



Abb. 3. Quantitative Muscarinbestimmung am Straubschen Froschherzen: 25% Lähmung durch $0,0035 \gamma$ Muscarinchlorid (= 1 Muscarineinheit).



Abb. 4. Acetylcholin- (A) und Muscarinchlorid-Wirkungen (M) am Kaninchen- (4a) und Katzendarm (4b).

lenten 0,38 mg/kg, KÖGL ebenfalls bei Esculenten 0,16–0,23 mg/kg.

Der isolierte Kaninchendarm (Ileum) kontrahiert sich bei einer Grenzkonzentration von 10^{-9} . Der Vergleich mit Acetylcholin ergibt eine doppelt so starke Wirkung durch Muscarin auf den Darmtonus des Kaninchens (Abb. 4a), während bei der Katze die Kontraktionen durch Muscarin etwas schwächer als die durch Acetylcholin bewirkten sind (Abb. 4b). KING fand für sein Muscarinchlorid submaximale Kontraktion des Kaninchendarmes mit $6,7 \cdot 10^{-7}$ und einen erkennbaren Effekt mit $6 \cdot 10^{-8}$.

Auch die blutdrucksenkende Wirkung des Muscarinchlorids bei der Katze ist stärker als diejenige des Acetylcholins. Die minimale depressive Dosis beträgt intravenös $0,002 \gamma/\text{kg}$ (Acetylcholin $0,005 \gamma/\text{kg}$). Bei gleichen Mengen wirkt Muscarin etwa doppelt so stark wie Acetylcholin, und die Blutdrucksenkung dauert 2–3mal länger. Die gleiche Blutdrucksenkung tritt auch nach Vagusdurchtrennung auf. Die Atmung wird durch Dosen über $0,02 \gamma/\text{kg}$ gesteigert: das Atemvolumen ist vergrössert, die Frequenz erhöht. Oberhalb $1\gamma/\text{kg}$ wird sie durch Bronchokonstriktion vermindert und steht still nach $10 \gamma/\text{kg}$. Atropin hebt diese tödliche Wirkung auf, so dass sich Atmung und Blutdruck innerhalb einiger Minuten beinahe vollständig erholen. Auch durch Muscarin bedingte Miosis und Speichelbluss werden durch Atropin verhindert.

Die Muskeldplatten werden auch bei diesen grossen Muscarinmengen ($> 10 \gamma/\text{kg}$) nicht beeinflusst, wie auch die Überleitung autonomer Synapsen (Ganglion cervicale superius) unverändert bleibt.

Zusammenfassend kann aus diesen Versuchen die reine, periphere, parasympathomimetische Muscarinwirkung folgendermassen charakterisiert werden: Starke Blutdrucksenkung, auch nach Vagotomie. Verlangsamung der Herztätigkeit bis zum diastolischen Stillstand. Beschleunigung der Atmung, Bronchokonstriktion. Erhöhung des Darmtonus. Fehlen von curare- oder nikotinartiger Wirkung. Der Vergleich der Wirkungsstärke

mit früher beschriebenen Muscarinsalzen anderer Autoren zeigt, dass das untersuchte reine Muscarinchlorid meistens stärker wirksam ist.

Die ausführliche Beschreibung dieser Versuche und weitere chemische und pharmakologische Untersuchungen werden an anderen Stellen veröffentlicht.

Wir danken dem Schweizerischen Nationalfonds und der Fritz-Hoffmann-La Roche-Stiftung zur Förderung wissenschaftlicher Arbeitsgemeinschaften in der Schweiz für die Unterstützung dieser Arbeit.

C. H. EUGSTER und P. G. WASER

Chemisches Institut und Pharmakologisches Institut der Universität Zürich, den 22. April 1954.

Summary

The alkaloid muscarin was isolated from fly agaric. The analyses of crystallized salts (chloride, tetra-chloroaurate, REINECKE's salt) led to $\text{C}_9\text{H}_{20}\text{O}_2\text{N}^+$ as the simplest formula. The presence of aldehyde and tri-methylammonium groups, which had been assumed hitherto, could not be proved. The quaternary nature of the nitrogen atom was shown. Pharmacological tests on frog heart, rabbit gut and cats show the purely peripheral parasympathomimetic effect of the smallest doses.

Über die Molekulargrösse des Hämovanadins¹

(Untersuchungen über den vanadiumhaltigen Blutfarbstoff, III)

Hämovanadin, der von MARTIN HENZE² in *Phallusia mammillata* Cuvier entdeckte, vanadiumhaltige Blutfarbstoff.

