

# PHARMACEUTICAL BULLETIN

Vol. 3 No. 3

June 1955

29. Shichiro Akiya et Utako Ariyoshi : Sur la variation du méthylehexabitale soluble dans le corps d'un lapin. I. Variation de l'acide glutamique et de l'acide aspartique libres dans le cerveau d'un lapin.

(Institute for Infectious Diseases,\* University of Tokyo)

On a déjà beaucoup de recherches relatives à la variation de l'anesthésique acide barbiturique dans un corps vivant, il reste cependant des points obscurs en ce qui concerne la véritable nature des produits métaboliques.

Aucune étude définitive n'a encore été faite sur le produit métabolique du méthylehexabitale, qui a un radical alcoyle à l'azote, et qui, partant, se décompose très facilement dans un corps vivant.

S'il s'agit d'un anesthésique barbiturique avec un radical de substitution non pas à l'azote, mais au point 5, une partie de sa structure sera oxydée, d'une façon ou d'autre, par ce radical, d'où on aura de la cétone, du radical hydroxylique et du radical carboxylique.<sup>1~11)</sup> Surtout le produit de substitution 5.5 N-3 se décompose par suite de l'éclosion d'anneau des pyrimidines.<sup>12~13)</sup>

En 1951, Cravito et d'autres<sup>14)</sup> ont présenté un rapport relatif aux effets d'un choc à l'insuline sur une souris. Ils ont constaté, à l'analyse chromatographique de l'acide glutamique et de l'acide aspartique libres dans son cerveau, une diminution du premier élément, contrebalancé par une augmentation du dernier. Ils donnaient la proportion de ces deux acides aminés 0.7~2.1, en moyenne 1.3 pour une souris choquée à l'insuline, proportion qui s'élève à 3.1~4.6, en moyenne 4.2 dans une souris en état normal. Ils en ont inféré que la transamination y était plus active entre l'acide glutamique et l'acide oxalacétique.

Davis<sup>15)</sup> nous a d'ailleurs informé que l'acide aspartique-L peut remplacer l'acide glutamique-L, dont a besoin une tranche de cerveau.

- \* Shirogane-daimachi, Minato-ku, Tokyo (秋谷七郎, 有吉歌子).
- 1) E. W. Maynert, H. B. van Dyke : Pharmacol. Rev., **1**, 217(1949).
  - 2) E. W. Maynert, H. B. van Dyke : J. Pharmacol. Exptl. Therap., **98**, 184(1950).
  - 3) E. W. Maynert, H. B. van Dyke : *Ibid.*, **98**, 180(1950).
  - 4) L. J. Roth, E. Leifer, J. R. Hogness, W. H. Langham : J. Biol. Chem., **178**, 962(1949).
  - 5) E. W. Maynert, H. B. van Dyke : J. Pharmacol. Exptl. Therap., **98**, 174(1950).
  - 6) E. W. Maynert, H. B. van Dyke : Science, **110**, 661(1949).
  - 7) B. B. Brodie, L. C. Mark, E. M. Papper, P. A. Lief, E. Bernstein, E. A. Rovenstine : J. Pharmacol. Exptl. Therap., **98**, 85(1950).
  - 8) J. L. Anderson, J. N. Smith, R. T. Williams : Biochem. J., **43**, xxxv(1948).
  - 9) E. W. Maynert, Jane M. Dauson : J. Biol. Chem., **195**, 385(1952).
  - 10) E. W. Meynert : *Ibid.*, **195**, 397(1952). 11) H. Tsukamoto, N. Nakano, H. Yosimura : Mémoire présenté à la séance générale de Pharmaceutical Society of Japan, mai 1953.
  - 12) D. Sato, T. Mineshita, T. Ooka : Ann. Repts. Shionogi Lab., **1951**, 1.
  - 13) J. Ravennós : J. Pharm. Pharmacol., **6**, 217(1954).
  - 14) Cravito : Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., **78**, 856(1951).
  - 15) Davis : "Metabolic Functions of Nervous Tissues," **7**, 119(1952).

