

Résumé

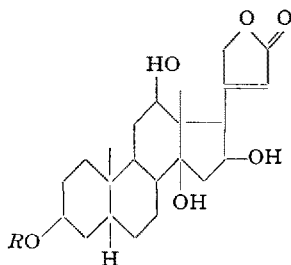
L'histidine inhibe la combinaison de l'oxygène avec l'hémoglobine. L'analyse de la courbe, donnant la relation entre la t_u des courbes de dissociation d'oxygène et la concentration de l'histidine, donne pour résultat qu'une molécule de histidine déplace deux molécules d'oxygène.

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); $\lambda_{\max} = 218 \text{ m}\mu$ ($\log \epsilon = 4,1$).

$C_{43}H_{88}O_{10}$ Ber. C 61,6 H 7,9 O 30,5 COCH_3 5,1%
(838,96) 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 ($[M]_D = +252^\circ$) und Diginatin ($[M]_D = +159^\circ$) 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.

$C_{47}H_{74}O_{20}$ Ber. C 58,9 H 7,8 O 33,4%
(959,06) 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).

Summary

The selective enzymatic degradation of lanatoside-D yields acetyl-diginatin- α , the mild alkaline hydrolysis des-acetyl-lanatoside-D. The properties of these glycosides are described; both can be transformed by further degradation into diginatin.

Pyrophosphatases of Bone

Scarce and discordant information is found in the literature as to the presence of pyrophosphatases in ossifying cartilage and bone, although, according to some authors¹, inorganic pyrophosphate seems to play a role in bone formation.

In the present work, we have thought it of interest to study the distribution and properties of pyrophosphatases in the various parts of bone tissue.

Experimental and Results. The anterior metatarsus of a less than 30 days old lamb was excised immediately after the killing of the animal, cooled at -10°C and freed from the soft parts and periosteum. From this sample, a section of which is shown in Figure 1, the following histologically uniform fractions were prepared: (1) Articular cartilage, (2) Spongiosa of epiphysis, (3) Epiphyseal cartilage plate, (4) Metaphyseal spongiosa, corresponding to newly ossified cartilage, and different from the spongiosa of epi-

1 g of each fraction was added with 5 ml of water and, when necessary, with traces of quartz sand, and homogenized in a mortar. The final volume of the homogenate was adjusted to 24 ml. 0.4 ml of the homogenate were incubated with 0.3 ml 0.15 M $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 0.1 ml 0.005 M MgCl_2 , 0.5 ml 0.0356 M diethylbarbiturate buffer of the desired pH. The final volume was brought to 1.5 ml with H_2O . The pH was checked before and after incubation. Controls were made without addition of the enzyme and of the substrate.

The samples were incubated for 8 min at 38°C with continuous stirring, and the reaction was stopped by heating for 3 min at 100°C or by addition of 1 ml 15% trichloroacetic acid (TCA). After centrifuging, inorganic orthophosphate was determined on an aliquot of the supernatant by the method of FISKE and SUBBAROW².

The activity has been assayed over all the pH range from 3.5 to 10.3. Results are given in Figure 2 and 3. No

