

angewandten akuten Versuchen bis um eine Zehnerpotenz weniger toxisch als die benützte Standarde: Cocain und Procain.

A. BOROVANSKÝ, A. SEKERA* und Č. VRBA

Institut für pharmazeutische Chemie der Masaryk-Universität und Pharmakologisches Institut der Fakultät für Veterinärmedizin, Brno (Tschechoslowakei), 9. Februar 1959.

Summary

Local anaesthetics of low toxicity were developed from the group of aroxy- and aralkoxysubstituted diethylaminoacetanilides. The substances were tested for local anaesthetic activity in surface and infiltration anaesthesia and for toxicity.

DISPUTANDUM

Erwiderung zum Beitrag von F. B. KLYNSTRA, *Experientia* 14, 437 (1958).

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

In einer kurzen Mitteilung berichtete KLYNSTRA über starke Veränderungen der O₂-Dissoziationskurve des menschlichen Hämoglobins bei Zusatz von Histidin und zog hieraus erhebliche Rückschlüsse auf die Gleichgewichte des Hb, bzw. entwickelte sogar theoretische Vorstellungen über die Anordnung der Hämgruppen im Molekül. Wir haben nun vor einiger Zeit Untersuchungen über die O₂-Dissoziationskurve des Hb hinsichtlich einer Beeinflussung durch Komplexbildner des Fe(2) angestellt, unter anderem untersuchten wir zum Beispiel auch HCN bzw. Imidazol. Wir konnten in Gegenwart hoher Konzentrationen dieser beiden Moleküle keine Veränderung der O₂-Bindungskurve des Hb – weder hinsichtlich der Form noch Lage der Kurve – beobachten (unveröffentlicht).

Umso erstaunter waren wir über die starke Veränderung der HbO₂-Dissoziationskurve, die KLYNSTRA in Gegenwart von Histidin erhielt. Wir prüften deshalb seine Ergebnisse – allerdings mit Rinder-Hb – nach. Die Ergebnisse sind tabellarisch zusammengestellt. Wie aus der Tabelle hervorgeht, ist Histidin im untersuchten Kon-

zentrationbereich *nicht* in der Lage, die O₂-Dissoziationskurve des Hb signifikant zu verändern. Unser primär gehegter Verdacht, dass KLYNSTRA den altbekannten Bohr-Effekt auf dem Umweg über das Histidin(di)hydrochlorid neu entdeckt hat, dürfte damit bestätigt sein. Vermutlich hat KLYNSTRA übersehen, dass die Pufferkapazität eines 1/15 M Phosphatpuffers (pH 7,38) bzw. einer 2,5 · 10⁻⁵ M (?) Hb-Lösung nicht ausreicht, um 10⁻² bzw. 10⁻¹ M Konzentration von Histidindihydrochlorid abzapuffern. Messungen des pH-Wertes der Endansätze wurden von ihm nicht ausgeführt.

Um noch den Einwand auszuschalten, dass wir nicht mit Menschen-, sondern mit Rinder-Hb gearbeitet hatten und möglicherweise Speziesdifferenzen bestehen könnten, wurde ein Differenzspektrum zwischen menschlichem HbO₂ bei Abwesenheit und Anwesenheit von Histidin aufgenommen. Es zeigten sich auch hierbei keine Unterschiede in der Lichtabsorption, obwohl nach KLYNSTRA eine Verdrängung des O₂ durch Histidin hätte erfolgen müssen (Versuchsbedingungen: [Hb(2)] = 2,5 · 10⁻³ val; [Histidin] = 5 · 10⁻² M; pH = 7,6; t = 20°C; Bereich = 450–680 mμ).

Die theoretischen Schlussfolgerungen von KLYNSTRA, zum Beispiel, dass 1 Molekül Histidin 2 Moleküle O₂ verdrängt, oder dass die Häme mit einer einzelnen Imidazolgruppe des Proteins verknüpft sind, erscheinen auf Grund unserer negativen Befunde im rechten Licht.

W. SCHELER und W. SCHWARTZKOPFF-JUNG

Deutsche Akademie der Wissenschaften, Institut für Medizin und Biologie, Berlin-Buch, Arbeitsbereich Pharmakologie, 9. März 1959.

Zur Erwiderung der Kritik von SCHELER und SCHWARTZKOPFF-JUNG diene das Folgende:

Das Nicht-Ausführen von pH-Messungen der Endansätze war eine Unterlassungssünde, wofür ich mich als Vorstand der Abteilung, an der KLYNSTRA arbeitete, persönlich mitverantwortlich fühle.

