

wir tropfenweise Calciumhydroxyd-Lösung zugesetzt, bis das pH 8—9 erreicht hatte. Der hierbei ausgefallene gelbe Niederschlag wurde abzentrifugiert und so oft mit destilliertem Wasser von 20° ausgeschüttelt, als sich die Extrakte noch gelb färbten. Die Mutterlauge des bei pH 8—9 ausgefallenen Niederschlags sowie die wässerigen Auszüge des Niederschlags wurden vereinigt, genau auf pH 7 eingestellt und im Vakuum bei niederer Temperatur eingeeignet. Während der Konzentration der Lösung beginnt das Calciumsalz des Pyridoxal-5'-phosphates auszufallen. Nachdem das Volumen der Lösung ca. 10 cm³ erreicht hat, bringt man diese durch Zusatz einiger Tropfen Calciumhydroxyd-Lösung wieder auf pH 8—9 und fügt 40 cm³ abs. Alkohol hinzu, wodurch das Calciumsalz des Pyridoxal-5'-phosphorsäureesters ausfällt. Dieses wurde durch Zentrifugieren abgetrennt, mit Alkohol und Äther gewaschen und im Vakuum getrocknet. Es ist ein citronengelbes, nicht wesentlich hygroskopisches Pulver, das sich in kaltem Wasser schwer löst.

<chem>C8H8O6NPCa</chem> , 6% <chem>Ca3(PO4)2</chem> , 3H ₂ O (361)					
Ber.	C 26,6	H 3,88	N 3,88	P (als <chem>PO4'''</chem>) 1,2	P (total) 9,8 Ca 13,4 %
Gef.	„ 25,68	„ 3,90	„ 4,17	„ 1,2 „ „	9,56 „ 14,59%

Wird das Calciumsalz des Pyridoxal-5'-phosphates aus dem Magnesiumsalz, über dessen Darstellung später berichtet werden soll, hergestellt, so ist es frei von Phosphationen.

<chem>C8H8O6NPCa</chem> , 3H ₂ O	Ber. C 28,8	H 4,2	N 4,2	P 9,3%
	Gef. „ 28,6	„ 4,0	„ 5,0	„ 9,0%

Zusammenfassung.

Aus Pyridoxal wurde durch Einwirkung von (N-Dimethylglycyl)-hydrazin das Pyridoxal-(N-dimethylglycyl)-hydrazon dargestellt. Aus diesem gewann man mittels meta-Phosphorsäure (HPO3)₃ den 5'-Triphosphorsäureester des Pyridoxal-(N-dimethylglycyl)-hydrazone und durch saure Hydrolyse letzterer Substanz das Pyridoxal-5'-phosphat. Dessen Calciumsalz besitzt ausgezeichnete Codecarboxylase-Wirkung, die derjenigen der natürlichen Codecarboxylase gleicht. Das natürliche Coferment der Aminosäuredecarboxylase ist daher Pyridoxal-5'-phosphat.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.

219. Introduction à une étude polarographique de la salive

par D. Monnier et Z. Besso.

(21 VII 51)

Généralités.

*Brdicka*¹⁾ constate que lorsqu'on polarographie les protéines ou leurs produits de dénaturation, en présence d'un sel de cobalt et d'un tampon constitué de chlorure d'ammonium et d'ammoniaque, on obtient deux vagues dont le potentiel $E_{\frac{1}{2}}$ est un peu plus négatif que celui du cobalt. Ces vagues sont dites *catalytiques*, car leur hauteur est environ 500 fois plus grande que ne le prévoit la théorie (équation de *Ilkovic*). Elles sont dues à la réduction de l'ion hydrogène sur la cathode

¹⁾ Collection Czechoslov. Chem. Commun. 5, 112, 148, 238 (1933).