¹ Dem Entdecker des Hämovanadins zum 80. Geburtstag gewidmet.

² M. HENZE, Z. physiol. Chem. 72, 494 (1911).

stoff von Aszidien ist nach unseren Untersuchungen¹ ein Sulfatkomplex des 3wertigen Vanadiums in chromoproteidartiger Bindung. Bei der Hämolyse der Blutzellen, die praktisch das gesamte Vanadium der Tiere enthalten², geht das Hämovanadin mit brauner Farbe in Lösung. Es lässt sich aus dem mit destilliertem Wasser bereiteten Hämolsat (Henzelösung) mit reinem Azeton in einem braunen Präzipitat niederschlagen³. Wegen ihrer Schwerlöslichkeit in Wasser eignen sich weder das braune Präzipitat noch die das Vanadium in der 4wertigen Stufe enthaltenden Oxydations- und Abbauprodukte des Hämovanadins (HENZES Chromogen, blaugrünes und grünes Präzipitat)⁴ zur Molekulargewichtsbestimmung. Wir haben daher zur Ermittlung der Molekulargrösse des Hämovanadins die Henzelösung herangezogen. Gemessen wurde die Diffusionsgeschwindigkeit nach den Angaben von NORTHRUP und ANSON⁵, einer Methode, die sich besonders für Substanzen eignet, welche nicht völlig rein von unspezifischen Begleitstoffen erhalten werden können, wie dies offenbar beim braunroten Hämovanadin in der Henzelösung der Fall ist. Aus dem Diffusionskoeffizienten erhält man mit Hilfe der Einsteinschen Gleichung⁶ den Molekeleradius sphärischer Moleküle und daraus das Molekulargewicht.

Methode, Apparatur und Eichung. Als Diffusionszelle (28,4 ml) diente ein Schottisches Glasfilter G 3 (poröse Membran $2,5 \times 30$ mm), das am oberen Ende mit einem Hahn verschlossen werden konnte. Die Zelle tauchte in eine Vorlage mit dem Lösungsmittel, das durch Überleiten von reinem Kohlendioxyd [Entfernung des O_2] mittels einer Lösung von Vanadin(II)-sulfat] sauerstofffreies Arbeiten gestattete. Zur Eichung der Apparatur, die nur relative Diffusionskoeffizienten liefert, haben wir 1n NaCl benutzt, dessen Diffusionskoeffizienten ÖHOLM⁷ zu $D_{50} = 83,3 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ bestimmt hat. Gemessen wurde die Menge an diffundiertem Natriumchlorid durch Titration der Chlorionen nach den Angaben von VOLHARD⁸. Mit der von NORTHRUP und ANSON⁹ abgeleiteten Gleichung ergab sich daraus für eine Messtemperatur von 5°C eine Apparatekonstante $K = D \cdot t/Q_{\text{ml}} = 0,0535 \pm 0,0010$ (Tab. I).

Tabelle I. Eichung der Diffusionszelle mit 1n NaCl-Lösung.

Diffusionsdauer t s	ml Ausgangslösung diffundiert Q_{ml}	Apparatekonstante K bei 5°C
210	0,0321	0,0545
140	0,0218	0,0535
240	0,0381	0,0525
180	0,0282	0,0532

¹ H.-J. BIELIG und E. BAYER, Liebigs Ann. Chem. 580, 135 (1953). – H.-J. BIELIG, E. BAYER, L. CALIFANO und L. WIRTH, Pubbl. Staz. Zool. Napoli 25, 26 (1954).

² H. BALTSCHEFFSKY und M. BALTSCHEFFSKY, Pubbl. Staz. Zool. Napoli 24, 447 (1953).

³ M. HENZE, Z. physiol. Chem. 79, 215 (1912).

⁴ H.-J. BIELIG, E. BAYER, L. CALIFANO und L. WIRTH, Pubbl. Staz. Zool. Napoli 25, 26 (1954). – L. CALIFANO und P. CASELLI, Pubbl. Staz. Zool. Napoli 21, 235 (1948).

⁵ J. H. NORTHRUP und M. L. ANSON, J. Gen. Physiol. 12, 543 (1929). – M. L. ANSON und J. H. NORTHRUP, J. Gen. Physiol. 20, 575 (1937).

⁶ A. EINSTEIN, Z. Elektrochemie 14, 235 (1908).

⁷ L. W. ÖHOLM, Z. physikal. Chem. 50, 309 (1905).

