

The same colour reactions characteristic of reserpine and rescinnamine were given by the four crystals: with Froehde's reagent, yellow-green to blue; with concentrated sulfuric acid, slightly greenish yellow and with concentrated nitric acid, brick red turning to greenish yellow solution.

Elementary analysis yielded the following results:

Crystal 1: C 64.76, H 6.71, N 4.81

Crystal 2: C 65.30, H 6.78, N 4.08

Crystal 3: C 65.88, H 6.83, N 4.61

Crystals 1 and 2 were identified by comparison on a paper chromatogram with pure reserpine and by their ultraviolet (Fig. 5, 6) and infrared absorption spectra (Fig. 7, 8, 9). Crystals 3 and 4 were identified by paper chromatography to be mixtures of reserpine and rescinnamine. Quantitative analysis showed crystals 1 and 2 to be 99% reserpine, crystal 3 is 90% reserpine and 10% rescinnamine and crystal 4 contains 95% reserpine and 5% rescinnamine.

The elementary analyses were made by Misses LYDIA JASON and GLORY LLEANDER, NSDB, and the UV- and IR-spectra by J. CAROL and staff, FDA, Washington.

R. M. BERNAL, A. VILLEGAS-CASTILLO,
and O. P. ESPEJO

College of Pharmacy, University of the Philippines and National Science Development Board, Manila, August 17, 1959.

Zusammenfassung

Aus *Rauwolfia amsoniaefolia* A. DC. wurden ziemlich reines Reserpin und ein Gemisch von Reserpin und Rescinnamin isoliert und charakterisiert.

Note on the Specificity of Mercuric Bromophenol Blue for the Cytochemical Detection of Proteins

Quite recently BAKER¹ has expressed some doubts on the specificity of bromophenol blue (BPB) as a protein stain. He seems to be of the opinion that whatever is stained by bromophenol blue does not necessarily contain proteins, and hence this fact does not qualify this stain to act as a reliable agent for the detection of proteins.

The purpose of this communication is to emphasize that, in addition to what BAKER¹ has observed, whatever is not stained with this dye is not always devoid of proteins.

The credit of bringing this powerful acid dye to the forefront as a specific stain for various proteins goes to MAZIA, BREWER, and ALFERT², who modified the older techniques employed by DURRUM³, KUNKEL, and TISELIUS⁴ and GESCHWIND and LI⁵ and standardized a new technique.

I have studied in detail the mucinogenesis in the goblet cells of different vertebrates [viz., *Mystus seenghala* (fish), *Rana tigrina* (amphibian), *Hemidactylus* sp. (reptile), and the house- and white rats (mammals)]. The mucus which these cells secrete has been established histochemically as acid mucopolysaccharides (see also PEARSE⁶ and PALAY⁷) as is evident from the following reactions (PAS +, Best's carmine –, Alcian blue⁸ +, mucicarmine +, SBB –, intensely metachromatic after Feyrter's 'enclosure' method⁶, and toluidine blue⁶ etc. etc.). Further, mucopolysaccharides and acid mucopolysaccharides invariably contain proteins (+ after coupled tetrazonium⁹) as one of their constituents (PEARSE⁶ and LILLIE¹⁰).

During the present investigations, mercuric bromophenol blue staining has been employed both on paraffin sections from the various fixatives such as Regaud, Lewitsky, Lewitsky saline¹¹, Champy, Helly, Zenker-formol, Zenker and Carnoy (both with and without chloroform) and gelatin sections from formaldehyde calcium¹², Lewitsky saline¹¹, and pyridine extracted (prior fixation in weak Bouin) material¹³. In none of the above preparations does the mucus in the thecae of the goblet cells give blue coloration with mercuric bromophenol blue technique of MAZIA, BREWER, and ALFERT².

So in the present state of knowledge, as BAKER¹ has also pointed out, it is safe to regard bromophenol blue merely as a 'powerful acid dye, capable of making direct links with basic groups in tissue-constituents' and perhaps also with certain acidic groups, through mercury.

In short, whatever is stained with mercuric bromophenol blue does not always contain proteins and whatever is not stained is not necessarily devoid of proteins.

K. C. KANWAR

Department of Zoology, Panjab University, Hoshiarpur¹⁴ (Punjab, India), January 23, 1960.

Résumé

Le bromophénol mercurique bleu n'est pas un colorant spécifique des protéines. Tout ce qui est teint par lui ne contient pas toujours des protéines et tout ce qui n'est pas teint n'est pas nécessairement dépourvu de protéines.

¹ J. R. BAKER, *Quart. J. micr. Sci.* **99**, 459 (1958).

² D. MAZIA, P. A. BREWER, and M. ALFERT, *Biol. Bull.* **104**, 57 (1953).

³ E. L. DURRUM, *J. Amer. chem. Soc.* **72**, 2943 (1950).

