

A Crystalline Molybdophosphoric Complex of Folic Acid

The role of molybdenum in biological systems has been a subject of recent interest, since this trace metal is a prosthetic group of the metalloflavoprotein enzyme, xanthine oxidase^{1,2}. Several reports on its metabolic role have appeared, which indicate a vital part for this mineral³. Prolonged studies conducted by us on the action of this metal have revealed a metabolic interrelationship with the tocopherols⁴. Observations derived from this work have yielded indirect evidence indicating the possibility of molybdenum forming complex phospho compounds *in vivo* with biologically vital organic molecules.

This prompted us to initiate a study of compounds of molybdophosphoric acid with known biologically vital substances. The first of this series; a complex of molybdophosphoric acid and α -tocopherol has been reported earlier⁵ and its biological activity partially studied⁶. The present communication is a brief summary dealing with the preparation, characterisation, and biological activity of a crystalline compound of molybdophosphoric and folic acids.

Methods: A solution of analar molybdophosphoric acid (B.D.H.) in glacial acetic acid (Merck G. R. No. 60) 1 μ mol/ml is gradually added to a saturated solution of folic acid in the same solvent until a clear precipitation occurs. The crystals of the precipitated compound are centrifuged, washed with glacial acetic and dried under partial vacuum in a cool dark place. A part of this substance is subjected to elemental analysis. The rest of it is dissolved in a minimum quantity of 0.1 N NaOH and neutralised to pH 7.0. The neutral solution of the crystalline complex is dialysed against glass distilled water at 4°C for 24 h and the resulting solution lyophilised. The solid complex is preserved in amber coloured vials.



Fig. 1: Microscopic appearance of the molybdophosphoric-folic acid complex

A 2.5% solution in Michaelis buffer pH 8.5 and $\mu = 0.1$ was dialysed against the same buffer for 48 h at 4°C. The dialysed sample was subjected to electrophoresis in the Kern LK 30 microelectrophoresis apparatus and molecular homogeneity established (Fig. 2).

Analytical data: The substance decomposes at 340°C. Found: C 37.3; H 4.2; N 13.2; P 0.5; Mo 18.7. $C_{194}H_{263}O_{102}N_{59}P_{Mo}_{12}$ requires C 37.26; H 4.22; N 13.25; P 0.49; Mo 18.49. The molybdophosphoric acid used was of Analar grade with formula $H_3PO_4 \cdot 12 MoO_3$.

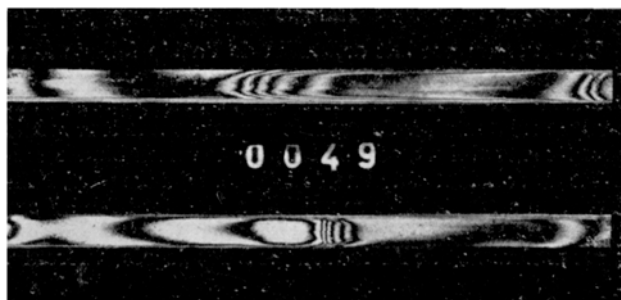


Fig. 2: Kern LK 30 electrophoretic pattern. Migration time 15 min at 6.0 v/cm – Michaelis buffer pH 8.5 $\mu = 0.1$

Biological activity: Normal albino rats treated parenterally with this compound, 10 mg/kg b. w., exhibited a marked leucopenia. 24 h after administration of the test dose, there was an average fall of 4000 cells/mm³. Differential leucocyte count revealed a reversal of the normal picture as evidenced by a suppression of the agranulocytes (lymphocyte count) concomitant with a rise in the granulocytes (neutrophil count).

This complex exhibited antimetabolite activity against folic acid using *S. faecalis* R. as the test organism. Dose response against graded levels of folic acid has been noted by inhibition of growth of *S. faecalis* R. in a folic acid free basal medium.

