

Mengen erhaltenen Nebenalkaloid aus *Erythrophleum Coumunga* BAILLON identisch und gibt bei der Mischprobe mit diesem keine Schmelzpunktserniedrigung.

B. G. ENGEL und R. TONDEUR

Organisch-chemisches Laboratorium der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich, den 17. Juni 1948.

Summary

In addition to cassaine, two new alkaloids have been isolated from the bark of *Erythrophleum guineense* DON, in crystalline form. Their empirical formulæ have been established by analysis of the free bases and of some of their crystalline salts.

Über ein Chromoplastin aus reifenden Tomaten

Nach GUILLERMOND¹ entstehen die Chloroplasten durch Differenzierung von Chondriosomen, die also ein Entwicklungsstadium der Chloroplasten darstellen. In den Chloroplasten bildet sich dann das Chloroplastin² (Chloroplastensubstanz³) und dessen spezifische grüne Pigmente, Chlorophyll a und b.

Streptomycin hemmt die Chlorophyllentwicklung bei der Keimung der Samen grüner Pflanzen, z. B. von Gerste⁴. Bei der Bearbeitung der Frage, an welchem Punkt der Entwicklung dieser hemmende Einfluß des Streptomycins auf die Chlorophyllentwicklung einsetzt⁵, wurde auch die Entwicklung der Carotinoide und damit die Bildung der entsprechenden Platten berührt.

In Früchten, welche Carotinoide ausbilden, treten dieselben während der Reifung dann auf, wenn das Chlorophyll verschwindet. Setzt man die Carotinoidsynthesen mit dem Phytol des Chlorophylls in Zusammenhang, so könnte man in Betracht ziehen, daß während des Reifens der carotinoidhaltigen Früchte das Phytol zur Carotinoidbildung verbraucht wird und daß ein Chloroplast unter Ersatz des Chlorophylls durch Carotinoid in ein Chromoplastin übergeht. Wir halten eine solche Annahme aber nicht für wahrscheinlich⁶.

Zur Frage der Chromoplastinbildung liefern die folgenden Versuche, die hier wegen Platzmangels nicht näher beschrieben werden können, einen Beitrag.

Das Fruchtfleisch nicht ganz reifer Tomaten wurde unter Eiskühlung verrieben und durch ein Filtertuch gepreßt. Der so erhaltene viskose Saft wurde auf p_H 7 gebracht und dann unter Eiszusatz zentrifugiert. Es bildete sich 1. eine überstehende Flüssigkeit (Fl), 2. ein Sediment (Se I).

Die Fl ist gelblich und zeigt im Dunkelfeld viele kleine Partikeln. Durch $\frac{1}{3}$ -Sättigung von Fl mit Ammoniumsulfat entsteht ein gelatinöser Niederschlag (Nie I). Die Fällung durch Ammoniumsulfat wurde dreimal wiederholt; nach der dritten Fällung wurde der in Wasser suspendierte Nie I 4 Tage lang gegen Eiswasser dialysiert. Nach der Dialyse wurde der Nie II möglichst vollständig in Wasser suspendiert und durch Zusatz einiger Tropfen 0,01 n. Salzsäure gefällt.

Ein Teil A des Nie II wurde bei 105° und weiter mit $CaCl_2$ getrocknet. Ein abgewogener Teil, Nie IIa, wurde mit 80%igem Alkohol extrahiert und weiter mit kochendem Alkohol und mit

Äther behandelt. Im ganzen betrug der Lipoidanteil von Nie II 18,5%. Stickstoffbestimmung des lipoidfreien Rückstandes ergab $N = 6,8\%$.

Teil B des Nie IIb wurde mit Chloroform extrahiert; die orangefarbene Lösung enthielt neben kleinen Mengen Xanthophyll noch Lycopin und Carotin in angenähert gleichen Mengen¹. Durch chromatographische Messungen der Chloroform- und Acetonlösungen nach A. H. GORDON wurde diese Zusammensetzung bestätigt.

