

Alle Versuche führten wir in 0,05 M Phosphatpuffer vom pH 7 durch. Die Temperatur betrug $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Die anfängliche H_2O_2 -Konzentration betrug immer 10^{-2} . Zur Versuchszeit 0 wird auf ein Endvolumen von 20 ml 1 ml einer $4 \times 10^{-4}\%$ igen frisch bereiteten Lösung von kristallisierter Katalase Boehringer zugegeben. Die anfängliche Steilheit der $[\text{H}_2\text{O}_2]$ -Zeitkurve nahmen wir als Mass für die α -Aktivität der Katalase⁶.

Mit dieser Messanordnung führten wir nun mit den drei Hemmstoffen CN^- , N_3^- und SH^- eine analoge Versuchsreihe durch. In Versuch I wird zunächst die Reinheit der H_2O_2 -Lösung sowie die polarographische Apparatur und in Versuch II die α -Aktivität der Katalase kontrolliert. In Versuch III wird unmittelbar nach der Katalase soviel Inhibitor zugesetzt, dass eine 50%ige Hemmung eintritt. In Versuch IIa wird vor dem Hemmstoff ausserdem noch Ag^+ zugesetzt und kontrolliert, ob die $[\text{Ag}^+]$ ausreicht, um den Hemmstoff zu binden. In Versuch IV, der entscheidet, ob eine Enthemmung im Sinne von (2) möglich ist, wählten wir die umgekehrte Reihenfolge der Zugabe: Katalase, Hemmstoff, Ag^+ .

Es zeigte sich, dass sich bei Versuchen vom Typus IV die drei Hemmstoffe grundsätzlich verschieden verhalten. Die einmal durch CN^- gehemmte Katalase kann wieder reaktiviert werden durch Zugabe von Ag^+ . Die CN^- -Hemmung ist somit, im Einklang mit den Versuchen von CHANCE⁷, primär auf eine reversible Komplexbildungsreaktion zurückzuführen. Hingegen kann die durch SH^- und N_3^- gehemmte Katalase nicht wieder enthemmt werden, was dafür spricht, dass hier ein ganz anderer Mechanismus wirksam ist oder dass nach der Komplexbildung sofort eine Folgereaktion eintritt⁸, die den Vorgang irreversibel macht.

Fräulein LUCIA GRAF danken wir für die Durchführung der Katalaseversuche. Der Stiftung zur Förderung der Arbeiten auf dem Gebiete der Atomwissenschaften danken wir bestens für die gewährte Unterstützung.

S. FALLAB und H. ERLÉNMEYER

Anstalt für anorganische Chemie, Basel, 19. November 1959.

Summary

The mechanism of catalase inhibition by CN^- , N_3^- , and SH^- has been investigated by a polarographic method. CN^- has been found to inhibit reversibly by a coordinating mechanism, whereas N_3^- and SH^- inhibits catalase irreversibly.

⁷ B. CHANCE, J. biol. Chem. 179, 1299 (1949).

⁸ In Übereinstimmung mit den Versuchen von D. KEILIN und D. NICHOLS, wonach N_3^- peroxydatisch oxydiert wird⁵.

On the Protease and Amylase Production in the Midgut Gland of Young and Mature African Snails

The African Giant Snail, *Achatina fulica* BOWDICH, changes its diet and feeding habits markedly as it grows older: whereas young snails feed mainly on fresh leaves and other green parts of plants, the older, mature snails are noted for their omnivorous feeding habits. They usually feed on decaying matter, even on small dead animals^{1,2}. Such an obvious change in feeding habits

suggests the possibility of a change in the enzyme pattern of the large midgut gland, in that young snails may produce more carbohydrates and probably less proteases than older ones.

To check this hypothesis 'enzyme powders' were made of glands from young (shell-length less than 4 cm) and older snails (shell-length 7 cm and over) which had previously been starved for 1–2 weeks, during which time feces was removed regularly. Water was available to them all the time to prevent estivation. The enzyme activity of the powders was determined (see for the technique used of making enzyme powders, the enzyme extracts and the determination of the amylase and protease activity 7 and 8). The results of these experiments were (Table):

Table

(a) Amylase (amount of reducing sugars present, expressed in mg glucose)

Small snails	Large snails
70.4	70.4
73.4	70.4
73.1	69.2
73.2	70.4
	70.4

(b) Protease (SØRENSEN's formaldehyde titration of 2 ml of enzyme extract-substrate mixture)

0.02	0.22
0.15	0.21
0.15	0.17
0.09	0.21
0.10	0.18
	0.26
	0.18

The significance of the differences in the population of data for amylase and protease activity between the young and the old snails was statistically tested by applying a *t*-test for small samples of unequal size³. The *p*-values for amylase- and protease activity in both groups are 0.02 and approximately 0.003 respectively. Hence, there is a significant difference in the activities of these two enzymes between the groups: *in the herbivorous snails slightly more amylase is produced than in the old omnivorous ones. The latter produce definitely more proteases.*

The changes of the enzyme activity in *Achatina* as it grows older agree very well with the changes observed in its feeding habits: the enzyme production 'fits' in the changed (normal) diet. The question now arises: is this change in enzyme production caused by that in feeding habits, or is it an integrative part of this latter change? Individual, diet depending changes in the digestive enzyme production have been reported to exist in a number of cases^{4–6}, but such clear-cut correlative changes were not demonstrated to exist in the older *Achatina*^{7–9}. It seems

³ We are indebted to Dr. A. L. TESTER, who kindly checked the results.

