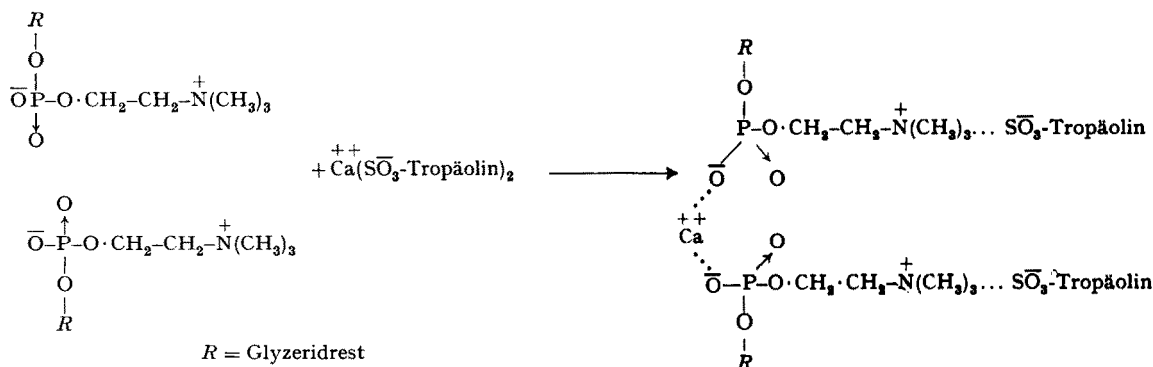




Barium usw. auch Amine wirksam, sofern sie die folgenden Bedingungen erfüllen:

Sie müssen mindestens 2 stark basische N-Atome besitzen, die bei neutralem pH je ein Proton addieren. Speziell bis-Imidazoline sind stark wirksam, während die entsprechenden Monoimidazoline nur sehr schwache Wirkung zeigen. Monoamine mit kleiner Alkylgruppe sind ebenfalls nur schwach wirksam. Die Wirkung der Monoamine steigt an mit zunehmender Länge der Alkylgruppen. Höhere Amine als Butylamin können wir an unserer Anordnung nicht prüfen, da dann bereits auch ohne Lecithin ein Übertritt des Farbstoffes in die Chloroformphase beginnt, was die Resultate unklar macht. Dass einfache Amine mit grösserer Alkylgruppe auch wirksam werden, dürfte mit der Löslichkeit und Anreicherung ihrer Salze in Chloroform zusammenhängen.

Neben der einfachen Anlagerung im Sinne Proton-Säure-Anion tritt offenbar eine Verknüpfung zweier Lecithin-Moleküle durch das zweiwertige Kation ein.

Die Bedingungen, die für eine Adsorption an Lecithin notwendig sind, sind ähnlich den Anforderungen, die an sogenannte «Histamine releaser»³ gestellt werden. Tatsächlich wird Histamin bei Gegenwart von Tropäolin aus neutraler wässriger Lösung an die lipide Phase fixiert und dürfte durch Stoffe mit grösserer Affinität wieder daraus verdrängt werden.

Experimentelles. Zur Verwendung gelangte eine $1/1000$ molare Lösung von synthetischem DL-Dipalmitoyl- α -lecithin (73 mg%) in gewöhnlichem Chloroform. Dieses darf beim Schütteln mit Wasser keine Säure abgeben. Zur Anwendung gelangte ferner eine Lösung von 1 mg% gereinigtem Tropäolin 00 in destilliertem Wasser. Von der zu prüfenden Substanz wird darin eine Stammlösung hergestellt und durch eine Spur verdünnter Natronlauge resp. Salzsäure auf pH 6–7 eingestellt.

Je 4 cm³ der Lecithin-Chloroformlösung und 4 cm³ der mit Tropäolin-Lösung verdünnten Stammlösung werden in einem Reagenzglas 2–3 min kräftig durchgeschüttelt. Das Gleichgewicht stellt sich rasch ein. Nun wird zentrifugiert, bis sich mindestens 2 cm³ klare wässrige Lösung abgetrennt haben. Diese wird vorsichtig abgezogen, nach Kontrolle des pH mit Salzsäure verdünnt auf 10 cm³ und der noch vorhandene Farbstoff spektrophotometrisch in 1 n Salzsäure durch Vergleich der Extinktionen bei 535, 540 und 545 m μ mit denen einer bekannten Farbstofflösung bestimmt.

