

heissem Alkohol verdünnten Lösung wird das Diphenylamin mit Wasser gefällt, umkristallisiert und im Hochvakuum sublimiert. Smp. unkor. 53° (Lit. 54°). Das reine Diphenylamin wird nach *Kjeldahl* auf Ammoniumchlorid verarbeitet.

Ergebnis der Isotopenanalysen.

Die Isotopenanalysen wurden nach der im Institut üblichen, von Herrn *H. Hürzeler* noch weiter verbesserten bandenspektroskopischen Mikromethode durchgeführt. Da das zum Diazotieren benutzte Natriumnitrit 2,57% ^{15}N und gewöhnlicher Stickstoff 0,37% ^{15}N enthält, stimmt die gefundene Isotopenverteilung mit der durch die Reaktionsschemas (3) bis (7) geforderten überein:

Tabelle 1.

^{15}N -Isotopenverteilung bei der thermischen Zersetzung des N,N-Diphenylhydrazins.

Spaltprodukt	^{15}N -Gehalt gefunden	^{15}N -Gehalt gefordert von Reaktionsschema (3) bis (7)
Stickstoff	2,58%	2,57%
Ammoniak	2,48%	2,57%
Diphenylamin	0,36 ₆ %	0,37%
$\bar{c}_k = \frac{\sum_1^i n_1 c_1}{\sum_1^i n_1}$	1,46%	1,47%

In der letzten Zeile ist noch der durchschnittliche ^{15}N -Gehalt angegeben, wie er sich für die Bruttogleichung (2) berechnet.

Der *Stiftung für wissenschaftliche Forschung an der Universität Zürich* sind wir für die Bereitstellung von Mitteln zu vielem Dank verpflichtet.

Zusammenfassung.

N,N-Diphenylhydrazin der Zusammensetzung $(\text{C}_6\text{H}_5)_2^{14}\text{N}^{15}\text{NH}_2$ wurde gecrackt, wobei neben $(\text{C}_6\text{H}_5)_2^{14}\text{NH}$ noch $^{15}\text{NH}_3$ und $^{15}\text{N}_2$ entstehen. Der Befund erklärt sich zwanglos durch einen Mechanismus, der über die Radikale $(\text{C}_6\text{H}_5)_2^{14}\text{N}$, $^{15}\text{NH}_2$ und $(\text{C}_6\text{H}_5)_2^{14}\text{N}^{15}\text{NH}$ abläuft.

Physikalisch-Chemisches Institut der Universität Zürich.

120. Recherches sur la biosynthèse des caroténoïdes chez un bacille paratuberculeux.

V. Influence de la température sur la composition du mélange pigmentaire¹⁾

par **Gilbert Turian**²⁾.

(7 V 53)

Parmi les facteurs physiques contrôlant l'évolution de la caroténo-génèse chez les microorganismes, la température a été peu étudiée.

¹⁾ IV^e communication, *Helv.* **34**, 1060 (1951).

²⁾ Bruce Research Fellow au Département de la Biologie, Université Johns Hopkins, Baltimore, U.S.A., 1951–52.

*Fromageot & Tchang*¹⁾ ont montré que la composition qualitative de la pigmentation de *Rhodotorula Sanniei* ne change pas dans les limites de température de 14 à 28°. Il était donc intéressant d'étudier l'influence de la température sur la composition qualitative et quantitative du mélange pigmentaire synthétisé par le Bacille de la fléole.

Mycobacterium phlei (souche coll. *P. Hauduroy*, Lausanne) a été cultivé sur un milieu simple composé de bacto-peptone 1%, glucose 4%, glycérol 2% (pH 7,2).

Le rapport C/N et la teneur en glycérol de ce milieu assurent une production de caroténoïdes abondante et bien diversifiée. Les cultures ont été séparées en deux lots placés respectivement à 30 et 37° et constitués chacun de 16 erlenmeyers (*Schott*, Jena, 250 cm³) contenant 50 cm³ de milieu. Après 6 jours d'incubation, les bacilles sont tués (bref autoclavage à 100°) et immédiatement soumis aux opérations d'extraction et de séparation des caroténoïdes selon des méthodes déjà décrites²⁾.