Teil C des Nie IIc wurde in schwach alkalischem Wasser möglichst fein verteilt und dann mit Chloroformoctylalkohol geschüttelt. Nach der Zentrifugierung konnten geschieden werden:

- a) eine pigmenthaltige Chloroformschicht,
- b) eine zwischen den Schichten liegende fibröse Masse,
- c) eine klare wäßrige Schicht.

Schicht c) wurde wie Fl behandelt. Das ganze Verfahren wurde 6mal wiederholt. In der schließlich überstehenden Lösung war die Pentosenreaktion nach BIAL sehr stark positiv. Das deutlich hervortretende Absorptionsband der Flüssigkeit lag bei 264–265 $m\mu$.

Durch Zentrifugieren von Se I erhält man 3 Schichten:

- a) untere Schicht, grau } erhalten Zelltrümmer,
- b) mittlere Schicht, weiß } Fibern usw.
- c) obere Schicht, rotorangelb, enthält prozentisch

viel Chromoplasten².

Carotinoide, in Kombination mit Proteinen (Carotinproteide; Polyenproteide), wie sie hier aus pflanzlichem Material erhalten wurden, sind bei vielen Crustaceen gefunden. Eine Farbänderung durch Abspaltung des Proteinteils ist bei den pflanzlichen Polyenproteiden nicht mit Sicherheit beobachtet worden. In Chromoproteiden vom Typus des Hummerfarbstoffes ist die Bindung zwischen Protein und Carotinoid anscheinend viel fester als in den Polyenproteiden der Früchte. Das Astacinprotein der roten Torula bleibt zu untersuchen.

Viele in unreifem Zustand grüne Früchte, welche bei der Reifung eine rote, blaue oder gelbe Farbe annehmen, enthalten in Fruchtfleisch und Schalen nur kleine Mengen von Carotinoiden. Ihre Farbe wird überwiegend durch Anthocyane bedingt, deren Bildung aus einem farblosen Vorstadium sich deutlich zeigt, wenn die Früchte in unreifem Zustand langsam getrocknet werden.

Versuch mit etiolierten Kohlblättern. Die inneren weißen Blätter eines schon grünen Kohlkopfes (*Brassica capitata*) wurden in einer mit Glasplatte bedeckten Schale auf Filterpapier, das einerseits mit Leitungswasser, andererseits mit einer M/500-Streptomycinlösung getränkt war, dem Tageslicht ausgesetzt. Nach 3 Tagen färbten sich die zu vergleichenden Blätter gleichheitlich rotviolett.

In den Wasserkontrollen entstand ganz wenig Chlorophyll. Entfernte man den Glasdeckel, so färbten sich die Blätter des Kontrollversuches im Tageslicht innerhalb 2 Tagen grün (Chlorophyll durch Extraktion spektroskopisch nachgewiesen), während die mit Streptomycin behandelten Blätter nur die rote Anthocyanfarbe zeigten.

In einem analogen Versuch waren die Blätter unbedeckt. In 4 verschiedenen Streptomycinkonzentrationen (M/70 bis M/800) bildete sich nach 3 Tagen kein Chlorophyll. In den 4 Streptomycinlösungen wie auch in der streptomycinfreien Kontrolllösung blieb die Bildung des rotvioletten Farbstoffes aus.

Einwirkung von Streptomycin auf den Pigmentwechsel bei reifenden Tomaten. Unreife grüne Tomaten wurden in Stücke verschiedener Dicke geschnitten; zehn Stücke wurden auf Filterpapier gelegt, welches mit einer Streptomycinlösung (3 mg/ml) getränkt war. Parallelversuche mit Wasser.

¹ Vgl. R. KUHN und CH. GRUNDMANN, Chem. Ber. 65, 1880 (1932). – Siehe auch N. A. MONTEVERDE und V. LUBIMENKO, Bull. Acad. Sci. Petersbourg, VI, ser. 6, 609 (1912). – A. SEYBOLD, Ber. Dtsch. bot. Ges. (1943).

² Bezüglich Chromoplastinbildung in Blättern siehe: A. FREY-WYSSLING Naturwiss. 26, 624 (1938).

