

Fig. 3

R. FISCHER⁷ et J. MONNIER

Centre de Transfusion Sanguine, Hôpital Cantonal, Genève (Suisse), le 29 novembre 1960.

Beitrag zur Papierchromatographie der Phytoöstrogene

Im Anschluss an die erfolgreichen chromatographischen Arbeiten von BOSE und CHANDRAN¹, BIGGERS und CURNOW², LYMAN et al.³ wird in der vorliegenden Mitteilung die papierchromatographische Trennung von Phytoöstrogenen aus Pflanzenextrakten beschrieben.

Das Pflanzenmaterial wurde jeweils mit 96% Alkohol extrahiert, der Alkohol unter vermindertem Druck abdestilliert und das Residuum in 1–2 ml Azeton gelöst. Von dieser Lösung wurden Proben in Form eines 2 mm breiten und 4 cm langen Streifens auf Papier Whatman Nr. 2 und 4 aufgetragen. Als Entwickler wurde eine Mischung von 2 Teilen Chloroform, 1 Teil konzentrierter Essigsäure und 1 Teil Wasser benutzt, und zwar in zwei Modifikationen: 1. untere Schicht dieser Mischung, 2. obere Schicht.

Die Chromatogramme wurden luftgetrocknet und die Stoffe mit UV-Licht und 0,1% Ferrichlorid-Lösung nachgewiesen. Die östrogene Aktivität der nachgewiesenen

Stoffe konnte nach vorheriger Extraktion mit Methanol an infantilen Mäuseweibchen von 6–8 g bestimmt werden (Methodik der Bestimmung wie in der früheren Arbeit: CHURÝ⁴).

Die untere Schicht der Entwicklungsmischung ist für die Trennung der Stoffe nicht geeignet, da das Chlorophyll mitgerissen und die Stoffe maskiert werden. Bei der Anwendung der oberen Schicht bleibt das Chlorophyll am Start zurück, was eine gute Trennung der anwesenden Stoffe ermöglicht. Im UV-Licht bei Anwendung von Kobaltglasfilter können mindestens 4, höchstens 8 Streifen sichtbar werden, deren Rf-Werte in der Tabelle I angeführt sind.

Die Ergebnisse der geprüften biologischen Aktivität der in den einzelnen Streifen anwesenden Stoffe sind der Tabelle II zu entnehmen:

Es ergibt sich, dass man chromatographisch auch solche Spuren von sexualaktiven Stoffen im Pflanzenmaterial nachweisen kann, die sonst in gereinigten Auszügen mittels biologischer Tests nicht erfassbar sind.

Den Detektionsergebnissen mit 0,1% Ferrichlorid-Lösung nach, sind die Stoffe in den Streifen mit Rf 0,95 bis 0,97 wahrscheinlich von Flavonoiden-Charakter. Ob der blau fluoreszierende Stoff (Rf 0,49) mit dem Cumestrol identisch ist, müssen spektrophotometrische Messungen beantworten. Beim hellblau fluoreszierenden Stoff (Rf 0,85) nehmen wir an, dass es sich um eine wahrscheinlich noch unbekannte sexualaktive Substanz handelt, zu deren näherer Charakterisierung Versuche im Gange sind.

Résumé. Description d'une méthode chromatographique sur papier pour la séparation des phytoestrogènes dans les extraits non purifiés de plantes. En utilisant la couche supérieure d'un mélange de deux parts de chloroforme, d'une part d'acide acétique et d'une part d'eau distillée, on a extrait 3 substances, qui, soumises au test biologique sur des souris infantiles, se montrèrent estrogènes.

J. CHURÝ

Biologisches Institut der Veterinärmedizinischen Fakultät, Brno (CSR), 30. Juni 1960.

