

## The Influence of Dyes on the Respiration of Baker's Yeast

In this paper we relate some observations on the influence of three types of dyes on the respiration of baker's yeast as measured by the Warburg technique in phosphate buffer ( $p_H = 5.9$ ) at  $28^{\circ}\text{C}$ . These three types of dyes are (1) the acridines, (2) the thiazines, (3) the dyes belonging to the triphenylmethane compounds.

BERNHEIM<sup>1</sup> has shown that acridines are inhibitors of bacterial respiration. We have observed that crystal violet readily diminishes the respiration of baker's yeast and that methylene blue in concentrations of  $2 \cdot 10^{-3}M$  and  $10^{-3}M$  causes a drop in the respiration of baker's yeast.

The following dyes were studied: trypaflavine as a representative of the acridines, methylene blue as a representative of the thiazines and crystal violet as belonging to the triphenylmethane dyes. The three dyes cause a progressive inhibition of the respiration of baker's yeast in glucose-phosphate medium, the most potent inhibitor being crystal violet.

ALBERT<sup>2</sup> and coll. have shown the importance of the basic dissociation constant in acridine compounds. McILLWAIN proved that the toxicity of acridines towards the growth of *Bacterium coli* is reversed by nucleic acid and adenylic acid. This finding corresponds to the fact that WAGNER-JAUREGG<sup>3</sup> and McILLWAIN<sup>4</sup> found that definite compounds are formed *in vitro* between nucleic acid and acridines.

We have found that the inhibition of baker's yeast respiration caused by trypaflavine, methylene blue and crystal violet is at least partially reversed by yeast nucleic acid, yeast adenylic acid and adenosine triphosphate. We give here some instances of these reversions. The Warburg cups always contained 2 ml of fluid: 1 ml of a 1% yeast suspension in phosphate buffer  $p_H 5.9$ , 0.1 ml of glucose 10% and the necessary amounts of inhibitor and reversing agent in 0.9 ml.

Results expressed in  $\text{mm}^3 \text{CO}_2$  per hour.

No adenylic acid No trypaflavine	No adenylic acid trypaflavine: $10^{-3}M$	$1500 \gamma$ adenylic acid; trypaflavine: $10^{-3}M$
114	10	34
116	16	39
No A.T.P. no crystal violet	No A.T.P. crystal violet $2.5 \cdot 10^{-4}M$	$500 \gamma$ A.T.P. crystal violet $2.5 \cdot 10^{-4}M$
74	26	47
90	29	43
No nucleic acid No methylene blue	No nucleic acid Methylene blue: $2 \cdot 10^{-3}M$	$500 \gamma$ nucleic acid Methylene blue: $2 \cdot 10^{-3}M$
88	44	60
85	47	66

<sup>1</sup> BERNHEIM: cited by A. ALBERT, Brit. J. exper. Pathol. 26, 185 (1945).

<sup>2</sup> A. ALBERT, S. D. RUBBO, R. J. GOLDACRE, M. E. DAVEY and J. D. STONE, Brit. J. exper. Pathol. 26, 160 (1945).

<sup>3</sup> TH. WAGNER-JAUREGG, Z. physiol. Chem. 239, 188 (1936).

<sup>4</sup> H. McILLWAIN, Biochem. J. 35, 1311 (1941).

Adenylic acid and nucleic acid were employed as Na-salt; A.T.P. as Ca-salt. These substances alone have no influence on the respiratory rate.

The interpretation of this type of reversion seems rather easy as definite compounds between acridines on the one side, nucleic acid and nucleotides on the other have been described. BRACHET<sup>1</sup> described the fixation of toluidine blue (a thiazine) by nucleic acid and adenylic acid. It is likely that other nucleotides more especially of the co-enzyme type will react with dyes. So the inhibition of respiration by dyes might be considered as a diversion of co-enzymes. That acridines and methylene blue have a common or similar action is also proved by the experiments on cross adaptation by HINSHELWOOD<sup>2</sup> and coll.

Full details on these experiments and a discussion on quantitative relations and biological significance shall be published elsewhere.

This research was aided by a grant of the Ella Sachs Plotz Foundation, by gifts of adenylic acid by Messrs. Hoffmann-La Roche (Basle) and of A.T.P. by J. Banga.

L. MASSART, G. PEETERS, J. DE LEY  
and R. VERCAUTEREN

Biological Department and Pharmacological Department of the Veterinary College University of Ghent,  
January 15, 1947.