Mizuno et Suzuki<sup>16)</sup> ont étudié la variation de l'acide glutamique et de l'acide aspartique libres dans les bacilles dysenterique les staphylocoque, et de B. C. G. résistance aux drogues. Ils ont signalé, pour les deux premiers bacilles ayant acquis de la résistance, une diminution de l'acide glutamique et l'augmentation de l'acide aspartique, la proportion de l'un à l'autre diminuant ainsi.

Quant aux troisième bacilles, l'acide glutamique diminue de 2 tiers au bout de certains jours de culture aussi bien dans les souches naturelles que dans les souches résistabilisées, tandis que l'acide aspartique accuse une augmentation sensible dans les souches naturelles, en contraste avec sa diminution dans les souches résistabilisées.

Nous allons examiner la proportion de l'acide glutamique et de l'acide aspartique dans un corps vivant, en tenant compte non seulement de leur action sur le système respiratoire, mais aussi de leur rôle fondamental pour la composition de protéine.

Nous avons observé pendant longtemps les variations du méthyle-hexabitale soluble avec radical méthyle à l'azote, dont on a injecté les veines de lapins. Nous avons obtenu, comme produits métaboliques, uréthane, Fp. 62°, acide oxalique, acide benzoïque, urée, acide hydroxybenzoïque-*m*,<sup>17~21)</sup> Fp. 137~144°, acide hippurique, oxalate d'ammonium, et autres substances huileuses, sans pourtant trouver aucune substance de structure méthyle-hexabitale.

Ce qu'on trouve en général dans l'urine d'un lapin normal, ce sont entre autres de l'urée et de l'acide benzoïque. Après plusieurs coups d'injection intraveineuse de méthyle-hexabitale, on trouve, au lieu de l'acide benzoïque même, ses produits dérivés — l'acide hippurique et l'acide hydroxybenzoïque-*m*. Du même coup, on a toujours de l'acide oxalique et du sel ammoniaque.

Nous avons remarqué ainsi une variation sensible dans les composants de l'urine du lapin, par suite de l'injection de ce médicament : Diminution sensible de l'acide benzoïque, principal élément de l'urine d'un lapin normal, dans un lapin soumis à l'expérience, et transformation en acide hippurique et acide hydroxybenzoïque-*m* d'abord, en acide oxalique et oxalate d'ammonium ensuite, il sera difficile d'attribuer ce phénomène au simple métabolisme de cette drogue même, il nous faudra plutôt supposer que le mécanisme azoté en particulier, de l'animal considéré en soit plus ou moins affecté. Un certain degré de consommation et de décomposition serait effectuée, par exemple, de sorte que soit apparu un métabolisme différent de celui d'un lapin normal. Ce qui nous a fait porter intérêt à la variation de l'acide glutamique dans le cerveau où l'anesthésique doit agir, pour faire des expériences sur la proportion en quantité de l'acide glutamique et de l'acide aspartique.

Dans la supposition que les mêmes expériences de Cravito, de Davis et de Mizuno et Suzuki, appliquées aux animaux, puissent donner des résultats semblables, nous avons fait l'analyse de l'acide glutamique et de l'acide aspartique libres dans le cerveau des lapins que nous avions soumis à l'injection intraveineuse de méthyle-hexabitale et de ceux

TABLEAU I. Quantité de l'acide glutamique et de l'acide aspartique libres dans le cerveau d'un lapin, et la proportion de ces deux acides aminé

Sexe	Poids du corps (g)	Poids du cerveau (g)	Quantité de concentré (cc)	Quantité de l'acide glutamique γ/g	Quantité de l'acide aspartique γ/g	G Aspart.
Normale	♂ 2700	7.5	20	1600	350	4.6
	♀ 2500	6.8	17	1420	380	3.8
	♂ 2600	6.8	17.5	1030		
	♂ 2600	7.1	11	950	310	3.1

16) D. Mizuno, K. Suzuki : Japan. J. Med. Sci. : 7, 193 (1954).

17) H. J. Bi lieg, A. Hayashida : Z. physiol. Chem., 266, 99(1940).