Tabelle I

Streifen	Fluoreszenz	Rf-Wert	Bemerkung
I	rot	—	—
II	hellblau	0,37	—
III	blau	0,49	aktiv
IV	dunkel	0,65	—
V	grün	0,76	—
VI	hellblau	0,85	aktiv
VII	grünlichgelb	0,94	aktiv
VIII	gelb-grün	0,97	aktiv

Tabelle II

Fluoreszenz	mg Uterusgewicht	% Zuwachs gegen Kontrolle
rot	3,7 ± 0,35	—
blau	10,7 ± 0,80	+ 163%
hellblau	13,00 ± 3,00	+ 242%
grünlich-gelb	6,50 ± 0,30	+ 71%
Kontrolle	3,80 ± 0,40	—

Further Studies on the Influence of Chloride on the Renal Tubular Reabsorption of Bicarbonate in the Dog

The influence of NaCl-induced rises in plasma chloride concentration (P_{Cl}) on tubular bicarbonate reabsorption was studied during $NaHCO_3$ loading 1. in normal dogs, 2. in respiratory acidotic dogs and 3. in dogs treated with acetazolamide¹. The data of these experiments were compared with the results previously obtained in this laboratory in normochloremic² and in hypochloremic^{3–5} animals.

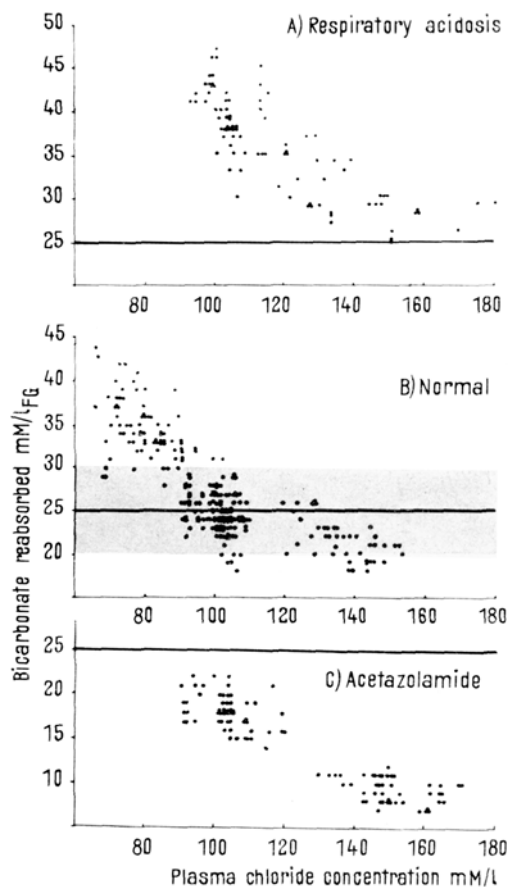
¹ Diamox was generously supplied by the Lederle Laboratories.
² CH. TOUSSAINT and P. VEREERSTRAETEN, Exper. 16, 309 (1960).
³ CH. TOUSSAINT, M. TERLERMAN, and P. VEREERSTRAETEN, Exper. 14, 417 (1958).
⁴ CH. TOUSSAINT, M. TERLERMAN, and P. VEREERSTRAETEN, Exper. 15, 232 (1959).
⁵ CH. TOUSSAINT, M. TERLERMAN, and P. VEREERSTRAETEN, Exper. 15, 434 (1959).

Experimental procedures. 1. *Normal dogs.* Bicarbonate reabsorption rate (BHCO_3R) was measured a) at normal P_{Cl} values (29 experiments on 17 dogs, 134 clearance periods), b) at high P_{Cl} values (8 experiments on 7 dogs, 43 clearance periods) and c) at low P_{Cl} values (13 experiments on 10 dogs, 84 clearance periods).

2. *Respiratory acidotic dogs.* While blood pCO_2 values were maintained between 132 and 164 mm Hg by the inhalation of CO_2 20% in O_2 , BHCO_3R was measured a) at normal P_{Cl} values (11 experiments on 9 dogs, 43 clearance periods) and b) at high P_{Cl} values (10 experiments on 9 dogs, 45 clearance periods).

3. *Acetazolamide-treated dogs:* During continuous infusion of acetazolamide (30–55 mg/kg/h, preceded by a priming dose of 10 mg/kg), BHCO_3R was measured a) at normal P_{Cl} values (8 experiments on 7 dogs, 65 clearance periods) and b) at high P_{Cl} values (5 experiments on 5 dogs, 46 clearance periods).

Results. 1. *Normal dogs* (Fig. B). The respective values of the slope of the regression lines calculated for the relation between BHCO_3R and P_{Cl} in the 3 groups of normal animals are: 0.295 in hypochloremia, 0.167 in normochloremia and 0.130 in hyperchloremia. Thus, the effect of Cl on BHCO_3R is progressively diminishing as P_{Cl} values are increasing so that the relation between BHCO_3R and P_{Cl} is truly a curvilinear one.



