

were purified by carrier-free preparative electrophoresis and countercurrent distribution. Their constants are compiled in the Table.

The biological activities of the analogues on the isolated rat uterus, in relation to bradykinin (1.0) are mentioned in the Table, from which it appears that the terminal carboxyl group is very important in this test whereas the terminal amino group seems of lesser significance.

**Zusammenfassung.** Es wird über die Synthese von 1-Deamino-bradykinin, 9-Decarboxy-bradykinin und 1-Deamino-9-decarboxy-bradykinin und über deren biologische Aktivität berichtet. Nach dem verwendeten Testsystem scheint die endständige Carboxylgruppe für die

Aktivität bedeutsamer zu sein als die endständige Aminogruppe.

W. D. JOHNSON<sup>7,8</sup>, H. D. LAW<sup>8</sup>  
and R. O. STUDER<sup>9</sup>

F. Hoffmann-La Roche Co., Ltd.,  
Chemical Research Department,  
Basel (Switzerland), 11 April 1969.

<sup>7</sup> Part of the PhD Thesis of W. D. JOHNSON.

<sup>8</sup> Department of Chemistry and Biology, Liverpool Regional College of Technology.

<sup>9</sup> Chemical Research Department, F. Hoffmann-La Roche & Co., Ltd., Basle (Switzerland).

### Zur Bindung von Biliverdin an das Protein im Crenilabrus-Blau

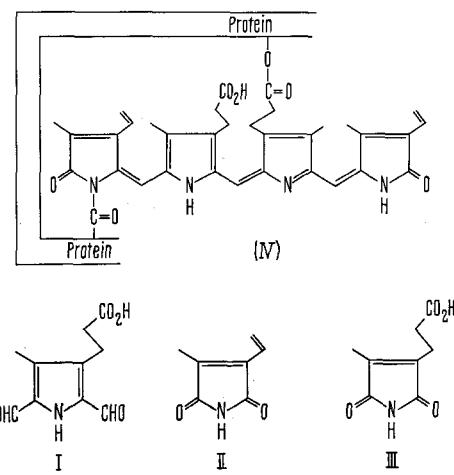
In einer früheren Mitteilung<sup>1</sup> berichteten wir über die Charakterisierung der farbgebenden Gruppe von Crenilabrus-Blau, einem Chromoproteid des Mittelmeerfisches *Crenilabrus pavo* C.V., als Biliverdin. Die Bindung dieses Farbstoffs an das Protein ist sicher keine salzartige oder Adsorptionsbindung, da die farbgebende Gruppe weder durch organische Lösungsmittel noch durch wässrige Harnstofflösungen oder pH-Veränderungen freigelegt wird. Von den möglichen kovalenten Bindungen wurde bisher – aufgrund der leichten Spaltbarkeit durch Methyllat – nur eine Esterbindung für wahrscheinlich gehalten. Einen näheren Einblick in die Bindungsverhältnisse hat nun der Chromsäureabbau von Crenilabrus-Blau gewährt.

Zum Abbau werden je 6,05 mg Chromoproteid (entsprechend 97 µg Biliverdin) in 0,25 ml Wasser gelöst und mit 0,1 ml Azeton versetzt; zum Vergleich dienen die mit 0,25 ml Wasser versetzten Lösungen von 50 bzw. 100 µg Biliverdin in 0,1 ml Azeton. Die Ansätze werden je 1 h mit 0,2 ml Oxydationslösung [1% CrO<sub>3</sub> in 2n H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; a) bei 20°; b) bei 100°C bzw. 1% KHSO<sub>4</sub>/1% Na<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> bei 20°C] stehengelassen. Die Abbauprodukte werden dann mit 0,2 ml Äther extrahiert und dünnenschichtchromatographisch identifiziert<sup>2</sup>; aus den Fleckengrößen werden die Mengen mit Hilfe von Vergleichsproben abgeschätzt.

Dass einer der mittleren Ringe (II bzw. III) und einer der äusseren (I bzw. IV) nicht an das Protein gebunden sein kann, zeigt der Chromatabbau des Chromoproteids: Dabei entstehen der Pyrroldialdehyd (I) und Methylvinylmaleinimid (II) in einer Menge, die jeweils *einem* Pyrrolring entspricht. In Übereinstimmung damit liefert der Chromsäureabbau bei 20°C (II) und Hämatinsäureimid (III) aus jeweils einem Ring. Das bedeutet, dass zwei Bindungen zum Protein vorhanden sein müssen, eine von einem der mittleren und eine von einem der äusseren Ringe des Biliverdins, sofern nicht die Abbauprodukte der anderen beiden Ringe durch Sekundärreaktionen verlorengehen. Die fehlenden Imide sollten beim Chromsäureabbau bei 100°C (Hydrolyse) gefunden werden; tatsächlich erhält man jetzt (III) in der für *zwei* Ringe erwarteten Menge, jedoch verschwindet das Methylvinylmaleinimid dabei fast vollständig. Offensichtlich addieren sich die Vinylgruppen des Gallenfarbstoffs besonders leicht in der Hitze an Thiolgruppen des Proteins (s. unten). Nach Vorbehandlung von Crenilabrus-Blau

mit Alkali (1 h bei 20°C in 0,1 n NaOH) ergibt der Chromsäureabbau bei 20°C hingegen (II) aus *zwei* Ringen und (III) aus einem Ring. Demnach wurde durch die milde Alkalibehandlung die Bindung des äusseren Rings gelöst, während die (vermutliche Ester-) Bindung des inneren Rings unter diesen Bedingungen erhalten bleibt. Den freien, chloroformlöslichen Farbstoff erhält man erst durch Einwirkung von heissem Alkali.

