

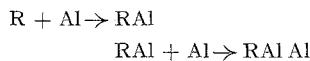
Tabelle I

V	0,1	0,2	0,25	0,3	0,33	0,4	0,45	0,5	0,6	0,7	0,8
E	0,065	0,110	0,140	0,156	0,160	0,155	0,148	0,142	0,125	0,105	0,072

Tabelle II

t (min)	4	7	10	15	20	30	60	120	25 h	30 h
E	0,060	0,110	0,122	0,147	0,170	0,180	0,200	0,215	0,250	0,250

Um die Zusammensetzung des Chelates B in Lösung zu bestimmen, haben wir das von P. JOB<sup>7,8</sup> eingeführte kolorimetrische Verfahren der kontinuierlichen Variation benutzt. Das Rutinmolekül kann an der C-5-Hydroxylgruppe und an den Hydroxylgruppen C-3' und C-4' des B-Ringes komplexiert werden. Da das gleichzeitige Zusammentreffen von einem Rutinmolekül mit zwei  $\text{AlCl}_3$ -Molekülen sicher nur selten stattfindet, ist eine stufenweise Komplexierungsreaktion anzunehmen; wir haben es demnach mit zwei Reaktionen 2. Ordnung zu tun (R = Rutin):



Die Absorptionsmaxima von Rutin ( $4 \times 10^{-5} M$ ) in methanolischer Lösung lagen bei  $\lambda_{max}$ : 356 nm ( $\epsilon = 19500$ ) (Bande I) und 257 nm ( $\epsilon = 23500$ ) (Bande II). Bei Zugabe eines Überschusses an methanolischer  $\text{AlCl}_3$ -Lösung erfolgt die Komplexierungsreaktion sehr schnell unter gleichzeitiger bathochromer Verschiebung der Absorptionsmaxima zu  $\lambda_{max}$ : 430 nm ( $\epsilon = 22800$ ) (Bande I) und 273 nm ( $\epsilon = 28300$ ) (Bande II).

Methanolische Stammlösungen gleicher Molarität ( $4 \times 10^{-5} M$ ) an Rutin und  $\text{AlCl}_3$  wurden bei gleichbleibender molarer Gesamtkonzentration in dem Verhältnis  $V = \text{Rutin/Rutin} + \text{AlCl}_3$  zusammengegeben und die Extinktion (E) bei  $\lambda_{max}$ : 430 nm und  $20,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$  gemessen (Tabelle I).

Bei der Wellenlänge 430 nm absorbiert Rutin selbst gering. Es konnte somit auf eine Differenzbildung der Extinktionswerte verzichtet werden. Wie aus Tabelle I ersichtlich, liegt die maximale Extinktion bei  $V = 0,33$ . Daraus schliessen wir, dass, wie schon T. I. MABRY vermutete, tatsächlich ein Rutin  $\text{AlCl}_3$ -Komplex im Ver-

hältnis  $R = 1$  und  $\text{AlCl}_3 = 2$  vorliegt. Um festzustellen, nach welcher Zeit die maximale Konzentration an Chelat vorhanden ist, wurde die Zunahme der Extinktion (E) in Abhängigkeit von der Zeit (t) bei  $V = 0,33$  ( $20,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$ ) gemessen. Aus der Tabelle II ergibt sich, dass die Komplexierungsreaktion langsam verläuft. Erst nach 25 h wurde ein konstanter Extinktionswert gefunden.

Berechnet man für die verschiedenen Zeitpunkte die Geschwindigkeitskonstanten nach der 1. Ordnung, so fallen diese deutlich mit fortschreitendem Umsatz ab. Danach ist eine Reaktion 1. Ordnung auszuschliessen. Eine Berechnung nach 2. Ordnung ergibt hinlänglich konstante Werte und deutet darauf hin, dass die Chelatbildung wohl hauptsächlich über die Zwischenstufe  $\text{R Al}$  zu  $\text{R Al Al}$  verläuft. Dies kann auch direkt aus der Verschiebung der Extinktionsmaxima bei langsamer  $\text{AlCl}_3$ -Zugabe geschlossen werden, da das langwellige Maximum (Bande I; Ring B) später erreicht wird als das kurzwellige Maximum (Bande II; Ring A).

*Summary.* The hypothesis of T. I. MABRY<sup>6</sup> about the chelatstructure of flavonoids with aluminium-III-chlorid could be confirmed by using JOB's<sup>7</sup> method of continuous variations.

