

Tabelle

Tag	Wirksubstanz	Kontrolle	50 mγ pro 25 cm³ NL	500 mγ pro 25 cm³ NL	1000 mγ pro 25 cm³ NL
4	Pantothenäsäure . . . . .	100%	108%	109%	117%
	Pantethin . . . . .	100%	130%	124%	111%
6	Pantothenäsäure . . . . .	—	—	—	—
	Pantethin . . . . .	100%	99%	94%	96%
8	Pantothenäsäure . . . . .	100%	123%	135%	129%
	Pantethin . . . . .	100%	107%	94%	95%
10	Pantothenäsäure . . . . .	—	—	—	—
	Pantethin . . . . .	100%	109%	104%	99%
12	Pantothenäsäure . . . . .	100%	112%	117%	101%
	Pantethin . . . . .	100%	101%	97%	100%
14	Pantothenäsäure . . . . .	100%	112%	113%	113%
	Pantethin . . . . .	—	—	—	—

Pantethin zur Verfügung, die auf synthetischem Wege<sup>1</sup> erhalten worden sind<sup>2</sup>.

Alle Kulturen des *Mucor hiemalis* sind auf einem Nährmilieu mit Na-Aacetat als einziger Kohlenstoffquelle gezüchtet worden<sup>3</sup>. Die Tabelle zeigt die wichtigsten der bis heute erhaltenen Ergebnisse.

prägt. Entgegen den bei Pantothenäsäure und Pantethin gemachten Beobachtungen, erstreckt sich die fördernde Wirkung des phosphorylierten Pantethins über die ganze Kulturdauer (4 bis 14 Tage).

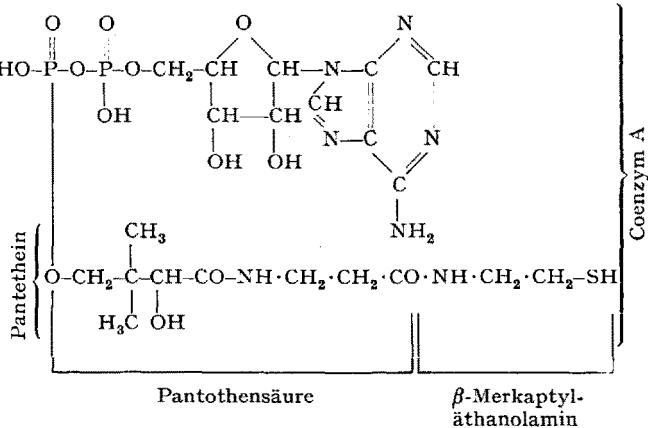
Diese Arbeit ist mit Unterstützung der «Fritz-Hoffmann-La Roche-Stiftung zur Förderung wissenschaftlicher Arbeitsgemeinschaften in der Schweiz» ausgeführt worden, der wir unseren besten Dank aussprechen.

E. C. GROB, Frl. V. GRUNDBACHER und W. H. SCHOPFER

Botanisches Institut der Universität Bern, den 17. Juli 1954.

#### Summary

Pantothenic acid, pantethine, and probably also phosphorylated pantethine stimulate the production of carotenoids by the fungus *Mucor hiemalis*.



Wir stellen fest, dass:

1. die Pantothenäsäure am 8. Tag der Kulturdauer die Carotinbildung maximal (35 %) fördert mit 500 mγ Pantothenäsäure pro 25 cm³ Nährösung. Die entsprechenden Tabellenwerte sind gegenüber dem Kontrollwert 100 % (ohne Pantothenäsäure) statistisch gesichert. Bei jüngeren Kulturen haben wir keine signifikante Stimulation der Carotinbildung feststellen können. Bei Kulturen, die älter sind als 8 Tage, beobachten wir eine Abnahme der Pantothenäsäurewirkung.

2. beim Pantethin schon am 4. Tage der Kulturdauer 50 mγ Pantethin pro 25 cm³ Nährösung, die maximale Wirkung von 30 % erreicht wird. Auch dieser Wert konnte statistisch gesichert werden. Mit zunehmendem Alter der Kulturen nimmt die fördernde Wirkung des Pantethins auch ab.

