

Brèves communications - Kurze Mitteilungen Brevi comunicazioni - Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. - Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. - Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. - The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

Biophysikalische Studien mit synthetischem Lezithin

Wir haben kürzlich gezeigt¹, dass synthetisches Dipalmitoyl- α -lezithin², in Chloroform gelöst, speziell bei Gegenwart von zweiwertigen Kationen wie Kalzium, Barium usw., beim Schütteln mit einer neutralen wässrigen Lösung von Tropäolin dieses der wässrigen Phase entzieht und in die Chloroform-Phase überführt. Dabei wurde der Grad der Aktivierung des Lezithins durch verschiedene Kationen miteinander verglichen.

Es hat sich nun gezeigt, dass Lezithin, in CCl_4 gelöst, unter sonst gleichen Bedingungen weniger aktiv ist als in Chloroform, dass also nicht nur die Gegenwart bestimmter Ionen in der wässrigen Phase, sondern auch die Eigenschaft des lipoiden Lösungsmittels die Aktivität des Lezithins massgebend beeinflusst. Dass Lezithin in apolaren Lösungsmitteln wie Benzol in Form von Mizellen³ oder in einer dielektrisch unwirksamen Form⁴ vorliegt, ist bereits früher auf anderen Wegen erkannt worden. Dass diese Mizellen auch in unserem Versuch in CCl_4 weniger wirksam sind, deutet darauf hin, dass ihre polaren Gruppen sich in apolaren Lösungsmitteln zu heteropolaren Ringen vereinigen, so dass sowohl ihre Dipolmomente wie auch ihre Additionsfähigkeit für Fremdionen verschwindet. Im Hinblick auf die zweifellos überragende biologische Bedeutung des Lezithins und die Tatsache, dass dieses jeweils zusammen mit andern Lipoiden wie Fetten, Wachsen, Cholesterin usw. vorkommt, erschien es uns von Interesse zu untersuchen, durch welche neutralen lipophilen Stoffe Lezithin in apolarer Phase (CCl_4) in unserem Versuch aktiviert, das heisst diese Mizellen gelockert werden, so dass es bereits ohne die Gegenwart von Kalzium¹ usw. direkt Tropäolin-Natrium anlagert.

Wir haben, in Anlehnung an die in unserer ersten Mitteilung¹ beschriebene, sehr einfache Versuchsanordnung jeweils in 4 cm³ einer Lösung von 73 mg% Lezithin⁵ in frisch destilliertem CCl_4 , 0,4 cm³, bzw. 0,4 g der zu prüfenden Substanz, gelöst und mit 4 cm³ einer 5 mg-proz. Tropäolin-Na-Salz-Lösung in $\frac{1}{500}$ M Phosphatpuffer vom pH 7,2 in einem dickwandigen Reagensglas 4 min kräftig geschüttelt, dann zentrifugiert und in der klaren überstehenden wässrigen Lösung das darin verbliebene Tropäolin spektrophotometrisch bestimmt. Wir erhielten für die homologen primären Alkohole die in Tabelle I ersichtlichen relativen Werte. Als Mass der Aktivierung des Lezithins dient die Abnahme an Tropäolin in der wässrigen Phase in % des ursprünglich vorhandenen.

Die Unwirksamkeit des Methylalkohols rührt zweifellos daher, dass er beim Schütteln in die wässrige Phase über-

geht, da an diesem Test zugleich der Verteilungskoeffizient CCl_4 /Wasser berücksichtigt wird.

Tabelle I

Alkohole	Abnahme an Tropäolin in der wässrigen Phase in %
Methanol	0 %
Äthanol	4,8%
n-Butanol	15,2%
n-Amylalkohol	20,0%
n-Heptylalkohol	14,0%
n-Oktylalkohol	3,6%
n-Nonylalkohol	0 %
n-Amylalkohol ohne Lezithin	0 %

Der Abfall der Wirkung bei den höheren Gliedern ist dem verhältnismässig geringeren Anteil an polaren Hydro-

Tabelle II

Ketone	
Aceton	2,0%
Methyl-Äthylketon	8,0%
Di-Äthylketon	30,0%
Di-Isobutylketon	0 %
Acetophenon	0 %
Cyclopentanon	23,0%
Cyclohexanon	17,2%
Cyclohexanon, bei 50°C geschüttelt . .	6,8%

xylgruppen zuzuschreiben, und es resultiert daher ein flaches Maximum der Wirkung in der Gegend des Amylalkohols.

