

The overall heat of reaction calculated by the Van't-Hoff equation between 20° and 40° was found to be: for Mb I $\Delta H = -13.500$ cal., and for Mb II $\Delta H = -13.300$ cal.

The results we have obtained show that the dissociation curves for Mb I and Mb II are very similar. The figures given for the minor component (Mb II) are highly interesting. This pigment shows all the properties

t °C	log K		$p \frac{1}{2}$ (mm Hg)	
	Mb I	Mb II	Mb I	Mb II
20	+ 0.18	+ 0.19	0.66	0.65
25	+ 0.03	+ 0.04	0.93	0.91
30	- 0.13	- 0.11	1.35	1.29
35	- 0.28	- 0.23	1.91	1.70
40	- 0.47	- 0.42	2.95	2.63

Values of log K and $p \frac{1}{2}$ for human Mb I and Mb II at different temperatures. $K = \text{MbO}_2/\text{Mb} \cdot p\text{O}_2$; $p \frac{1}{2}$ = oxygen pressure (at 20° C) for 50% saturation.

of a myoglobin: reversible combination with oxygen, shape of the dissociation curve, and affinity for O_2 , so that we must definitely give up the thought that we are dealing with an impurity or an artefact.

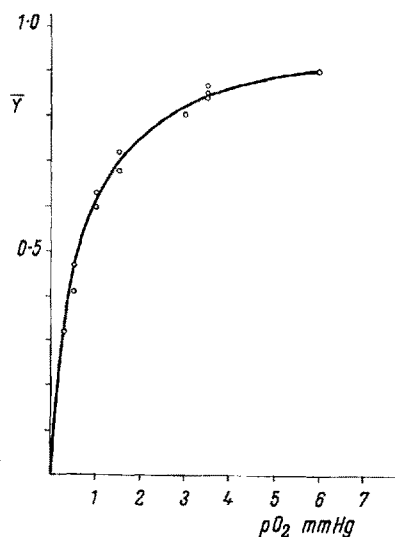


Fig. 3.—Oxygen dissociation curve of human Mb II ($4 \times 10^{-5} M$) at 20° and pH 8; $p \frac{1}{2} = 0.65$ mm Hg; $Y = \text{MbO}_2/\text{Mb} + \text{MbO}_2$.

As far as the two Mb are concerned, and we have demonstrated their presence also in the muscle extract, we can state that they are perfectly equivalent in their most typical physiological property: that is, the reversible combination with O_2 . We must reject the hypothesis that Mb II is a residue of foetal Mb; experiments which we have carried out demonstrate that foetal Mb cannot be separated in electrophoresis from adult Mb, and that the preparations of foetal Mb show the presence of several components which have electrophoretic characteristics similar to those found in adult Mb.

The above results show that studies (also with spectrophotometric methods) on the equilibrium between human Mb and O_2 can be rightly based on non-homogeneous crystallized pigment particularly because Mb I and Mb II have identical absorption spectra.

Research on the structure of the pigment must, on the other hand, be based on homogeneous preparations. Results of the preliminary research which we have

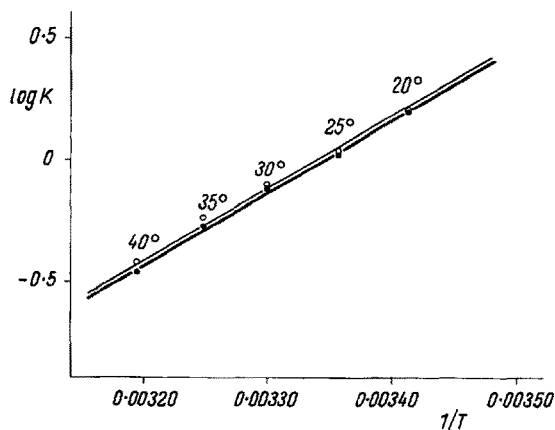


Fig. 4.—Influence of temperature on oxygen affinity of human Mb I = ● and Mb II = ○; pH 8, borate buffer 0.05; $K = \text{MbO}_2/\text{Mb} \cdot p\text{O}_2$.

carried out lead us to think that the two Mb have different chemical natures, as seems to be the case with horse-Mb⁷.

Research along this line is in progress in our Institute.

A. ROSSI-FANELLI and E. ANTONINI

Institute of Biological Chemistry, University of Rome (Italy), August 5, 1957.