⁸ J. VOLHARD, J. prakt. Chem. 117, 217 (1874).

⁹ J. H. NORTHRUP und M. L. ANSON, J. Gen. Physiol. 12, 543 (1929).

Um sicher zu sein, dass die mit Natriumchlorid gewonnene Apparatekonstante K auch für hochmolekulare Substanzen (Proteine) gilt, haben wir zunächst die Diffusionskonstanten von kristallisiertem Oxyhämoglobin aus Rinderblut¹ und von Zytochrom c aus Rinderherz² mit der angegebenen Apparatur bei 5°C an Luft bestimmt. Gemessen wurden die diffundierten Mengen an Zytochrom c kolorimetrisch nach JUNOWICZ-KOCHOLATY und HOGNESS³, an Hämoglobin durch Vergleich der Extinktionen bei 540 und 575 μm zwischen der Ausgangslösung und der jeweiligen Lösung in der Vorlage nach der Diffusion. Als Diffusionskoeffizienten und als Molekeleradien ergaben sich für Hämoglobin $D_{50} = 4,99 (\pm 0,10) \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$; $r = 2,66 \cdot 10^{-7} \text{ cm}$ und für Zytochrom c $D_{50} = 8,29 (\pm 0,20) \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$; $r = 1,60 \cdot 10^{-7} \text{ cm}$. Diesen Werten entsprechen die folgenden Molekulargewichte: Hämoglobin $M = 64\,200 \pm 3\,000$ (für $d_4 = 1,33$); Zytochrom c $M = 13\,600 \pm 1\,300$ (für $d_4 = 1,30$). Die so auf der Eichbasis NaCl gefundenen Molekulargewichte stehen in guter Übereinstimmung mit dem für Säugetierhämoglobin angegebenen mittleren Molekulargewicht von 67 000 (Rinderhämoglobin aus Osmoseversuchen⁴) und dem für Zytochrom c aus Sedimentationsdaten berechneten Molgewicht von 13 200⁵.

Hämovanadinslösung und -bestimmung. Die zur Molekulargewichtsbestimmung des braunroten Hämovanadins benutzte Henzelösung, die frisch ein pH von 2,5–2,8 aufweist, haben wir aus gewaschenen Blutzellen von *Phallusia mamillata* durch Hämolyse mit destilliertem Wasser nach unseren früheren Angaben⁶ dargestellt. Einwandfreie Präparate erhält man nur aus frisch gefangenen Tieren bei raschem Arbeiten, da die mit der Oxydation des Hämovanadins aus dem Komplex freiwerdende Schwefelsäure zur Abspaltung von Protein und unterhalb von pH 2 zur Lösung der komplexen Bindung des Vanadiums führt (denaturiertes Hämovanadin⁷). Als Lösungsmittel in der Vorlage verwendete man eine der Henzelösung im pH entsprechende Schwefelsäure. Die Diffusion geschah unter sauerstofffreiem Kohlendioxyd bei 5°C. Den relativen Hämovanadin gehalt bestimmte man sicherer als durch Vergleich der Extinktionen beim Wendepunkt der Absorptionskurve im Gebiete von 420 μm durch spektrophotometrische Messung der jeweiligen Vanadindosis in Form des roten Hydroxo-oxo-di(8-oxychinolino)-vanadins(V)⁸.

In Tabelle II sind die Ergebnisse unserer Diffusionsversuche mit Henzelösungen von verschiedenem pH und verschiedener Konzentration an braunrotem Hämovanadin eingetragen. Hieraus ergibt sich, dass das braunrote Hämovanadin im pH-Bereich von 2,5–2,8 einen mittleren Diffusionskoeffizienten von $D_{50} = 6,87 (\pm 0,17) \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ und einen Molekeleradius von

¹ Dargestellt nach den Angaben bei P. B. HAWK, B. L. OSER und W. H. SUMMERSON, *Practical Physiological Chemistry*, 12. Aufl. (The Blakiston Comp., New York 1947), S. 441.

² Bereitet nach D. KEILIN und L. F. HARTREE, Proc. Roy. Soc. London B 122, 298 (1937).

³ R. JUNOWICZ-KOCHOLATY und T. R. HOGNESS, J. biol. Chem. 129, 569 (1939).

⁴ J. ROCHE, A. ROCHE, G. S. ADAIR und M. E. ADAIR, Biochem. J. 26, 1811 (1932).