⁴ M. I. GROSSMAN, H. GREENGARD, and A. C. IVY, Amer. J. Physiol. 138, 676 (1942/43).

⁵ B. T. SQUIRES, J. Physiol. 119, 153 (1953).

⁶ W. E. KNOX, V. H. AUERBACH, and E. C. C. LIN, Physiol. Rev. 36, 164 (1956).

⁷ C. L. PROSSER and P. B. VAN WEEL, Physiol. Zool. 31, 171 (1958).

⁸ P. B. VAN WEEL, Z. vgl. Physiol., in print (1959).

⁹ P. B. VAN WEEL, Exper. 15, 110 (1959).

¹ P. B. VAN WEEL, Chron. Nat. 104, 241 (1948).

² H. W. LANGE, Pac. Scie. 4, 323 (1950).

therefore logical to assume that in this snail the pattern of enzyme production changes on ageing. Whether this affects the food preference, or whether it is only a part of the entire physiological process, leading to a change in feeding habita, is still an unsolved problem.

A. C. SMITH and P. B. VAN WEEL

Department of Zoology and Entomology, University of Hawaii (U.S.A.), September 16, 1959.

Zusammenfassung

Junge Individuen von *Achatina fulica* Bowdich fressen mit Vorliebe Pflanzenteile, ältere Individuen sind omnivor. Die Enzymaktivitäten der grossen Mitteldarmdrüse wurden untersucht: bei jungen Tieren wird etwas mehr Amylase als bei älteren Individuen, bei älteren Tieren deutlich mehr Protease als bei jüngeren Individuen produziert. Zwischen Enzymproduktion und Futterwahl besteht also eine Korrelation, doch ist ihre kausale Beziehung noch nicht geklärt.

Alkaloid Studies XXIII¹
Isolation of Four New *Aspidosperma* Alkaloids:
Cylindrocarpine, Refractine, Pyrifoline,
and Pyrifolidine

The recent interest² in alkaloids of the genus *Aspidosperma* prompts us to record in preliminary form some of the results of a systematic survey of Brazilian *Aspidosperma* species which is now in progress in our laboratories.

Our results with *A. olivaceum* Muell.-Arg. do not differ from those already published recently³, while the only

¹ Paper XXII, J. S. E. HOLKER, M. CAIS, F. A. HOCHSTEIN and C. DJERASSI, J. org. Chem. 24, 314 (1959).
² For leading references see: J. SCHMUTZ and H. LEHNER, Helv. chim. Acta 42, 874 (1959). – P. C. FERREIRA, G. B. MARINI-BETTOLO, and J. SCHMUTZ, Exper. 15, 179 (1959). – M. A. ONDETTI and V. DEULOFEU, Tetrahedron Letters No. 7, 1 (1959).
³ J. SCHMUTZ and F. HUNZIKER, Pharm. Acta Helv. 33, 341 (1958).

Table

	Cylindrocarpine		Refractine		Pyrifoline		Pyrifolidine		
Formula	C ₂₉ H ₃₂ N ₂ O ₄		C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O ₄		C ₂₃ H ₃₀ N ₂ O ₃		C ₂₂ H ₃₀ N ₂ O ₃	C ₂₃ H ₃₂ N ₂ O ₃	
Analysis	Calc.	Found	Calc.	Found	Calc.	Found	Calc.	Calc.	Found
C	73.70	73.72	69.09	69.34	72.22	72.24	71.32	71.84	71.70
H	6.83	6.86	6.85	6.88	7.91	7.91	8.16	8.39	8.27
N	5.93	5.73	7.32	7.33	7.32	7.43	7.56	7.29	7.50
O	13.54	13.77	—	—	12.55	12.64	12.96	12.48	12.79
2 OCH ₃	13.13	13.06	16.23	16.16	16.25	16.07	16.76	16.14	16.77
N-acetyl	—	—	11.25	11.65	11.25	11.15	11.62	11.20	11.25
Mol-weight ^a	—	—	382.5	378	382.5	373	370.5	384.5	374
M. p.	168–169° C		157.5–159° C		141.5–143.5° C		147.5–150° C		
[α] ^b	–181°		–23.5°		+102°		+90°		
pKa ^c	5.9		6.64		6.40		6.85		
Ultraviolet absorption spectrum ^d	λ _{max} mμ	log ε	λ _{max} mμ	log ε	λ _{max} mμ	log ε	λ _{max} mμ		log ε
	216	4.53	216	4.43	217	4.41	223		4.50
	248	4.05	260	4.12	261	4.04	252		3.94
	285	4.31	286–289	3.44–3.45	286–288	3.63	286		3.32
			inflection		inflection				
	λ _{min}	log ε	λ _{min}	log ε	λ _{min}	log ε	λ _{min}		log ε
	237	4.02	237	3.78	238	3.73	243		3.91
	254	4.04					279		3.31
Infrared absorption spectrum ^e	λ _{max} μ		λ _{max} μ		λ _{max} μ		λ _{max} μ		
	5.79		5.74		6.10		6.05		
	6.06		6.00		6.23		6.14		
	6.23		6.27		6.29				

^a Perchloric acid titration; ^b All rotations in chloroform; ^c Potential titration in 66% dimethylformamide; ^d In ethanol; ^e In chloroform