B. JANISTYN

*Pharmakognostisches Institut der Universität,  
Schänzelstrasse 9-11, D-78 Freiburg im Breisgau  
(Deutschland), 30. April 1970.*

<sup>7</sup> P. JOB, Ann Chim. 9, 113 (1928) und 71, 97 (1936).

<sup>8</sup> R. T. FOLEY und R. C. ANDERSON, J. Am. chem. Soc. 70, 1195 (1948) und 71, 909 (1949).

### Isoméries *cis-trans* des ménaquinones et oxydations phosphorylantes dans les extraits de *Myco-bacterium phlei*

GUTNICK et BRODIE<sup>1</sup> ont décrit l'incorporation de tritium dans la phylloquinone par des extraits de *M. phlei* incubés avec un substrat oxydable en présence de  $^3\text{H}_2\text{O}$ . Ces résultats n'ont cependant pu être reproduits dans d'autres laboratoires<sup>2-4</sup>. De plus, HORTH et al.<sup>5</sup> ayant préparé la phylloquinone doublement marquée  $2-[^{14}\text{C}^3\text{H}_3]$ , n'ont pu observer aucun changement significatif du rap-

port  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  après incubation avec les mêmes extraits. Enfin Di MARI et al.<sup>4</sup> ont observé dans les mêmes conditions une perte de deutérium inférieure à 1% en utilisant la phylloquinone  $2-[CD_3]$ ,  $3\alpha-[CD_2]$  ou  $3\beta-[CD]$ .

L'ensemble de ces résultats négatifs amenait donc à penser qu'aucun des mécanismes précédemment postulés pour l'intervention des ménaquinones dans les oxydations

phosphorylantes n'était opératif. Il restait cependant la possibilité que seule une petite partie de la quinone, constituant un pool séparé, était intéressée dans les mécanismes impliqués et que le phénomène d'échange pouvait alors passer inaperçu (cf. les incorporations de 0,1 à 0,3% de tritium<sup>3</sup>, et la perte de 1% de <sup>2</sup>H<sup>4</sup>).

Une récente publication de DUNPHY et al.<sup>6</sup> revenant sur des résultats antérieurs, indiquait que la «majeure partie du tritium» incorporé dans la phylloquinone (ou la dihydroménaquinone-9 endogène), après incubation avec <sup>3</sup>H<sub>2</sub>O, pouvait être éliminée par chromatographie sur gel de silice imprégné de nitrate d'argent, mais que la radioactivité résiduelle migrait alors comme l'isomère *cis* de chaque quinone. Cet isomère *cis* avait été caractérisé aussi à l'état naturel chez *M. phlei* où il représente environ 2,5% de la dihydroménaquinone-9 totale<sup>6,7</sup>.

Il était donc possible que cet isomère *cis* représente en fait la fraction active de la ménaquinone, ce qui expliquerait ainsi la faiblesse des échanges observés. Dans la plupart des cas, en effet, les différents auteurs avaient utilisé soit la phylloquinone synthétique (environ 90% *trans*) ou la *trans*-phylloquinone purifiée, soit la dihydroménaquinone-9 naturelle (environ 98% *trans*). Nous avons donc envisagé de reprendre certaines expériences d'échange d'hydrogène déjà réalisées, mais en séparant les deux isomères afin de détecter l'échange éventuel intervenant au niveau de l'isomère *cis*. L'incorporation spécifique du méthyle de la méthionine en position-2 de la dihydroménaquinone-9<sup>8</sup> nous a donné la possibilité d'obtenir une quinone doublement marquée [2-<sup>14</sup>C<sup>3</sup>H<sub>3</sub>]. De plus cette méthode a permis d'éviter les opérations habituelles de fractionnement des systèmes oxydophosphorylants, destruction de la ménaquinone endogène et restauration de l'activité par addition de la quinone doublement marquée, puisque l'incubation de cellules entières lavées de *M. phlei* avec de la méthionine-[<sup>14</sup>C<sup>3</sup>H<sub>3</sub>] en présence d'un substrat oxydable dans un tampon phosphate, réalisé à la fois les conditions nécessaires au double marquage de la quinone et au fonctionnement des systèmes oxydophosphorylants.