Tabelle III

Säureamide u. a.	Abnahme an Tropäolin in der wässrigen Phase in %
Benzonitril	0 %
Chlorbenzol	0 %
Nitrobenzol	0 %
Benzoesäureäthylester	0 %
Zimtsäure-n-amylamid	0 %
p-Toluolsulfonsäurediäthylamid . .	0 %
Zimtsäuredimethylamid	10,6%
Cinnamalessigsäurepiperidid	15,6%
Zimtsäurediäthylamid	16,3%
Zimtsäurediäthylamid, bei 50-60°C geschüttelt	8,6%
Zimtsäurepiperidid	17,6%
p-Methoxyzimtsäurepiperidid	21,8%
Zimtsäuremorpholid	29,0%
Zimtsäuremorpholid, bei 50-60°C geschüttelt	7,2%

¹ R. HIRT und R. BERCHTOLD, Exper. 14, 436 (1958).

² R. HIRT und R. BERCHTOLD, Pharm. Acta Helv. 33, 349 (1958).

³ P. H. ELWORTHY, J. chem. Soc. 1959, 813. - M. FAURE and J. LEGAULT-DEMARE, Bull. Soc. Chim. biol. 32, 509 (1950). - H. I. PRICE and W. C. M. LEWIS, Biochem. J. 23, 1030 (1929). - E. BAER *et al.*, J. cell. comp. Physiol. 17, 355 (1941). - K. J. PALMER und F. O. SCHMITT, J. cell. comp. Physiol. 17, 385 (1941).

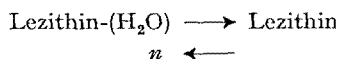
⁴ R. KUHN, Chem. Ber. 68, 2386 (1935).

⁵ Synthetisches α -Dipalmitoyl-lezithin.

Ähnlich verhalten sich Ketone, die in Tabelle II aufgeführt werden.

Ein weiteres Beispiel einer homologen Reihe aktiver Verbindungen ist in Tabelle III dargestellt. Es sind dies N-Dialkylamide der Zimtsäure. Die Verhältnisse liegen ähnlich wie bei den Alkoholen, nur dass die Wirkung allgemein etwas erhöht erscheint.

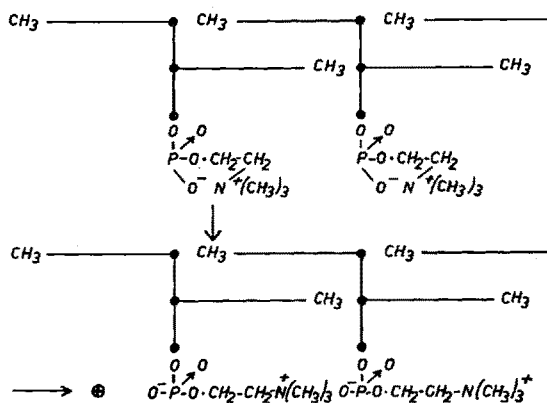
Dass es nun nicht die direkte Erhöhung der Dielektrizitätskonstante der lipoiden Phase ist, welche das Lezithin aktiviert, erhellt daraus, dass Nitrobenzol, Benzonitril, Chlorbenzol trotz hoher Dielektrizitätskonstante völlig unwirksam sind. Vielmehr ist anzunehmen, dass diejenigen Stoffe wirksam sind, welche die lipoiden Phase hydratisieren, das heisst Wasser in sie einführen. Aktive Säureamide sind in kaltem Wasser viel leichter löslich als in warmem, was ebenfalls für eine Hydratisierung spricht. Besonders deutlich zeigen diesen Löslichkeitscharakter zum Beispiel die Diäthylamide der Buttersäure, Valeriansäure, Capronsäure und Dipropylamide der Krotensäure. Die in diesem Versuch aktive Form des Lezithins ist wohl dessen Hydratform, wie sie von BAER⁶ und auch von HOWTON⁷ beschrieben worden ist und die wir durch Hydratwasser-Bestimmung nach Karl Fischer bestätigen konnten. Eigenartigerweise scheint das Gleichgewicht



in CCl_4 allein auch beim Schütteln mit Wasser ganz auf Seite der hydrattwasserarmen Form zu liegen, und erst die Zugabe eines Lösungsvermittlers für Wasser ermöglicht die Bildung der stärker hydratisierten Form.

