

from 0.5 mc uniformly labelled commercial ethylene oxide (Tracerlab). A total of 0.67 mM of C^{14} ethanolamine, with 5.2×10^7 c/min/mM was injected in three portions at 24 h interval into a 20 g mouse. The animal was then killed, the skin removed, and homogenized in a Waring blender with 70 ml water. The mixture was boiled for 30 min and filtered. The filtrate was used for the isolation of taurine and the insoluble coagulate was used for the extraction of cystine after hydrolysis in 3 vol. 6 N HCl. Taurine was isolated by a procedure similar to that described by VERLY *et al.*⁵, using 50 mg of carrier. The final crystalline product was checked for purity by chromatography and it was recrystallized 6 times from water-ethanol to constant radioactivity. Cystine was obtained by the cuprous mercaptide precipitation and recrystallized 5 times at the isoelectric point to constant radioactivity. Purity was checked by chromatography and by the SULLIVAN method⁶. Radioactivity was measured after conversion of the compounds to $BaCO_3$ and correcting for self-absorption. The results are reported in the table.

Specific activity of injected ethanolamine and the extracted taurine and cystine

	c/min/mM
Ethanolamine	3.5×10^7
Cystine	6.6×10^4
Taurine	1.3×10^4

Inspection of the table shows that the mouse converted a small amount of ethanolamine into taurine and that cystine has a higher specific activity than taurine. This finding rules out the possibility that the taurine produced comes directly through: ethanolamine $\rightarrow$ cysteamine $\rightarrow$ taurine, in which case cystine, being excluded from the path, should not have been labelled. The results indicate that the route was probably: ethanolamine $\rightarrow$ glycine $\rightarrow$ serine $\rightarrow$ cystathionine $\rightarrow$ cysteine $\rightarrow$ taurine. All the steps of the last-mentioned route have in fact been found to be of biological occurrence⁷.

As a result of the present work, it may be concluded that the transulfuration of ethanolamine is a process of secondary importance, if it exists at all. Thus the mechanism of the biosynthesis of cystamine represents a problem which still requires a solution.

D. CAVALLINI, F. POCCHIARI, and
L. TENTORI

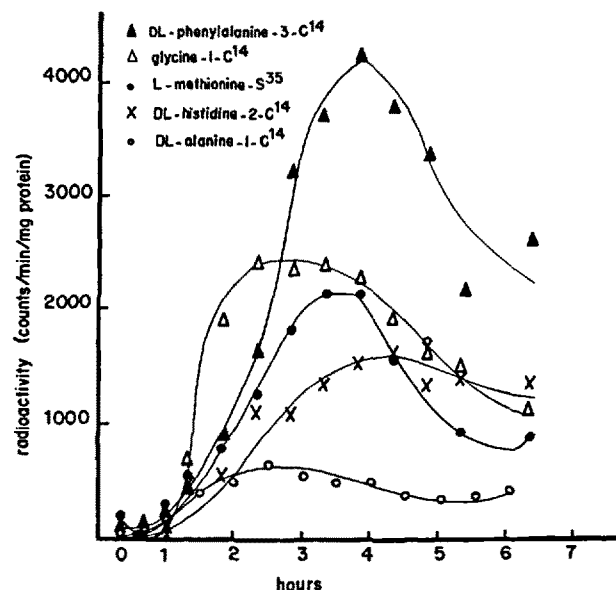
Institute of Biological Chemistry of the University, Departments of Biochemistry and Biology of the Istituto Superiore di Sanità, Rome, December 27, 1956.

Riassunto

L'etanolamina marcata con C^{14} è trasformata nel topo in taurina e cistina. La cistina ha una attività specifica più elevata della taurina. Questa constatazione indica che la transulfurazione della etanolamina nel topo è un processo biologico di scarsa importanza.

Radioactive Amino Acid Incorporation into the Rat Pancreatic Juice Proteins*

In a previous paper¹ results were presented studying the rate of incorporation of glycine- C^{14} into the rat pancreatic juice proteins. The data obtained suggest that these proteins are built up from blood amino acids and not from pre-existing plasma proteins. As our results are based on observations performed only with glycine- C^{14} , it is desirable to extend them to other amino acids. In this paper we present the results obtained utilizing radioactive phenylalanine, alanine, histidine and methionine besides glycine.



Incorporation of radioactive amino acids into the rat pancreatic proteins. Abscissa: Time after injection of radioactive amino acid. Each point is the average of three animals.