Riassunto

Dalla mioglobina umana cristallizzata sono stati isolati, a mezzo dell'elettroforesi su gel di amido, due componenti puri ed omogenei: Mb I e Mb II. Dei due componenti sono state determinate, in varie condizioni sperimentali, le curve di dissociazione per l'ossigeno.

⁷ H. T. THEORELL and A. AKESON, *Ann. Acad. Sci. fenn.* 60, 303 (1955). — H. THEORELL, Personal Communication.

Über die Alkaloide von *Rauwolfia ligustrina* R. & S. Raugustin, ein neues reserpinähnliches Alkaloid*

Von den amerikanischen *Rauwolfia*-Arten sind bis heute ausser *R. sellowii* Muell.-Arg.², *R. grandiflora* Mart.³ und *R. schueli* Speg.⁴ hauptsächlich die nach der neuen Klassifikation von RAO⁵ unter der Bezeichnung

* 30. Mitteilung über *Rauwolfia*-Alkaloide¹.

¹ 29. Mitteilung siehe C. F. HUEBNER und E. SCHLITTLER, *J. Amer. chem. Soc.* 79, 250 (1957).

² F. A. HOCHSTEIN, *J. Amer. chem. Soc.* 77, 5744 (1955). — S. C. PAKRASHI, C. DJERASSI, R. WASICKY und N. NEUSS, *J. Amer. chem. Soc.* 77, 6687 (1955).

³ W. B. MORS und P. ZALTZMAN, *Chem. and Ind.* 1956, 173.

⁴ G. IACOBUCCI und V. DEULOFEU, *J. org. Chem.* 22, 94 (1957).

⁵ A. S. RAO, *A Revision of Rauwolfia with Particular Reference to the American Species* (Diss.), *Annals of the Missouri Botanical Garden* 43, 253 (1956).

R. tetraphylla L.⁸ zusammengefassten Varietäten chemisch untersucht worden⁷. Über *R. indecora* Woodson⁸ und *R. ternifolia* H.B.K.⁹, welche nach RAO¹⁰ zusammen mit *R. alphonsiana* Muell.-Arg. und *R. parvifolia* Bert. ex Spreng. und ihren Varietäten heute als *R. ligustrina* R. & S. bezeichnet werden müssen, sind nur unvollständige Angaben bekannt. Erst in jüngster Zeit haben diese durch die papierchromatographischen Untersuchungen von KORZUN *et al.*¹¹ eine gewisse Erweiterung erfahren.

Wie die nahe verwandte *R. tetraphylla*, so besitzt auch *R. ligustrina* ein unerwartet reichhaltiges Alkaloidspektrum¹². Neben Reserpin haben wir durch fraktionierte Extraktion, Chromatographie und Gegenstromverteilung die bereits bekannten Alkaloide Tetrahydroalstonin, Aricin, Ajmalicin, Isoreserpin, Isoreserpinin, Reserpinin, Deserpidin, Pseudoreserpin, α -Yohimbin, Ajmalin, Sarpagin, Serpentin, Serpentin und ein bisher unbekanntes Alkaloid, das wir *Raugustin* nennen, isoliert. Papierchromatographisch liessen sich ausserdem in geringen Mengen Rescinnamin, Isoreserpin, Renoxydin¹³, Raunescine, Isoraunescine, Yohimbin und einige seiner Isomeren, sowie noch vier bisher nicht identifizierte Basen nachweisen¹⁴. Die Ausbeute an kristallisiertem Reserpin beträgt nach sorgfältigem Chromatographieren der Mutterlaugen 0,085%. Mit einem Gehalt von etwa 1% des Gewichtes der lufttrockenen Wurzeln stellt Reserpin das Hauptalkaloid dar.

Die Isolierung des neuen Alkaloides Raugustin neben der schon bekannten Base Pseudoreserpin¹⁵ und der nachgewiesene Gehalt an Raunescine und Isoraunescine¹⁶ lenkten unsere Aufmerksamkeit auf die Gruppe der an den Hydroxylfunktionen unvollständig methylierten reserpinähnlichen Basen. Wie HOSANSKY und SMITH¹⁷ vermutet und HUEBNER und SCHLITTLER¹ bewiesen haben, bilden Raunescine (I) und Isoraunescine (II) ein Paar von Isomeren, welche je eine freie Hydroxylgruppe

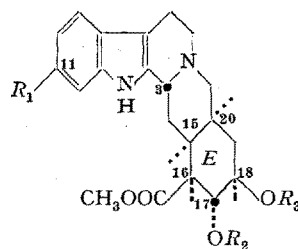
im Ring E enthalten und sich einzig durch verschiedene Verknüpfungsstellen der esterartig gebundenen 3,4,5-Trimethoxybenzoesäure unterscheiden. Ihr Ringgerüst entspricht in seinem sterischen Bau demjenigen des Deserpidins⁷ (III).