Aus diesen Ergebnissen lassen sich die in Formel (IV) gezeigten Bindungsverhältnisse für das Biliverdin im Crenilabrus-Blau ableiten. Die Empfindlichkeit gegen kaltes Alkali spricht für das Vorliegen einer N-Azyl-Bindung am äusseren Ring, die Labilität gegen heisses Alkali für eine Esterbindung am inneren Ring<sup>3</sup>. Damit



<sup>1</sup> L. ABOLINS und W. RÜDIGER, Experientia 22, 298 (1966).

<sup>2</sup> W. RÜDIGER, Hoppe Seyler's Z. physiol. Chem. 348, 129 (1967); Biochemical Society Symposium on Porphyrins and Related Compounds, London (1968).

<sup>3</sup> Welcher der inneren und welcher der äusseren Ringe gebunden ist, ist nicht bekannt; in Analogie zum Phycoerythrin werden hier Bindungen an den Ringen I und III formuliert.

besitzt das Biliverdin hier denselben Bindungstyp wie die Gallenfarbstoffe in den Phykobilinen<sup>4</sup>; hierauf und nicht auf der chemischen Struktur der fargebenden Gruppen dürfte die von LEMBERG<sup>5</sup> und FONTAINE<sup>6</sup> gefundene spektrale Ähnlichkeit mit dem Phykozyanin beruhen. Mit dem Lösen der N-Azyl-Bindung verschwindet die spektrale Besonderheit des Crenilabrus-Blaus: Das langwellige Maximum, das in 0,1*n* H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bei 665 nm liegt, verschiebt sich beim Erhitzen der sauren Lösung (1 h auf 100 °C) auf 670–675 nm; dieselbe Verschiebung findet man beim Ansäuern des alkalibehandelten Chromoproteids. Freies Biliverdin absorbiert in 0,1*n* H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, wie in methanol. Salzsäure<sup>7</sup>, maximal bei 670–680 nm.

Die beiden Bindungen sind sicher auch durch Säure (kalte konzentrierte Salzsäure bzw. heiße verdünnte Schwefelsäure) spaltbar, was für die Esterbindung durch den Chromsäureabbau des säurebehandelten Chromoproteids bewiesen wurde. Unter Säureeinwirkung reagieren aber die Vinylgruppen von Porphyrinen<sup>8</sup>, Porphyrinogenen<sup>9</sup> und Gallenfarbstoffen<sup>10</sup> mit Thiolgruppen des Proteins. Diese Sekundärreaktion tritt auch beim Crenilabrus-Blau auf (vgl. Chromsäureabbau bei 100 °C), wobei gleichzeitig das Protein zu Peptiden hydrolysiert wird. Das Reaktionsprodukt ist weder wasserlöslich (wie das Ausgangsmaterial) noch chloroformlöslich (wie Biliverdin), löst sich aber in Amylalkohol und in methanolisierter Salzsäure. Aus ihm lässt sich durch nachträgliche Einwirkung von Alkali kein Biliverdin mehr gewinnen.

**Summary.** The blue biliprotein from the fins of the Mediterranean fish *Crenilabrus pavo* C.V. was analysed with respect to linkages between colouring matter (biliverdin IX $\alpha$ ) and apoprotein. It was shown by chromic oxidation under various conditions and determination of degradation products that one of the outer and one of the inner rings of biliverdin are free. The remaining inner ring is bound to the apoprotein presumably by an ester bond, while the lability of the linkage between one outer ring and apoprotein corresponds to a N-acyl-bond.

W. RÜDIGER und L. ABOLINŠ

*Institut für Biochemie der Universität des Saarlandes, Saarbrücken (Deutschland), und Zoophysiologisches Institut der Universität Uppsala (Schweden), 20. Januar 1969.*

- <sup>4</sup> W. RÜDIGER und P. O'CARRA, *Europ. J. Biochem.* 7, 509 (1969).
- <sup>5</sup> R. LEMBERG, *Justus Liebigs Annln Chem.* 461, 46 (1928); 477, 195 (1930).
- <sup>6</sup> M. FONTAINE, *Bull. Inst. océanogr. Monaco* 1941, Nr. 792.
- <sup>7</sup> C. H. GRAY, A. KULCZYCKA und D. C. NICHOLSON, *J. chem. Soc. London* 1961, 2268.
- <sup>8</sup> H. THEORELL, *Biochem. Z.* 301, 201 (1939).
- <sup>9</sup> S. SANO und S. GRANICK, *J. biol. Chemistry* 236, 1173 (1961).
- <sup>10</sup> P. O'CARRA, C. O'HEOCHA und D. M. CARROLL, *Biochemistry* 3, 1343 (1964).

### Alkaloids of *Aspidosperma melanocalyx* Muell.-Arg.

An investigation of the alkaloids of the bark of *Aspidosperma melanocalyx* Muell.-Arg.<sup>1</sup> has resulted in the isolation of 2 principal bases. The first, extracted by chloroform from aqueous solution at pH 4, was identified as N-acetyl-16,17-dihydroxyaspidospermidine (demethyl-aspidocarpine, I)<sup>2,3</sup>. The presence of traces of the N-propionyl analogue of I (II) was indicated by mass spectrometry.

- <sup>1</sup> Collected near Couto de Magalhães, Diamantina, Minas Gerais and Itaiaçu and Luisiana, Goiás, Brazil, by Mr. A. P. DUARTE who also identified the plant. Registered in the Rio de Janeiro Botanical Garden under Nos. 123334, 123335, and 125163.
- <sup>2</sup> C. FERRARI, S. MCLEAN, L. MARION and K. PALMER, *Can. J. Chem.* 41, 1531 (1963).
- <sup>3</sup> P. RELYVELD, Ph. D. Thesis, University of Utrecht (1966). We thank Dr. RELYVELD for kindly furnishing comparison samples.