Den bisherigen Ergebnissen nach zu schliessen, findet sich die carotinbildende Wirkung auch beim phosphorylierten Pantethin, wenn auch weniger stark ausge-

#### Sur la caractérisation de dérivés guanidiques d'origine biologique par électrophorèse et chromatographie sur papier (chromatoélectrophorèse)

La chromatographie sur papier des dérivés guanidiques<sup>1</sup> permet d'analyser des mélanges de ceux-ci, grâce à l'emploi de divers solvants en une ou en deux dimensions. Nous nous sommes proposé d'associer dans le même but la chromatographie monodimensionnelle à l'électrophorèse, réalisées perpendiculairement l'une à l'autre sur une même feuille de papier. Les propriétés des corps étudiés sur lesquelles reposent ces deux opérations étant différentes, on pouvait espérer tirer de leur application successive des informations particulièrement précises, et cela dans un temps beaucoup plus bref que celui exigé par la chromatographie bidimensionnelle. Un travail poursuivi indépendamment du nôtre au moyen d'une technique du même ordre a, d'ailleurs, déjà montré l'efficacité de la chromatographie dans le cas de mélanges d'amines<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> M. VISCONTINI, K. ADANK, N. MERKLING, K. EHRHARD und P. KARRER, Helv. chim. Acta 36, 836 (1953); 37, 375 (1954).

<sup>2</sup> Diese Präparate sind uns in freundlicher Weise von Herrn Prof. VISCONTINI, Zürich, überlassen worden.

<sup>3</sup> W. H. SCHOPFER und E. C. GROB, Exper. 8, 140 (1952).

<sup>1</sup> J. ROCHE, NGUYEN-VAN THOAI, W. FELIX et Y. ROBIN, C. r. Acad. Sci. 223, 1688 (1951). — J. ROCHE, NGUYEN-VAN THOAI et J. L. HATT, Biochim. biophys. Acta 14, 71 (1954).

<sup>2</sup> J. BLASS, M. MACHEBOEUF et P. REBEYROTTE, Bull. Soc. Chim. biol. 35, 953 (1953).

## Tableau

Migration électrophorétique ( $\text{pH} = 8,6$ , 300 V, 0,4 mA/cm, 2 h,  $t^\circ = +10^\circ$ ),  $R_f$  (papier Arches 302); solvants: 1° *n*-butanol, acide acétique, eau (73:10:17), 2° pyridine, isopentanol, acide acétique, eau (80:40:10:40) de divers dérivés guanidiques et de la citrulline et réactions colorées données par leurs taches<sup>1</sup>.

Corps étudié	Migration électrophorétique (cm)	$R_f$		Réactions colorées		
		<i>n</i> -butanol	pyridine	de SAKAGUCHI	à l' $\alpha$ -naphtol diacétyle	à la ninhydrine
1° Citrulline . . . . .	3,20	0,12	0,24	—	—	—
2° Glycocyamine . . . . .	3,85	0,25	0,31	+	+	—
3° Créatine . . . . .	4,00	0,23	0,31	—	+++	—
4° Acide $\gamma$ -guanidobutyrique . .	4,00	0,49	0,55	+	+	—
5° Arginine . . . . .	8,05	0,13	0,22	+	+	+
6° Arcaine . . . . .	10,70	0,22	0,42	+	+	—
7° Diméthylguanidine . . . . .	12,85	0,40	0,60	—	+++	—
8° Agmatine . . . . .	13,00	0,13	0,34	+	+	+
9° Méthylguanidine . . . . .	13,9	0,40	0,57	+	+	—
10° Guanidine . . . . .	14,9	0,33	0,47	—	+++	—
11° Octopine . . . . .	—	0,05	0,21	+	+	—

<sup>1</sup> Les réactions colorées indiquées sont opérées selon les modalités décrites dans <sup>3</sup> pour celles de SAKAGUCHI et à l' $\alpha$ -naphtol-diacétyle et par pulvérisation d'une solution de ninhydrine à 0,1% dans l'acétone.

<sup>2</sup> J. ROCHE, NGUYEN-VAN THOAI, W. FELIX et Y. ROBIN, C. r. Acad. Sci. 223, 1688 (1951). — J. ROCHE, NGUYEN-VAN THOAI et J. L. HATT, Biochim. biophys. Acta 14, 71 (1954).