Dabei ist noch ein Zweites hervorzuheben: das sichtbare Absorptionsspektrum des Hämoglobins ändert sich nicht oder kaum nach Hinzufügung des Histidins. Bei einer Komplexbindung des Histidins am Eisen würde man eine derartige Änderung erwarten.

Andererseits ist es meines Erachtens doch zweifelhaft, ob der Einfluss des Histidins auf das Hb/O₂-Gleichgewicht

Beeinflussung der O₂-Dissoziationskurve des Rinderhämoglobins durch Histidin

Phosphatpuffer 1/15 M (pH 7,4), Temperatur = 20,5°C. Die Analyse der O₂-Bindung an Hb erfolgte spektralphotometrisch gemäss $y = 100 \times (E_x - E_{Hb}) / (E_{HbO_2} - E_{Hb})$, die Gasanalyse mittels Haldanescher Apparat.

E_x = Extinktion der unbekannten Lösung, E_{Hb} = Extinktion des reduzierten Hb, E_{HbO_2} = Extinktion des Oxyhämoglobins.

[Histidin] = 0 M; [Hb(2)] = 3,32 · 10 ⁻³ val; pH = 7,52; n = 2,80; log pO ₂ 50% = 0,83		[Histidin] = 10 ⁻² M; [Hb(2)] = 3,24 · 10 ⁻³ val; pH = 7,67; n = 2,85; log pO ₂ 50% = 0,81		[Histidin] = ~ 10 ⁻¹ M; [Hb(2)] = 3,28 · 10 ⁻³ val; pH = 7,57; n = 2,50; log pO ₂ 50% = 0,82	
log pO ₂ [mm Hg]	% HbO ₂ (y)	log pO ₂ [mm Hg]	% HbO ₂ (y)	log pO ₂ [mm Hg]	% HbO ₂ (y)
0,44	11,8	0,59	18,6	0,50	15,3
0,72	27,8	0,77	48,3	0,65	28,8
0,79	42,4	0,81	52,3	0,77	46,3
0,96	66,7	1,03	78,5	0,98	70,7
1,12	88,2	1,14	87,3	1,12	83,1
1,23	95,8	1,26	94,2	1,28	93,2

ohne weiteres auf den Bohr-Effekt zurückzuführen sei. Erstens tritt eine auffällige Formänderung der Kurve auf, die beim einfachen Bohr-Effekt (auch in stark verdünnten Lösungen) fehlt. Zweitens ist der Histidin-Effekt, wie aus der Abbildung hervorgeht, am stärksten bei den niedrigen Konzentrationen, wo die pH-Verschiebung relativ gering sein muss. Da die Beziehung zwischen pH und t_{O_2} (50%) zwischen pH 7,50 und 6,50 bei menschlichem Hämoglobin linear ist (auch für verdünnte Hb-Lösungen!), würde man für den Einfluss des Histidins auf die Lage der Dissoziationskurve eine andere Beziehung erwarten, als in KLYNSTRAS Kurve in Erscheinung tritt. Selbstverständlich werden neue Experimente mit menschlichem Hämoglobin hier entscheiden müssen. KLYNSTRAS bisherige Versuche lassen weitgehende theoretische Schlussfolgerungen nicht zu.

H. P. WOLVEKAMP

Zoologisches Institut, Leiden, 3. April 1959.

Da der Hauptanlass zum vorausgehenden *Disputandum* die detaillierten theoretischen Überlegungen von F. KLYNSTRAS waren und diese in ihren weitgehenden Schlussfolgerungen auch von Herrn Prof. WOLVEKAMP zurückgenommen wurden, können wir jetzt Schluss der Diskussion erklären.

M

A Method for Purifying Rat Myoglobin for Kinetic Studies¹

Recent investigations dealing with the functional role of myoglobin (Mb) during altitude acclimatization of rats necessitated the preparation of freshly purified Mb for use in kinetic studies². While the chemistry of Mb obtained from other mammalian species has been adequately investigated^{3,4}, very little information is available on the purification of rat Mb⁵.

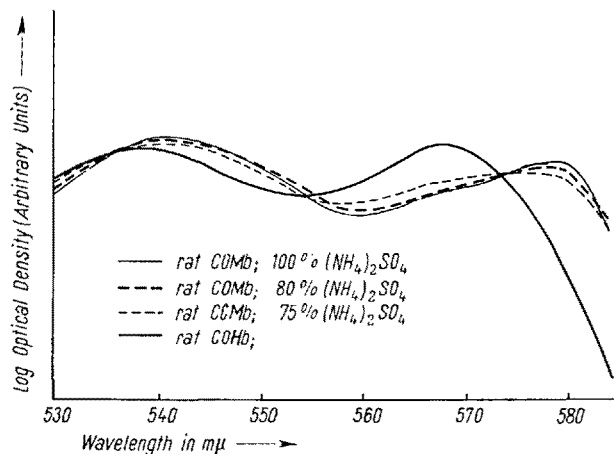
The present report describes a relatively simple method for obtaining pure rat Mb which can be used for kinetic measurements. It is based on a procedure originally described by THEORELL⁶ for purifying horse Mb.