de mercure, réaction qui est catalysée par les groupements $-\text{SH}$ et $-\text{S}-\text{S}-$ des protéines. Les courbes polarographiques obtenues dans ces conditions, avec le sérum sanguin, présentent aussi deux vagues, dont on peut tirer, pour un même individu, certaines constantes caractéristiques. Il y a aussi une certaine analogie entre les courbes fournies par le sang normal de personnes différentes. On observe par contre des altérations des polarogrammes — diminution ou augmentation de la hauteur des sauts par exemple — lorsque les déterminations sont faites sur le sang de personnes atteintes de maladies infectieuses ou de cancer. Une méthode d'indentification de cette dernière affection basée sur ces considérations a même été proposée. Il semble donc d'un grand intérêt de faire l'étude systématique du sérum sanguin au polarographe, et d'en rechercher les constantes caractéristiques dans divers cas. Mais ce travail n'est pas aisé car la complexité du sérum rend l'interprétation des polarogrammes souvent difficile. Nous avons pensé qu'il serait peut-être avantageux d'entreprendre une étude de la salive, liquide pauvre en matières dissoutes et de composition chimique probablement plus simple.

Appareillage et mode opératoire.

Toute cette étude a été faite au polarographe *Sargent XXI* avec l'électrode à gouttes de mercure, dont les constantes sont:

Temps de goutte $t \approx 5$ sec.; hauteur du mercure $H \approx 450$ mm; masse de mercure $m = 1,4$ mg/sec.

Les solutions utilisées sont: chlorure de cobalt (II) 0,008-m.; chlorure d'ammonium 1-n.; hydroxyde d'ammonium 1-n.

La solution à polarographier est préparée de la façon suivante: à 10 cm^3 de chlorure de cobalt, on ajoute 5 cm^3 de chlorure d'ammonium, 5 cm^3 d'hydroxyde d'ammonium et 1 cm^3 de salive. On complète à 50 cm^3 avec de l'eau bidistillée. 10 à 15 cm^3 de cette solution sont introduits dans la cuve polarographique. On peut chasser l'oxygène, bien que les vagues de ce dernier ne gênent pas, mais on évite ainsi une oxydation partielle du cobalt (II) en cobalt (III).

Etude qualitative de la salive.

Etant donné la faible concentration de la salive en soufre thiol ou disulfure organique, on pouvait se demander s'il était possible d'obtenir des sauts caractéristiques suffisamment bien marqués. Nous avons été fort surpris de constater que les courbes obtenues avec la salive non diluée sont inutilisables, même si on prend le soin d'éliminer la plus grande partie de la mucine par centrifugation. Il faut diluer la salive au moins 10 fois, mais de préférence 50 fois, pour obtenir des courbes satisfaisantes alors que le sérum sanguin est en général dilué 100 fois.

Il est bien évident que cette étude ne se justifie que si on peut trouver certaines constantes caractéristiques pour chaque individu, pour des salives normales, et si ces polarogrammes s'altèrent plus ou moins lors de troubles de l'organisme. Dans cette étude, nous nous sommes limités à la salive de personnes en bonne santé, prise à divers moments de la journée, au cours de plusieurs semaines.

Les résultats sont portés dans le tableau I. Les potentiels de demi-vagues ($E_{1/2}$) sont donnés par rapport à la surface de mercure qui constitue l'anode. La signification de h_1 , h_2 , h , h_{\max} , α et β est indiquée sur le graphique.

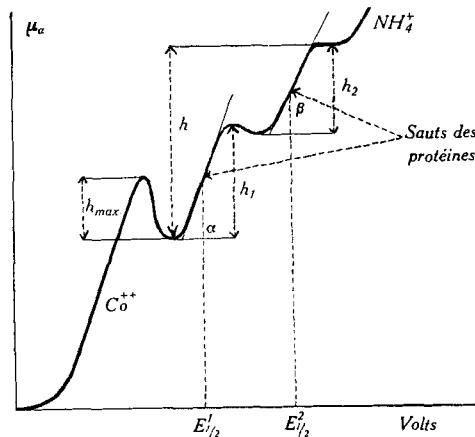


Fig. 1.

Le tableau I renferme les résultats obtenus sur la salive d'une même personne (salive A), prise dans diverses conditions.

Tableau I.
Salive A. Sensibilité 0,08 μ_a /mm. Dilution 50.