*Méthodes expérimentales.* *Mycobacterium phlei* est cultivé en milieu agité à 37 °C pendant environ 20 h sur milieu de BRODIE<sup>9</sup>. Les bactéries centrifugées sont lavées à l'eau 3 fois et mises en suspension dans un tampon tris 0,01 M contenant du phosphate de K 0,014 M et KCl 1,15%, pH 7,4. Les quinones sont extraites à l'acétone, puis purifiées comme décrit précédemment<sup>3</sup>. Les comptages de radioactivité du <sup>3</sup>H et <sup>14</sup>C sont effectués par scintillation liquide au moyen d'un Packard Tri-Carb 3314 équipé d'une standardisation externe dans le mélange scintillant habituel. Le réglage utilisé permet d'obtenir une efficacité moyenne de comptage de 57% pour <sup>14</sup>C et 37% pour <sup>3</sup>H (<sup>14</sup>C dans le canal <sup>3</sup>H:11%, <sup>3</sup>H dans le canal <sup>14</sup>C<0,1%). La méthionine doublement marquée n'a pu être comptée

qu'après addition de 1 ml d'éthanol pour 10 µl environ de solution aqueuse. Dans une expérience, le comptage a aussi été effectué sur l'iodure de méthyle distillé directement dans le mélange scintillant et provenant d'un aliquot traité par l'acide iodhydrique<sup>10</sup>. L'irradiation des ménaquinones a été effectuée dans des récipients en pyrex placés à 10 cm environ de deux tubes Mazda TFD 40 W (lumière blanche).

*Résultats et discussion.* L'incubation de cellules lavées de *M. phlei* dans un tampon tris-phosphate contenant du malate 0,5 M, 0,05 µc/ml de L-méthionine-[<sup>14</sup>CH<sub>3</sub>] et 1 µc/ml de L-méthionine-[<sup>3</sup>C<sup>3</sup>H<sub>3</sub>], à l'air et à 30 °C pendant 2 h, permet d'obtenir une dihydroménaquinone doublement marquée dans le méthyle-2<sup>8,11,12</sup>. Le Tableau I montre que les rapports <sup>3</sup>H/<sup>14</sup>C mesurés dans la méthionine-[<sup>14</sup>C<sup>3</sup>H<sub>3</sub>] utilisée et la dihydroménaquinone-[2-<sup>14</sup>C<sup>3</sup>H<sub>3</sub>] isolée ne semblent pas présenter de différences significatives. Le rapport mesuré pour la dihydroménaquinone varie peu après plusieurs purifications successives. Afin de mesurer le rapport <sup>3</sup>H/<sup>14</sup>C dans chacun des isomères *cis* et *trans*, les trois échantillons obtenus ont été chromatographiés sur gel de silice F<sub>254</sub> (Merck) à l'aide du solvant hexane/n-butyl-éther (98:2); une bonne séparation des isomères exige 5 à 6 développements successifs. L'adsorbant est ensuite gratté par bandes de 1 mm dans une fiole de comptage, à l'aide d'un appareil de SNYDER<sup>13</sup> modifié. Un exemple de séparations obtenues, assorti des rapports <sup>3</sup>H/<sup>14</sup>C calculés, est donné dans la Figure.

- D. L. GUTNICK et A. F. BRODIE, J. biol. Chem. 240, 3698 (1965).
- C. D. SNYDER, S. J. DI MARI et H. RAPORT, J. Am. chem. Soc. 88, 3868 (1966).
- F. SCHERRER, R. AZERAD et M. VILKAS, Experientia 23, 360 (1967).
- S. J. DI MARI, C. D. SNYDER et H. RAPORT, Biochemistry 7, 2301 (1968).
- C. E. HORTH, D. McHALE, L. R. JEFFRIES, S. A. PRICE, A. T. DIPLOCK et J. GREEN, Biochem. J. 100, 424 (1966).
- P. J. DUNPHY, D. L. GUTNICK, P. G. PHILLIPS et A. F. BRODIE, J. biol. Chem. 243, 398 (1968).
- P. J. DUNPHY, D. L. GUTNICK, P. G. PHILLIPS et A. F. BRODIE, Arch. Biochem. Biophys. 122, 252 (1967).
- M. GUÉRIN, R. AZERAD et E. LEDERER, Bull. Soc. Chim. Biol. 47, 2105 (1965).
- A. F. BRODIE et C. T. GRAY, J. biol. Chem. 219, 853 (1956).
- W. SAKAMI, *Handbook of Isotope Tracer Methods* (Department of Biochemistry, Western Reserve University, School of Medicine, Cleveland, Ohio 1955), p. 75.
- R. AZERAD, R. BLEILER-HILL, F. CATALA, O. SAMUEL et E. LEDERER, Biochem. biophys. Res. Comm. 27, 253 (1967).
- G. JAUREGUIBERRY, M. LENFANT, B. C. DAS et E. LEDERER, Tetrahedron 8, 27 (1966).
- E. D. SNYDER, Analyt. Biochem. 9, 183 (1964).

