

### Summary

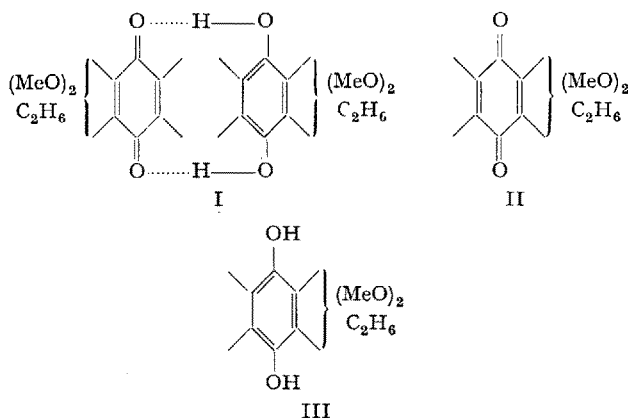
The function of the halteres of the higher *Diptera* and its relation to their flight were tested by the aid of slowmotion pictures. The influence of the halteres on orientation has been demonstrated for each of the three axes around which the filmed animals were passively rotated.

### Three New Antibiotics from a Species of *Gliocladium*

A species of *Gliocladium* was isolated from a sample of soil obtained from a vigorous young pine plantation at Wareham, Dorset, England, in January, 1948. It was abundant in the surface inch of the soil which, at this level, was highly acid (pH 4.1). The mould gives white, floccose colonies on Czapek agar when grown in the dark; colonies grown in light develop a pale pink colour in the sporing areas. Older colonies are somewhat caespitose or coremial and ropiness is common. In young colonies the conidial structure is a definite penicillus but in older colonies true penicilli are rare and an *Acrostalagmus*-like conidial apparatus is more common. The conidia are ovate or elliptical,  $3.1\text{--}6.0\ \mu \times 2.8\text{--}4.3\ \mu$  (mean  $4.5\ \mu \times 3.6\ \mu$ ), aggregated in spore-balls  $10\text{--}15\ \mu$  in diameter. The mould is a member of the *Gliocladium roseum* series, but as it is distinct from other strains which we have attributed to *Gliocladium roseum* (Link.) Bainier, we prefer not to identify it to species at present.

In an agar-streak test the fungus inhibited *Staphylococcus aureus* but did not inhibit *Bacterium coli*, *Salmonella typhi* or *Candida albicans*. The antibacterial substance is also produced on liquid media, a Raulin-Thom solution containing 5% glucose being, in our experience, most satisfactory. For routine assay of culture filtrates a cylinder-plate method has been used, the agar plates being seeded with spores of *Bacillus subtilis*. Maximum titres are usually reached, in 3 to 4 weeks, when the fungus is grown on layers of medium of 1.5 cm depth.

The active material may be extracted by shaking the culture filtrate twice with  $1/10^{\text{th}}$  vol. of carbon tetrachloride. The residue obtained by evaporating the extracts, when crystallised from petrol ether (40–60), gives yields of 300–800 mg of an orange-coloured crystalline solid from each litre of culture filtrate. This crude solid is obviously a mixture, as individual crystals vary in colour from yellow to deep red.



Some difficulty was encountered in separating and purifying the constituents of this crude mixture, since chromatography on alumina by the method of fractional elution, partition chromatography on silica gel and

paper chromatography all proved unsuccessful, possibly because of the close structural relationship of some of the substances involved. By short-path distillation and fractional crystallization, however, we were able to isolate three distinct antibacterial substances for which we propose the names *rubrogliocladin*, *aurantiogliocladin* and *gliorosein*. These three substances are the main components of the crude solid.

On repeated recrystallization from petrol ether (40–60), alternating with high vacuum sublimation, rubrogliocladin was isolated in dark red needles (garnet-like), m.p.  $74^{\circ}$ .

Analyses of this compound which contains no nitrogen, no halogen and no sulphur were in good agreement with the molecular formula  $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_8$  (Found: C, 60.89, 61.02; H, 6.61, 6.63. Required: C, 60.90; H, 6.64). Rubrogliocladin contains four methoxyl groups (Found: MeO, 30.57. Required: MeO, 30.47). Rubrogliocladin is readily soluble in most organic solvents as well as in water. In alcoholic solution it shows two absorption bands in the ultraviolet; I.  $\lambda_{\text{max}}$  4070 Å,  $\epsilon = 650$ ; II.  $\lambda_{\text{max}}$  2750 Å,  $\epsilon = 22,000$ .

