphase praktisch reinen Stickstoff oder Sauerstoff bzw. native oder synthetische Luft (1 Vol. O<sub>2</sub> + 4 Vol. N<sub>2</sub>). Der Gasstoffwechsel der aeroben Hefesuspensionen wurde somit durchgehend bei hohen Sauerstoffkonzentrationen untersucht. In Zusammenhang mit unseren eigenen Untersuchungen über die Physiologie der Weinhefen<sup>2</sup> schien es nun von Interesse, die Wirkung minimaler Mengen Sauerstoff auf die Vergärung der Glukose durch ruhende Zellen der Kulturweinhefe «Fendant» aus Kulturen verschiedenen Alters zu studieren. Dabei wurde auch die Bedeutung der Dauer der N<sub>2</sub>-Gasung für die physiologische Aktivität der Hefezellen untersucht.

Die zur Gewinnung des Zellmaterials benützten Nährlösungen, Kulturgefässe und Erntemethoden sowie die Details der in den Gärversuchen verwendeten Methodik wurden bereits in einem anderen Zusammenhang ausführlich beschrieben<sup>3</sup>. Hier sei nur erwähnt, dass das Hefematerial in der Nährlösung C gezüchtet wurde. Diese enthält nebst Mineralsalzen und Kaliumzitrat-Puffer vitaminfreies Kaseinhydrolysat als Stickstoffquelle und Glukose als Kohlenstoff- und Energiequelle<sup>4</sup>.

<sup>1</sup> C. H. CHIN, *Nature* 165, 926 (1950).

<sup>2</sup> T. WIKÉN und O. RICHARD, *Antonie van Leeuwenhoek* 17, 209 (1951); 18, 31, 293 (1952); 19, im Druck (1953); *Schweiz. Z. allg. Path. Bakt.* 14, 560 (1951).

<sup>3</sup> T. WIKÉN und O. RICHARD, *Antonie van Leeuwenhoek* 19, im Druck (1953).

<sup>4</sup> T. WIKÉN und O. RICHARD, *Antonie van Leeuwenhoek* 17, 209 (1951); 18, 31, 293 (1952); 19, im Druck (1953); *Schweiz. Z. allg. Path. Bakt.* 14, 560 (1951).

<sup>1</sup> W. BRAUN und R. PFUNDT, *Biochem. Z.* 287, 115 (1936). – R. PFUNDT, *Biochem. Z.* 291, 237 (1937); 294, 300 (1937). – G. MENZINSKY, *Ark. Kemi* (Stockholm) 2, 1 (1950). – H. FINK, R. LECHNER und E. HEINISCH, *Biochem. Z.* 278, 23 (1935); 283, 71 (1936). – H. FINK und R. LECHNER, *Biochem. Z.* 286, 83 (1936). – K. BERNHAUER, *Gärungschemisches Praktikum* (Verlag Springer, Berlin 1939).

<sup>2</sup> J. RIBÉREAU-GAYON, S. LAFOURCADE und M. LAFON, *Ind. Agricol. Alim.* 67, 477 (1950). – J. RIBÉREAU-GAYON, E. PEYNAUD und S. LAFOURCADE, *Ind. Agricol. Alim.* 68, 141 (1951).

<sup>3</sup> M. A. AMERINE und M. A. JOSLYN, *Table wines* (University of California Press, Berkeley 1951).

<sup>4</sup> F. HAYDUCK und H. HAEHN, *Biochem. Z.* 128, 568 (1922). – O. MEYERHOF, *Biochem. Z.* 162, 43 (1925). – O. WARBURG, *Biochem. Z.* 189, 350 (1927).

<sup>5</sup> K. TRAUTWEIN und J. WASSERMANN, *Biochem. Z.* 229, 128 (1930). – F. WINDISCH, *Biochem. Z.* 246, 332 (1932).

<sup>6</sup> H. FINK und F. JUST, *Biochem. Z.* 308, 15 (1941).