1. *Fractionnement de l'extrait acétonique des bacilles cultivés à 30° (1,65 g de bacilles secs).*

Après la saponification, l'épiphase éthéropétrolique contient la majeure partie des pigments, l'hypophase hydroalcoolique alcaline n'étant que légèrement teintée. L'éther de pétrole est ensuite agité avec du méthanol à 90%, auquel il ne cède pas de pigment, puis lavé avec de l'eau et enfin séché sur Na₂SO₄. La solution des pigments est finalement concentrée sous vide dans un courant de CO₂ avant d'être filtrée sur une colonne (20 × 1,5 cm) de MgO-celite (1:1).

Chromatogramme sur MgO-celite (1:1) des polyènes de *Mycobacterium phlei* cultivé 6 jours à 30°; développement avec éther de pétrole (Eb. 30—60°) contenant 1—5% éthanol absolu.

Bande No.	Description	Maxima d'absorption ³⁾ (dans l'éther de pétrole) en mμ
1	violet foncé	(480), 452, (428)
2		
3	gris bleuté pâle	—
4		
5	orange	501, 471, 445
6	jaune	480, 452, 428
7	jaune orangé	490, 460, 435
8	incolore, fluorescence bleue	308, 297 ⁴⁾
9	jaune très pâle	—
10	incolore, faible fluorescence gris-vert	367, (348)
11	incolore, odeur terpénoïde	—

Fraction 1 (fig. 1C): pigment épiphase vis-à-vis du méthanol à 90%; léger passage dans méthanol 95%; pas capté par sol. alcoolique alcaline; pas de coloration bleue avec HCl conc. Difficilement éluable. Caroténoïde neutre oxygéné apparenté à la cryptoxanthine.

Fractions 2, 3, 4: isomères probables du pigment précédent.

¹⁾ *C. Fromageot & J. L. Tchang*, Arch. Mikrobiol. **9**, 424 (1938).

²⁾ *G. Turian*, Helv. **34**, 1060 (1951).

³⁾ Déterminés avec le spectro-photomètre de *Beckman*.

⁴⁾ Détermination dans l'hexane purifié sur silicagel.

Fraction 5 (fig. 2A): lycopénoïde présentant une étroite analogie avec le rhodopène des *Rhodothiobactéries*¹). Pigment épiphase (avec méthanol 95%), présent à la concentration de 2,9 mg pour 100 g de bacilles secs (en utilisant la valeur $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 3460$ donnée par *Zechmeister*²) pour le lycopène à 468 $m\mu$).

Fraction 6 (fig. 1A): léprotène, pigment plus fortement adsorbé que le γ -carotène (fraction 7), ce qui le distingue nettement du β -carotène. Production estimée à 2 mg% g de bacilles secs (en utilisant la valeur $E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 2590$ du β -carotène à 450 $m\mu$ selon *Zechmeister*²).

Fraction 7 (fig. 1B): γ -carotène, ainsi que le confirme la formation d'une bande homogène jaune orangé lors de la chromatographie mixte de ce pigment épiphase avec du γ -carotène authentique isolé de *Neurospora crassa*. L'estimation quantitative indique 2,5 mg% g de bacilles secs ($E_{1\text{ cm}}^{1\%} = 2760$ à 459 $m\mu$).

Fraction 8: fluorescence bleue passant au gris-vert après addition d' H_2SO_4 à la solution éthéropétrolique de ce composé non identifié (stérol?).

Fraction 9: pigment mineur présentant les mêmes caractéristiques d'adsorption que le caroténoïde voisin de la flavacine (« ζ -carotène») que nous avons récemment isolé du même bacille cultivé sur milieu synthétique additionné de diphenylamine³).

Fraction 10: phytofluène³ en traces.

Fraction 11: vraisemblablement composé(s) terpénoïde(s).

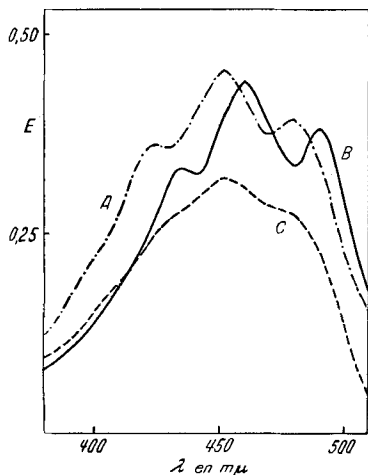


Fig. 1.