	Conditions	h_1 μ_a	h_2 μ_a	h μ_a	h_{\max} μ_a	$E_{1/2}^1$ volts	$E_{1/2}^2$ volts	α	β
I	Le matin à jeun (6 h.)	1,6	1,2	2,8	5,6	1,43	1,62	57	40
		1,7	0,8	2,0	2,1	1,36	1,56	53	30
		1,2	0,8	1,6	5,0	1,37	1,66	45	32
II	Au cours de la matinée à des jours différents	0,8	2,9	3,2	0	1,36	1,66	30	44
		0,8	3,0	3,4	0	1,39	1,67	36	47
		1,0	3,8	4,3	1,9	1,35	1,53	39	54
		0,7	3,9	4,5	0,6	—	—	34	54
		0,8	3,0	3,4	3,2	1,40	1,66	36	47
		1,4	4,7	5,2	0	1,25	1,58	46	60
		0,9	3,9	4,7	1,4	1,37	1,54	37	60
		0,6	2,8	3,0	4,7	1,39	1,70	27	47
		1,3	2,5	3,5	1,6	—	—	42	33
		0,6	3,4	3,4	2,6	1,38	1,65	30	55
III	Après repas à des jours différents	1,6	4,0	5,5	0	1,30	1,58	40	57
		1,6	4,7	6,4	0	1,36	1,66	44	60
		1,1	4,1	5,2	0	—	—	30	55
	Valeurs moyennes	I	1,5	1,0	2,2				
		II	0,9	3,4	3,8				
		III	1,4	4,2	5,7				

L'examen du tableau I conduit aux remarques suivantes:

1. Un grand nombre de facteurs interviennent dans la formation de la salive, d'où la différence dans la hauteur des sauts de la salive d'une même personne prise au même moment de la journée. Quant à la forme de la courbe, elle est assez constante. La composition de la salive varie constamment, du moins en ce qui concerne la concentration des dérivés organiques sulfurés et azotés.

2. On ne peut tirer aucune conclusion en ce qui concerne l'effet de la fumée de cigarette, du café et de la pâte dentifrice sur la sécrétion de la salive, car les courbes obtenues ne sont pas reproductibles.

3. On observe, malgré la faible reproductibilité des courbes, une très nette différence entre les polarogrammes pris le matin à jeun et ceux provenant de salives sécrétées au cours de la journée. D'autre part, la salive prise après le repas est en général plus concentrée que celle provenant d'autres moments de la journée.

4. En ce qui concerne les maxima des vagues du cobalt(II), nous avons fait une curieuse constatation. On sait en effet que lorsqu'on polarographie une solution renfermant du cobalt(II), le saut dû à la réduction de cet ion présente un maximum souvent très accentué, qui gêne le dosage. L'addition de petites quantités de protéine permet de supprimer complètement ce phénomène. Or, dans les conditions de nos recherches, nous obtenons parfois ce maximum du cobalt. Ceci pourrait indiquer que la salive est pauvre en protéines. Mais ce maximum disparaît en partie, et même souvent complètement, lorsqu'on filtre la solution, soit sur papier filtre, soit sur verre fritté. Aucune explication de ce phénomène n'a été trouvée, car cette filtration ne peut qu'enlever une certaine quantité de protéines, ce qui aurait pour effet d'augmenter encore ce maximum.

Après cette étude, nous avons entrepris une série d'essais semblables aux premiers sur la salive d'une autre personne (salive B). Les résultats sont portés dans le tableau II.

Tableau II.

Salive B. Sensibilité 0,08 μ_a /mm. Dilution 50.

	Conditions	h_1 μ_a	h_2 μ_a	h μ_a	$h_{\max.}$ μ_a	$E_{\frac{1}{2}}$ volts	$E_{\frac{2}{2}}$ volts	α	β
I	Le matin à jeun (6 h.) à des jours différents	6,6	1,1	6,5	0	1,40	1,62	—	—
		7,0	1,1	6,8	0	1,36	1,57	—	—
		4,6	1,0	4,6	0	1,43	1,64	70	44
II	Au cours de la journée à des jours différents	2,6	1,4	3,9	0	1,36	1,60	60	39
		2,4	1,4	3,2	0,3	1,44	1,67	60	37
		2,6	1,3	3,0	0,3	—	—	66	40
		3,7	1,3	4,4	0	—	—	67	40
	Personne altérée	3,7	3,4	6,8	0	1,36	1,60	65	40
	Même salive après boire	2,4	1,4	3,3	0	1,35	1,58	55	40
III	Après divers repas	3,2	1,2	4,0	0	1,40	1,60	64	40
		3,7	1,3	4,4	0	—	—	67	40
		2,6	1,3	3,0	0,3	—	—	66	40
	Valeurs moyennes	I II III	6,0 2,8 3,2	1,1 1,4 1,3	5,9 3,4 3,8	1,40 1,40 1,40	1,61 1,63 1,60	70 63 66	44 39 40

