

diabetes, and microscopic evidence of intercapillary glomerulosclerosis. Breeding experiments are now in progress, using elevated α -2 serum proteins as a genetic marker in an attempt to increase the incidence of spontaneous diabetes. The extremely high levels of α -2 (up to 35%) observed in diabetic hamsters may be due either to an increase of normally existing α -2 proteins, or perhaps to new and different molecules which are a genetic reflection of the diabetic state. Chemical analysis of the α -2 globulin fractions in diabetic and non-diabetic hamsters would be required in order to distinguish between these two possibilities; such investigations are now in progress.

M. N. GREEN, G. YERGANIAN, and H. MEIER⁴

The Children's Cancer Research Foundation and the Department of Pathology, Harvard Medical School, at The Children's Hospital Medical Center, Boston (Massachusetts) May 10, 1960.

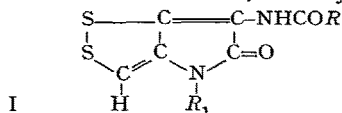
Zusammenfassung

Bei chinesischen Hamstern aus Inzuchten mit erblicher Zuckerkrankheit wurden erhöhte Serum- α -2-Eiweisswerte konstatiert. Die Erhöhung erfolgt vor Auftreten der Hyperglykämie oder Blutgefäß- und anderen sekundären pathologischen Veränderungen. Es wird gefolgert, dass die Eiweisserhöhung gen-bedingt ist und wahrscheinlich chemisch abnormales Eiweiss betrifft.

Isolation of *iso*-Butyropyrrothine along with Thiolutin and Aureothricin from a *Streptomyces* sp.

A new species of *Streptomyces* (*S. pimprina*) has been found to produce an undescribed antifungal antibiotic Hamycin of the polyene (heptaene) type¹. Hamycin is present in the mycelium and the filtered broth was found to contain four antibiotics with antibacterial activity and, in addition, one colourless crystalline inactive compound.

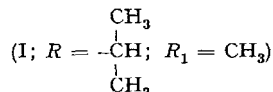
The chloroform extract of the broth, on crystallization from benzene-methanol (60:40), gave a yellow crystalline compound (yield 50 mg/l), which was identified as the antibiotic Thiolutin² (I; $R = \text{CH}_3$; $R_1 = \text{CH}_3$) by comparison with an authentic sample (kindly supplied by Dr. A. C. FINLAY of Chas Pfizer & Co., Brooklyn, N. Y.).



The mother liquor was chromatographed on paper, using benzene saturated with formamide as the developing phase, the paper having been soaked previously in acetone containing 20% formamide³. With ascending technique four yellow spots with the R_f (A) 0.0, (B) 0.4, (C) 0.71, and (D) 0.92 were obtained, which, when tested bioautographically with *Sarcina lutea* as the test organism, were found to be active.

The separation and the isolation of the antibiotics were done on cellulose powder, using formamide as the stationary phase and benzene saturated with formamide as the developing phase. Three moving bands together with one dark stationary band were observed. The three moving bands were collected separately and rechromatographed individually using a narrower column. The homogeneity of each fraction was ascertained by paper chromatography.

The fast moving band (D, $R_f = 0.92$) was found to contain two components. One of them was an inactive colourless crystalline basic compound (D 1) which could be separated from the other by extracting a benzene solution of the mixture by dilute acid. Free base (yield, 20 mg/l) was crystallized from benzene into colourless prisms, m.p. 205°C [found, C 73.0, H 4.7, N 13.5%, M.W. 198 (Rast method)]. The other component was an orange-red active compound (D 2) which could be crystallized from benzene into orange-red plates, m.p. 228–229°C (found, C 47.4, H 4.8, N 10.9%) yield, 1 mg/l. This orange-red compound was identified as *iso*-butyropyrrothine⁴



from its analysis and its identical IR, and UV spectra, identical antimicrobial spectrum and undepressed melting point with a 'synthetic' *iso*-butyropyrrothine prepared by the action of *iso*-butyrylchloride on pyrrothine hydrochloride² in pyridine. The 'synthetic' *iso*-butyropyrrothine, when purified through cellulose column gave m.p. 228–229°C. CELMER and SOLOMONS⁵ mention its melting point as 222–228°C.

Natural *iso*-butyropyrrothine has an antimicrobial spectrum similar to Thiolutin. The *in vivo* inhibition concentration (in $\mu\text{g/ml}$) for various organisms is *Bacillus subtilis*, 1.25; *Sarcina lutea*, 0.45; *Staphylococcus aureus*, 1.0; *Candida albicans*, *Escherichia coli*, and *Salmonella paratyphi* were insensitive.