18) E. Lederer, J. Polonsky : C. A., 43, 2685(1949).

19) Biophys. Acta, 2, 431(1948).

20) O. Tamemasa : J. Pharm. Soc. Japan, 71, 1019(1951).

21) B. Boylaid, D. Manson, J. B. Solomon, C. H. Wiltshire : Biochem. J., 53, 420(1953).

	jours							
Injection intraveineuse de méthyle-hexabitale	15	{	2500	5.8	14	1380	460	3.0
		{	3000	6.5	18	1190	440	2.7
	31	{	1450	5.9	11	670	760	0.9
		{	1600	5.5	11	440	260	1.7
		{	2500	6.6	13	610	450	1.4
Injection intraveineuse de l'acide aspartique	1	{	2300	7.2	20	1360	430	3.1
		{	2360	6.5	20	1370	400	3.4
	10	{	2100	10.0	20	1080	260	4.2
		{	2100	8.7	20	1060	330	3.2

qui avaient subi ; celle d'acide aspartique.

Tableau I donne les résultats de cette expérience, montrant une baisse de la proportion de ces deux acides aminé à  $\frac{1}{3}$  environ.

Cette baisse de la proportion de l'acide glutamique et de l'acide aspartique libres dans le cerveau suppose, à notre avis, qu'un changement soit survenu, sous l'action du médicament, au métabolisme des deux acides aminé dans le cerveau où l'acide glutamique exerce une action importante ; soit que la faculté de synthèse de l'acide glutamique s'affaiblisse, soit que son utilisation s'intensifie, si la proportion entre l'acide glutamique —facteur du système respiratoire ainsi que de la composition de protéine—et l'acide aspartique, son pendant, va s'abaissant, c'est qu'un trouble jeté par le medicament dans l'exercice normal du métabolisme nécessite un recours à un autre système métabolique.

L'injection intraveineuse d'acide aspartique n'entraîne de variation ni à la quantité de l'acide aspartique libre dans le cerveau ni à sa proportion avec l'acide glutamique. Ce phénomène n'est pas sans intérêt, si l'on le rapporte aux résultats d'une expérience faite par Waelsch et d'autres,<sup>22)</sup> qui affirment qu'aucune variation sensible de quantité n'a été provoquée, pour l'acide glutamique dans le cerveau, par l'injection intraveineuse de cette drogue.

Je tiens à exprimer mes remerciements sincères à M. le docteur Den-ichi Mizuno, directeur de la Section chimique de l'Institut d'Hygiène, Tokio, et à M. Kiyosi Suzuki, licencié en agriculture, pour leurs précieux conseils et leur direction bienveillante.

### Experimentale

Le lapin a été soumis à l'expérience après 10~15 jours d'élevage qui suivaient ses achats.

Après l'extraction rapide de tout son sang, on a dégagé ses cerveaux (cerveaux et cervelets) pour les mettre au mélangeoir pendant une minute en les refroidissant à la glace. On les a réchauffés en les remuant dans un bain d'eau tiède et y a ajouté de l'alcool jusqu'à 70%. Le précipité en ayant été enlevé, on a distillé sous pression réduite cette solution pour en obtenir une quantité déterminée de liquide épais, dont on a analysé l'acide glutamique et l'acide aspartique à l'essai microbien à *Leuconostoc mesenteroides* P-60.

(On a donc la quantité respective des substances correspondant à l'acide glutamique et à l'acide aspartique en proportion avec ce microbe plutôt que la quantité même de ces deux acides aminés.)

1) Le tableau suivant donnera la quantité de l'acide glutamique et de l'acide aspartique et leur proportion dans 1 g. de cerveau d'un lapin normal, traité ainsi (malgré la variation individuelle de la quantité absolue de ces deux acides aminés, leur proportion reste assez fixée).

2) Lapin soumis à l'injection intraveineuse de méthyle-hexabitale soluble : Même traitement après 15 et 31 jours d'injection de 50 mg. par jour de méthyle-hexabitale soluble dans les veines auriculaires. Au bout de 31 jours, diminution de l'acide glutamique et baisse de sa proportion.

