

Results of Nitrogen Determinations and Serum Adsorptions (50 mg lipid)

	Lipid Extract ($\mu\text{g N}$)	Lipid with Normal Serum ($\mu\text{g N}$)	Lipid with Anti-Rh Serum ($\mu\text{g N}$)	Unadsorbed Anti-Rh Serum (titer units)	Adsorbed Anti-Rh Serum (titer units)
Rh + Lot #					
41	370	370	680	2560	80
42	340	360	460	2560	160
43	200	300	430	2560	160
44	300	480	970	2560	80
45	330	620	1120	2560	40
Rh — Lot #					
6	420	440	430	2560	2560
7	280	600	580	2560	2560
8	250	400	440	2560	1280
9	220	340	300	2560	2560
10	220	300	280	2560	2560

to determine the accuracy of the method: first, by comparison of two series of known nitrogen values run independently with this same method and, second, by using a single series of known values run with two different methods, the one described above and a distillation technique. The standard difference of the means in these series is not significant.

Results with 30 different preparations of lipid from Rh positive cells indicate that, although there is some non-specific adsorption of both anti-Rh and normal serums on the exposed lipid particle, the anti-Rh serum was without a single exception adsorbed to a greater extent than was the normal serum. A mean of 400 μg was found for the difference in N adsorption of normal serum and anti-Rh serum in the 30 preparations. 12 lipid fractions prepared from Rh negative (cde) red cells adsorbed a mean of only 30 μg more anti-Rh serum than normal serum; several lots adsorbed slightly less of the anti-Rh serum than of the normal serum. The difference between adsorption of anti-Rh on the Rh positive lipid particle and on the Rh negative lipid particle is highly significant (t of 3.27 at the 1% level of confidence). Titrations of anti-Rh serums before and after exposure to the lipid particles with hemagglutinating techniques, using calibrated pipettes, show several fold drops in titer with Rh positive lipid exposure and slight fall, if any, with the Rh negative lipid. Subjective error was avoided through one of us providing the other with unknown lipid samples for analysis, the origin of each determinable only by reference to a key.

It seems reasonable to conclude that the greater degree of adsorption of antibody nitrogen on the lipid derived from the Rh positive red cells is a specific effect. The Table shows the total nitrogen determinations in relation to 5 different lots of Rh positive lipid in sequence and 5 different Rh negative lots, together with the serum titrations.

BETTINA B. CARTER⁶ and J. C. HARRIS

Department of Microbiology, State University of New York, College of Medicine at Syracuse and Veterans Administration Hospital, Syracuse, N.Y., January 18, 1956.

Zusammenfassung

Eine Reihe der Lipidfraktionen von Rh-positiv und Rh-negativ (D-positiv und D-negativ) roten Zellen

⁶ Present address: Department of Biology, Western Michigan College, Kalamazoo, Michigan.

menschlichen Blutes wurde der Wirkung von anti-Rho Serum (anti-D) ausgesetzt. Die dabei adsorbierte Menge von Stickstoff wurde quantitativ bestimmt. In jedem Fall adsorbierten die Lipide von Rh-positiv roten Zellen mehr Antikörperstickstoff als die aus Rh-negativ roten Zellen extrahierten Lipide. Man darf wohl daraus schliessen, dass der höhere Grad der Adsorption von Antikörperstickstoff auf Lipiden von Rh positiv roten Zellen ein spezifischer Effekt ist.

Is Lysine the Source of the Pyridine Ring in Nicotine?¹

The suggestion of ROBINSON² that a genetic relationship exists between ornithine and pyrrolidine rings occurring in many alkaloids has recently received confirmation in the case of nicotine by the work of several groups³. ROBINSON⁴ had previously called attention to a similar relationship between lysine and the pyridine ring, and noted the presence of both ornithine and lysine skeletons in nicotine.

LEETE⁵ has proposed a tentative biogenetic scheme for nicotine, based on modifications of the suggestions of ROBINSON, which again suggests the possibility of lysine as a basic source of the pyridine ring. However, we have now obtained data, using (+)-lysine- ϵ - ^{15}N -dihydrochloride and L(+)-lysine- ^{14}C , which indicate that lysine is not incorporated as such into the nicotine molecule by root cultures of *Nicotiana tabacum* var. Turkish, grown under sterile conditions as outlined elsewhere⁶. In one experiment, 66.2 mg of the ^{15}N -lysine was fed to 100 root cultures. These were harvested⁶ after one week and gave 31 mg of nicotine. A portion of this nicotine was converted to gaseous nitrogen and determined mass spectrometrically. The remainder was oxidized to nicotinic acid by means of nitric acid and analyzed similarly. The analytical results for these compounds appear in

¹ Research performed under the auspices of the United States Atomic Energy Commission.