Zu erwähnen ist, dass die Absorption aus der wässrigen Phase ausbleibt, wenn an Stelle des Chloroforms Tetrachlorkohlenstoff verwendet wird. Wir nehmen an, dass die Dielektrizitätskonstante des Lösungsmittels eine wesentliche Rolle spielt.

³ W. D. M. PATON, Histamine release by Compounds of simple chemical structure, *Pharmacol. Rev.* 9, 269 (1957).

Die spektrophotometrischen Bestimmungen, für die wir herzlich danken, wurden in unserem physikalisch-chemischen Laboratorium (Leitung Dr. A. V. WILLI) durch Herrn A. SOPRANETTI ausgeführt.

R. HIRT und R. BECHTOLD

Forschungsinstitut der Dr. A. Wander AG., Bern,
11. August 1958.

Summary

Synthetic lecithin, dissolved in chloroform, is able to add salts which are non-soluble in chloroform and to transfer these at neutral pH from the aqueous into the lipid phase. The effect is dependent on the cation concentrations and particularly on their valency. Calcium, barium, copper ions, etc., are about one hundred times more effective than sodium and potassium. Two-basic amines are also very effective. For experimental reasons, anion was, up to now, not varied and in all tests tropéoline was used.

A Contribution to the Problem of the Haem-Protein Linkage in Haemoglobin

Opinions differ as to whether the haem group in haemoglobin is bound to two or to only one imidazole in the protein. The former opinion was expressed by CONANT¹ and, among others, by LEMBERG and LEGGE² in their monograph on hematin compounds; the latter opinion (of HAUROWITZ³, with his hypothesis that haemoglobin is an aquo-compound, in which one water molecule is bound coordinately to the iron atom) is supported by experimental evidence, as well as by the results of the differential titration of haemoglobin (WYMAN⁴).

We made a series of experiments in which we followed the effect of histidine on the oxygen equilibrium in a dilute haemoglobin solution.

The haemoglobin solutions were prepared from fresh human blood according to HILL and WOLVEKAMP⁵. We used a phosphate buffer (1/15 M, pH 7.39). Histidine in various concentrations was added to these solutions. The degree of oxygenation at different oxygen pressures was determined with the aid of a two-stage colorimeter com-

¹ J. B. CONANT, *Harvey Lectures* 28, 159 (1933).

² R. LEMBERG and J. W. LEGGE, *Hematin Compounds and Bile Pigments* (Interscience Publishers, New York-London 1949).

³ F. HAUROWITZ, *The Bond between Haem and Globin, Haemoglobin*, a symposium (Ed. F. J. W. Roughton and J. C. Kendrew, Butterworths Scientific Publications, 1949), p. 51.

⁴ J. WYMAN, *Heme Proteins*, *Adv. Protein Chem.* 4, 402 (1948).

⁵ R. HILL and H. P. WOLVEKAMP, *Proc. Roy. Soc., London* [B] 120, 484 (1936).

bined with a Zeiss microspectroscope (HILL⁶). A series of dissociation curves obtained in this way is shown in Figure 1.

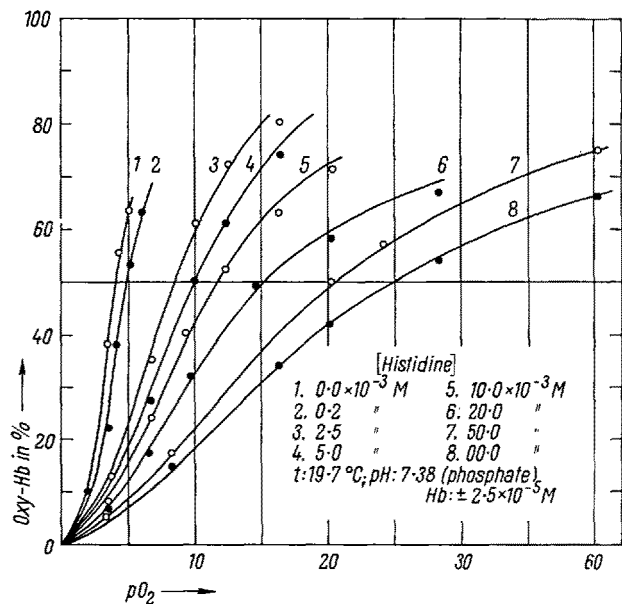


Fig. 1

Taking the half-saturation values of these dissociation curves, and plotting them against their respective histidine concentrations, we obtain the curve shown in Figure 2. This curve gives us valuable information about the