Material and methods. Adult male Wistar rats weighing from 300 to 400 g were used throughout. In the glycine experiment the weight of the animals was 240 g. The anesthesia, stimulation of pancreatic secretion and collection of pancreatic juice was performed as already described². Endovenous injection of 3.3 μ C of the following amino acids was performed 5 min after the secretin-carbamoylcholine stimulus: DL-phenylalanine-3- C^{14} , DL-alanine-1- C^{14} , DL-histidine-2- C^{14} , glycine-1- C^{14} and L-methionine-S³⁵. Three rats were injected with each of the amino acids. 5 μ l samples of pancreatic juice were collected every 20 min during the first 2 h and every half hour for the next 4 h. These samples were spread on stainless steel planchets and their radioactivity measured with a thin mica window Geiger-Müller counter (TGC-2 of Tracerlab). Under these conditions no selfabsorption is observed. The protein content of each planchet was determined by the method described by LOWRY *et al.*³.

* Aided partially by grants from the 'Conselho Nacional de Pesquisas' and 'Deutsche Forschungsgemeinschaft'.

¹ L. C. U. JUNQUEIRA, G. C. HIRSCH, and H. A. ROTHCHILD, *Biochem. J.* **61**, 275 (1955).

² L. C. U. JUNQUEIRA, G. C. HIRSCH, and H. A. ROTHCHILD, *Biochem. J.* **61**, 275 (1955). – G. C. HIRSCH, L. C. U. JUNQUEIRA, H. A. ROTHCHILD, and S. R. DOHI, *Pflügers Arch. ges. Physiol.* (1956) (in press).

³ O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR, and R. J. RANDALL, *J. biol. Chem.* **193**, 265 (1951).

⁵ W. G. VERLY and G. KOCH, *Biochem. J.* **58**, 663 (1954).

⁶ M. X. SULLIVAN and W. C. HESS, *J. biol. Chem.* **116**, 221 (1936).

⁷ A. WEISSBACH and D. B. S. SPRINSON, *J. biol. Chem.* **203**, 1031 (1953). – D. SHERIN, *J. biol. Chem.* **162**, 297 (1946). – V. DU VIGNEAUD, *A Trail of Research* (Cornell University Press, 1953).

Results and discussion. The results obtained are presented in the figure. One may see that incorporation of the different amino acids used is similar. Very little radioactivity is present in the first hour after the amino acid injection and the maximum occurs between 2 and 4 h. The incorporation of alanine and glycine presents its maximum around 2½ h, while for histidine this maximum is around 4 h. The maximal incorporation of methionine and phenylalanine is between those two values, i.e. 3½ h. No significance can be attributed to these differences in time owing to the variability observed from animal to animal, as already described in the experiment with glycine¹.

It is difficult to compare the results regarding the specific activity of the samples of pancreatic juice proteins obtained with the different amino acids injected. Although the same amount of μC was injected in all animals, only half of this activity is available to the cell in the case of the DL-amino acids. Even so, wide discrepancies are observed, probably due to the different content of the several amino acids and their conversion products in the proteins studied.

The data above presented suggest that the results and conclusions obtained working with glycine may be extended to the other four amino acids, i.e. that the rat pancreatic juice proteins are synthesized from the free amino acids of the blood.

HANNA A. ROTHSCHILD, G. C. HIRSCH⁴,
and L. C. U. JUNQUEIRA

*Laboratory for Cell Physiology, Faculdade de Medicina,
Universidade de São Paulo, Brasil, November 19, 1956.*

Zusammenfassung

Es wurde der zeitliche Verlauf des Einbaus radioaktiver Aminosäuren (Phenylalanin-3- C^{14} , Alanin-1- C^{14} , Histidin-2- C^{14} und Methionin- S^{35}) in die Proteine des Pankreassaftes der Ratte untersucht. Ein Maximum des Einbaus kommt zwischen der zweiten und vierten Stunde nach Injektion der Aminosäuren vor, während in der ersten Stunde praktisch keine radioaktiven Proteine nachgewiesen werden konnten. Die Ergebnisse werden verglichen mit denen früher beschriebener Versuche mit Glyzin- C^{14} .

⁴ Permanent address: Zoologisches Institut, Göttingen.

Versuche zur chromatographischen Trennung der im Augentstiel von *Astacus astacus* enthal- tenen myotropen Wirkstoffe

Nachdem durch frühere Arbeiten erwiesen war, dass im Augentstiel des Flusskrebse (*Astacus astacus*) ein Wirkstoff gebildet wird, der die Bewegungen isolierter Därme von Insekten (Larven von *Tenebrio molitor*)¹ und Säugern (Meerschweinchen und Kaninchen)² positiv myotrop beeinflusst, wurden Versuche unternommen, die aus dem Augentstiel gewonnenen Extrakte durch Methoden der Papierchromatographie zu reinigen. Die

in diesem Extrakt enthaltenen Substanzen sollten getrennt werden, um nach Möglichkeit den Wirkstoff zu isolieren und seine chemische Natur näher zu definieren.