From its chemical properties it is apparent that rubrogliocladin is a quinhydrone of the structure I. On reduction with  $\text{SO}_2$  rubrogliocladin is converted into the corresponding hydroquinone, III, m.p.  $84^{\circ}$ ,  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_4$  (Found: C, 60.53; H, 7.17. Required: C, 60.60; H, 7.12). Further evidence of the quinhydrone nature of rubrogliocladin was gained from a second coloured compound which is contained in the mixture. This compound, aurantogliocladin, is the parent quinone and was obtained in large orange leaflets from petrol ether (40–60), m.p.  $63^{\circ}$ . In conc.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a deep violet colour is produced. Analyses and molecular weight determinations of this compound, which is free from nitrogen, halogen and sulphur, lead to the molecular formula  $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_4$  (Found: C, 61.30; H, 6.18; MeO, 31.47. Required: C, 61.21; H, 6.16; MeO, 31.63 [2]). The ultraviolet absorption spectrum of aurantogliocladin (I.  $\lambda_{\text{max}}$  4070 Å,  $\epsilon = 1200$ ; II.  $\lambda_{\text{max}}$  2750 Å,  $\epsilon = 38,400$ ) is identical with that of rubrogliocladin but the intensity of the former is approximately twice that of the quinhydrone.  $\text{SO}_2$  in aqueous solution reduces aurantogliocladin to a hydroquinone which is identical with III. Rubro- and aurantogliocladin produce, when treated with 2:4-dinitrophenylhydrazine at room temperature, identical mono-dinitrophenylhydrazones, the yield in the case of rubrogliocladin being approximately half that obtained from aurantogliocladin. The dinitrophenylhydrazone, when recrystallized from ethyl acetate, melts at  $243^{\circ}$   $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{O}_7\text{N}_4$  (Found: C, 50.91; H, 4.07; N, 14.49. Required: C, 51.06; H, 4.28; N, 14.89).

Conclusive evidence was adduced for the quinhydrone structure of rubrogliocladin when a mixture containing equal amounts of the hydroquinone (III) and aurantogliocladin (II) was crystallized from petrol-ether (40–60) and a red molecular complex was obtained which is identical with rubrogliocladin. While the function of the oxygen atoms in aurantogliocladin has been established, only further work can reveal the position and the nature of the side-chains.

Finally, a third mould product was isolated in colourless needles, m.p.  $48^{\circ}$ , for which the name gliorosein is proposed. To this compound the molecular formula  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_4$  is assigned (Found: C, 60.59, 60.73; H, 7.28, 7.05; MeO, 31.00. Required: C, 60.60; H, 7.12; MeO, 31.31 [2]). In the ultraviolet it shows the following ab-

<sup>1</sup> All melting points were determined on a Kofler block.

sorption:  $\lambda_{\max}$  2890 Å,  $\epsilon = 24,320$ . Gliorosein, which is isomeric with the hydroquinone (III), does not react with ketonic reagents nor does it give any colour with ferric chloride. It does not decolourise bromine in glacial acetic acid, but its unsaturated character is disclosed by the colour produced with tetranitromethane. It does not form a quinhydrone.

The antibacterial and antifungal activity of these substances has been determined by three methods: a) a spore germination test using spores of the fungus *Botrytis allii*, carried out at pH 3.5; b) a serial dilution ( $\times 2$  steps) test to determine bacteriostatic activity in broth, at pH 7.0; c) an assay of solutions of differing concentration by the conventional cylinder plate technique, using agar seeded with *Bacillus subtilis* spores. The results are presented in the table, all figures being based on experiments in triplicate.

Antibacterial and antifungal activity of the *Gliocladium* antibiotics

| Substance            | Least inhibiting concentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) |                    |                   | Diam. (mm) of inhibition zone in <i>B. subtilis</i> cylinder plate assay |     |     |    |
|----------------------|-----------------------------------------------------|--------------------|-------------------|--------------------------------------------------------------------------|-----|-----|----|
|                      | <i>Botrytis allii</i>                               | <i>B. subtilis</i> | <i>Bact. coli</i> | $\mu\text{g/ml}$                                                         |     |     |    |
|                      |                                                     |                    |                   | 400                                                                      | 200 | 100 | 50 |
| Rubrogliocladin . .  | 50                                                  | 200                | 400               | 21                                                                       | 18  | 16  | 12 |
| Aurantogliocladin .  | 50                                                  | 200                | 400               | 22                                                                       | 19  | 16  | 13 |
| « Hydroquinone III » | 50                                                  | 200                | 400               | 21                                                                       | 18  | 15  | 12 |
| Glorosein . . . . .  | >400                                                | 200                | 400               | 18                                                                       | 15  | 12  | 9  |

The three substances most clearly related chemically, viz. the quinone aurantogliocladin, the quinhydrone rubrogliocladin and the hydroquinone obtained by reduction, are all of similar activity; gliorosein is distinctly less active. It cannot be claimed that the activity of any is of a high order.

P. W. BRIAN, P. J. CURTIS, S. R. HOWLAND, E. G. JEFFERYS, and H. RAUDNITZ.

Imperial Chemical Industries Limited, Butterwick Research Laboratories, Welwyn, England, September 24, 1950.