⁴ H. G. KUNKEL and A. TISELIUS, *J. gen. Physiol.* **35**, 89 (1951).

⁵ I. R. GESCHWIND and C. H. LI, *J. Amer. Chem. Soc.* **74**, 834 (1953).

⁶ A. G. E. PEARSE, *Histochemistry* (Churchill Ltd., London 1954).

⁷ S. PALAY, *Frontiers in Cytology* (New Haven, Yale University Press 1958), p. 305.

⁸ H. F. STEEDMAN, *Quart. J. micr. Sci.* **91**, 477 (1950).

⁹ J. F. DANIELLE, *Symp. Soc. exp. Biol.* **1**, 101 (1947).

¹⁰ R. D. LILLIE, *Histopathologic Technic and Practical Histochemistry* (The Blakiston Company Inc., New York 1954).

¹¹ J. R. BAKER, *Quart. J. micr. Sci.* **97**, 621 (1956).

¹² J. R. BAKER, *Quart. J. micr. Sci.* **85**, 1 (1944).

¹³ J. R. BAKER, *Quart. J. micr. Sci.* **87**, 441 (1946).

¹⁴ The department has now shifted to Chandigarh.

Enzymatische Hydrierungen im Ring A von Steroiden mittels Streptomyzeten¹⁻³

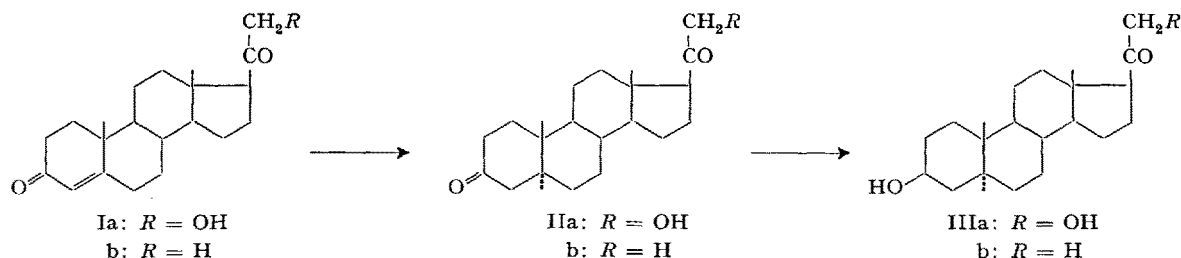
Die Fähigkeit, Steroide im Ring A enzymatisch zu hydrieren, ist unter den Mikroorganismen ziemlich verbreitet⁴. Die umgekehrte Reaktion hingegen, die Hydrierung von Δ^4 -3-Keto-steroiden zu den entsprechenden im

¹ 10. Mitt. über mikrobiologische Reaktionen; 9. Mitt. siehe J. URECH, E. VISCHER und A. WETTSTEIN, *Helv. chim. Acta* **43**, 1077 (1960).

² 170. Mitt. über Steroide; 169. Mitt. siehe R. NEHER und A. WETTSTEIN, *Helv. chim. Acta* **43**, 1171 (1960).

³ Auszugsweise vorgetragen am VII. Internationalen Kongress für Mikrobiologie, Stockholm 1958.

⁴ Vgl. zum Beispiel E. VISCHER und A. WETTSTEIN, *Adv. Enzymol.* **20**, 237 (1958).



Ring A gesättigten Verbindungen, wurde nur selten und meist lediglich als Nebenreaktion anderer mikrobiologischer Umsetzungen beobachtet.

Im Verlaufe von Untersuchungen über die Einwirkung verschiedener Streptomyzeten auf Δ^4 -3-Keto-steroiden haben wir einen Stamm gefunden, der Cortexon (11-Desoxy-corticosteron, Ia) bei 30stündiger Inkubation in guter Ausbeute in eine Substanz umwandelt, welche die charakteristische Absorption im UV nicht mehr aufweist. Sie ist im Papierchromatogramm etwas polarer als das Ausgangsmaterial und enthält noch die unveränderte Ketol-Seitenkette, nach der Elementar-Analyse aber keine zusätzliche Sauerstofffunktion. In der Folge liess sie sich als das 3 β ,21-Dihydroxy-allopregnan-20-on (IIIa) identifizieren.

Bei dieser enzymatischen Reaktion entstand also unter stereospezifischer Absättigung der 4,5-Doppelbindung ein Produkt der Allo-(5 α)-Reihe, und zudem wurde die 3-Ketogruppe in eine β -orientierte sek. Alkoholgruppe übergeführt. Da es sich um eine für Pilze und speziell für Streptomyzeten neuartige Reaktion handelte⁵, wurde sie näher untersucht.