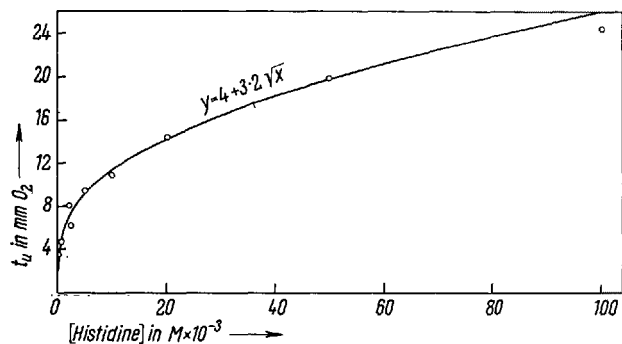


Fig. 2

reactions involved, as it may be converted into the empirical equation

$$y = 4y' + 3.2x'\sqrt{x} = a + bx^{\frac{1}{2}},$$

while a similar equation may be derived on the following theoretical assumptions:

(a) the histidine molecule acts reversibly with the haemoglobin; (b) the histidine-haemoglobin molecule is not oxygenable, and (c) the oxy-haemoglobin does not react with the histidine molecule.

Now taking the following equilibria

$$K_1 = \frac{[\text{HbHist}_n]}{[\text{Hb}][\text{Hist}]_n}$$

$$K_2 = \frac{[\text{HbO}_2]}{[\text{Hb}][\text{O}_2]}$$

and putting $p\text{O}_2$ instead of oxygen concentration, we find, after some algebraic analysis,

$$p\text{O}_2 = K(1 + K_1[\text{Hist}]^n).$$

Substituting y for $p\text{O}_2$, and x for histidine, we get the relation

$$y = K(1 + K_1 x^n),$$

in which, for $n = \frac{1}{2}$, both our empirical and our theoretical equations get identical forms. This leads us to suggest that the reaction in question is a competitive inhibition reaction, in which the inhibitor – histidine – evidently competes with the oxygen for the active site in the haem group.

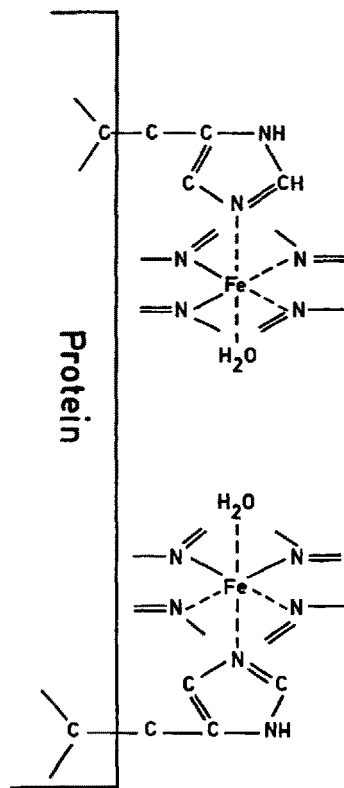


Fig. 3

As n has the value of $\frac{1}{2}$ one histidine molecule must inhibit two haems. This may be explained on the assumption that the histidine molecule reacts with the active site of one haem, whilst it blocks the active site of the second haem by steric hindrance. Competition between the imidazole of free histidine and imidazole in the protein for the active site of that haem being very unlikely, the effect of histidine on the oxygen equilibrium of haemoglobin would appear to contradict the hypothesis that two imidazole molecules are involved in the haem-protein linkage.

As haemoglobin contains four haems, and two can be blocked by a single histidine molecule, we must conclude that

(1) the haems are placed in two pairs, in the way as suggested on other grounds by WYMAN⁴, but with their active sites closely facing each other (Figure 3).

(2) the sixth coordination valency of the iron – i.e. the active site in haemoglobin – must be occupied, as suggested by HAUROWITZ³, by a molecule of water.