Diskussion der Ergebnisse. Nach KUHN⁴ ist Lezithin in benzolischer Lösung völlig intermolekular heteropolar assoziiert und dielektrisch unwirksam, während es in Alkohol monomolekular vorliegt. Man darf wohl annehmen, dass in einem ganz bestimmten Milieu diese beiden Formen sehr leicht ineinander übergehen können, was uns, zusammen mit unseren Ergebnissen und der Tatsache, dass Lezithin sehr leicht Lamellen und Schläuche (sog. Myelin-Figuren) bildet, veranlasst, die folgenden Hypothesen aufzustellen:

1. Darnach könnte man sich vorstellen, dass das Prinzip der Nervenleitung in folgendem Vorgang besteht:

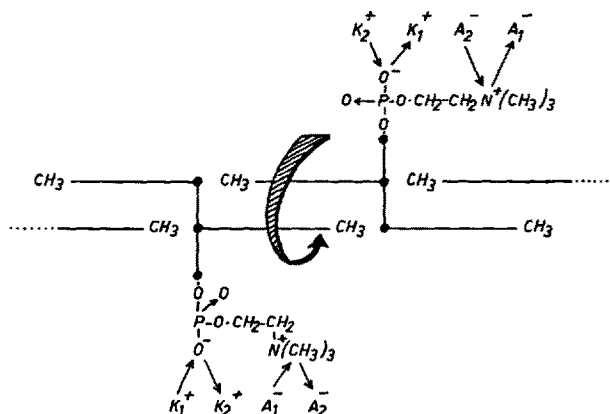


Eine Lezithin-Lamelle oder ein -Röhrchen mit der im 1. Bild dargestellten oberen labilen Struktur wird bei der Annäherung einer positiven Ladung, zum Beispiel Proton oder anderes Kation, von links unter Umlagerung von der

intramolekularen zur intermolekularen Zwitterionverknüpfung in die untere Form übergehen, wobei auf der rechten Seite die fortgeleitete positive Ladung in Form der Trimethylammoniumgruppe wieder erscheint. Von rechts nach links kann natürlich ebenso eine negative Ladung geleitet werden. Diese Leitung wäre eine dielektrische Verschiebung einzelner Impulse über die Kette und wäre verknüpft mit einer kleinen materiellen Verschiebung der zwitterionischen Ladungsträger $-\text{O}-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$. Dadurch wäre die gegenüber der metallischen Leitung sehr viel geringere Geschwindigkeit der Nervenleitung plausibel, ebenso die Tatsache, dass der Nerv nur einzelne Impulse bei einer bestimmten Reizschwelle überleiten kann.

Massgebend für die Funktion dieser Leitung ist die dynamische Situation. Fixierung des Lezithins in einer der beiden Extremformen durch zu starke oder zu schwache Hydratisierung, hervorgerufen durch Eindringen geeigneter Stoffe in das Medium, müsste diese Leitung hemmen.

2. Die Fähigkeit des Lezithins, aus wässriger Phase ionisierte Stoffe zu addieren und sie in lipophile Komplexe überzuführen, legt weiter den Gedanken nahe, Lezithin könnte als «rotating carrier» in folgender Weise eine wesentliche Rolle beim aktiven Transport ionogener Substanzen durch die Zellwand spielen:



Lamellenförmig in der schematisch angegebenen Form aneinandergelagerte Lezithinmoleküle der Zellwand drehen sich um die Längsachse ihrer Fettsäureketten; beladen sich auf der einen Seite mit Anionen A_1 und Kationen K_1 und tauschen nach der Drehung auf der andern Seite die Ionen gegen A_2 und K_2 aus und drehen sich damit wieder zurück.