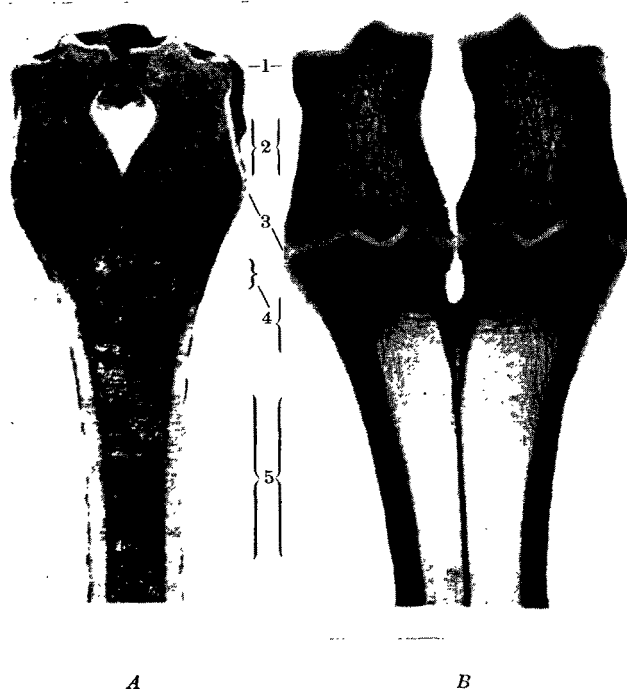


Fig. 1.—Photograph (A) and microradiograph (B) of a section of lamb's anterior metatarsus.

1 = Articular cartilage, 2 = Spongiosa of epiphysis, 3 = Epiphyseal cartilage plate, 4 = Spongiosa of metaphysis, 5 = Compact bone.

physis, (5) Compact bone, (6) Bone marrow of diaphysis, (9) Periosteum. Fractions 2 and 4 were centrifuged so as to extrude the marrow contained between the trabeculae, which was separately examined as fractions, (7) Marrow from No. 2, and (8) Marrow from No. 4.

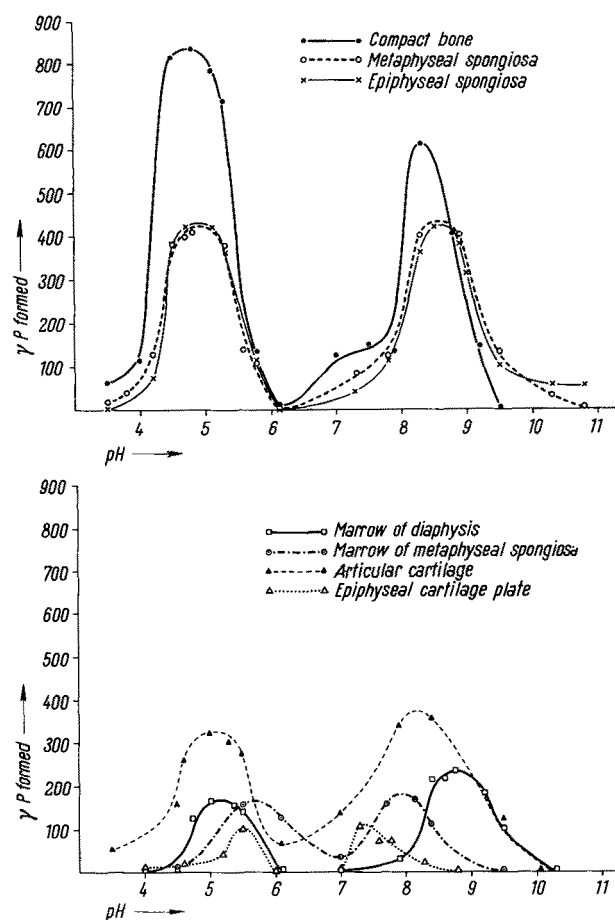


Fig. 2 and 3.—Pyrophosphatase activity at different pH of the various components of bone.

Ordinates give μg orthophosphate (calculated as P) formed in 8 min at 38°C from 2.8 mg P added as $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$. The incubation medium contained also 16.6 mg tissue (wet weight), 0.1 ml 0.005 M MgCl_2 , 0.5 ml 0.0356 M diethylbarbiturate buffer of the desired pH. Final volume 1.5 ml with H_2O .

activity was found in the marrow of epiphyseal spongiosa and in periosteum.

Discussion. Periosteum and the marrow of epiphyseal spongiosa do not show pyrophosphatase activity over all the pH range tested. All the other fractions show two

¹ P. CARTIER and J. PICARD, Bull. Soc. Chim. biol. 37, 1169 (1955).

² C. N. FISKE and Y. SUBBAROW, J. biol. Chem. 66, 375 (1925).