Tabelle I

	R ₁	R ₂	R ₃
Raunescine (I)	H	H	Tmb
Isoraunescine (II)	H	Tmb	H
Deserpidin (III)	H	CH ₃	Tmb
Pseudoreserpin (IV)	OCH ₃	H	Tmb
Raugustin (V)	OCH ₃	Tmb	H
Reserpin (VI)	OCH ₃	CH ₃	Tmb

Tmb = 3,4,5-Trimethoxybenzoyl-Rest

Auf Grund der nachfolgenden Daten nehmen wir eine analoge Strukturbeziehung für die drei am Kohlenstoffatom 11 methoxylierten Basen Pseudoreserpin (IV), Raugustin¹⁸ (V) und Reserpin (VI) an.



Raugustin befindet sich wie die andern Alkaloide der Reserpingruppe in der Fraktion der schwachen Basen und wird durch Chromatographie an Aluminiumoxyd und Reinigung über das schwerlösliche Nitrat gewonnen. Auf Grund der Analysenwerte für die Base und das Nitrat (Tabelle II) ergibt sich die Bruttoformel C₃₂H₃₈O₉N₂·(H₂O) für Raugustin. Es besitzt 5 O-Methyl-, keine N-Methyl- und keine C-Methyl-Gruppen, ferner 2 aktive Wasserstoffatome (NH, OH). Die optische Drehung, $[\alpha]_D^{25}$ beträgt -50° ($\pm 4^\circ$), ($c = 0,609$ in Chloroform).

Das Ultraviolett-Absorptionsspektrum in Alkohol zeigt die beim Reserpin und Pseudoreserpin beobachteten Maxima bei 217 m μ ($\epsilon = 54600$) und 268 m μ ($\epsilon = 15400$), die Schulter bei 291 m μ ($\epsilon = 9300$ m μ) und ein ausgeprägtes Minimum bei 246 m μ ($\epsilon = 9000$), welche für das gleichzeitige Vorhandensein einer 6-Methoxyindol-Gruppierung und eines 3,4,5-Trimethoxybenzoyl-Restes charakteristisch sind¹⁹.

Wie beim Isomerenpaar Raunescine und Isoraunescine, so besteht auch für Pseudoreserpin und Raugustin eine weitgehende Übereinstimmung der Infrarot-Spektren. Ausser einer schwachen Absorptionsbande bei 2,77 μ , welche einer freien Hydroxylgruppe zugeschrieben wird,

¹⁸ Die Bezeichnung «Iso-pseudoreserpin», welche in Analogie zu «Iso-raunescine» ursprünglich vorgesehen war, lässt sich heute nicht mehr verwenden, weil in der neueren Alkaloidforschung die Silbe «Iso-» für die am Kohlenstoffatom 3 epimere Verbindungsreihe gebräuchlich ist und von M. W. KLOHS *et al.* in diesem Sinne auch schon benützt worden ist. Korrekterweise müsste auch der Name Isoraunescine abgeändert werden.

¹⁹ L. DORFMAN *et al.*, Helv. chim. Acta 37, 59 (1954).

⁸ A. S. RAO, Annals of the Missouri Botanical Garden 43, 285 (1956): Mit *R. tetraphylla* L. sind unter anderem synonym *R. hirsuta* Jacq., *R. canescens* L., *R. heterophylla* R. & S., *R. tomentosa* Jacq. usw.

⁷ Eine Zusammenstellung der diesbezüglichen Literatur befindet sich zum Beispiel bei *Rauwolfia: Botany, Pharmacognosy, Chemistry and Pharmacology* by R. E. WOODSON, JR., H. W. YOUNGKEN, E. SCHLITTLER und J. A. SCHNEIDER (Verlag Little, Brown & Company, Boston, Toronto, 1957).

⁸ M. ISHIDATE, M. OKADA und K. SAITO, Pharm. Bull. (Japan) 3, 320 (1955).