² R. ROBINSON, J. chem Soc. 876 (1917).

³ E. LEETE, L. MARION, and I. D. SPENCER, Can. J. Chem. 32, 116 (1954). – E. LEETE, Chem. and Ind. 19, 537 (1955). – L. J. DEWEY, R. V. BYERRUM, and C. D. BALL, Biochim. et Biophys. Acta 18, 141 (1955).

⁴ R. ROBINSON, Proc. Univ. Durham Phil. Soc. 8, 1, 14 (1927).

⁵ E. LEETE, Chem. and Ind. 19, 537 (1955).

⁶ R. F. DAWSON, D. R. CHRISTMAN, and R. C. ANDERSON, J. Amer. chem. Soc. 75, 5114 (1953).

the Table. The pyrrolidine nitrogen of the nicotine is seen to contain 0.774 atom-% excess ¹⁵N, 7 times as much excess ¹⁵N as does the pyridine nitrogen, and the isotopic incorporation is very low.

To exclude the possibility that this result might have been caused by elimination of the terminal nitrogen atom of the lysine during the formation of a ring compound, by analog with some other biological systems⁷, 4.0 mg L(+) -lysine, uniformly labeled in the carbon chain with ¹⁴C, was administered to 20 tobacco root cultures, using the same techniques as before. The cultures were harvested after 5 days and yielded 5.7 mg of nicotine as it dipicrate. The specific radioactivities of the compounds involved are shown in the Table:

	¹⁵ N atom-% excess	¹⁴ C µc/nmole
Isotopic L(+) -lysine	49.2 (in one position)	153
Nicotine	0.427	0.008,2*
Nicotinic acid	0.110	0.002,6*

* Corrected for dilution with carrier.

In both feedings of the labeled lysines, the transfer of isotope from lysine to nicotine was of very low order of magnitude, and there was a pronounced preference for isotopic enrichment of the pyrrolidine rather than the pyridine ring. These results indicate that lysine is apparently sufficiently removed from nicotine in the chemical economy of the plant that it not only fails to enter the pyridine ring of nicotine directly, but parts of the lysine molecule actually appear in the pyrrolidine ring in preference to the pyridine ring.

We wish to express our appreciation to Drs. S. C. MADDEN and F. M. SINEX for generous gifts of the labeled lysines.

A. A. BOTHNER-BY, R. F. DAWSON,
and D. R. CHRISTMAN

Departments of Chemistry and Biology, Brookhaven
National Laboratory, Upton, Long Island, New York,
November 18, 1955.

Zusammenfassung

Gibt man L(+)-Lysin-ε-¹⁵N oder in allen Stellungen mit ¹⁴C markiertes L(+)-Lysin zu keimfreien Kulturen von abgeschnittenen Wurzeln von *Nicotiana tabacum*, so erzeugen die Wurzeln Nikotin, welches kleine Mengen ¹⁵N oder ¹⁴C enthält. Ferner enthält das Nikotin mehr ¹⁵N oder ¹⁴C im Pyrrolidinring als im Pyridinring. Lysin liegt daher nicht auf dem direkten biogenetischen Weg zum Nikotin.

⁷ H. J. VOGEL and B. D. DAVIS, J. Amer. chem. Soc. 74, 109 (1952).

Histaminantagonistische Wirkungen
von Adrenochrom-Monosemicarbazon¹

Bei Versuchen an der Meerschweinchenhaut beobachteten wir histaminantagonistische Wirkungen von

Adrenochrom-Monosemicarbazon (*ACHR*). Dieser Effekt wurde quantitativ mit der histaminantagonistischen Wirkung der spezifischen Antihistaminika (*A.H.*) *Pyrilamin maleat* (*NNR*)² und *Antazolin methansulfonat* (*NNR*)³ verglichen. Dabei wurde der Einfluss sowohl auf die durch «exogenes» als auch auf die durch «endogenes» in der Haut selbst freigesetztes Histamin hervorgerufene vaskuläre Permeabilitätssteigerung geprüft.