### Résumé

La respiration de la levure de boulangerie en milieu glucose-phosphate est inhibée par la trypaflavine, le bleu de méthylène, le violet de cristal. Cette inhibition disparaît du moins partiellement par addition d'acide nucléique, d'acide adénylique et d'A.T.P.

<sup>1</sup> J. BRACHET and J. JEENER: Enzymologia 11, 222 (1943-1945).

<sup>2</sup> J. M. G. PRYCE, D. S. DAVIS and C. N. HINSHELWOOD, Trans. Faraday Soc. 41, 465 (1945).

### PRO LABORATORIO

#### Ein Verfahren zur kolorimetrischen Bestimmung des Thyroxins

Im Rahmen einer entwicklungsphysiologischen Untersuchung über die Anurenmetamorphose stellte sich das Bedürfnis nach einer einfachen chemischen Bestimmungsmethode des Thyroxins. Das in dieser Untersuchung ausgearbeitete kolorimetrische Analysenverfahren beruht auf der von W. KOMANT<sup>1</sup> entdeckten Diazoreaktion des Thyroxins: Thyroxin reagiert in sodaalkalischer Lösung bei tiefen Temperaturen mit Diazo-benzolsulfosäure unter Bildung eines roten Farbstoffes. Da die sodaalkalische Zersetzung der überschüssigen Diazobenzolsulfosäure die Stabilität des Thyroxinfarbstoffes stark beeinträchtigt und daher eine direkte kolorimetrische Bestimmung des Thyroxins verunmöglicht, wurde versucht, diese Zersetzung in hinreichendem Maße zu hemmen. Dies gelingt, wenn man der Farbstofflösung zwischen 1 und 6 min nach Beginn der Kupplungsreaktion Natronlauge zufügt. Werden 6,5 Volumteile Farbstofflösung mit 1 Teil 2n- oder 3n-NaOH versetzt, so beträgt die Extinktionsabnahme zwischen 5 und 15 min nach Kupplungsbeginn nur noch

<sup>1</sup> W. KOMANT, Arch. exper. Path. 153, 116 (1930).

0,2–0,3% min<sup>-1</sup>. Die Absorptionskurve des Thyroxinfarbstoffes im sichtbaren Spektralbereich (Fig. 1) weist ein deutliches Absorptionsmaximum bei  $\lambda = 5100 \text{ \AA}$  auf. Von den Filtern des Pulfrichschen Stufenphotometers liegen die Filter S 50 und S 53 mit den Filterschwerpunkten 4960 und 5330  $\text{\AA}$  dem Absorptions-

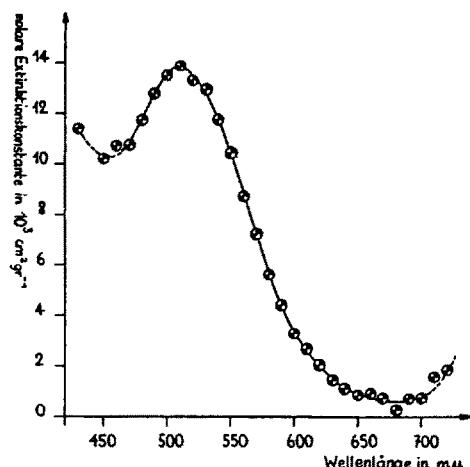


Fig. 1.

maximum am nächsten. In den vorliegenden Untersuchungen wurde das lichtstarke Grünfilter L 2 verwendet. Aus Fig. 2 geht hervor, daß das BEERSche Gesetz der Lichtabsorption im Konzentrationsintervall zwischen 0 und 10 mg-% für das vom Filter L 2 des Pulfrichschen Stufenphotometers durchgelassene Licht streng erfüllt ist. Der mit NaOH stabilisierte Farbstoff eignet sich daher zur kolorimetrischen Bestimmung des Thyroxins. Die in Fig. 1 zur Darstellung gelangende

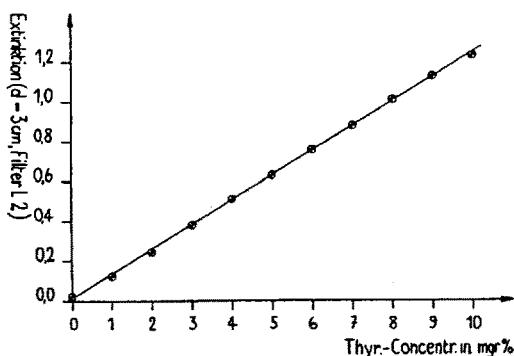


Fig. 2.

Eichkurve des Thyroxinfarbstoffes wurde mit Hilfe der Methode der linearen Regression aus den empirischen Extinktionswerten bestimmt.