The development of this crystalline substance is interesting in that it resembles in behaviour the folic acid antagonists such as aminopterin and methopterin⁷, considered to be effective tools for inducing remissions in the acute leukemias⁸.

This work will be published in fuller detail elsewhere.

Acknowledgement: The author is indebted to Dr. N. G. MAGAR, Department of Biochemistry, Institute of Science, Bombay, where part of this work was originally initiated, and to his present chief Professor V. RAMALINGASWAMI for his encouragement. Grateful thanks are due to Dr. R. B. COLAH, Haffkine Institute, Bombay, for the pure strain of *S. faecalis* R.

P. P. NAIR

Department of Pathology, All-India Institute of Medical Sciences, New Delhi (India), August 30, 1959.

¹ D. A. RICHERT and W. W. WESTERFELD, J. biol. Chem. 203, 915 (1953). – W. W. WESTERFELD, D. A. RICHERT, and E. S. HIGGINS, in: W. D. McELROY and B. GLASS (Eds.), A Symposium on Inorganic Nitrogen Metabolism (Baltimore 1956).

² E. C. DE RENZO, E. KALEITA, P. G. HEYTLER, J. OLESON, B. L. HUTCHINGS, and J. H. WILLIAMS, Arch. Biochem. Biophys. 45, 247 (1953). – E. C. DE RENZO, P. G. HEYTLER, and E. KALEITA, Arch. Biochem. Biophys. 49, 242 (1954).

³ L. R. ARRINGTON and G. K. DAVIS, J. Nutr. 55, 185 (1955). – L. F. GRAY and L. J. DANIEL, J. Nutr. 53, 43 (1954). – J. B. NEILANDS, F. M. STRONG, and C. A. ELVEHJEM, J. biol. Chem. 172, 431 (1948). – R. L. SHIRLEY, R. D. OWENS, and G. K. DAVIS, J. Nutr. 44, 595 (1951).

⁴ P. P. NAIR, in: Doctoral thesis, Metabolic Interrelationship Between Vitamin E and Molybdenum (Univ. of Bombay 1956). – P. P. NAIR and N. G. MAGAR, Indian. J. med. Res. 46, 561 (1958). – P. P. NAIR, N. G. MAGAR, and T. P. BHARADWAJ, J. postgraduate Med. 2, 163 (1956). – P. P. NAIR and N. G. MAGAR, Curr. Sci. 27, 208 (1958).

⁵ P. P. NAIR and N. G. MAGAR, J. Ind. chem. Soc. 33, 475 (1956).

⁶ P. P. NAIR and N. G. MAGAR, Proc. Ind. sci. Congr. Abstr. 11, 424 (1957).

⁷ T. H. JUKES, E. L. R. STOKSTAD, and A. L. FRANKLIN, N. Y. Acad. Sci. 52, 1336 (1950).

⁸ S. FARBER, Blood 7, 97 (1952).

Résumé

Un nouveau produit cristallin de l'acide folique avec l'acide molybdophosphorique est décrit. Ce produit a été soumis aux examens microscopique, électrophorétique et analyse élémentaire. Ce produit provoque une leucopénie chez les rats albins, ce qui indique une ressemblance probable aux antidotes de l'acide folique. D'autre part, l'observation a montré que ce produit a un effet inhibitif sur la croissance des *Streptococcus faecalis* R. dans des cultures renfermant de l'acide folique à des degrés différents.

Über den Phytoöstrogengehalt einiger Pflanzen

In einer Reihe von Arbeiten wurden in verschiedenen Pflanzen Stoffe nachgewiesen, die bei übermässiger Zufuhr sexuelle Störungen bei weiblichen Tieren hervorrufen können (ROBINSON¹, BULL², UNDERWOOD³, DOHAN⁴, CHAMBERLAIN⁵, SCHOOP und KLETTE⁶). Die für solche Störungen verantwortlichen sexualaktiven Stoffe nannte SCHOOP⁶ Phytoöstrogene.