⁵ K. O. PEDERSEN, unveröffentlicht. Zitiert nach K. G. PAUL in J. B. SUMNER und K. MYRBÄCK, *The Enzymes* II, 1 (Academic Press, New York 1951), S. 375.

⁶ H.-J. BIELIG, E. BAYER, L. CALIFANO und L. WIRTH, Pubbl. Staz. Zool. Napoli 25, 26 (1954).

⁷ H.-J. BIELIG, E. BAYER, L. CALIFANO und L. WIRTH, Pubbl. Staz. Zool. Napoli 25, 26 (1954).

⁸ H.-J. BIELIG, E. BAYER, L. CALIFANO und L. WIRTH, Pubbl. Staz. Zool. Napoli 25, 26 (1954). – H.-J. BIELIG und E. BAYER, Liebigs Ann. Chem. 584, 96 (1953).

$r = 1,93(\pm 0,05) \cdot 10^{-7}$ cm aufweist. Unter Annahme eines spezifischen Gewichtes von $d_4 = 1,33$ ergibt sich danach für das Hämovanadin in der Henzelösung ein Molekulargewicht von $24\,400 \pm 1\,900$.

Tabelle II

Diffusionskoeffizient und Molgewicht von braunrotem Hämovanadin. Henzelösung I: pH = 2,5; 277 γ Vanadium/ml. Henzelösung II: pH = 2,8; 144,5 γ Vanadium/ml.

Probe	Diffusionsdauer t s	ml Ausgangslösung diffundiert Q_{ml}	Diffusionskoeffizient $D \cdot 10^7$ bei 5°C	Molekellradius $r \cdot 10^7$ cm	Molekulargewicht M
I	86 400	1,14	7,06	1,88	22 500
	86 400	1,08	6,78	1,96	25 500
	86 400	1,10	6,71	1,98	26 200
II	129 600	1,66	6,85	1,94	24 700
	138 600	1,80	6,95	1,91	23 500
	164 700	2,14	6,93	1,92	23 900

Die Konstanz von Q_{ml} in der Zeiteinheit bei den verschiedenen Versuchen macht es unwahrscheinlich, dass in der Henzelösung mehrere, sich im Molekulargewicht wesentlich unterscheidende, vanadiumhaltige Chromoproteide vorkommen. In Übereinstimmung mit der Empfindlichkeit des Hämovanadins gegen pH-Werte unterhalb 2,5 wurden bei Diffusionsversuchen mit einem schwach angesäuerten Hämolsat ($\text{pH} = 2,2$) Molekulargewichte gefunden, die um etwa eine Zehnerpotenz niedriger lagen als die oben angegebenen Werte für nichtdenaturiertes, braunrotes Hämovanadin.

Nimmt man an, dass das braunrote Hämovanadin in der Henzelösung denselben Vanadiumgehalt hat wie das aus dieser Lösung mit Azeton gefällte braune Präzipitat, nämlich 4,58 % V, so enthält 1 Molekül braunrotes Hämovanadin etwa 24 Atome Vanadium.

Die Versuche am Hämovanadin wurden von Oktober bis Dezember 1953 an der Zoologischen Station Neapel ausgeführt, den wir für ihre grosszügige Unterstützung herzlich danken. Den Aufenthalt in Italien ermöglichte uns eine Zuwendung des Consiglio Nazionale delle Ricerche in Rom. Die Deutsche Forschungsgemeinschaft förderte die Arbeit durch ein E. BAYER gebotenes Stipendium.

H.-J. BIELIG und E. BAYER

Max-Planck-Institut für medizinische Forschung,
Institut für Chemie, Heidelberg, den 27. April 1954.

Summary

The red-brown haemovanadin which is contained in the haemolysate (Henze Solution) of blood cells of the ascidia *Phallusia mammillata* Cuvier is a chromoprotein with trivalent vanadium as the central atom and sulphuric acid bound coordinatively. It is found to have a molecular weight of $24,400 \pm 1,900$ according to the estimation of the diffusion coefficient ($D_{5^\circ} = 6 \cdot 87 \pm 0 \cdot 2 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ at pH 2,5–2,8).

Über die Natur des Leberglykogens normaler und diabetischer Tiere unter verschiedenen Bedingungen

Die zahlreichen Untersuchungen über den Glykogenstoffwechsel im diabetischen Organismus beschäftigen sich ausschliesslich mit der Menge, nicht aber mit der

Natur des gebildeten Polysaccharids. Die Befunde, die wir bei unseren Untersuchungen über den Gehalt der Leber und des Muskels an Hexosephosphorsäuren beim normalen und diabetischen Tiere erhielten¹, veranlassten uns, diese Frage zu prüfen.