**Techniques.** On réalise dans un premier temps une chromatographie en une dimension à  $+15^\circ\text{C}$ , sur papier Arches 302 (migration du solvant sur 20 cm). Après séchage à l'air chaud pour éliminer le solvant, on imprègne la feuille d'une solution tampon au véronal de  $\text{pH} = 8,6$  et de force ionique 0,1, puis on la soumet à l'électrophorèse<sup>1</sup>. Celle-ci est opérée sous 300 V et 0,4 mA/cm, perpendiculairement à la direction de la chromatographie préalable (passage du courant pendant 2 h à  $+10^\circ\text{C}$  sur la bande de papier, d'une longueur utile de 20 cm, déposée horizontalement dans la cuve de l'appareil). Les taches sont révélées au moyen de diverses réactions colorées, après séchage du papier à l'air chaud (réaction à la ninhydrine pour les acides  $\alpha$ -aminés et l'agmatine, réaction de SAKAGUCHI pour les guanidines monosubstituées, réaction au diacétyle- $\alpha$ -naphtol pour la guanidine et l'ensemble de ses dérivés, réaction au  $\beta$ -diméthylaminobenzaldéhyde pour la citrulline<sup>2</sup>).

**Applications et résultats.** L'examen du Tableau I rend compte des résultats obtenus dans l'application de la chromatographie et de l'électrophorèse monodimensionnelles sur papier à l'étude de divers dérivés guanidiques. Les opérations ont été réalisées dans les conditions indiquées plus haut, à ceci près que la détermination des  $R_f$  a été faite après migration des solvants de 45-50 cm.

L'électrophorèse sur papier permet de séparer en 2 h sur 20 cm tous les composés étudiés, sauf la glycocyamine, la créatine et l'acide- $\gamma$ -guanidobutyrique, dont les  $\text{pH}_1$  sont très voisins. La citrulline peut être distinguée de ces derniers, dont la migration est peu différente, grâce à sa réaction spécifique au  $\beta$ -diméthylaminobenzaldéhyde (solution à 1% dans l'acétone additionnée de 10% HCl). Les  $R_f$  indiqués sont analogues à ceux ob-

tenus antérieurement sur d'autres papiers<sup>1</sup>. Le mélange de pyridine, d'isopentanol, d'acide acétique et d'eau (80:40:10:40), constitue dans la plupart des cas le solvant le plus efficace; il convient toutefois de lui préférer le mélange de *n*-butanol, d'acide formique et d'eau (63:20:17) pour séparer la glycocyamine de la créatine.

L'association de la chromatographie à l'électrophorèse conduit à une résolution satisfaisante de mélanges de dérivés guanidiques en 8 h. On la réalise sur une feuille de papier carrée (30 × 30 cm). Une tache de la solution est chromatographiée par une migration du solvant sur une longueur de 20 cm, ce qui demande environ 6 h à  $+15^\circ\text{C}$ . Le papier est ensuite séché sous un courant d'air chaud, puis imprégné d'une solution tampon au véronal ( $\text{pH} = 8,6$ ; force ionique = 0,1), dont l'excès est, s'il y a lieu, éliminé par séchage entre deux feuilles de papier filtre. On soumet alors le chromatogramme ainsi humecté (non révélé) à l'action d'un champ électrique, perpendiculairement au sens dans lequel a été opérée la migration initiale du solvant. Après 2 h, on retire le papier de la cuve à électrophorèse, maintenue à  $+10^\circ\text{C}$  pendant toute la durée de l'opération; on le séche à l'air chaud et l'on révèle les taches aux diverses réactions colorées indiquées plus haut<sup>2</sup>. On opère successivement dans ce but les réactions à la ninhydrine, de SAKAGUCHI et au diacétyle- $\alpha$ -naphtol-*et*, accessoirement, celle au  $\beta$ -diméthylaminobenzaldéhyde — par pulvérisation de réactifs ou, mieux, par la technique de JEPSON et SMITH<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> J. ROCHE, NGUYEN-VAN THOAI, W. FELIX et Y. ROBIN, C. r. Acad. Sci. 223, 1688 (1951). — J. ROCHE, NGUYEN-VAN THOAI et J. L. HATT, Biochim. biophys. Acta 14, 71 (1954).

<sup>2</sup> J. ROCHE, NGUYEN-VAN THOAI, W. FELIX et Y. ROBIN, C. r. Acad. Sci. 223, 1688 (1951). — J. ROCHE, NGUYEN-VAN THOAI et J. L. HATT, Biochim. biophys. Acta (1954) (sous presse). — R. ACHER et C. CROCKER, Biochim. biophys. Acta 9, 704 (1952). — C. F. DENT, Biochem. J. 43, 169 (1948). — J. B. JEPSON et I. SMITH, Nature 171, 4B (1953); 172, 1100 (1953). — G. TOENNIES et J. J. KOLB, Anal. Chem. 23, 823 (1951).