⁹ H. T. CARDOSO und I. A. A. VENANCIO, Rev. bras. Biol. 16 (2), 231 (1956).

¹⁰ A. S. RAO, A Revision of *Rauwolfia* with Particular Reference to the American Species (Diss.), Annals of the Missouri Botanical Garden 43, 299 (1956).

¹¹ B. P. KORZUN, A. F. ST. ANDRÉ und P. R. ULSHAFFER, J. Amer. pharm. Ass. (im Druck).

¹² Das Material wurde in verdankenswerter Weise von Prof. A. DUCKE, Fortaleza und Dr. D. DE ANDRADE LIMA, Recife, Brasilien, gesammelt und identifiziert.

¹³ P. R. ULSHAFFER, W. I. TAYLOR und R. H. NUGENT, C. R. Acad. Sci., Paris 244, 2989 (1957), Renoxydin = Reserpin-N-oxyd.

¹⁴ Über Einzelheiten der Auftrennung des Alkaloidgemisches und die papierchromatographische Arbeitsmethode wird später berichtet.

¹⁵ M. W. KLOHS, F. KELLER, R. E. WILLIAMS und G. W. KUSSELOW, Chem. and Ind. 1956, 187; J. Amer. chem. Soc. 79, 3763 (1957).

¹⁶ N. HOSANSKY und E. SMITH, J. Amer. pharm. Ass. 44, 639 (1955). – C. F. HUEBNER und E. SCHLITTLER, J. Amer. chem. Soc. 79, 250 (1957). – Vgl. auch: E. E. VAN TAMELEN und C. W. TAYLOR, J. Amer. chem. Soc. 79, 5256 (1957). (Anmerkung bei der Korrektur.)

¹⁷ N. HOSANSKY und E. SMITH, J. Amer. pharm. Ass. 44, 639 (1955).

Tabelle II

	Schmelzpunkte (alle korrigiert)	Elementaranalyse			
			C %	H %	N %
Raugustin-Hydrat $C_{32}H_{38}O_9N_2 \cdot H_2O$	160–170° (Zers.) (im Vakuumröhrchen)	Ber. Gef.	62,73 62,52	6,58 6,87	4,57 4,51
Raugustin-Nitrat $C_{32}H_{38}O_9N_2 \cdot HNO_3$	262–263° (Zers.) (im Vakuumröhrchen)	Ber. Gef.	58,44 58,68	5,98 6,08	6,39 6,38
Monoacetyl-Raugustin $C_{34}H_{40}O_{10}N_2$	232–234° (Zers.) (Kofler-Block)	Ber. Gef.	64,14 63,93	6,33 6,22	4,40 4,34
1 Acetyl: Ber. 2,36; Gef. 2,55%.					

deckt sich das IR-Spektrum des neuen Alkaloides im kürzerwelligen Teil vollständig mit demjenigen des Reserpins. Chemisch lässt sich diese Hydroxylgruppe durch die Bildung eines O-Acetylderivates (vgl. Tabelle II) mit Acetanhydrid in Pyridin nachweisen.

Einen konfigurativen Hinweis vermittelt das IR-Spektrum durch die Gestalt der Absorptionsbande bei 3,4 μ , welche auf ihrer längerwelligen Seite eine schwach ausgebildete Schulter aufweist. Sie deutet darauf hin, dass das Kohlenstoffatom 3 entsprechend der von WENKERT und ROYCHAUDHURI²⁰ beobachteten Gesetzmässigkeit die β -Konfiguration besitzt.

Gewisse physikalisch-chemische und biologische Eigenschaften des Raugustins erhärten seine strukturelle Verwandtschaft mit dem Isoraunescin. So verhalten sich, zum Beispiel, beide Basen praktisch gleichartig gegenüber Zweiphasen-Verteilungssystemen und bei der Papierchromatographie. Andererseits haben pharmakologische Versuche gezeigt, dass Raugustin²¹ wie Isoraunescin¹ nicht reserpinähnlich wirkt, insbesondere keine sedativ-hypnotische Wirkung besitzt. Beide Tatsachen legen nahe, dass auch bei unserem neuen Alkaloid die Verknüpfungsstelle des 3,4,5-Trimethoxybenzoyl-Restes nicht derjenigen der biologisch wirksamen Verbindungen I, III, IV und VI entspricht und dieser sich wohl in Stellung 17 befindet.