Untersucht wurde die Absorption des Jod-Glykogen-Komplexes in halbgesättigter Ammoniumsulfatlösung nach SCHLAMOWITZ², in halbgesättigter Natriumsulfatlösung und in wässriger Lösung, die Aufspaltungskurve des Glykogens bei der Hydrolyse in n HCl sowie die Zahl der Endgruppen nach der Methode von POTTER und HASSID³. Das Glykogen wurde nach den Angaben von SCHLAMOWITZ⁴ isoliert, mit dem Unterschied, dass wir zur Extraktion nicht nur 5 %ige, sondern auch 30 %ige Trichloressigsäure benützten und dass wir vor der Essigsäurefällung die wasserunlöslichen Stoffe durch Zentrifugieren entfernten. Die Reinheit des Glykogens bestimmten wir durch Reduktion nach $2 \frac{1}{4}$ h Hydrolyse in n HCl nach HAGEDORN-JENSEN⁵ und nach NELSON⁶, den Phosphatgehalt nach FISKE und SUBARROW⁷. Es wurden hauptsächlich Ratten von 160 bis 200 g Körpergewicht benutzt. Die alloxandiabetischen Tiere wurden 15–20 Tage nach der Verabreichung des Alloxans (15 mg/100 g Körpergewicht subkutan) verwendet; die Glukoseausscheidung betrug bei konstanter Nahrungsaufnahme täglich 6,0–8,5 g. Das Leberglykogen wurde nach Fütterung mit gemischter Diät, bei hungernden Tieren (Normaltiere 24 h, diabetische 36 h) nach Zufuhr von Glukose, Fruktose und Sorbose untersucht. Jede Versuchsserie wurde an 3–7 Tieren ausgeführt. Daneben wurde das Leberglykogen nach Glukosefütterung² auch bei einem normalen, 2 kg schweren und bei einem diabetischen Kaninchen untersucht, das 20 Tage vorher intravenös 80 mg/kg Körpergewicht Alloxan erhalten hatte und dessen Blutzucker 550 mg % betrug.

Zunächst haben wir in halbgesättigter Ammoniumsulfatlösung die Jod-Glykogen-Absorptionskurve des Leberglykogens des normalen, mit Glukose gefütterten Kaninchens aufgenommen. Wie aus der Abbildung 1 hervorgeht, erhielten wir denselben Kurvenverlauf wie SCHLAMOWITZ² mit einem Absorptionsmaximum bei etwa 496 m μ . Das Leberglykogen der Ratte nach Glukosefütterung ergibt unter gleichen Bedingungen annähernd denselben Kurvenverlauf wie dasjenige des Kaninchens (Abb. 1). Das Maximum liegt ebenfalls bei 496 m μ , doch ist die Absorptionsintensität geringer (in halbgesättigtem Natriumsulfat ist die Absorption grösser und die Farbe stabiler als in halbgesättigtem Ammoniumsulfat). Bei den Versuchen mit alloxandiabetischen Ratten unter gleichen Bedingungen sind 2 Feststellungen hervorzuheben: 1. die Absorptionsintensität ist wesentlich geringer als beim Normaltier; 2. es besteht eine Verschiebung des Maximums nach dem kürzeren Wellenbereich (480 m μ , Abb. 1). Dementsprechend ist auch die Farbe des Jod-Glykogen-Komplexes in halbgesättigter Ammoniumsulfatlösung bei alloxandiabetischen Tieren anders als bei normalen, braungelb beim diabetischen, rot beim normalen. Die Untersuchung des Leberglykogens des diabetischen Kaninchens zeigte gleiche Verhältnisse (Abb. 1). Die Unterschiede in Absorption und Farbe zwischen Jod-Glykogen-Komplex

¹ E. DUPASQUIER und L. LASZT (im Druck).

² M. SCHLAMOWITZ, J. biol. Chem. 190, 519 (1951).

³ A. L. POTTER und W. Z. HASSID, J. Amer. Chem. Soc. 70, 9488 (1948).

⁴ M. SCHLAMOWITZ, J. biol. Chem. 188, 145 (1951).

⁵ H. C. HAGEDORN und B. N. JENSEN, Biochem. Z. 135, 46 (1923); 137, 92 (1923).

⁶ N. NELSON, J. biol. Chem. 153, 375 (1944).

⁷ G. H. FISKE und Y. SUBARROW, J. biol. Chem. 66, 375 (1925).