L'étude des salives A et B et de quelques autres dont nous n'avons pas fait mention, montre qu'il y a de très grandes différences lorsqu'on passe de l'une à l'autre, tant en ce qui concerne la hauteur des sauts que l'allure générale des polarogrammes. On peut donc affirmer que la concentration salivaire des composés sulfurés et azotés organiques varie beaucoup d'une personne à l'autre. En effet, la salive B, par exemple, donne un premier saut (h_1) très important (6, 2, 8, 3, 2 μ_a), alors que celui de la salive A est à peu près constant, de 1,2 μ_a en moyenne. Quant au second saut, très variable pour la salive A, il est compris entre 1,1 et 1,3 μ_a pour la salive B. La concentration des protéines est aussi variable, semble-t-il, puisqu'on observe, dans les mêmes conditions de dilution, des maxima du cobalt très marqués dans les polarogrammes de la salive A, alors qu'ils sont petits ou nuls dans les essais effectués sur la salive B.

Remarques. La hauteur des sauts catalytiques obtenus pour la salive prouve que cette dernière renferme des composés organiques sulfurés et azotés en quantité appréciable. Cette concentration est de l'ordre de grandeur de celle du sérum sanguin (environ la moitié), pour autant qu'il est possible de le dire, la hauteur des sauts n'étant qu'approximativement proportionnelle à la concentration. Le thiocyanate présent en petites quantités dans la salive, ne joue aucun rôle dans les phénomènes observés. Les expériences que nous avons faites à ce sujet le prouvent de façon irréfutable. D'après les travaux de *Brdicka*, *Tropp* et coll. et *Beach* et coll.¹⁾, il semble que seul le second saut catalytique (h_2) soit dû au soufre. Le premier saut aurait pour origine l'azote organique mais ne pourrait se manifester qu'en présence de soufre organique.

Nous avons effectué le polarogramme de deux amylases, aimablement mises à notre disposition par le Dr *Fischer* (Laboratoire de chimie organique de l'Université de Genève, Prof. *K. H. Meyer*), afin de comparer leurs polarogrammes à ceux fournis par la salive. A la concentration $2 \cdot 10^{-6}$ -m. environ, l'amylase de porc donne une courbe polarographique présentant deux sauts semblables à ceux de la salive. On peut supposer que ces sauts proviennent de l'amylase elle-même, mais étant donné la difficulté de purification, il n'est pas exclu que ce soufre soit apporté par des impuretés. Une autre amylase, le lysozyme, a aussi été polarographiée; elle renferme selon notre appréciation 5 à 10 fois plus de soufre que l'amylase de porc. Les polarogrammes sont très semblables à ceux précédemment établis.

Etude de salives et d'amylases à diverses dilutions.

Des travaux ont été effectués par *C. Tropp*, *L. Juhling* & *F. Geiger*²⁾ sur l'évolution de diverses protéines et autres composés organiques sulfurés et azotés, en fonction de la concentration. Il nous a paru intéressant de faire des essais identiques sur deux salives (A et B)

¹⁾ *Brdicka*, Mikroch. **15**, 104 (1934). *Tropp*, *Geiger* & *Stoyes*, Z. physiol. Ch. **277**, 192 (1943). *Beach* et coll., J. Biol. Chem. **115**, 1930 (1939).

²⁾ Z. physiol. Ch. **292**, 225 (1939).

et sur les deux amylases déjà citées. Les résultats sont données dans le tableau III.

Tableau III.