Bicarbonate reabsorption rate values plotted with plasma chloride concentration values in respiratory acidosis A, in normal dogs B, and during acetazolamide treatment C.

The horizontal lines drawn at BHCO_3R values of 25 mm/L_{GF} represent the mean value of BHCO_3R during NaHCO_3 infusion in normal dogs. The hatched zone in B represents the 4 σ range of the mean value of BHCO_3R .

2. *Respiratory acidotic dogs* (Fig. A). As for the normal animals, the depression induced by Cl on BHCO_3R is of greater magnitude at normal than at high P_{Cl} levels: the values of the slope of the regression lines calculated for the relation between BHCO_3R and P_{Cl} are 0.276 for the normochloremic, and 0.169 for the hyperchloremic respiratory acidotic animals.

3. *Acetazolamide-treated dogs* (Fig. C). Despite the profound inhibition of BHCO_3R produced by acetazolamide, this tubular transport is further depressed (to the extremely low level of 7.0 mm/L_{GF}) by NaCl administration. As was noted for normal and for respiratory acidotic animals, the influence of Cl on BHCO_3R is diminishing as P_{Cl} is progressively rising: the regression line has a slope of 0.114 at normal, instead of 0.055 at high P_{Cl} levels. Both values differ significantly from zero ($P < 0.001$).

Comment. Although the depression of BHCO_3R produced by Cl was previously noted in normal⁶ and in respiratory acidotic⁷ dogs, our data further show that the magnitude of the influence of hyperchloremia is primarily affected by the initial level of BHCO_3R itself. This phenomenon is demonstrated by the fact that, for any given value of P_{Cl} increment, the intensity of Cl influence on BHCO_3R is diminishing in the following order: respiratory acidotic, normal and acetazolamide-treated animals. The values of the slope of the regression lines calculated for the relation between BHCO_3R and P_{Cl} in the three conditions investigated, differ significantly in the sole case of respiratory acidotic versus acetazolamide-treated animals ($0.02 < P < 0.05$ in normochloremia and $0.001 < P < 0.01$ in hyperchloremia).

Finally, our data on respiratory acidotic dogs loaded with NaHCO_3 alone demonstrate that, contrarily to a recently held view⁸, the increase in BHCO_3R observed at high plasma bicarbonate concentration values is readily explained by the spontaneous reduction in P_{Cl} which follows acute NaHCO_3 loading.

Résumé. L'intensité de la dépression qu'entraîne l'hyperchlorémie sur la réabsorption tubulaire du bicarbonate chez le chien paraît être essentiellement déterminée par le niveau initial de la réabsorption du bicarbonate.

CH. TOUSSAINT and P. VEREERSTRAETEN

Laboratoire de Médecine expérimentale, Université libre de Bruxelles et Fondation médicale Reine Elisabeth, Bruxelles (Belgium), October 14, 1960.

⁶ R. F. PITTS and W. D. LOTSPEICH, Amer. J. Physiol. 147, 138 (1946).

⁷ J. G. HILTON, N. E. CAPECI, G. T. KISS, O. R. KRUESI, V. V. GLAVIANO, and R. WEGRIA, J. clin. Invest. 35, 481 (1956).

⁸ W. B. SCHWARTZ, A. FALBRIARD, and G. LEMIEUX, J. clin. Invest. 38, 939 (1959).

Effects of Stimulation and Inhibition of Bicarbonate Reabsorption on the Renal Tubular Transport of Sodium and Chloride in the Dog

The numerous observations¹⁻³ demonstrating the influence of changes in plasma chloride concentration (P_{Cl}) on tubular bicarbonate reabsorption rate (BHCO_3R) have led us to investigate the tubular transport of Na and Cl in

¹ R. F. PITTS and W. D. LOTSPEICH, Amer. J. Physiol. 147, 138 (1946).

² J. G. HILTON, N. E. CAPECI, G. T. KISS, O. R. KRUESI, V. V. GLAVIANO, and R. WEGRIA, J. clin. Invest. 35, 481 (1956).

³ CH. TOUSSAINT and P. VEREERSTRAETEN, Exper. 17, 80 (1961).