Spectres d'absorption dans l'éther de pétrole. (Eb. 30–60°):
 - - - - - léprotène (A);
 ——— γ -carotène (B);
 - - - - - oxy-caroténoïde (C).

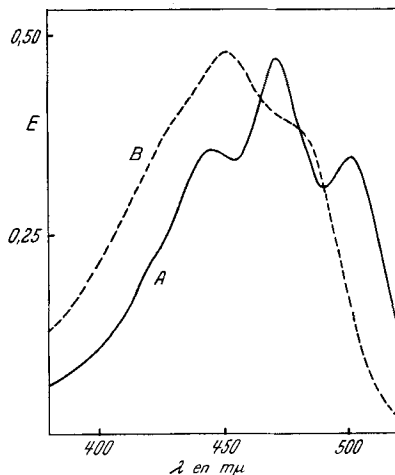


Fig. 2.

Spectres d'absorption dans l'éther de pétrole. (Eb. 30–60°):
 ——— lycopénoïde (A);
 - - - - - chrysofléine (B).

2. Fractionnement de l'extrait acétonique des bacilles cultivés à 37° (1,60 g de bacilles secs).

Après la saponification, l'épiphase éthéropétrolique est colorée en jaune pâle alors que l'hypophase hydroalcoolique alcaline est rouge orange foncé.

¹ P. Karrer & U. Solmssen, *Helv.* **18**, 25, 1306 (1935); P. Karrer, U. Solmssen & H. Koenig, *Helv.* **21**, 454 (1938).

² L. Zechmeister, *Chem. Rev.* **34**, 267 (1944).

³ G. Turian & F. Haxo, *J. Bact.* **63**, 690 (1952).

a) L'épiphase est recueillie et fractionnée sur colonne de MgO-celite (1:1). Le chromatogramme, obtenu en développant avec l'éther de pétrole contenant 1—5% d'éthanol absolu, permet de reconnaître les bandes, faiblement marquées, du caroténoïde oxygéné, du lycopénoïde (rhodopène?), du léprotène et du γ -carotène. En prolongeant suffisamment le lavage de la colonne, il a été possible de récupérer l'ensemble de ces caroténoïdes dans le filtrat.

La courbe d'absorption totale de ce filtrat étheropétrolique (lavé à l'eau pour éliminer l'éthanol) présente un maximum à 458 m μ . En assimilant le mélange à du γ -carotène¹⁾, cela permet d'estimer à 2 mg% g la teneur des bacilles secs en caroténoïdes neutres.

b) L'hypophase alcaline est acidifiée jusqu'au virage au jaune, avec l'acide acétique 1/3. Ses pigments sont transférés dans l'éther de pétrole et la solution filtrée sur colonne de MgO-celite (1:1). Le chromatogramme, développé avec l'éther de pétrole-éthanol 15%, révèle dans son tiers supérieur une importante zone brun violet foncé suivie plus bas d'une légère bande brun orangé. La zone principale est découpée sur la colonne et le pigment élué avec l'éthanol à 95% additionné de quelques gouttes d'acide acétique. Le pigment acide est ensuite transféré dans l'éther de pétrole. Son spectre d'absorption établi dans ce solvant (fig. 2B) correspond à celui du caroténoïde céto-énolique récemment décrit par nous sous le nom de chrysofléine²⁾. L'utilisation de la valeur 2590 pour $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ à 450 m μ (β -carotène³⁾) nous permet d'estimer à 6,5 mg% g de bacilles secs la quantité de chrysofléine produite par le Bacille de la fléole dans nos conditions de culture à 37°.

Le 2^e pigment, présent en trop faible quantité, n'a pu être spectroscopiquement identifié.

Conclusions.