Substances	Dilution	Concentration	$h_1 (\mu_a)$	$h (\mu_a)$
<i>Salive A 9 h.</i>	100	0,01	0,4	1,5
	90	0,011	0,5	1,7
	80	0,0125	0,6	1,8
	70	0,0143	1,0	3,6
	60	0,0167	1,1	4,6
	50	0,02	1,6	5,5
	40	0,025	1,3	6,0
	30	0,033	2,1	6,5
	25	0,040	2,5	10,0
	20	0,050	4,0	—
	15	0,067	4,0	—
	10	0,1	3,6	—
<i>Salive B 9 h.</i>	120	0,0083	0,6	1,0
	100	0,01	0,6	1,1
	80	0,0125	1,0	1,6
	60	0,0167	1,6	2,6
	50	0,02	2,5	3,2
	40	0,025	3,5	—
	20	0,05	4,5	8,5
	15	0,067	3,3	—
<i>Amylase de porc</i>		$2 \cdot 10^{-2} \text{ g/l}$	1,2	0,7
		$5 \cdot 10^{-2} \text{ , ,}$	4,5	3,8
		10^{-1} , ,	11,0	11,0
		$1,33 \cdot 10^{-1} \text{ , ,}$	12,2	13,5
		$2 \cdot 10^{-1} \text{ , ,}$	11,2	14,7
<i>Lysozyme</i>		$3,3 \cdot 10^{-3} \text{ g/l}$	1,2	2,4
		$5 \cdot 10^{-3} \text{ , ,}$	1,0	2,3
		$6,6 \cdot 10^{-3} \text{ , ,}$	2,1	3,3
		10^{-2} , ,	3,8	5,0
		$2 \cdot 10^{-2} \text{ , ,}$	8,4	12,5
		$2,66 \cdot 10^{-2} \text{ , ,}$	12,8	—
		$4 \cdot 10^{-2} \text{ , ,}$	18,6	32,0

Dans leur travail, *Tropp* et coll. (loc. cit.) montrent que la plupart des composés organiques sulfurés et azotés, étudiés en fonction de la concentration (en présence de cobalt(II), de chlorure d'ammonium et d'hydroxyde d'ammonium) présentent un effet de croisement lorsqu'on porte en abscisses les concentrations et en ordonnées, d'une part h_1 et d'autre part h . Les courbes de certaines substances comme la trypsine, la pepsine, etc. ne se croisent pas. Par contre, dans tous les cas, on

observe un écartement des courbes lorsque la concentration augmente. Ce même écartement se produit sur les solutions que nous avons étudiées comme le montrent les valeurs données dans le tableau III, mais seule l'amylase de porc présente l'effet de croisement (pour une concentration de 10^{-1} environ). Dans ce cas, il est possible que le soufre provienne d'une impureté. Néanmoins, il ne semble pas impossible que la ptyaline joue un rôle important dans le phénomène catalytique; seule une étude approfondie permettra de l'affirmer.

L'étude comparative des salives A et B montre qu'il y a, entre ces deux solutions, de très grandes différences de composition qui ne sont pas dues au seul fait qu'elles renferment plus ou moins d'eau. L'examen des courbes de dilution prouve qu'il y a une variation dans la concentration relative des divers composés organiques.

Ce travail a pour objet de servir d'introduction à une recherche plus poussée sur la constitution de la salive. Nous désirions poser les bases d'une étude future qui comprendra une série d'essais effectués sur un grand nombre de salives d'individus sains et d'établir dans chaque cas la courbe de dilution qui, pour une personne déterminée, semble présenter un aspect caractéristique. Une étude identique doit être effectuée sur des personnes malades et dans les cas de caries dentaires.

Il sera peut-être nécessaire d'étudier séparément chaque sorte de glande salivaire.

RÉSUMÉ.

L'étude polarographique de la salive en présence de cobalt(II), de chlorure d'ammonium et d'ammoniaque a été effectuée. La hauteur des sauts catalytiques varie sensiblement pour une même personne au cours de la journée et particulièrement le matin à jeun et après les repas. D'une personne à l'autre, on observe d'importantes différences dans les polarogrammes, non seulement dans la hauteur des sauts, mais dans l'allure des courbes. Les polarogrammes de dilution montrent qu'il existe non seulement une différence de composition chimique due au fait que la salive sécrétée renferme plus ou moins d'eau, mais qu'il y a aussi une différence dans la composition relative des composés organiques sulfurés et azotés.

Laboratoire de chimie analytique et de microchimie,
Université de Genève.
