

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 vaginaler Abstriche 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.

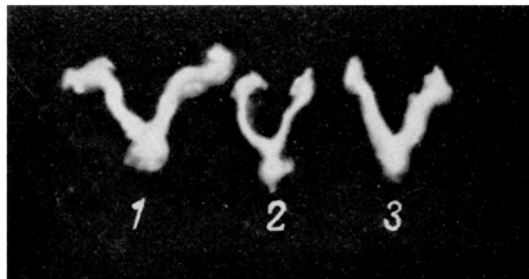


Abb. 1: Gebärmutter von Versuchs- und Kontrollmäusen; 1. Maus, mit Hopfenextrakt behandelt; 2. Kontrollmaus, Olivenölbehandlung; 3. Maus mit Östradiolbenzoat behandelt; 3,5fache lineare Vergrößerung

- 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).

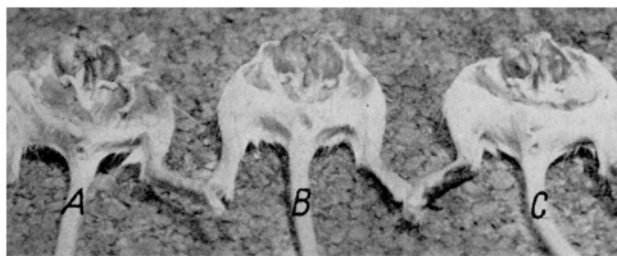


Abb. 2: A. Maus mit Kohlextrakt behandelt; B. Kontrollmaus ohne Behandlung; C. Maus mit Östradiolbenzoat behandelt; 1,5fache lineare Vergrößerung

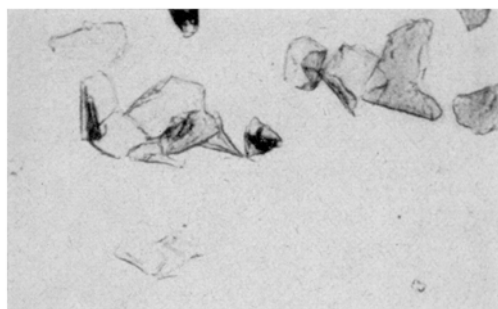


Abb. 3: Vaginalanstrich einer mit Kohlextrakt behandelten kastrierten Ratte

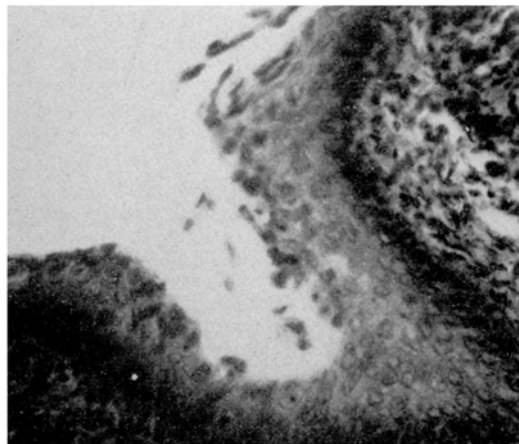


Abb. 4: Vaginalschnitt einer infantilen mit Rotklee-Extrakt behandelten Maus

J. CHURÝ

Biologisches Institut der Veterinärmedizinischen Fakultät, Brno (ČSR), 24. August 1959.

Summary

The quantity of phyto-estrogens in red clover, hop, peas, and cabbage was estimated by titration on castrated female rats and infantile mice. The level of phyto-estrogens was as follows: in hop 1050–2000 γ /kg, in peas 4–6 γ /kg, in cabbage 24 γ /kg, and in red clover 6–9 γ /kg. The author supposes that the sexual disorders described by ROSENBERGER¹⁴ in cows fed with cabbage, can be explained by the presence of phyto-estrogens in this plant.

Notes on the Hydroxamate Assay for Amino Acid Activating Enzymes¹

The amino acid activating enzymes, first described in mammalian tissues by HOAGLAND² are now quite generally accepted to catalyse the first step in protein synthesis. A worrisome aspect of this concept, however, has been the fact that, while all AA³ are incorporated into protein, most tissues seem to possess activating enzymes for only a few^{4–7}. In some cases, this anomaly seems to be due to a rapid inactivation of some of the enzymes during the extraction and/or purification procedures^{8,9}, but it now appears that the assays may also be at fault. WEBSTER¹⁰ has discussed reasons for failing to obtain an ATP-PP₃² exchange with some amino acids; and it is the purpose of the present note to point out some sources of error when the hydroxamate assay is used. In order to obtain meaningful results with the latter, it is essential not only to have a reliable method for the determination of the hydroxamate formed, but also to ascertain that the NH₂OH is not interfering with any of the enzymes, and that the extract used does not destroy the hydroxamate formed or otherwise interfere with its determination.

The Determination of Hydroxamate: For hydroxamates of AA, the method of SCHWEET¹¹ is preferable to that of LIPMANN and TUTTLE¹², which was developed for the determination of acetyl hydroxamate. Instead of strong mineral acid, the former employs concentrated TCA, adjusted to pH 0.9, which is optimum for color development with AA hydroxamates. Under assay conditions, however, when crude extracts are used and in the presence of NH₂OH·KCl, the pH (i. e., the empirical reading obtained with a Beckman Model G glass electrode) is often as low as 0.3. Since the color yield in this reaction is inversely proportional to pH between pH 0.3 and 0.9¹³ and decreases 20% (0.027 O. D. units at 540 m μ for 1 μ M LeuH) for every 0.1 pH unit, very considerable errors in the determination of the AAA-activity are introduced unless the final pH of the reaction mixture (after addition of FeCl₃) is taken into consideration.

The Effect of Hydroxylamine on the Assay: It was originally reported by HOAGLAND² that high concentrations of salt-free NH₂OH did not seem to inhibit the AAA-enzymes in liver extract, although NH₂OH·HCl neutralized with NaOH was highly inhibitory. SCHWEET *et al.*¹⁴, however, found that this inhibition was most likely

¹ This investigation was aided by U. S. Public Health Service Training Grant CRTY-5028.

² M. B. HOAGLAND, *Biochim. biophys. Acta* 16, 288 (1955).

³ The following abbreviations are used throughout: ATP, adenosine triphosphate; AA, amino acid; AAA-enzyme, amino acid activating enzyme; LeuH, leucine hydroxamate.

⁴ G. D. NOVELLI and J. A. DeMOSS, *J. cell. comp. Physiol.* 50, 173 (1957).

⁵ J. W. DAVIS and G. D. NOVELLI, *Arch. Biochem. Biophys.* 75, 299 (1958).

⁶ J. M. CLARK, *J. biol. Chem.* 233, 421 (1958).

⁷ R. D. COLE, J. COOTE, and T. S. WORK, *Nature* 179, 199 (1957).

⁸ G. D. NOVELLI, *Proc. nat. Acad. Sci., Wash.* 44, 86 (1958).

⁹ B. NISMANN, F. H. BERGMANN, and P. BERG, *Biochim. biophys. Acta* 26, 639 (1957).

¹⁰ G. C. WEBSTER, *Arch. Biochem. Biophys.* 82, 125 (1959).

¹¹ R. S. SCHWEET, *Biochim. biophys. Acta* 18, 566 (1955).

¹² F. LIPMANN and C. TUTTLE, *J. biol. Chem.* 159, 21 (1945).

¹³ I. D. RAACKE, *Biochim. biophys. Acta* 27, 416 (1958).

¹⁴ R. S. SCHWEET, R. W. HOLLEY, and E. H. ALLEN, *Arch. Biochem. Biophys.* 71, 311 (1957).