F. B. KLYNSTRA

Laboratory of Experimental Zoology, State University of Leyden, September 17, 1958.

⁶ R. HILL, Proc. Roy. Soc., London [B] 120, 472 (1936).

Résumé

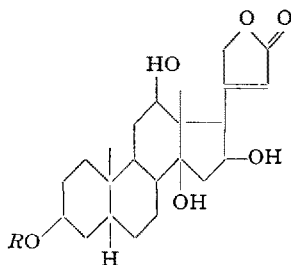
L'histidine inhibe la combinaison de l'oxygène avec l'hémoglobine. L'analyse de la courbe, donnant la relation entre la t_u des courbes de dissociation d'oxygène et la concentration de l'histidine, donne pour résultat qu'une molécule de histidine déplace deux molécules d'oxygène.

On peut conclure que les hèmes s'attachent à la partie protéinique de l'hémoglobine par un seul groupement d'imidazole.

Acetyl-diginatin- α und Desacetyl-lanatosid D¹

Aus den Blättern der *Digitalis lanata* Ehrh. konnte kürzlich ein neues, genuines Glykosid, das Lanatosid D isoliert werden². Es gelang, den chemischen Aufbau dieser Verbindung durch einen stufenweisen Abbau bis zum Diginatin³ weitgehend aufzuklären. Es traten dabei einerseits die beiden Desglucoverbindungen, Acetyl-diginatin- α und β , andererseits das Desacetyl-lanatosid D auf. Diese Glykoside konnten lediglich papierchromatographisch nachgewiesen werden, da für die Abbauprobe nur 50 mg Lanatosid D zur Verfügung standen.

Inzwischen konnten wir entsprechend den früher gemachten Angaben² durch Fraktionierung der isomorph kristallisierenden Lanatoside an Silicagelsäulen eine weitere Menge Lanatosid D (I) herstellen. Im folgenden berichten wir über präparative Versuche, die zur Isolierung des kristallisierten Desacetyl-lanatosid D (II) und des Acetyl-diginatin- α (III) führten.



I Lanatosid D

$R = (\text{Digitoxose})_2\text{-Digitoxose-Glucose}$
Acetyl

II Desacetyl-lanatosid D

$R = (\text{Digitoxose})_3\text{-Glucose}$

III Acetyl-diginatin

$R = (\text{Digitoxose})_2\text{-Digitoxose}$
Acetyl

IV Diginatin

$R = (\text{Digitoxose})_3$

Acetyl-diginatin- α . Zur präparativen Abspaltung der D-Glucose aus Lanatosid D benutzten wir ein aus *D. lanata*-Blättern hergestelltes Fermentpräparat (Digilanidase)^{4,5}. Die rohe Desglucoverbindung, das Acetyl-digina-

tin- α (III), kristallisierte aus Methanol-Chloroform-Äther in flachen, für die α -Reihe der Desgluco-lanatoside charakteristischen Plättchen⁶⁻⁷. Der Smp. lag bei 199–202°, $[\alpha]_D^{20} = +30,1^\circ$ ($c = 0,6$ in Pyridin); $\lambda_{\max} = 218 \text{ m}\mu$ ($\log \epsilon = 4,1$).

$\text{C}_{43}\text{H}_{88}\text{O}_{10}$ (838,96)	Ber. C 61,6 H 7,9 O 30,5 COCH ₃ 5,1%
Gef. C 61,4 H 8,0 O 30,1 COCH ₃ 4,7%	

Das Vorliegen des α -Isomeren ging eindeutig aus dem Vergleich der Molekularrotationen von Acetyl-diginatin- α ($[\text{M}]_D = +252^\circ$) und Diginatin ($[\text{M}]_D = +159^\circ$) hervor. Die beobachtete Differenz von $+93^\circ$ (in Pyridin) steht mit den entsprechenden Werten, die zwischen den α -Formen des Acetyl-digitoxins, Acetyl-gitoxins und Acetyl-digoxins und ihren acetylfreien Derivaten auftreten, in guter Übereinstimmung⁷.