Alle bis heute bekannten Eigenschaften stützen die für Raugustin vorgeschlagene Strukturformel V, wenn auch für die Konfiguration der Asymmetriezentren C 15, 16, 17, 18 und 20 noch keine hinreichenden Beweise bestehen. Zur Abklärung dieser Frage haben wir versucht, unser Alkaloid in ein mit Pseudoreserpin gemeinsames Abbauprodukt überzuführen. Da letztere Verbindung das Ringgerüst des Reserpins besitzt²², wäre bei Identität der Reaktionsprodukte die Konstitution des Raugustins ebenfalls bewiesen.

Für die Methanolyse der beiden Alkaloide stand jedoch nur sehr wenig Material zur Verfügung, und es gelang jeweils nur, die 3,4,5-Trimethoxybenzoesäure, nicht aber das Methylpseudoreserpat in kristallisierter Form zu isolieren. Sobald mehr Ausgangsmaterial vorhanden ist, soll dieser Identitätsnachweis durch direkten Vergleich der stickstoffhaltigen Komponenten noch erbracht werden.

J. M. MÜLLER

Forschungslaboratorien der CIBA Aktiengesellschaft,
Pharmazeutische Abteilung, Basel, 24. September 1957.

²⁰ E. WENKERT und D. K. ROYCHAUDHURI, J. Amer. chem. Soc. 78, 6417 (1956).

²¹ Die pharmakologischen Prüfungen wurden in der Biologischen Abteilung der CIBA AG durchgeführt und seien Herrn PD Dr. H. J. BEIN bestens verdankt.

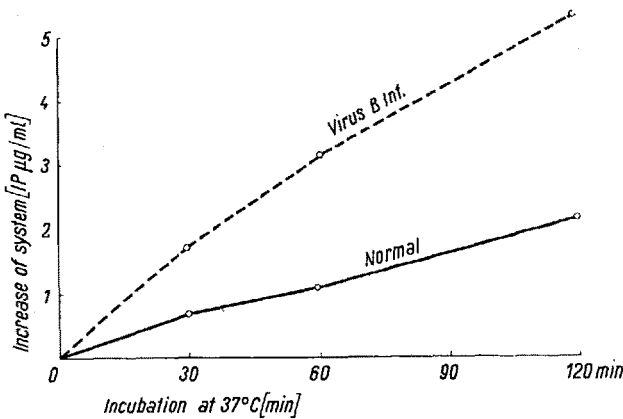
²² M.W. KLOHS, F. KELLER, R. E. WILLIAMS und G.W. KUSSEROW, J. Amer. chem. Soc. 79, 3763 (1957).

Summary

Twenty-one alkaloids have been identified from the root of *Rauwolfia ligustrina* R. & S. The more important ones are reserpine, pseudoreserpine and raugustine, a new base which is isomer to pseudoreserpine. The structure of the latter compound is discussed.

The Effect of Virus B on Enzyme-Systems
of the Host, *in vivo* and *in vitro*¹

Virus B was first isolated and thoroughly studied by SABIN². For the present study rabbits were infected intracerebrally or intramuscularly with 0.2 ml of $1/100$ diluted infected tissue culture (TC) fluid. The animals were killed after exhibiting typical symptoms of the disease³. Fluids of Maitland-type of cultures, suspect for harboring virus B, were inoculated into TC of Rhesus kidney cortex and incubated for 6 days at 37°C; repeated subcultures helped to reach the final diagnosis. Supernatant of centrifuged brain homogenates (2000 r.p.m. for 10 min) of 4 animals and roller tube TC (6 batches) were assayed⁴. Standard techniques served for enzyme determinations⁵. Table I shows typical results. The decrease of common phosphomonoesterases and DNA-ases was in contrast with the great increase of RNA-ases and 5-nucleotidases (5-NT-ase, Figure).



¹ This work was supported by a Public Health Grant of the Ontario Department of Health, Canada.

² A. M. SABIN, Brit. J. exp. Path. 25, 321 (1934). – A. B. SABIN and A. M. WRIGHT, J. exp. Med. 59, 115 (1934).

³ A. M. SABIN, Brit. J. exp. Path. 25, 321 (1934).

⁴ Courtesy of Dr. D. L. McLEOD and Dr. G. H. MACMORINE, Connaught Medical Research Laboratories, University of Toronto.

⁵ E. KOVACS, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 92, 183 (1956).