¹ E. GUILLERMOND, Traité de Cytologie végétale (Paris 1933).

² A. STOLL, Atti X.º Congr. intern. di Chimica (Roma 1938) 206.

³ F. MENKE, Z. physiol. Chem. 257, 43 (1938). – E. L. SMITH, (J. Gen. Physiol. 24, 565 (1941).

⁴ H. v. EULER, Kem. Arbeten Ny följd II, 9 (Mai 1947). – M. BRACCO und H. v. EULER, ebenda 10 (Oktober 1947); 10 (November 1947); 10 (März 1948).

⁵ H. v. EULER, M. BRACCO und E. HELLER, C. R. Acad. Sci. Paris 227, 16 (1948).

⁶ Vgl. A. F. SCHIMPER, Jb. wiss. Bot. 16 (1885).

3 Tage nach Beginn des Versuches waren die Tomatenschalen des Parallelversuches gelb. Dagegen war nach 3 Tagen in den streptomycinbehandelten Tomatenschnitten ein Übergang von Grün in Gelbrot noch kaum zu bemerken.

Bei mikroskopischer Vitalbeobachtung der Schnitte in 10%iger Zuckerlösung zeigte sich:

In den Wasserkontrollen: keine Cytolyse; fast alle Platten sind in gelborangefarbige Chromoplasten verwandelt worden.

Ohne Behandlung: keine Cytolyse; fast alle Platten gut erhalten, alle tragen deutlich den Charakter von Chloroplasten.

M. BRACCO und H. v. EULER

Institut für organisch-chemische Forschung der Universität Stockholm, den 10. Juli 1948.

Summary

(1) By precipitation with ammonium sulfate, streptomycin, or calcium salts, we obtained from the pulp of tomatoes a substance containing carotinoids. The behaviour of this substance was analogous to that of chloroplast-substance and to that of animal cytoplasmatic nucleoproteins. Like these it contains proteins, lipids, and very probably nucleic acids. We regard this substance as a *chromoplastine*.

(2) Experiments with slices of green tomatoes show that the changing over of the chlorophyll content into the carotinoid content is inhibited by the presence of streptomycin.

(3) Streptomycin inhibits the formation of chlorophyll in etiolated separated cabbage leaves, just as this drug inhibits the formation of chlorophyll in growing seeds.

(4) The development of anthocyanides is not influenced by streptomycin.

Purification of Arginase

A survey of the literature on arginase shows considerable divergence between the conclusions of different workers on almost all aspects of the subject. These variations are due mainly to the fact that none (with the exception of three or four of the 40 or 50 different procedures for the preparation and purification of arginase thus far published) gives a product even approximately pure. Most of the preparations used have contained from four to a very much greater number of enzymes, many of which undoubtedly interfered and rendered the conclusions uncertain¹. This is particularly unfortunate in view of the importance of the arginase-arginine relationship in the growth of tissues under normal and pathological conditions on which accurate quantitative data are badly needed. It is in connection with such studies, on which a report is now in preparation by A. VANNOTTI², NEUKOMM³, and the writer, that it was decided to publish in detail a purification procedure which has been developed by the writer over the last two years, fully recognizing of course that many improvements, and perhaps quite different procedures, are possible.

¹ S. EDLBACHER and S. SIMONS, *Z. physiol. Chem.* **167**, 76 (1927). – M. M. RICHARDS and L. HELLERMAN, *J. Biol. Chem.* **134**, 237 (1940). – M. MOHAMED and D. M. GREENBERG, *Arch. Biochem.* **8**, 349 (1945). – S. BACH, *J. Nature* **158**, 376 (1946). – C. B. THOMPSON, *Science* **104**, 576 (1946).

² Director of the Medical Policlinic, Lausanne.

³ Laboratoire du Centre anticancéreux romand, Lausanne.