Acetyl-diginatin- α wurde durch schwache Alkalien zum Diginatin (IV)³ abgebaut. Unser Präparat kristallisierte aus Aceton in feinen Prismen vom Smp. 251–253°; $[\alpha]_D^{20} = +20,5^\circ \pm 2^\circ$ und $[\alpha]_D^{20} = +26,3^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,6$ in Methanol). $\lambda_{\max} = 218 \text{ m}\mu$ ($\log \epsilon = 4,1$).

Auch das IR-Spektrum, sowie die in verschiedenen Lösungsmittelsystemen erhaltenen R_f -Werte sprechen für die Identität des aus Acetyl-diginatin- α erhaltenen Abbauproduktes mit einem authentischen Diginatin-Präparat⁸.

Desacetyl-lanatosid D. Die Verseifung der im Zuckerrest des Lanatosids D vorliegenden Acetylgruppe wurde wie üblich mit KHCO_3 in verdünnter methanolischer Lösung vorgenommen⁹. Die vorerst amorph anfallende Desacetyl-Verbindung kristallisierte nach Chromatographie an wassergesättigtem, schwach aktivem Silicagel in farblosen, zu Büscheln vereinigten Prismen vom Smp. 199–204°; $[\alpha]_D^{20} = +21,0^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,5$ in Pyridin); $\lambda_{\max} = 218 \text{ m}\mu$ ($\log \epsilon = 4,1$). Reinstes, kristallisiertes Desacetyl-lanatosid D (II) konnte auch durch Gegenstromverteilung amorpher Präparate zwischen Methyl-äthylketon und Wasser (1:1) gewonnen werden.

$\text{C}_{47}\text{H}_{74}\text{O}_{20}$ (959,06)	Ber. C 58,9 H 7,8 O 33,4%
Gef. C 59,1 H 8,3 O 33,7%	

Durch selektive Abspaltung der D-Glucose mit dem Blattferment der *D. lanata*^{4,5} wurde Desacetyl-lanatosid D zum Diginatin (IV)³ abgebaut. Das aus Aceton kristallisierte Präparat zeigte den Smp. 250–253°; $[\alpha]_D^{20} = +23,1^\circ \pm 2^\circ$ und $[\alpha]_D^{20} = +28,2^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 0,5$ in Methanol); $\lambda_{\max} = 218 \text{ m}\mu$ ($\log \epsilon = 4,1$). Die Identität unseres Präparates mit Diginatin wurde durch den Vergleich der IR-Spektren, sowie durch Bestimmungen der R_f -Werte in verschiedenen Lösungsmittelgemischen bewiesen⁸.

Die Ergebnisse der hier beschriebenen präparativen Versuche bestätigen die in unserer früheren Mitteilung² gemachten Angaben über den papierchromatographisch überprüften Verlauf des Abbaus von Lanatosid D. Der Zuckerrest von Lanatosid D ist demnach analog demjenigen der Lanatoside A, B und C aufgebaut.

A. VON WARTBURG, E. ANGLIKER,
F. BARFUSS und J. RENZ

Pharmazeutisch-chemisches Laboratorium SANDOZ,
Basel, 20. Oktober 1958.

¹ Vorläufige Mitteilung. Eine ausführliche Arbeit erscheint demnächst in den *Helv. chim. Acta*.

² E. ANGLIKER, F. BARFUSS, W. KUSSMAUL und J. RENZ, *Liebigs Ann. Chem.* 607, 131 (1957).

³ J. E. MURPHY, *J. Amer. pharmac. Assoc.* 44, 719 (1955).

⁴ A. STOLL, A. HOFMANN und W. KREIS, *Z. physiol. Chem.* 235, 249 (1935). – A. STOLL und J. RENZ, *Enzymologia* 7, 362 (1939).

⁵ A. STOLL und W. KREIS, *Helv. chim. Acta* 17, 592 (1934).

⁶ A. STOLL und W. KREIS, *Helv. chim. Acta* 35, 1318 (1952).

⁷ A. STOLL, A. VON WARTBURG und W. KREIS, *Helv. chim. Acta* 35, 1324 (1952).

⁸ Wir danken Herrn Dr. J. E. MURPHY für die freundliche Überlassung einer Probe Diginatin.

⁹ Vgl. die Herstellung der krist. Purpureaglykoside A und B (= Desacetyl-lanatoside A und B) A. STOLL, W. KREIS und A. VON WARTBURG, *Helv. chim. Acta* 37, 1134 (1954).