<sup>7</sup> H. FINK und E. BERWALD, *Biochem. Z.* 258, 141 (1933). – B. EPHRUSSI und P. P. SLONIMSKI, *C. r. Acad. Sci. Paris* 230, 685 (1950).

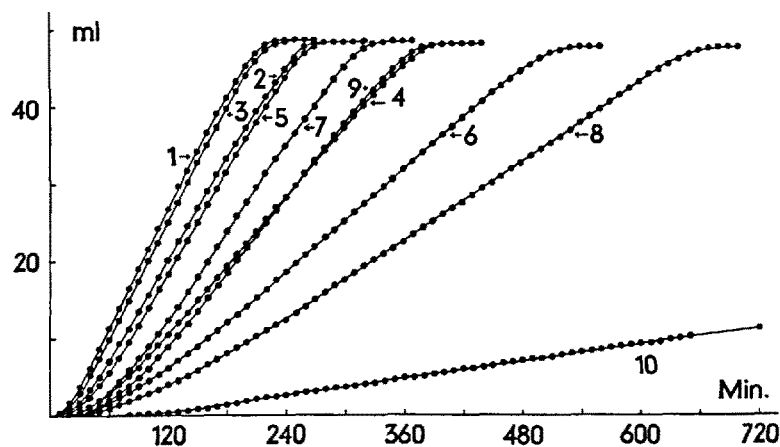


Abb. A. Zellen aus 17 h alten Kulturen.

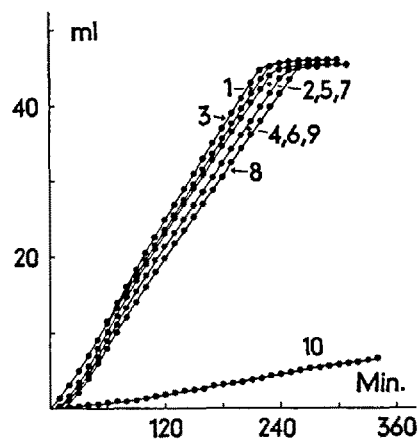


Abb. B. Zellen aus 66 h alten Kulturen

Die Abhängigkeit der Vergärung der Glukose von der Dauer der  $N_2$ -Gasung und vom Zusatz kleiner Mengen  $O_2$  unmittelbar vor dem Einkippen der Glukoselösung. Kurven 1-9:  $CO_2$ -Produktion. Kurve 10:  $O_2$ -Aufnahme.

Behandlung der Hefesuspension vor dem Zusetzen der Glukoselösung:

1. 40 min Schütteln mit ruhender Luft.
2. 40 min Schütteln mit strömendem  $N_2$ .
3. 40 min Schütteln mit strömendem  $N_2$ , Zusatz von 0,6 ml  $O_2$ .
4. 40 min Schütteln mit strömendem  $N_2$ , 20 min Schütteln in ruhender  $N_2$ -Atmosphäre.
5. 40 min Schütteln mit strömendem  $N_2$ , 20 min Schütteln in ruhender  $N_2$ -Atmosphäre, Zusatz von 0,6 ml  $O_2$ .
6. 40 min Schütteln mit strömendem  $N_2$ , 40 min Schütteln in ruhender  $N_2$ -Atmosphäre.
7. 40 min Schütteln mit strömendem  $N_2$ , 40 min Schütteln in ruhender  $N_2$ -Atmosphäre, Zusatz von 0,6 ml  $O_2$ .
8. 40 min Schütteln mit strömendem  $N_2$ , 60 min Schütteln in ruhender  $N_2$ -Atmosphäre.
9. 40 min Schütteln mit strömendem  $N_2$ , 60 min Schütteln in ruhender  $N_2$ -Atmosphäre, Zusatz von 0,6 ml  $O_2$ .
10. 40 min Schütteln mit ruhender Luft.