Der verwendete Mikroorganismus kann gemäss der Klassierung von ETTLINGER *et al.*⁶ der Gattung *Streptomyces griseus* (Krainsky) Waksman et Henrici⁷ zugezählt werden. Er wurde für diese Umsetzungen auf einem Pepton-Fleischextrakt-Medium bei 27°C in Schüttelgefässen gezüchtet. Zu den innerhalb 24 h ausgewachsenen Kulturen gab man die zu untersuchenden Steroide in Azeton-Lösung unter sterilen Bedingungen zu, worauf bei der gleichen Temperatur inkubiert wurde. Die Umsetzungsprodukte wurden durch Extraktion mit Essigester und anschliessender Chromatographie an Silicagel in reiner Form isoliert oder in einzelnen Fällen papierchromatographisch unter Verwendung mehrerer Lösungsmittelsysteme und Farbreaktionen identifiziert.

Mit diesem Streptomyzeten konnten auch andere Δ^4 -3-Keto-steroiden, wie Corticosteron, 17 α -Hydroxy-cortexon (Reichsteins Substanz S), Progesteron (Ib) und 16 α -Hydroxy-progesteron, sowie Δ^4 -Androsten-3,17-dion in die entsprechenden gesättigten 3 β -Hydroxy-(5 α)-Verbindungen übergeführt werden.

Bei einigen dieser fermentativen Umsetzungen wurde die Bildung von jeweils einem zusätzlichen Umsetzungsprodukt beobachtet, das sich im Papierchromatogramm etwas weniger polar als das Ausgangsmaterial erwies und das auf Grund der fehlenden UV-Absorption ebenfalls im Ring A gesättigt sein musste. Diese Produkte sind bei 18stündigen Inkubationen von Cortexon, Progesteron, 17 α -Hydroxy-cortexon und Δ^4 -Androsten-3,17-dion als Reinsubstanz isoliert und identifiziert worden. In allen Fällen handelte es sich um die entsprechenden gesättigten 3-Keto-(5 α)-Verbindungen, offenbar die Zwischenprodukte der fermentativen Prozesse. Die Tatsache, dass diese Verbindungen bei nochmaliger Inkubation mit dem *S. griseus*-Stamm in guter Ausbeute in die 3 β -Hydroxy-Derivate übergeführt wurden, bestätigte diese Annahme.

Im Verlaufe der mikrobiologischen Umsetzung von Cortexon (Ia) und Progesteron (Ib) wurden die Konzentrationen der Ausgangsstoffe, der gesättigten 3-Keto-Derivate IIa und IIb, sowie der 3 β -Hydroxy-Verbindungen IIIa und IIIb quantitativ verfolgt. Dabei zeigte sich in beiden Fällen, dass zuerst die 4,5-Doppelbindung hydriert wurde unter Bildung der 3-Keto-Derivate IIa und IIb, und dass die letzteren in einer zweiten Phase zu den entsprechenden 3 β -Hydroxy-Verbindungen IIIa und IIIb reduziert wurden. Die Resultate eines solchen Experimentes sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Inkubation von Cortexon mit *S. griseus*

Zeit h	Ia	IIa	IIIa
8	50%	40%	5%
14	20%	40%	35%
24	0	25%	60%
36	0	0	85%

Die beschriebenen reduktiven Umsetzungen können selbstverständlich auch mittels bekannter chemischer Methoden durchgeführt werden. Diese erfordern aber meist den Schutz der anderen im Molekül vorhandenen reduzierbaren Gruppen, und der stereospezifische Verlauf ist nicht gewährleistet. Aus diesen Gründen kann die Anwendung der mikrobiologischen Reaktion von Vorteil sein. So konnte zum Beispiel das früher aus Nebennieren isolierte 3 β ,16 α -Dihydroxy-allopregnan-20-on⁸ in einer fermentativen Verfahrensstufe aus 16 α -Hydroxy-progesteron gewonnen werden.

Wir danken Herrn A. REUT für die sorgfältige Ausführung der experimentellen Untersuchungen.

E. VISCHER und A. WETTSTEIN

Forschungslaboratorien der CIBA, Basel, 25. Mai 1960.

Summary

A strain of *Streptomyces griseus* has been found to convert Δ^4 -3-keto steroids into the corresponding saturated 3-keto-5 α -compounds and, on prolonged incubation, into the 3 β -hydroxy-5 α -derivatives.

⁵ Neuerdings beschrieben M. SHIRASAKA und M. TSURUTA ähnliche reduktive Umsetzungen mit einem Stamm von *Allernaria bataticola*, vgl. Arch. Biochem. Biophys. 85, 277 (1959).

⁶ L. ETTLINGER, R. CORBAZ und R. HÜTTER, Arch. Mikrobiol. 31, 326 (1958).

⁷ Wir danken den Herren Prof. E. GÄUMANN, Dr. R. HÜTTER und Dr. H. ZÄHNER bestens für die Überlassung und Bestimmung dieses Stammes.

⁸ R. NEHER, P. DESAULLES, E. VISCHER, P. WIELAND und A. WETTSTEIN, Helv. chim. Acta 41, 1667 (1958).