Die isolierende Fettschicht würde durch diese Drehung niemals unterbrochen, um so mehr als ohne weiteres mehrere solcher Lamellen übereinandergelagert werden können, wobei stafettenartig die Ionen von einer Schicht auf die andere übertragen werden. Es ist klar, dass lipoid-lösliche Stoffe ohne diesen Mechanismus diese Fettschicht durchdringen können. β -Lezithin, das biologisch offenbar nicht vorkommt, wäre unfähig, diese Drehung auszuführen. Durch Temperaturerhöhung wird die Hydratisierung der aktivierenden Stoffe sowohl in wässriger wie in lipoider Phase vermindert. Dies bewirkt eine Verminderung der Aktivität des Lezithins bei erhöhter Temperatur in unserem Versuch. Spielt nun die Aktivität des Lezithins eine bestimmte Rolle im Zellstoffwechsel, so wäre über die mehr oder weniger starke Hydratisierung der Lipide und damit parallel eine Veränderung der Lezithinaktivi-

⁶ E. BAER, J. Amer. chem. Soc. 75, 621, 5535 (1953).

⁷ D. R. HOWTON, Science 119, 420 (1954).

⁸ J. F. DANIELLI, Soc. exper. Biol. 8, 509 (1954).

tät zudem ein automatischer Mechanismus der biologischen Temperaturregelung gegeben.

R. HIRT und R. BERCHTOLD

Forschungsinstitut Dr. A. Wander AG., Bern, 29. Mai 1959.

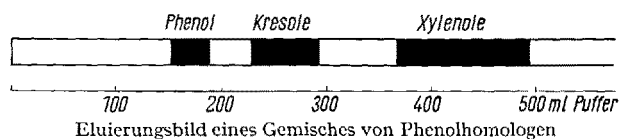
Summary

Dissolved in an apolar solvent (CCl_4), lecithin, also when shaken with water, is present in an inactive form of low water content. Certain liposoluble substances hydrate the lipid phase and consequently the lecithin dissolved therein, converting it into the active form.

The importance of lecithin for cell wall permeability and for conduction of nerve impulses is discussed.

Über die Trennung von Phenol-Derivaten an Ionenaustauscherharzen

Über erfolgreiche Trennungen von Phenol und seinen Derivaten auf papierchromatographischem Wege ist verschiedentlich berichtet worden¹. Die Ausbeute der getrennten Verbindungen bleibt jedoch im μg -Bereich; die quantitative Ermittlung lässt sich daher relativ schlecht durchführen.



In eigenen Untersuchungen ist die Möglichkeit geprüft worden, mit Hilfe von kernsulfonierten Polystyrolharzen, die eine hohe Kapazität besitzen, eine Trennung und Reinigung einzelner Phenolderivate zu erreichen. Wir verwendeten 55 X 1 cm-Säulen, die mit der Na-Form des Kationenaustauschers Dowex 50 X 4 (minus 400 mesh) gefüllt waren. Die Präparierung der Harze ist an anderer Stelle beschrieben worden^{2,3}.

Das Kationenaustauscherharz wird mit einem Na-Zitrat-Puffer vom pH 3,42 (2,4) in die chromatographische Röhre eingeschlammmt und mit etwa 120 ml 0,2 N NaOH gewaschen. Nach Äquilibrierung mit der genannten Pufferlösung ist die Säule gebrauchsfertig. Die Analysenprobe, die 10–15 mg jeder Komponente umfassen kann, soll einen pH-Wert von 3–3,4 besitzen. Die Eluierung erfolgt mit der angegebenen Pufferlösung bei einer Durchlaufgeschwindigkeit von 15 ml/h. Die Durchsatzrate der Pufferlösung kann bis auf 30 ml/h erhöht werden, ohne eine Verschlechterung des Trenneffektes zu bewirken, wenn entsprechend feinkörnige Harzpartikel verwendet werden. Die Einzelkomponenten haben wir mit Hilfe von diazotiertem Nitranilin sowie mittels der Infrarotspektroskopie qualitativ im Eluat nachweisen können.

Über weitere Untersuchungen zur Trennung von komplexen Gemischen von Phenolderivaten an Ionenaustauschersäulen wird an anderer Stelle berichtet werden.

G. KRAMPITZ und W. ALBERSMEYER

Institut für Anatomie und Physiologie der Haustiere der Universität Bonn, 5. Mai 1959.