<sup>3</sup> R. ACHER et C. CROCKER, Biochim. biophys. Acta 9, 704 (1952). — C. F. DENT, Biochem. J. 43, 169 (1948). — J. B. JEPSON et I. SMITH, Nature 171, 4B (1953); 172, 1100 (1953). — G. TOENNIES et J. J. KOLB, Anal. Chem. 23, 823 (1951).

<sup>1</sup> Appareil du type décrit par W. GRASSMAN, K. HANNIG et D. KNEDEL, Dtsch. med. Wschr. 76, 333 (1951).

<sup>2</sup> J. ROCHE, NGUYEN-VAN THOAI, W. FELIX et Y. ROBIN, C. r. Acad. Sci. 223, 1688 (1951). — J. ROCHE, NGUYEN-VAN THOAI et J. L. HATT, Biochim. biophys. Acta (1954) (sous presse). — R. ACHER et C. CROCKER, Biochim. biophys. Acta 9, 704 (1952). — C. F. DENT, Biochem. J. 43, 169 (1948). — J. B. JEPSON et I. SMITH, Nature 171, 4B (1953); 172, 1100 (1953). — G. TOENNIES et J. J. KOLB, Anal. Chem. 23, 823 (1951).

Les Figures 1 et 2 reproduisent des décalques de taches obtenues au cours de deux chromatoélectrophorèses des dérivés étudiés, réalisées chacune avec un solvant chromatographique différent dans leur premier temps. Nous avons joint à l'un d'eux (Figure 1, A), aux fins de comparaison, un document rendant compte de la migration électrophorétique des mêmes corps non soumis à une chromatographie préalable.

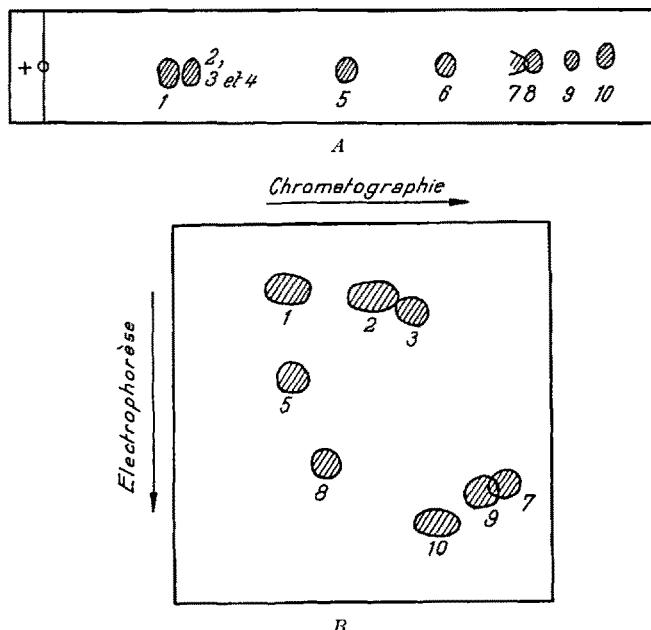


Fig. 1. A. – Migration électrophorétique sur papier de divers dérivés guanidiques et de la citrulline (tampon au véronal de pH = 8,6 et de force ionique 0,1; 300 V, 0,4 mA/cm, 2 h, + 10°C). – B. – Chromatoélectrophorèse sur papier des mêmes corps par chromatographie en une dimension (solvant: pyridine, 80; isopentanol, 40; acide acétique, 10; eau, 40), suivie d'une électrophorèse (mêmes conditions que A) dans l'autre dimension. 1 citrulline, 2 glycocyamine, 3 créatine, 4 acide  $\gamma$ -guanidobutyrique, 5 arginine, 6 arcaïne, 7 diméthylguanidine, 8 agmatine, 9 méthylguanidine, 10 guanidine (dépôt de la goutte du mélange dans l'angle supérieur gauche).