Die Mehrheit der erwähnten Autoren nimmt an, dass die Phytoöstrogene die Sterilität der weiblichen Tiere verursachen. Demgegenüber stehen Arbeiten, die zeigen, dass Phytoöstrogene gewisse Funktionen des weiblichen Organismus stimulieren können (BARTLETT⁷, CHENG *et al.*⁸, BULAŠEVIČ⁹).

Fasst man die bisherigen Befunde der Phytoöstrogenforschung zusammen (KOLLER¹⁰, CHURÝ¹¹), so kann man sagen, dass das einseitige Betonen der Unfruchtbarkeitswirkung dieser Stoffe auf die geringe Kenntnis der Physiologie der Karenz dieser Stoffe zurückzuführen ist. Nach den Ergebnissen der ausgedehnten Untersuchungen von SCHOOP und KLETTE⁶ lässt sich eine Arbeitshypothese aufstellen, die besagt, dass die Phytoöstrogene sowohl normale Reservoirs sexualaktiver Stoffe wie auch phylogenetisch fixierte Stimulatoren der weiblichen sexuellen Funktionen darstellen. Somit wäre denkbar, dass eine Überdosierung, ebenso aber auch ein Mangel an diesen Stoffen, zu unregelmässiger Sexualtätigkeit der Haustiere führt.

Diese theoretische Annahme über die biologische Bedeutung der Phytoöstrogene weist auf die Wichtigkeit ihrer Erforschung hin.

In unseren bisherigen Versuchen prüften wir den Gehalt dieser Stoffe in Hopfen, Rotklee, Erbsmehl und Kohl: Hopfen soll von den bisher untersuchten Pflanzen die grösste Phytoöstrogenmenge enthalten (KOCH und HEIM¹²); die Verfütterung von Erbsen führt bei Rattenweibchen zur Sterilität (Sanyal¹³); Rotklee wurde als Phytoöstrogendepot von verschiedenen Autoren beschrieben; Kohl soll nach ROSENBERGER¹⁴ bei Kühen nebst «Kohlänämie» auch zu sexuellen Störungen führen.

In diesen Pflanzen wurde der Phytoöstrogengehalt an kastrierten Rattenweibchen und infantilen Mäusen bestimmt. Bei den Ratten wurden die Proben intravaginal, bei den Mäusen subkutan oder peroral gegeben. Die Menge der verabreichten Öllösung betrug bei Mäusen 0,01–0,04 ml pro Tag, bei den Ratten 0,02–0,04 ml. Die Öllösungen wurden während 4 Tagen verabreicht. 48 h nach der letzten Injektion wurden die Mäuse getötet und die Uterusgrösse bestimmt. Die ROBINSONSche¹ Methodik der Uterusgrössebestimmung haben wir modifiziert: das Herauspräparieren der Uteri wurde erst nach einer 24stündigen Alkohol-Formalin-Fixation vorgenommen. Die Organe wurden mit Filterpapier getrocknet und auf einer Torsionswaage gewogen. Bei Ratten wurde die Wirkung mittels vaginalen Abstrichen verfolgt.

Der Effekt der so geprüften Öllösungen wurde auch histologisch an Schnitten von Vagina und Uterus verfolgt. Die Empfindlichkeit der Mäuse und Ratten wurde durch Titration mit Östradiolbenzoat ermittelt. Bei Mäusen wurde die Menge der Phytoöstrogene im Material mittels einer Titrationskurve von 0,002–0,012 γ Östradiolbenzoat bestimmt.

Die Extraktion der Phytoöstrogene aus dem Pflanzenmaterial wurde mit kochendem 96% Alkohol 3mal wiederholt und die Extrakte nach Verdampfen durch Ansäuern mit Oxalsäure von Phytin und Chlorophyll befreit. Nach Filtration und Alkalisierung mit *N* NaOH wurde bei 100°C 10 min hydrolysiert, dann mit *N* HCl angesäuert und nachher mit Äther extrahiert. Die Ätherextrakte wurden über Natriumsulfat getrocknet, der Äther abdestilliert und das Residuum in Olivenöl gelöst. Die Menge des Öles wurde so gewählt, dass 1 ml der Öllösung 5–10 g des Pflanzenmaterials entsprach.