Die Geschwindigkeit der Kohlendioxydproduktion der Hefezellen wurde volumetrisch in der Apparatur nach von EULER, MYRBÄCK, NILSSON und ALM<sup>1</sup> bei 25°C gemessen, wobei die Schüttelgeschwindigkeit 100 volle Schwingungen (je 100 Hin- und Herbewegungen) pro Minute betrug. Als Gärgefäße dienten Erlenmeyer-Kolben von etwa 50 ml Gesamtvolumen mit einer seitlich eingeschliffenen Ampulle. Diese enthielten 2,0 ml Hefesuspension im Hauptraum und 1,0 ml Glukoselösung in der Seitenampulle. Dies entsprach 300 mg frischer, gewaschener Hefe bzw. 200 mg wasserfreiem Zucker. Zur Herstellung der Hefesuspension bzw. Glukoselösung benutzten wir einen 0,16 M Bernsteinsäure-Natriumsuccinat-Puffer vom pH 4,9. Der zur Gasung der Gärkolben verwendete Stickstoff wurde von Sauerstoff befreit, indem wir das Gas durch alkalische Pyrogallollösung und nachher über rotglühendes reduziertes Kupfer im elektrischen Ofen bei 400–450°C strömen liessen.

Die Ergebnisse zweier typischer Versuche sind in den Abbildungen A und B und in der Tabelle dargestellt. Es ist ersichtlich, dass die Geschwindigkeit der Vergärung der Glukose durch die ruhenden Hefezellen, welche aus den 17 h alten Kulturen stammten, unter anaeroben Bedingungen sehr stark von der Art der  $N_2$ -Gasung abhängig ist, indem sie kräftig abnimmt (13,0 bzw. 8,9, 6,6 und 5,1 ml  $CO_2$  pro 300 mg feuchte Hefe und Stunde), wenn die Dauer der  $N_2$ -Behandlung grösser wird (40 bzw. 40 + 20, 40 + 40 und 40 + 60 min). Es geht ferner hervor, dass durch den Zusatz einer kleinen Menge Sauerstoff (3,0 ml Luft oder 0,6 ml  $O_2$ ) eine günstige Wirkung auf die Gärung hervorgerufen wird, indem die Geschwindigkeit der Kohlendioxydproduktion wesentlich gesteigert wird (von 13,0 bzw. 8,9, 6,6 und 5,1 auf 14,9 bzw. 13,1, 11,2 und 9,6 ml  $CO_2$  pro 300 mg feuchte Hefe und Stunde). Beim Zellmaterial aus den 66 h alten

Kulturen konnte dieser Einfluss der Dauer der  $N_2$ -Gasung bzw. des Zusatzes einer kleinen Menge Sauerstoff nicht oder nur in geringem Ausmasse festgestellt werden (von 11,5 bzw. 11,1, 11,1 und 10,9 auf 12,4 bzw. 11,5, 11,5 und 11,1 ml  $CO_2$  pro 300 mg feuchte Hefe und Stunde).

Der  $N_2$ - bzw.  $O_2$ -Effekt wurde durch die Ergebnisse zahlreicher weiterer Versuche bestätigt. In einigen von diesen wurde die alkalische Pyrogallollösung, welche zur Absorption des im Bombenstickstoff vorhandenen Sauerstoffs diente, durch eine alkalische Lösung von Natriumhydrosulfit (Natriumhyposulfit,  $Na_2S_2O_4$ ) ersetzt. Die gleichen Effekte konnten auch nach Gasung mit Argon festgestellt werden.

Der Zusatz von 3,0 ml Luft oder 0,6 ml Sauerstoff entspricht einer  $O_2$ -Konzentration in der Gasphase von etwa 1 Vol.%. In Experimenten mit synthetischen Gemischen von Stickstoff und Sauerstoff konnte der erwähnte Effekt bereits in Anwesenheit von 0,01 bis 0,05 Vol.% Sauerstoff eindeutig nachgewiesen werden.