The steps in the purification are as follows:

(1) Muscle obtained from rats is crushed while frozen in dry ice and the Mb is extracted with an equal volume of distilled water⁷. The extract is adjusted to pH 7.0 with 0.1 M NaOH.

(2) Extraneous proteins are then precipitated by the dropwise addition of saturated basic lead acetate (1/4 volume of solution to 1 volume of extract). After discarding the precipitate the excess lead ions are precipitated from the extract by the addition of a slight excess of Na_2HPO_4 and NaH_2PO_4 . During precipitation, the pH

is carefully maintained between 7 and 8. After centrifugation, the precipitate is discarded; the supernatant is readjusted to pH 7.0 and bubbled with carbon monoxide.



Comparison of the absorption spectra of rat COMb extracts (after dialysis against different saturations of ammonium sulfate solutions) with that of rat COHb. All solutions were in *M*/15 phosphate buffer, pH 7.8.

(3) Having converted the Mb to carbonylmyoglobin (COMb)⁸, the extract is dialyzed against 60% saturated $(NH_4)_2SO_4$, pH 7.0, for 18 h. Next the resulting precipitate is centrifuged down; the supernatant is reconverted to COMb and dialyzed against 80% saturated $(NH_4)_2SO_4$, pH 7.0, for 12 h⁹. The light red precipitate contains all spectroscopically detectable hemoglobin, some Mb, and other proteins. The precipitate is removed by centrifugation at 14 000 *g*.

(4) The supernatant is converted to COMb and dialyzed against *M*/15 K_2HPO_4 . After 12 h of dialysis the purified extract contains O_2 Mb with a minimal amount of metmyoglobin.

On a number of occasions attempts were made to form O_2 Mb by oxygenation of either reduced Mb or COMb. The oxygenation of reduced Mb was unsatisfactory since it consistently resulted in the formation of much metmyoglobin. In contrast, the oxygenation of COMb sometimes yielded pure O_2 Mb, though generally some metmyoglobin was also present. The latter method was not used since it was more time consuming than the dialysis method and usually gave only slightly less metmyoglobin contamination.

The unstable nature of Mb necessitates that it be purified as quickly as possible and that the purified solutions be used for kinetic measurements within a few hours after preparation. After storing Mb at 5°C for a few days, metmyoglobin could not be converted to O_2 Mb.

The purification of Mb for kinetic experiments necessitates the removal of any protein impurity which might influence the measurement of the reaction rates. Hemoglobin and cytochrome *c* are probably the only protein impurities that would interfere with measurements of O_2 Mb kinetics. The absence of a band at 550 mμ (Figure) shows that cytochrome *c* was not present in the purified solutions.

⁸ During purification Mb should be kept as COMb, which seems to be less susceptible to denaturation than O_2 Mb. In order to form COMb, a pinch of $Na_2S_2O_4$ is added to the solution after it has been saturated with CO.

⁹ The 80% saturated $(NH_4)_2SO_4$ should have a specific gravity of at least 1.205 at 25°C to assure removal of hemoglobin.

¹ This research was aided by the U.S. Air Force School of Aviation Medicine, Randolph AFB, under contract AF 18(600)-940 and the National Institutes of Health under grant RG-5112(R1). This is paper No. 2342 in the Pennsylvania Agricultural Experiment Station.

² G. K. STROTHER, E. ACKERMAN, A. ANTHONY, and E. H. STRICKLAND, *Amer. J. Physiol.* **196**, 517 (1959).

³ H. THEORELL, *Biochem. Z.* **268**, 73 (1931).

⁴ A. ROSSI-FANELLI and E. ANTONINI, *Exper.* **13**, 477 (1957).

⁵ A. ROSSI and C. ARAGONA, *Boll. Soc. ital. Biol. sper.* **17**, 206 (1942).

⁶ A. H. T. THEORELL, *Biochem. Z.* **252**, 1 (1932).

⁷ Mb must be kept around 0–10°C throughout the purification. On several occasions when Mb solutions warmed to 25°C for several hours, changes were detected in the 530–585 mμ region of the COMb spectrum.