In allen von uns untersuchten Pflanzen wurden Phytoöstrogene nachgewiesen (Abb. 1–4). Im Hopfen beträgt die Menge der Phytoöstrogene 1050 bis 2000 γ /kg, im Rotklee 6 bis 9 γ , im Erbsenmehl 4–6 γ und im Kohlkraut 24 γ /kg.

Vergleichen wir unsere Versuchsergebnisse mit den Angaben der Literatur, so finden wir gute Übereinstimmung beim Rotklee; nach BARTLETT⁸ enthält diese Pflanze 7 γ /kg, nach CHENG⁷ 8–16 γ /kg. Beim Hopfen sind unsere Befunde von jenen KOCHS und HEIMS¹² verschieden; sie stimmen jedoch mit der Angabe überein, dass Hopfen die bisher an Phytoöstrogenen reichste Pflanze ist. Betreffend der Befunde beim Kohl konnten wir unsere Befunde nicht vergleichen, weil diese Pflanze bisher auf Phytoöstrogengehalt nicht untersucht wurde. Nach unseren Befunden können nun die älteren Befunde und Angaben ROSENBERGERS¹⁴ über die Sexualstörungen bei Kühen nach Kohlverfütterung durch die Anwesenheit von Phytoöstrogenen erklärt werden.

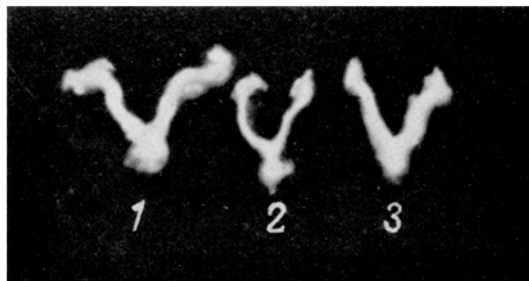


Abb. 1: Gebärmutter von Versuchs- und Kontrollmäusen; 1. Maus, mit Hopfenextrakt behandelt; 2. Kontrollmaus, Olivenölbehandlung; 3. Maus mit Östradiolbenzoat behandelt; 3,5fache lineare Vergrößerung

- ¹ T. J. ROBINSON, Austr. J. exp. Biol. med. Sci. 27, 297 (1949).
- ² L. B. BULL, Austr. vet. J. 27, 237 (1951).
- ³ E. J. UNDERWOOD, Austr. vet. J. 27, 63 (1951).
- ⁴ F. C. DOHAN, J. A. V. M. A. 118, 323 (1951).
- ⁵ B. S. CHAMBERLAIN, J. Dept. Agric. S. Australia 60, 238 (1957).
- ⁶ G. SCHOOP, Fortpflanzung und Besamung der Haustiere 2, 10 (1952); Dtsch. tierärztl. Wschr. 5, 37 (1955); 5, 103 (1955); Mh. Tierheilk. 9, 1 (1957).
- ⁷ S. BARTLETT, Nature 162, 845 (1948).
- ⁸ E. CHENG, J. anim. Sci. 12, 507 (1953); 12, 944 (1953).
- ⁹ M. E. BULAŠEVIČ, Usp. sovr. biol. 43, 208 (1957).
- ¹⁰ R. KOLLER, Fortpflanzung Zuchthygiene Haustierbesamung 5, 3 (1955).
- ¹¹ J. CHURÝ, Veterinářství 9, 341 (1958).
- ¹² W. KOCH und G. HEIM, Münch. med. Wschr. 95, 845 (1953).
- ¹³ S. N. SANYAL, Calcutta med. J. 47, 313 (1950).
- ¹⁴ H. ROSENBERGER, Dtsch. tierärztl. Wschr. 51, 63 (1943).