Zur Extraktbereitung wurden jeweils 2 Paar Augentstiele im Achatmörser zerrieben, in 0,15 ml Aqua destillata aufgenommen und 15 min bei 2400 Touren zentrifugiert. Von dem überstehenden Extrakt wurden jeweils 0,02 ml auf das Papier gebracht. Der Startpunkt war 3 cm vom unteren Rand entfernt.

Zur Entwicklung der Chromatogramme wurde aufsteigend in Rundzylindern von 38 cm lichter Höhe und 9 cm Durchmesser gearbeitet. Als die geeignetste Papiersorte erwies sich S und S 2043 a Gl. Als Lösungsmittel diente ein Gemisch aus Butanol-Essigsäure-Wasser 8:5:2, eine Abwandlung des sogenannten «Patridge-Gemisches»³.

Nachdem die aufgebrauchte Lösung gut getrocknet war, wurden die Chromatogramme 10–20 h in die Atmosphäre des Lösungsmittels gebracht. Dann wurde entwickelt. Die Laufzeiten betrugen 16–72 h, die Laufstrecken 15–30 cm. Die Chromatogramme wurden danach getrocknet und die einzelnen Flecke mit Ninhydrin (2% in 95% Butanol + 5% 2*n* Essigsäure) sichtbar gemacht.

Es zeigten sich dann 6 Flecke, deren R_F -Werte bei 0,079, 0,112, 0,174, 0,207, 0,250 und 0,368 liegen. Der erste Fleck hat im Kern eine rosa Färbung, die nach dem Rand zu violett wird. Die übrigen 5 Flecke färben sich violett an.

Nicht nachgewiesen werden konnten in den Chromatogrammen Zucker oder allgemein reduzierende Substanzen (Reagenzien: 1% KMnO_4 + 2% Na_2CO_3 in wässriger Lösung, sowie 1% Anilinphthalat in wassergesättigtem Butanol), Adrenalin und Noradrenalin (Reagenz: 2% 4-Dimethyl-aminobenzaldehyd in Butanol), sowie Cholin und dessen Ester (Reagenz: 0,2% Dipikrylamin in Aceton-Wasser 1:1). Auch freie Sulfhydrylgruppen konnten durch Besprühen mit 5% Nitroprussidnatrium in 5% Essigsäure, die mit Ammoniumsulfat gesättigt ist, und anschließendes Einbringen in eine Atmosphäre von konzentriertem Ammoniak nicht festgestellt werden. Freie Sulfhydrylgruppen färben sich nach dieser Methode leuchtend rot, um später in eine beständige Blaufärbung überzugehen.

Zur Prüfung der Wirksamkeit der einzelnen Substanzen wurden auf 7,5 cm breiten Papierstreifen 6 Chromatogramme nebeneinander entwickelt. Eines wurde abgetrennt und mit Ninhydrin sichtbar gemacht. Nach diesem Leitchromatogramm wurden aus den übrigen 5 Streifen die einzelnen Substanzen 24 h in $n/10$ Salzsäure eluiert. Die Eluate wurden nach dieser Zeit auf dem Wasserbade abgedampft, die Salzsäure abgeraucht und die Rückstände in 1 ml Warmblutringer aufgenommen.

Diese Extrakte wurden am isolierten Meerschweinchenileum untersucht. Hierbei zeigte sich, dass der positiv myotrope Wirkstoff in Zone 1 lokalisiert ist. Das Eluat dieser Zone ruft am isolierten Darm dieselben Bewegungsänderungen hervor (Steigerung von Tonus, Amplitude und Frequenz) wie der rohe Augentstiel-extrakt². Die Eluate aller anderen Zonen des Chromatogrammes waren ebenso wirkungslos wie die Eluate der durchgeführten Blindversuche.

Es ist somit möglich, die myotrop wirksame Phase von den anhaftenden Begleitstoffen zu trennen und, wenigstens in Lösung, mit dem isolierten Wirkstoff zu arbeiten.

¹ G. KOLLER, Verh. dtsch. Zool. Ges., Tübingen 1954, 18, 417 (1955).

² H. KUHNEN, Verh. dtsch. Zool. Ges., Erlangen 1955, 19, 117 (1956).

³ F. CRAMER, *Papierchromatographie*, 2. Aufl. (Verlag Chemie, Weinheim 1953).