Methode. Weisse Meerschweinchen von etwa 300 g Gewicht erhielten 2 ml/kg einer 1%igen Lösung von Trypanblau «Grübler» intravenös. 4–5 min danach wurden in die enthaarte Rückenhaut links und rechts parallel zur Mittellinie intrakutan injiziert: Histamin-2HCl als «exogenes Histamin» (10⁻⁵ g/ml); Verbindung 48/80 als «endogenes Histamin» freisetzende Substanz⁴ in äquieffektiver Konzentration (10^{-4.5} g/ml); Histamin + Antagonist; 48/80 + Antagonist; physiologische Kochsalzlösung. Die Injektionsvolumina betrugen 0,05 ml, alle Wirkstoffe wurden unmittelbar vor dem Versuch in physiologischer Kochsalzlösung gelöst. Die Bestimmung der Wirkungsstärke der intrakutanen Injektionen erfolgte 10–15 min danach durch Bewertung der Intensitätsstufe des Farbstoffaustritts in den Quaddelbereichen. Unbeeinflusste Reaktionen bestanden in einem kreisförmigen scharf begrenzten Fleck von gleichmässig dunkelblauer Farbe. Bei «fast vollständigem Antagonismus» fand sich im Injektionsbereich angedeutet kreisförmige unscharf begrenzte diffuse oder fleckförmig vereinzelte, noch sehr schwach hellblaue Anfärbung.

Ergebnisse. Die Wirkung jedergeprüften Antagonistenkonzentration wurde aus mindestens 10 Einzelinjektionen bestimmt. Die Konzentrationen⁵ der Antagonisten, welche bei gleichzeitiger intrakutaner Injektion den Farbstoffaustritt fast vollständig verhinderten, betrugen für

Pyrilamin gegen Histamin: 10⁻⁶ g/ml, gegen 48/80: 10^{-3.5} g/ml;
Antazolin gegen Histamin: 10⁻⁵ g/ml, gegen 48/80: 10^{-3.5} g/ml;
ACHR gegen Histamin: 10^{-3.4} g/ml, gegen 48/80: 10^{-3.4} g/ml.

Gegenüber «exogenem Histamin» wirkt *Pyrilamin* demnach 10mal stärker als *Antazolin* und 400mal stärker als *ACHR*. Gegenüber 48/80 («endogenem Histamin») sind beide *A.H.* gleich wirksam, *Pyrilamin* jedoch erst in etwa 300mal und *Antazolin* in etwa 30mal höherer Konzentration als gegenüber «exogenem Histamin». *ACHR* hemmt in der gleichen Konzentration die Wirkung «exogenen» und «endogenen Histamins» gleich stark. *ACHR* ist demnach gegenüber «endogenem Histamin» annähernd ebenso wirksam wie die spezifischen *A. H.*

In einer zweiten kleineren Versuchsreihe wurden die antagonistischen Substanzen zuerst intraperitoneal verabreicht. Etwa 35–40 min danach wurde Trypanblau intravenös, anschliessend an jedem einzelnen Versuchstier sowohl Histamin als auch 48/80 in verschiedenen jeweils äquieffektiven Konzentrationen intrakutan injiziert.

Ergebnisse. Die Wirksamkeit der Antagonisten ergab sich aus dem Verhältnis der am nichtvorbehandelten und am vorbehandelten Tier gleich wirksamen Konzentrationen von Histamin beziehungsweise 48/80; dieses betrug nach

10^{-5.5} g/g Tier *Pyrilamin*⁵ für Hist. 1:10–32, für 48/80 1:3,2;
10^{-4.5} g/g Tier *Antazolin*⁵ für Hist. 1:10–32, für 48/80 1:3,2;
10^{-4.8} g/g Tier *ACHR* für Hist. 1:3,2–10, für 48/80 1:3,2.

² Mepyramin. maleat. NFN.
³ Imidamin. methansulfonat. NFN.
⁴ W. D. M. PATON, Brit. J. Pharmacol. 6, 499 (1951).
⁵ Die Konzentrations- bzw. Dosisangaben beziehen sich auf die Salze.

¹ «Adrenoxyl» ORION Helsinki, unter Lizenz LABAZ Brüssel.