In ruhenden Zellen der Weinhefe «Fendant» aus sehr jungen Kulturen scheint somit eine oder mehrere Komponenten des Zymasystems durch Gasung mit Stickstoff oder Argon inaktiviert zu werden. Die Inaktivierung wird durch minimale Mengen Sauerstoff ganz oder teilweise aufgehoben. Bei ruhenden Zellen aus alten «Fendant»-Kulturen können diese Effekte nicht oder nur in geringem Ausmasse festgestellt werden.

Diese Arbeit gehört in den Rahmen der Untersuchungen über die Physiologie der Weinhefen, welche von der Abteilung für Landwirtschaft des Eidgenössischen Volkswirtschaftsdepartements aus dem Weinbaufonds unterstützt werden. Den zuständigen Behörden sind wir zu grossem Dank verpflichtet. Fräulein R. BUCHMANN danken wir bestens für sorgfältige Assistenz.

T. WIKÉN und O. RICHARD

Institut für landwirtschaftliche Bakteriologie und Gärungsbiologie, Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich, den 14. Juli 1953.

<sup>1</sup> R. NILSSON, Meth. Fermentforschung (hg. von BAMANN und MYRBÄCK) 3, 2150 (1941).

### Summary

This study deals with the effect of minute amounts of oxygen upon the fermentation of glucose by resting cells of the same wine yeast Fendant grown for 17 and 66 h, respectively, in a synthetic substrate containing glucose, vitamin-free casein hydrolysate, citrate buffer and mineral salts. The results prove conclusively the dependence of the metabolic activity of the yeast cells from young cultures on the duration of flushing with oxygen-free nitrogen or argon before the addition of glucose, the rate of carbon dioxide production in the approximately linear phase of fermentation decreasing considerably with increasing flushing times. This inactivation of the cells is removed, as a whole or partly, at oxygen tensions greater than 0.01–0.05% by volume. Resting cells from old Fendant cultures show the effects mentioned only to a very small extent. It is assumed that in resting cells from young Fendant yeast cultures one or more components of the zymase system are inactivated on flushing with nitrogen or argon. The activity is restored, quantitatively or partly, by minute amounts of oxygen introduced prior to the addition of glucose.

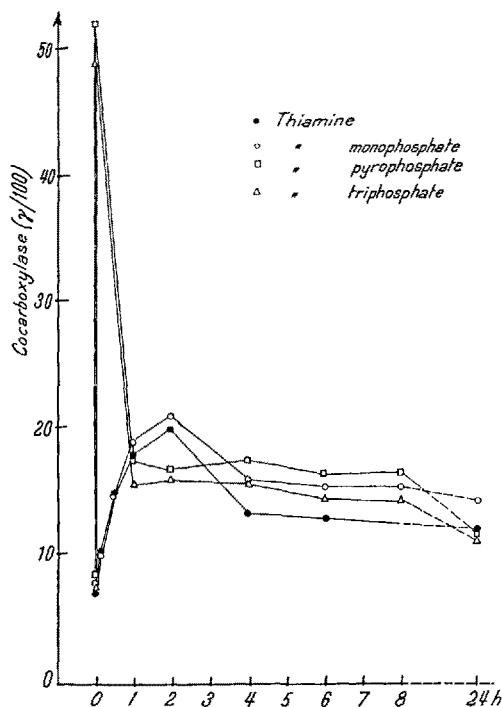
### The Level of Blood Cocarboxylase after Administration of Thiamine and its Phosphoric Esters

Various aspects of thiamine and diphosphothiamine (DPT) metabolism have been investigated by several authors<sup>1</sup>. Since MARKEES and MEYER<sup>2</sup> pointed out the therapeutical importance of DPT, the fate of this coenzyme, when administered parenterally, has been taken into account. The level of blood cocarboxylase was studied after thiamine<sup>3</sup> and DPT<sup>4</sup> injection. The excretion of thiamine by the kidneys after administration of thiamine and DPT was studied by TATSUO ABE<sup>5</sup>. According to this author, the administration of both thiamine and DPT is followed by the excretion of free thiamine, and it has been found that when DPT is injected, the elimination of thiamine is extended over a longer period of time.