Another band (C, $R_f = 0.71$) gave a yellow-orange crystalline compound (yield 1 mg/l) which was identical to Aureothricin⁶ (I; $R = \text{CH}_2\text{---CH}_3$; $R = \text{CH}_3$) in all obvious respects, including infra red, U. V. spectra, paper chromatographic behaviour and antimicrobial spectrum. 'Synthetic' Aureothricin was prepared by the method of CELMER and SOLOMONS² from pyrrothine hydrochloride and propionic anhydride.

The third moving band (B, $R_f = 0.4$) was found to be Thiolutin itself.

The stationary band (A, $R_f = 0.0$) at the top of the column was removed and extracted with methanol and the methanol extract was chromatographed on alumina (Activity III) in dry chloroform. A band which was eluted with chloroform-methanol (99:1) showed activity against *S. lutea* but the UV absorption spectrum was different from either Thiolutin group or Holomycin³ (I; $R = \text{CH}_3$, $R_1 = \text{H}$). This fraction (A) was obtained in very small quantity and is not characterised as yet.

AKABORI and NAKAMURA⁷ have obtained Thiolutin and Aureothricin along with 1-6-dihydroxyphenazine from a *Streptomyces* sp. To our knowledge, this is the first time that a *Streptomyces* sp. has been found to produce Thiolutin (acetopyrrothine), Aureothricin (propiopyrrothine),

Our thanks are due to Dr. M. J. THIRUMALACHAR for his interest in this work.

¹ Hindustan Antibiotics Limited, Indian Patent Appl. No. 71394.

² W. D. CELMER and I. A. SOLOMONS, J. Amer. chem. Soc. 77, 2861 (1955).

³ L. ETTINGER, E. GÄUMANN, R. HÜTTER, W. KELLER-SHIERLEIN, F. KRADOLFER, L. NEIPP, V. PRELOG, and H. ZAHNER, Helv. chim. Acta 42, 563 (1959).

⁴ For the nomenclature see foot note 5a of ².

⁵ W. D. CELMER and I. A. SOLOMONS, Antibiot. Ann. 1953–1954, 622.

⁶ H. NISHIMURA, T. KIMURA, and M. KUROYA, J. Antibiot., Tokyo [A] 6, 57 (1953).

⁷ H. AKABORI and M. NAKAMURA, J. Antibiot., Tokyo [A] 12, 17 (1959).

and their another homologue *iso*-butyropyrrothine along with a polyene (heptaene) and an unidentified antibiotic in the same fermentation broth.

D. S. BHATE, R. K. HULYALKAR,
and S. K. MENON

Antibiotics Research Centre, Hindustan Antibiotics Ltd.,
Pimpri (near Poona, India), July 4, 1960.

Résumé

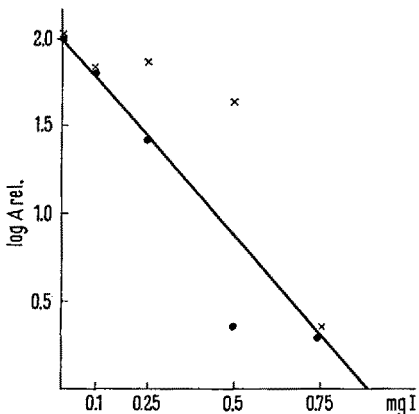
Une nouvelle espèce de *Streptomyces* (*S. pimprina*) produit l'*iso*-butyropyrrothine avec la thiolutine (l'acétopyrrothine), l'aureothricine (la propriopyrrothine) et un antibiotique antifongique du groupe du polyène (heptaène).

Über die Hemmung von Hurain,
einer pflanzlichen Protease,
durch Trypsininhibitoren

Hurain ist ein eiweissverdauendes Ferment aus dem Saft von *Hura crepitans* L. (Euphorbiaceae). Es ist von den Papainasen deutlich zu unterscheiden wegen seiner Resistenz gegen Oxydation, weil es von Glutathion und andern Aktivatoren von Papain nicht aktiviert wird und weil es Ascaris und andere Darmparasiten *in vitro* nicht angreift, wie es die Papainasen tun¹.

Aus der letztgenannten Eigenschaft wurde geschlossen, dass Hurain möglicherweise von Trypsininhibitoren in seiner Wirkung gehemmt wird, wie das Trypsin oder Chymotrypsin. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Möglichkeit experimentell bewiesen.