#### Zusammenfassung

Aus den Kulturfiltraten einer *Gliocladium*-Art lassen sich im wesentlichen drei Substanzen isolieren, und zwar Rubrogliocladin ( $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_8$ ), Aurantogliocladin ( $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{O}_4$ ) und Gliorosein ( $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_4$ ). Alle drei Verbindungen besitzen eine nur geringe antibiotische Wirksamkeit. Im Rubrogliocladin liegt ein Chinhydrone I vor. Diese Molekelverbindung setzt sich aus äquimolaren Mengen des Chinons, Aurantogliocladin II, und des entsprechenden Hydrochinons III zusammen. Letzteres kann leicht durch Reduktion von Rubrogliocladin und Aurantogliocladin erhalten werden. Dieses Hydrochinon stellt eine mit dem natürlich vorkommenden Gliorosein isomere Verbindung dar.

#### Unterdrückung der Brunst (hormonale Kastration) mit Brunststoffen<sup>1</sup>

Die moderne Endokrinologie eröffnete der chemischen Kastration neue Perspektiven und Möglichkeiten. Die

bis heute näher erforschten hormonalen Methoden zur Unterdrückung des Geschlechtstriebes bei weiblichen Tieren bestehen in der Verabreichung von: a) Progestogenen, b) luteinisierenden Gonadotropinen, c) Epiphyseextrakten, d) Antihormonen, e) Androgenen. In der Veterinärpraxis hat sich nur die unter b) angegebene Methode bewährt, ihrer Verbreitung steht aber der hohe Preis der Präparate hindernd im Wege.

Seit mehreren Jahren werden zur hormonalen Kastration männlicher Tiere, insbesondere von Hähnen, Östrogene in großem Ausmaße angewandt. Bei weiblichen Tieren wurde unseres Wissens diese Methode praktisch nicht erprobt, wohl deshalb nicht, weil es *a priori* unwahrscheinlich erschien, mit Brunststoffen die Brunst unterdrücken zu können. Mehr durch einen glücklichen Umstand als durch zielstrebige Forschung stellten wir fest, daß es beim weiblichen Schweine gelingt, den Geschlechtstrieb mittels Östrogenen zu eliminieren. Die nähere Prüfung dieser Frage an insgesamt 144 Schweinen (125 Versuchstiere, 19 Kontrolltiere) der veredelten Bündner Landrasse führte zu folgenden Ergebnissen:

1. Mit Hilfe von Östrogenen (Applikation des Wirkstoffes subkutan hinter den Ohren) ist es möglich, bei weiblichen Schweinen den Geschlechtstrieb zu unterdrücken.

2. Eine Hemmung der Brunst tritt bei Östrogendosen von 5–60 mg nur auf, wenn der Wirkstoff zwischen dem 5.–18. Tag des Brunstzyklus, das heißt während der Corpus-luteum-Phase, verabreicht wird. Die besten Erfolge werden erzielt, wenn der Wirkstoff zwischen dem 7.–13. Tag des Zyklus appliziert wird. Ob größere, während der Follikel- und Corpus-luteum-Anbildungsphase (18.–21. bzw. 1.–4. Zyklustag) verabreichte Hormonmengen auch die gewünschten Erfolge zeitigen, muß durch weitere Versuche eruiert werden.

3. Eine endgültige Abklärung der Dosierungsfrage war nicht möglich. Gute Ergebnisse (Erfolg in rund 90 % der Fälle) erreicht man mit einmaliger Applikation von 30–50 mg, doch genügen sehr oft schon 20 mg, in vereinzelten Fällen sogar bereits 5 mg Wirkstoff.

4. Signifikante Unterschiede in der Wirksamkeit verschiedener Östrogenpräparate (verwendet wurden vor allem Diäthylstilböstrol [verestert und unverestert], Dicarbäthoxydiäthylstilben und Östradioldipropionat) konnten nicht festgestellt werden. Eingehendere diesbezügliche Untersuchungen sind aber angezeigt.

5. Bei juvenilen Tieren kann durch die erwähnten Östrogenmengen die Geschlechtsreife bzw. der Geschlechtstrieb nicht eliminiert werden. Von den geschlechtsreifen Tieren sprechen Muttertiere (nach Beendigung der Laktation) leichter an als virginelle Tiere.

6. Die Dauer der Brunstlosigkeit (Anöstrie) beträgt im allgemeinen mehrere Monate und ist somit für die Ermöglichung einer geordneten Ausmast ausreichend. Da in unseren Versuchen die Beobachtungszeit meistens relativ kurz war (1–3 Monate), konnte die Anöstriedauer nicht sicher abgeklärt werden. In einem Fall betrug die Beobachtungszeit 204 Tage, Brunst trat während dieser Zeit nicht auf.

7. Die Mästbarkeit ist erleichtert und die Körpergewichtszunahme erhöht.

8. Das Ovarialgewicht der behandelten Tiere ist, wie die nachfolgende Zusammenstellung zeigt, höher als dasjenige der Kontrollen.

Die Meßergebnisse wurden mittels des *t*-Testes nach STUDENT-FISHER statistisch geprüft. Die Gewichts-differenzen erwiesen sich als signifikant (Sicherheit 98 %).

<sup>1</sup> Die Arbeit erscheint *in extenso* als Inauguraldissertation von L. CANDINAS.