The methods here described have given, at its best, a product which in the Tiselius apparatus shows two components of which active arginase constitutes about 80% and the other component is an inactive protein. There are also present traces of catalase and of riboflavin. The best yield obtained before drying is 65% of the arginase in the first crude extraction, and the activity of the final dried product when thoroughly reactivated is about 65,000 arginase units (AU) per gram¹. Attempts at crystallization have been abandoned, as a preliminary estimation of the amino acid content of the purified product indicates a composition similar to that of the non-crystallizable gelatin or elastin.

Procedure

A. Extract 1.0 kg fresh young Horse liver in 2.0 l/5% sodium acetate to which 30.8 g $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ has been added, and p_{H} adjusted to 7.0 with 1N NaOH, for 5 days at 5°–10° temperature. Filter and centrifuge; reject residue.

B. Add 1.0 l 0.12 M lead acetate, adjust p_{H} to 6.7, stand over night in refrigerator. Centrifuge, reject residue.

C. Add pure dry ammonium sulphate to 35% saturation; adjust p_{H} to 6.8; stand over night in refrigerator. Centrifuge; reject residue.

D. Add ammonium sulphate to bring to 75% saturation. Adjust p_{H} to 7.0. Stand over night. Centrifuge; reject supernatant. Dissolve precipitate in 150–200 cc 0.1 M phosphate buffer p_{H} 7.0. Stand over night. Centrifuge; reject precipitate.

E. Dialyse in distilled water adjusted to p_{H} 6.5–6.8 for three days in refrigerator. Centrifuge; reject precipitate. (Solution now contains about 3 g ammonium sulphate per l.)

F. Add ammonium sulphate until definite precipitate is obtained—usually about 22% saturation. Adjust p_{H} to 6.8. Centrifuge; reject precipitate.

G. Add ammonium sulphate to about 68% saturation, adjust p_{H} to 6.8. Stand over night. Centrifuge; reject supernatant. Dissolve precipitate in 275–300 cc phosphate buffer p_{H} 7. Stand over night. Centrifuge; reject residue.

H. Dialyse in distilled water adjusted to p_{H} 6.8 for three days in refrigerator. Centrifuge; reject precipitate. Adjust p_{H} to 6.8.

J. Add cobaltous chloride to give 4 mg Co^{++} per cc. Stand three hours at room temperature. In constant temperature bath at 63°, heat with constant stirring to 60°, maintain at that temperature for 5 minutes, cool rapidly. Centrifuge; reject precipitate. Adjust solution to p_{H} 6.8.

K. To remove the catalase, which is now the chief remaining impurity, add 0.2 M MnSO_4 (p_{H} 5.4) and 2% K_2HPO_4 adjusted with NaOH to p_{H} 9, in the following proportions:

Arginase solution	3 parts
MnSO_4	1 part
K_2HPO_4	3 parts

It is essential that (1) the p_{H} 's be rigorously as indicated; (2) that the MnSO_4 be added first with rapid stirring for not more than 15–20 seconds; (3) that the K_2HPO_4 be added at once and rapidly and the solution vigorously stirred for 5 minutes. Keep at 5°–10° until the suspension begins definitely to precipitate out; then centrifuge and reject precipitate. The solution should now be colourless, but will sometimes show a pink tinge from excess of cobalt, which should be removed by adjusting the p_{H} to 7.2 with 1.0 M NaOH added dropwise with constant stirring, followed by a final centrifugation.

If the clarified solution is slightly yellowish, it still contains traces of catalase and riboflavin, practically negligible. Should the colour be definitely yellow or tinged on brown, the excess impurities must be removed by repeating operations G, H and K.

Finally the solution may be reduced to a dry powder by lyophilizing after thorough dialysing out all salts. Unfortunately this thorough dialysis also removes an essential as yet unidentified coenzyme, and activity is restored only about 20% by the addition of manganese or cobalt.

The coenzyme may be obtained as follows: 500 cc of the product from operation B above is dialysed for 10 days in 1 l of distilled water without change of water. The dialysis water is then reduced by slow evaporation to 150–200 cc. One cc of this solution is sufficient to reactivate a solution of 1 g of the dried product a further 50%. The powder if kept thoroughly dry keeps its activity for at least a

¹ Laboratoire du Centre anticancéreux romand, Lausanne.