Für die gewählten Versuchsbedingungen (Reagenzien, Mischungsverhältnis von Thyroxin-, Soda- und Diazo-benzolsulfosäurelösung wie 1,0:0,8:0,8, NaOH-Zusatz zur Farbstofflösung wie 1:6,5, Extinktionsmessung mit dem Pulfrichschen Stufenphotometer) sind bei der kolorimetrischen Bestimmung des Thyroxins folgende Punkte zu beachten:

1. Die Kupplungsreaktion muß bei möglichst tiefen Temperaturen durchgeführt werden, da bei höheren

Temperaturen die sodaalkalische Zersetzung des überschüssigen Azoreagens die Kupplungsreaktion schon während den ersten Minuten wesentlich stört.

2. Da der Thyroxinfarbstoff unbeständig ist, wird der Farbstofflösung nach Ablauf der Kupplungszeit Natronlauge im Volumenverhältnis 1:6,5 zugefügt, deren Konzentration 2,3,4 oder 5n betragen muß, um maximale Farbintensität zu gewinnen.

3. Um maximale Farbintensität und minimale Streuungen der Extinktionswerte zu erhalten, muß bei 0°C Kupplungstemperatur die Kupplungszeit zwischen 4 und 5 min gewählt werden.

4. Da die Extinktion der mit Natronlauge versetzten Farbstofflösung sich mit zunehmender Versuchszeit, wenn auch nur langsam, manchmal aber ziemlich unregelmäßig verändert, ist es vorteilhaft, die Farbstofflösung wenige Minuten nach der NaOH-Zugabe zu kolorimetrieren.

5. Für das gleichmäßige Ausfallen der Farbreaktion ist neben der Temperaturkonstanz ein gutes Durchmischen der Farbstofflösung nach der Zugabe von Azoreagens und nach der Zugabe der Natronlauge unbedingt erforderlich, sowie ein auf 1–2 sec genaues Einhalten der Kupplungszeit.

Unter Berücksichtigung der in den Punkten 1–5 festgelegten Bedingungen kann folgende Arbeitsvorschrift zur kolorimetrischen Bestimmung des Thyroxins aufgestellt werden: 5 cm<sup>3</sup> der zu bestimmenden Thyroxinlösung werden 4 cm<sup>3</sup> 10%ige Sodalösung zugefügt und das Gemisch auf 0°C abgekühlt. Die abgekühlte sodaalkalische Thyroxinlösung wird mit 4 cm<sup>3</sup> frisch zubereiteter, ebenfalls auf 0°C abgekühlter Diazobenzolsulfosäurelösung (Herstellung nach den Angaben von WEISS und SSBOLEW<sup>1</sup>) bei 0°C unter guter, 15 sec dauernder Durchmischung versetzt. Die Durchmischung wird 1, 2, 3 min nach Beginn der Kupplungsreaktion wiederholt. Die Lösung nimmt dabei einen roten Farbton an. 4 min nach Kupplungsbeginn werden der Farbstofflösung unter kräftigem Schütteln 2 cm<sup>3</sup> 3n-NaOH zugefügt und das Bestimmungsgemisch (15 cm<sup>3</sup>) der Zimmertemperatur ausgesetzt. Die Messung der Extinktion erfolgt zwischen 5 und 7 min nach Kupplungsbeginn, respektive 1–3 min nach der NaOH-Zugabe mit dem Pulfrichschen Stufenphotometer, Filter L 2. Wird die Schichtdicke  $d = 3 \text{ cm}$  gewählt, so läßt sich aus der Gleichung der Eichkurve die Thyroxinkonzentration durch Einsetzen der experimentell bestimmten Extinktion  $E$  zu

$$K = \frac{E - 0,007}{0,124} \text{ mg}/\%$$

berechnen. Unter Verwendung der Schichtdicke  $d = 5 \text{ cm}$  lassen sich mit dieser Methode in 1 cm<sup>3</sup> Bestimmungslösung gerade noch 10 γ Thyroxin quantitativ nachweisen.

Den Firmen F. Hoffmann-La Roche & Co. AG. und J. R. Geigy AG., Basel, sei für die Überlassung der Mittel bestens gedankt.

HERMANN MOSER

Zoologische Anstalt der Universität Basel, den 29. Januar 1947.

#### Summary

A colorimetric method for the determination of thyroxin has been worked out. Directions for practical use are given.

<sup>1</sup> M. WEISS und N. SSBOLEW, Bioch. Z. 58, 119 (1914).