Tableau I. Rapports isotopiques <sup>3</sup>H/<sup>14</sup>C dans le méthyle de la méthionine et dans le méthyle-2 de la dihydroménaquinone-9

Expérience	<sup>3</sup> H/ <sup>14</sup> C dans le méthyle de la méthionine		<sup>3</sup> H/ <sup>14</sup> C dans le méthyle-2 de la dihydroménaquinone-9 après purifications chromatographiques					Ecart moyens
	Détermination	<sup>3</sup> CH <sub>3</sub>	3	4	5	6	7	
1	24 ± 0,2	—	25,2	24,8	25,0	25,2	—	+ 1,1
2	23,1 ± 0,4	—	21,8	21,8	21,4	22,0	21,9	-1,3
3	21,7 ± 0,5	20,75 ± 0,05	17,3	18,5	19,3	19,1	19,2	-1,5

Cette technique a été jugée indispensable lorsque nous nous sommes aperçus que le simple découpage, l'élution et le comptage de la partie antérieure de la bande correspondant à l'isomère *cis* et de la partie postérieure de la bande correspondant à l'isomère *trans* (pour éviter toute contamination réciproque) donnaient des rapports  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  respectivement plus bas et plus haut que le rapport moyen global de la dihydroménaquinone chromatographiée. L'examen des rapports  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  mesurés le long du pic des deux isomères montre qu'il s'agit là du résultat d'un effet isotopique chromatographique. Il apparaît, dans les deux cas, que les molécules tritierées sont plus retenues que les molécules marquées au  $^{14}\text{C}$ ; le rapport statistique moyen peut être trouvé, pour chaque isomère, en mesurant la valeur du rapport  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  au sommet du pic correspondant.

Des effets isotopiques chromatographiques analogues, affectant des composés méthylés ou non, ont déjà été signalés<sup>14, 15</sup>.

Les résultats trouvés sont indiqués dans le Tableau II; ils montrent que le rapport  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  dans l'isomère *cis* (environ 5% du total) est pratiquement identique à celui de l'isomère *trans*.

Ces résultats montrent qu'aucun échange de tritium n'intervient au niveau du méthyle en -2 de l'isomère *cis* de la dihydroménaquinone. L'origine et le rôle attribués à cet isomère *cis* par BRODIE et al.<sup>6</sup> semblent très contestables: la *cis*-phylloquinone ne peut restaurer les oxydations phosphorylantes d'extraits de *M. phlei* irradiés. De plus nos propres résultats confirment entièrement l'observation faite par DI MARI et RAPOPORT<sup>16</sup> suivant laquelle l'isomère *cis* est simplement produit par irradiation de l'isomère *trans*. L'incubation d'extraits irradiés de *M. phlei* en présence d'un mélange de *cis*, *trans*-phylloquinone ou de *cis*- ou *trans*-phylloquinone purifiées montre que l'interconversion des deux isomères est indépendante de toute activité enzymatique; le taux d'interconversion est identique, aussi bien pour les extraits réactivés et incubés en présence de 2,4-DNP, de KCN ou même bouillis. Au bout de 15 min l'isomère *cis*, présent à raison de 0,8% avant l'incubation passe à 3,5% en moyenne, tandis que l'isomère *trans* présent à raison de 2% passe à 10% environ. Ces résultats indiquent que l'interconversion dépend en fait d'illuminations accidentelles inévitables pendant les manipulations. L'irradiation en lumière blanche de chacun des deux isomères en solution dans le cyclohexane conduit à un équilibre contenant 30% de *cis*, et 70% de *trans*.