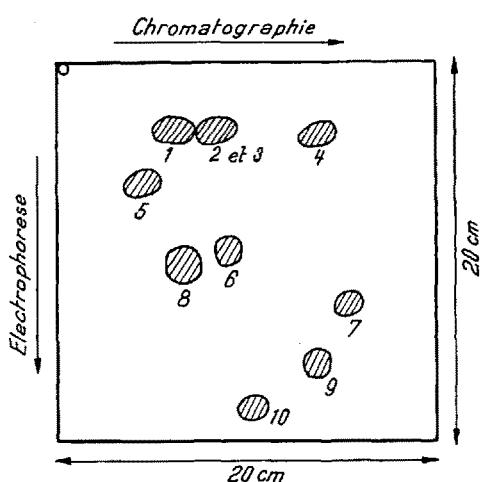


Fig. 2. Chromatoélectrophorèse sur papier de divers dérivés guanidiques et de la citrulline, réalisée par chromatographie monodimensionnelle (solvant: *n*-butanol, 63; acide formique, 20; eau, 17) suivie d'électrophorèse (tampon au véronal de pH = 8,6 et de force ionique = 0,1, 300 V, 0,4 mA/cm, + 10°C). 1 citrulline, 2 glycocyamine, 3 créatine, 5 arginine, 7 diméthylguanidine, 8 agmatine, 9 méthylguanidine, 10 guanidine (lieu de dépôt de la goutte du mélange indiqué par un rond).

Dans les conditions correspondant au document B de la Figure 1, la séparation obtenue est satisfaisante, sauf pour la glycocyamine et la créatine. Les taches de celles-ci sont presque superposées, mais elles peuvent être différencier au moyen des réactions colorées spécifiques de chacune d'elles (Tableau I). L'emploi d'un mélange de *n*-butanol, d'acide formique et d'eau (63:20:17), comme solvant dans la chromatographie préalable à l'électrophorèse, permet de localiser la glycocyamine et la créatine dans deux taches, la mono- et la diméthylguanidine étant alors, en revanche, confondues en une seule, comme le montre l'examen de la Figure 2.

L'association des deux méthodes d'analyse bénéficie d'avantages propres à chacune. Elle présente en outre, sur la chromatographie bidimensionnelle, celui d'être beaucoup plus rapide (8 h); sa sélectivité est par ailleurs différente, car elle met en œuvre la charge électrique des corps en même temps que leur comportement chromatographique. L'étude dont les résultats ont été présentés ici n'est qu'une application de la chromatoélectrophorèse à un groupe particulier de dérivés, dont l'identification dans des extraits de tissus animaux a été ainsi réalisée<sup>1</sup>. L'emploi de cette méthode est susceptible d'une large extension mettant en œuvre la migration électrophorétique à plusieurs pH et la chromatographie dans divers milieux. Deux d'entre nous poursuivent des recherches à ce sujet<sup>2</sup>.

S. LISSITZKY, ISABELLE GARCIA et J. ROCHE

*Laboratoire de Biochimie générale et comparée, Collège de France, Paris, et Laboratoires de Chimie biologique et de Chimie générale et pharmaceutique, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Alger, le 9 avril 1954.*

#### Summary

Paper chromatography has been used in conjunction with electrophoresis in a perpendicular direction (chromatoelectrophoresis), in order to characterize various guanidoderivatives of biological interest and also citrulline. The isolation of definite spots can be obtained with a satisfactory selectivity by this procedure, at a higher speed than by bidimensional chromatography; and the use of a few coloured reactions (ninhydrine, SAKAGUCHI, diacetyl- $\alpha$ -naphthol and *p*-dimethylaminobenzaldehyde) on the same electrochromatogram has been successfully practised in this field.

<sup>1</sup> S. LISSITZKY, I. GARCIA et J. ROCHE, C. r. Soc. Biol. 148, 436 (1954).

<sup>2</sup> Un intéressant travail de J. BLASS, O. LECOMTE et J. POLONOVSKI sur la chromatoélectrophorèse des acides aminés a paru C. Bull. Soc. Chim. biol. 36, 627 (1954) après le dépôt de la présente note (addendum de <sup>2</sup> à la correction des épreuves).

#### Sul significato dell'affinità dei granuli neutrofili dei leucociti per i coloranti tipo Sudan

Da un esteso esame critico e sperimentale della sudanofilia leucocitaria LILLIE e BURNTNER<sup>1</sup> hanno recentemente tratto la conclusione che l'affinità dei leucociti neutrofili per i coloranti tipo Sudan non dipende dalla liposolubilità dei coloranti stessi, ma da una vera combinazione chimica fra il radicale  $\beta$ -naftolico della loro molecola e i granuli «sudanofili».

<sup>1</sup> R. D. LILLIE e H. J. BURNTNER, J. Nat. Canc. Inst. 13, 220 (1952); J. Histochem. Cytochem. 1, 8 (1953).