La température détermine un changement important dans la composition quantitative du mélange pigmentaire de *Mycobacterium phlei*. Ce changement concerne essentiellement le rapport des caroténoïdes neutres au caroténoïde acide principal, la chrysofléine, ainsi que le montre le tableau ci-dessous résumant nos analyses quantitatives:

Composants		30°	37°
Caroténoïdes neutres	Phytofluène	traces	non décelé
	Léprotène	7,5 mg%	2 mg%
	γ -carotène «Rhodopène»		
Caroténoïdes acides	Chrysofléine	traces	~ 6 mg%

Ces résultats corroborent nos déterminations antérieures⁴⁾ concernant l'accumulation progressive de la chrysofléine lors du vieillissement des cultures de *M. phlei* et nous confirment dans l'opinion que ce pigment acide représente le produit final d'une oxydation enzymatique des caroténoïdes hydrocarbures.

Nous exprimons notre profonde gratitude à M. le Prof. F. T. Haxo pour l'aide et les précieux conseils qu'il nous a prodigués au cours de ce travail.

1) $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 2760$ à 459 m μ selon Zechmeister, l. c.

2) G. Turian, Helv. **33**, 1303 (1950).

3) L. Zechmeister, l. c.

4) G. Turian, Helv. **33**, 1303 (1950).

SUMMARY.

Temperature induces quantitative changes in the pigmentation of *Mycobacterium phlei* grown 6 days on glycerol broth.

The following neutral carotenoids are synthesized in good amounts at 30°C: leprotene, γ -carotene, a "rhodopin-like" lycopene, an oxy-carotenoid and traces of phytofluene; only traces of the acidic chrysoflein are produced.

At 37°C, only small amounts of the same neutral compounds are detectable, but formation of chrysoflein is considerably increased.

Biology Department, The Johns Hopkins University,
Baltimore, U.S.A.

121. Metallkomplexe und tuberkulostatische Aktivität.

Metallionen und biologische Wirkung, 14. Mitteilung¹⁾

von H. Erlenmeyer, J. Bäumler und W. Roth.

(8. V. 53.)

Die tuberkulostatische Wirkung einer grösseren Zahl von Verbindungen, von denen auf Grund ihrer Struktur die Fähigkeit zur komplexen Bindung von Metallionen zu erwarten ist, wird auf Zusatz von Metallionen, insbesondere von Cu^{2+} , erhöht²⁾. Für die in zahlreichen Versuchen beobachtete Wechselwirkung von Oxin mit Cu^{2+} wurde noch ermittelt, dass Oxin, das in normalen in-vivo-Versuchen unwirksam ist, bei gleichzeitiger Verabreichung von Cu^{2+} eine Aktivität zeigt, die der Wirkung von ca. 10 mg/kg Streptomycin entspricht³⁾.

Die weitere Beobachtung, dass es auch bei in-vitro-Prüfungen Verbindungen gibt, die im normalen Versuch keine tuberkulostatische Aktivität zeigen und mit denen erst auf Zusatz von Cu^{2+} und dann starke Wirkungen zu erhalten sind⁴⁾, spricht – da Cu^{2+} allein in den benutzten Konzentrationen unwirksam ist – dafür, dass das ganze System, bestehend aus Verbindung mit Chelatstruktur und Cu^{2+} , für solche Wirkungen notwendig ist.

Diese erst durch Cu^{2+} ausgelöste Aktivität war in vitro und in vivo für 5-Oxychinoxalin (I) ermittelt worden und in vitro auch für 1-Oxyphenazin (II) und Antipyrin-azo-barbitursäure (III). Neue Versuche zeigten, dass auch Antipyrin-azo- α -naphthionsäure (IV) und Salicylaldoxim (V) zu dieser Gruppe gehören (Tabelle 1).

¹⁾ 13. Mitteilung L. Müsli, W. Roth & H. Erlenmeyer, Helv. **36**, 886 (1953).

²⁾ A. Albert, S. D. Rubbo, R. J. Goldacre & G. B. Balfour, Brit. J. exp. Path. **28**, 69 (1947); E. Sorkin, W. Roth & H. Erlenmeyer, Exper. **7**, 64 (1951).

³⁾ Wir möchten auch an dieser Stelle der CIBA Aktiengesellschaft für die biologische Prüfung dieses Systems unseren verbindlichsten Dank sagen.

⁴⁾ E. Sorkin, W. Roth & H. Erlenmeyer, Helv. **35**, 1736 (1952).