Il est certain que la dihydroménaquinone-9 présente une interconversion analogue qui explique le pourcentage d'isomère *cis* trouvé après extraction<sup>7</sup>. La dihydroménaquinone-9 obtenue à partir d'une culture de *M. phlei* poussée en présence de L-méthionine-[ $\text{C}^3\text{H}_3$ ], extraite avec les précautions habituelles, contient 4,1% d'isomère *cis*; si l'extraction est conduite dans l'obscurité totale à l'exception de brèves illuminations en lumière rouge, ce pourcentage est ramené à 2,4%. L'irradiation d'un échantillon marqué de dihydroménaquinone-9 [ $^{14}\text{CH}_3$ ], isolé dans ces conditions, indique, outre une destruction importante, l'accroissement rapide du taux d'isomère *cis*<sup>17</sup>.

**Summary.** Incubation of *M. phlei* washed cells with [ $^{14}\text{CH}_3$ ]-L-methionine led to [ $^{2-14}\text{C}^3\text{H}_3$ ] dihydroménaquinone-9 with an isotope ratio identical to that of methionine. Chromatography of the doubly labelled quinone indicated, despite a pronounced isotope effect, that both *cis* and *trans* isomers had the same isotope ratio. This result eliminates any possibility of hydrogen exchange in the 2-methyl group of menaquinones during oxidative phosphorylation, even in the *cis* isomer. Furthermore, it is confirmed that this compound is certainly formed from natural or synthetic menaquinones during isolation or incubation periods by the effect of daylight irradiation.

F. SCHERRER et R. AZERAD

Tableau II. Rapports isotopiques  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  dans le méthyle-2 des isomères *cis* et *trans* de la dihydroménaquinone-9 [ $2-^{14}\text{C}^3\text{H}_3$ ].

Expérience	$^3\text{H}/^{14}\text{C}$ avant séparation	<i>cis</i> %	$^3\text{H}/^{14}\text{C}$	
			<i>cis</i>	<i>trans</i>
1	$19,8 \pm 0,1^a$	$5,1 \pm 0,3^b$	$19,4 \pm 0,06^b$ (3) <sup>c</sup>	$19,6 \pm 0,3$ (3)
2	$15,5 \pm 0,1^a$	$3,75 \pm 0,05$	$15,3 \pm 0,2$ (4)	$15,2 \pm 0,2$ (4)
3	$19,2 \pm 0,1$	4,5	20,4 (1)	20,4 (1)

<sup>a</sup> Rapports mesurés après changement des réglages du double comptage et plusieurs mois après la détermination initiale (Tableau I).

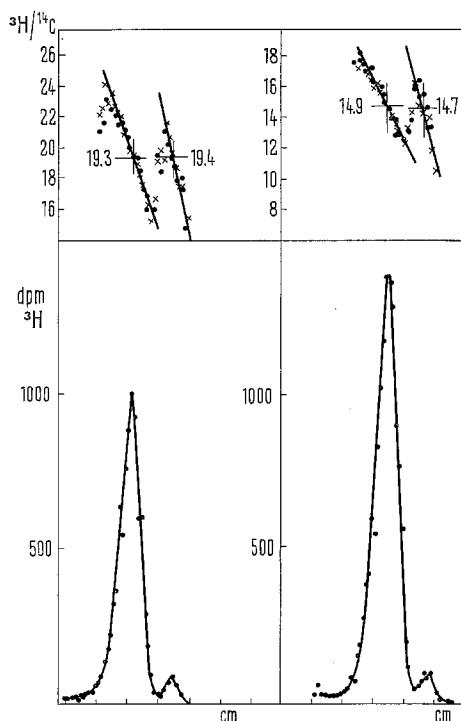
<sup>b</sup> Erreur standard sur la moyenne. <sup>c</sup> Nombre de mesures.

<sup>14</sup> P. D. KLEIN, V. CEJKA et P. A. SZCZEPANIK, *Atomlight* (New Engl. Nuclear Bull. 1968), vol. 64, p. 1.

<sup>15</sup> D. S. SGOUTAS et F. A. KUMMEROW, *J. Chromatog.* 16, 448 (1964).

<sup>16</sup> S. J. DI MARI et H. RAPOPORT, *Biochemistry* 7, 2650 (1968).

<sup>17</sup> Nous remercions les Professeurs E. LEDERER et M. VILKAS pour l'intérêt porté à ce travail.



*Institut de Biochimie, Faculté des Sciences,  
F-91 Orsay (France), 1 juin 1970.*