Material und Methoden. Hurain wurde aus dem Saft, der durch Einschnitte in den Stamm von *Hura crepitans* gewonnen wird, durch Filtrierung und Lyophilisierung dargestellt. Eine weitere Reinigung wurde in dieser Arbeit nicht vorgenommen. Das verwandte Trypsin war ein kommerzielles Präparat (Biochemical Preparation Inc. 1:150). Der kristallisierte Trypsininhibitor aus Soyabohnen wurde von derselben Firma bezogen, die Inhibitoren aus Ascaris und Bohnen wurden nach den entsprechenden Vorschriften der Literatur hergestellt^{2,3}. Die proteolytische Aktivität wurde nach der Methode von ANSON⁴ mit leichten Modifikationen bestimmt.



Hemmung von Trypsin und Hurain durch Bohnen-Hemmstoff.
Abzisse. mg des Hemmstoffes. Ordinate. Log der Enzymaktivität nach ANSON⁴. Jeder Ansatz bestand aus 5.0 ml Substrat, 1.0 ml Ferment (1 mg Trypsin oder 6.66 mg Hurain) und der entsprechenden Menge Hemmstoff. Die Fermentaktivität ohne Hemmstoff wird als 100% bezeichnet. Die Ferment- und Hemmstoffmengen wurden bestimmt als N x 6.25.

Hemmstoff	Hemmung %	
	Trysin	Hurain
—	0	0
Bohnen	26.6	29.5
Ascaris	18.8	18.5
Soya	28.8	34.0

Hemmung von 3 Inhibitoren auf die proteolytische Wirkung von Trypsin und Hurain, ausgedrückt in % der Anfangsaktivität und errechnet pro mg Hemmstoff.

Ergebnisse. In der Fig. wird das Ergebnis der Hemmung von Trypsin (1 mg/Versuch) und Hurain (6,6 mg/Versuch) durch verschiedene Mengen von Bohneninhibitor angegeben. Die Werte beider Fermente fallen unter Berücksichtigung der Streuung auf eine Gerade, wenn die Hemmstoffmengen gegen den Logarithmus der Fermentaktivität aufgetragen werden.

Der Vergleich der 3 geprüften Inhibitoren wird in der Tabelle vorgelegt. Es wurde in jedem Versuch mit 5 verschiedenen Mengen von Ferment und einer festen Menge von Hemmstoff (0.1 mg für Trypsin und 0.25 mg für Hurain) gearbeitet. Die Hemmung ist in % der Anfangsaktivität, die in Trypsineinheiten errechnet wurde, ausgedrückt und auf 1 mg Hemmstoff berechnet. Die Inhibierungswirkung der 3 geprüften Hemmsubstanzen war quantitativ fast gleich stark für beide untersuchte Enzyme.

W. G. JAFFÉ⁵ und DINAH S. DE SEIDL

Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela,
Caracas, 10. Mai 1960.

Summary

Hurain, a protease from the sap of the tree *Hura crepitans* L., is inhibited by trypsin inhibitors from soya, kidney beans, and ascaris.

Ein ausführlicherer Bericht über die hier mitgeteilten Versuche wird in Acta Cientifica Venezolana erscheinen.

¹ W. G. JAFFÉ, J. biol. Chem. 149, 1 (1943).
² N. M. GREEN, Biochem. J. 66, 416 (1957).
³ D. E. BOWMAN, Proc. Soc. exp. Biol. Med., N. Y. 86, 491 (1954).
⁴ M. L. ANSON, J. gen. Physiol. 22, 79 (1938/39).
⁵ Z. Zt. Max-Planck-Institut für Eiweiss- und Lederforschung, München 15.

Pharmacological Actions of 4-Hydroxytryptamine and 4-Hydroxytryptophan

4-Hydroxytryptamine (4-HT) and 4-hydroxytryptophan(4-HTP) are of conspicuous biological interest because 4-HTP is the only tryptophan amino acid which so far has been found to be decarboxylated in the mammalian organism¹, and because 4-HT, besides being one of the most active hydroxyindolealkylamines, is strictly re-

The amines and amino acids used in the present investigation were synthesized at the Farmitalia S. p. A. Research Laboratories, Milan, by Dr. C. PASINI and V. COLÓ.
¹ V. ERSFAMER, A. GLÄSSER, M. B. NOBILI, and C. PASINI, Exper. 16, 506 (1960).