3) Lapin soumis à l'injection d'acide aspartique : Même traitement effectué 1 heure après un coup ou dix coups par jour d'injection de 0.5 g. pas de changement dans la quantité de l'acide glutamique ni de l'acide aspartique, ni dans leur proportion.

### Resumé

Nous avons observé pendant longtemps les variations du méthyle-hexabitale soluble avec radical méthyle à l'azote, dont on a injecté dans les veines de lapins. Nous avons obtenu de l'urine du lapin comme produits métaboliques, uréthane, Fp. 62°, acide oxalique,

22) Waelsch : J. Biol. Chem., 184, 37(1950).

acide benzoïque, urée, acide hydroxybenzoïque-*m*, Fp. 137~144°, acide hippurique, oxalate d'ammonium, et autre substances huileuses.

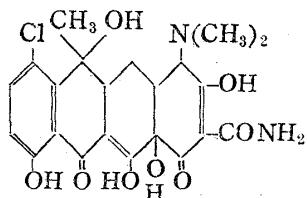
Nous avons fait l'analyse de l'acide glutamique et de l'acide aspartique libres dans le cerveau des lapins, à l'essai Microbien à *Leuconostoc mesenteroides* P-60. Tableau I donnera les résultats de cette expérience montrant une baisse de la proportion de ces deux acides aminé à  $\frac{1}{3}$  environ.

(Reçu à 27 auguste, 1954)

**30. Takeichi Sakaguchi and Kiyomi Taguchi : Metal Chelate Compounds with Tetracycline Derivatives. II.\* Colorimetric Determination of Aureomycin with Thorium(IV).**

(Pharmaceutical Institute, University of Chiba\*\*)

Aureomycin (chlorotetracycline) is the most widely used antibiotic and the following structure has been reported by Waller, Hutchings, *et al.* in the Lederle Laboratories and also by Woodward, Stephans, *et al.*<sup>1)</sup>



The quantitative determination of the antibiotic has been an important part of pharmaceutical and clinical analyses. A generally used, official method for the determination of Aureomycin is attributed to the fact that an intense yellow color is produced when it is heated with 0.2*N* hydrochloric acid.<sup>2)</sup> Other methods are through ultraviolet absorption spectra by Hiscox,<sup>3)</sup> fluorometric analysis,<sup>4)</sup> titration in nonaqueous solvent,<sup>5)</sup> and polarographic determination.<sup>6)</sup>

In this paper, a new sensitive method for the determination of Aureomycin is proposed.

#### I. Procedure by Th(IV)

Investigations indicated that the enolized hydroxyl group of 1,3-diketone,  $\text{--C}=\text{CH}(\text{OH})\text{--C}=\text{O}$  in Aureomycin underwent chelation with metallic ions such as Th(IV), UO<sub>2</sub>, Al(III), and Zr(IV).

In acidic medium, Aureomycin solution has peaks at 230, 262.5, and 367.5 m $\mu$ . When an aqueous solution of Th(IV) salts is added to an aqueous solution of Aureomycin Hydrochloride, an intense yellow color formed. This complex was studied spectrophotometrically and found to have maximum absorption at 405 m $\mu$  at pH 4.0 (Fig. 1).

\* Part I : This Bulletin, 3, 147(1955).

\*\* Inohana-cho, Chiba (坂口武一, 田口清水).

1) C. W. Waller, *et al.* : J. Am. Chem. Soc., 74, 4978(1952); R. B. Woodward, *et al.* : *Ibid.*, 74, 4976(1952).

2) J. Levine, *et al.* : J. Am. Pharm. Assoc., 38, 473(1949).

3) Dorothy J. Hiscox : *Ibid.*, Sci. Ed., 40, 237(1951).

4) M. Serenhe : C. A., 46, 5112(1952).

5) Charles W. Pifer, *et al.* : J. Am. Pharm. Assoc., 42, 509(1953).

6) Krestynova-Telupilova, *et al.* : Chem. Listy, 47, 637(1953).