The purpose of this work was to investigate the modifications of the content of blood cocarboxylase when thiamine or one of its phosphoric esters (mono-, pyro-, tri-) was administered.

The experiments were performed on 6 male dogs kept on a standard diet. The amount of blood cocarboxylase in each animal was determined by the method of WESTENBRINK<sup>6</sup> before intravenous injection of free thiamine (3 mg/kg) and at different times after this administration over a period of 24 h. At one week intervals, the same type of experiment was repeated by injecting intra-

venously monophosphothiamine (4 mg/kg), diphosphothiamine (5 mg/kg) and triphosphothiamine (6 mg/kg) respectively. The results of these experiments are given in the Figure where the points of the curves represent the average of the results obtained for all 6 animals.



The content of blood cocarboxylase in dogs after intravenous injection of thiamine, monophosphothiamine, diphosphothiamine, and triphosphothiamine.

From the Figure it can be seen that the administration of thiamine and monophosphothiamine brings about an increase in blood cocarboxylase, its maximum being 2 h after injection. Furthermore, monophosphothiamine appears to be somewhat more active than free thiamine. The administration of diphosphothiamine and triphosphothiamine is immediately followed by a sharp increase in blood cocarboxylase activity. However, between the first and the third hour, the level of blood cocarboxylase is lower than when thiamine and monophosphothiamine are injected.

These results indicate that the administration of all three thiamine phosphoric esters is more effective than that of thiamine itself in maintaining the level of blood cocarboxylase higher than in normal conditions for at least 24 h. The Figure shows clearly that triphosphothiamine has the same behaviour as DPT. This fact provides strong evidence that *in vivo* triphosphothiamine is not immediately split into monophosphothiamine and pyrophosphate, as was observed *in vitro*<sup>1</sup>.

The thiamine phosphoric esters used in this work were prepared according to VISCONTINI *et al.*<sup>2</sup>. We are indebted to Prof. VISCONTINI for his suggestions in the preparation of these substances.

DAGMAR SILIPRANDI and F. LAVIANO

*Institute of Biological Chemistry, University of Rome, June 15, 1953.*

<sup>1</sup> M. VISCONTINI, G. BONETTI, C. EBNÖTHER, and P. KARRER, *Helv. chim. Acta* 34, 1388 (1951).

<sup>2</sup> M. VISCONTINI, G. BONETTI, and P. KARRER, *Helv. chim. Acta* 32, 1478 (1949).

<sup>1</sup> S. OCHOA, in *The biological action of the vitamins*, by E. A. EVANS JR. (University of Chicago Press, 1944), p. 17. – B. C. P. JANSSEN, *Vitamins and Hormones* 7, 83 (1949). – H. G. K. WESTENBRINK, *Expos. ann. bioch. méd.* 12, 121 (1951).

<sup>2</sup> S. MARKEES and F. W. MEYER, *Schweiz. med. Wschr.* 79, 931 (1949).

<sup>3</sup> H. VAN MARKEN LICHTENBELT and E. FLORIJN, *Bioch. bioph. Acta* 8, 349 (1952). – N. SILIPRANDI, F. NAVAZIO, and M. LOVETTI, *Boll. Soc. it. Biol. Sper.* 28, 263 (1952).

<sup>4</sup> H. VAN MARKEN LICHTENBELT and E. FLORIJN, *Bioch. bioph. Acta* 8, 349 (1952). – D. SILIPRANDI and F. LAVIANO, *Boll. Soc. it. Biol. Sper.* 28, 264 (1952).

<sup>5</sup> ABE TATSUO, *J. Japan. Soc. Food Nutr.* 1, 175 (1949).

<sup>6</sup> H. G. K. WESTENBRINK and E. STEYN PARVÉ, *Inter. Rev. Vitam. Res.* 21, 461 (1950).