¹ F. CRAMER, *Papierchromatographie*, 4. Auflage (1958), p. 149.

² S. MOORE und W. H. STEIN, *J. biol. Chem.* 152, 663 (1951); 211, 893 (1954).

³ R. MÜLLER und G. KRAMPITZ, *Z. Tierernähr. Futtermittelkunde* 11, 44 (1956).

Summary

A new method for the chromatographic separation of phenolic derivatives on sulphonated polystyrene resins is reported.

Effet cytologique des traitements mécanique et ultrasonique sur quelques bacilles aérobies

MUDD *et al.*¹ ont soumis divers bacilles gram-positifs à l'action des vibrations soniques; après 10 min ils ont observés des fragments gram-négatifs parmi les bactéries gram-positives et ont utilisé ce procédé pour l'isolement des parois cellulaires. Cependant la plupart des études similaires ont été faites avec un vibreur électromagnétique spécial (MICKLE²) en combinaison avec des «ballotini» (perles de verre) de 0,2 mm de diamètre; cette technique a surtout été employée pour l'isolement des parois cellulaires (DAWSON³, SALTON et HORNE⁴). D'une façon plus détaillée, TOMCSIK et BAUMANN-GRACE⁵ ont étudié l'effet cytologique de cet appareil sur 32 souches de *B. megaterium*, 12 de *B. anthracis* et 31 de *B. cereus*. Le but du présent travail est d'élucider et de comparer les effets de ces 2 techniques sur les formes végétatives et les spores de quelques bacilles aérobies. Nous avons utilisé le vibreur MICKLE et un oscillateur ultrasonique M. S. E. MULLARD.

1. *Effet des vibrations ultrasonique sur les formes végétatives de B. anthracis, B. cereus et B. megaterium (Bacillus M)*. Les cultures sur le milieu Gladstone-Fildes gélosé ont été maintenues 16 h dans l'étuve à 30° C (*B. cereus* et *Bacillus M*) ou dans l'étuve à 37° C (*B. anthracis*). Le premier effet de l'agitation ultrasonique sur les formes végétatives est le découpage des chaînes: après un temps très court de 1 ou 2 min, toutes les formes sont monocellulaires. Le second effet se manifeste sur la paroi latérale: les parois deviennent vides, sont brisées en fragments de plus en plus petits et après 30 min leur dissolution est presque complète. De cette observation, nous pouvons tirer la conclusion que les parois transversaux sont scindées avant la lésion des parois latérales. L'effet sur la capsule de *Bacillus M* a été également étudié: après 90 s d'agitation ultrasonique le serum antipolysaccharidique ne révèle plus de septums transversaux mais des condensations polaires sont encore visibles; le serum antipeptidique montre une destruction partielle de la capsule. Après 5 à 10 min 80% des formes monocellulaires sont vides mais l'encre de Chine révèle encore la présence de la couche intérieure de la capsule. Après 20 min, la dissolution des cellules est très avancée. La capsule ne protège donc pas, d'une façon appréciable, la paroi cellulaire.

Bacillus M ne forme des spores que sur l'extrait de pommes de terre gélosé mais même après 14 jours d'incubation sur ce milieu, on n'observe pas de libération des spores (TOMCSIK et BAUMANN-GRACE⁶). Si l'on sou-

Travail effectué avec l'aide du Fonds de recherches Hans Buess.

¹ S. MUDD, K. POLEVITZKY, T. F. ANDERSON et L. A. CHAMBERS, *J. Bact.* 42, 251 (1941).

² H. MICKLE, *J. R. micr. Soc.* 68, 10 (1948).

³ J. M. DAWSON, *The Nature of the Bacterial Surface* (Blackwell, Oxford 1949), p. 119.

⁴ M. R. J. SALTON et R. W. HORNE, *Biochim. biophys. Acta* 7, 19 (1951).

⁵ J. TOMCSIK et J. B. BAUMANN-GRACE, *Schweiz. Z. Path. Bakt.* 19, 566 (1956).

⁶ J. TOMCSIK et J. B. BAUMANN-GRACE, *Schweiz. Z. Path. Bakt.* 21, 914 (1958).