

Experiment No.	Aminoalcohol	pH of reaction*	Concentration (M)**		Yield*** (%)	Recovery of P (%)
			Aminoalcohol	Cyclic P		
1	HOCH ₂ CH ₂ NH ₂	9.35	6.75 (2.0)	0.05 (Ca ⁺⁺)	62	93
2	HOCH ₂ CH ₂ NH ₂	9.35	6.75 (2.0)	0.15 (Ca ⁺⁺)	61	91
3	HOCH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂	9.4	6.75 (2.5)	0.05 (Ca ⁺⁺)	83.5	86.6
4	HOCH ₂ C(CH ₂ OH) ₂ NH ₂	9.12	0.5 (0.45)	0.025 (Ca ⁺⁺)	13 (50)	95–100
5	HOCH ₂ C(CH ₂ OH) ₂ NH ₂	9.12	0.5 (0.45)	0.025 (Na ⁺)	5 (10)	95–100
6	HOCH ₂ C(CH ₂ OH) ₂ NH ₂	8.3	0.5 (0.31)	0.025 (Ca ⁺⁺)	5 (18)	95–100

* Measured with a pH meter. ** The values in parentheses represent the concentration of free amine calculated from the amount of concentrated HCl added. *** Values in parentheses are the % of cyclic phosphate hydrolyzed to glycol phosphate (determined by weak acidity titration). In experiments 1, 2, and 3, paper chromatography showed only glycol P and the transesterification product. No cyclic P appeared to remain.

$R_p^5 = 0.88$ for the derivative of ethanolamine, giving a ninhydrin reaction;

$R_p = 1.23$ for the derivative of dimethylethanolamine.

Passage through the anion-exchange resin Dowex-1(Cl⁻) at neutral pH resulted in the disappearance of the glycol phosphate but the new P containing component was quantitatively recovered, confirming its amphoteric nature.

(2) For the derivative of ethanolamine it was shown by paper chromatography that acid hydrolysis gave glycol phosphate and ethanolamine. 1.085 M of the aminoalcohol (determined by periodate) was formed per mole of glycol phosphate (determined by the increase in weak acidity due to secondary phosphate⁶).

(3) For the derivative of dimethylethanolamine, titration after removal of accompanying glycol phosphate by passage through Dowex-1(Cl⁻) revealed little weak acidity⁶.

The results of the main experiments are summarized in the Table.

The catalytic effect of Ca⁺⁺ is seen when one compares the results of Experiments 4 and 5. Such effect of polyvalent cations on the alkaline hydrolysis of phosphodiester has been observed by several investigators.

Experiments 4 and 6 show the influence of pH.

Although further studies will be necessary to ascertain the mechanism of the reaction, our present results indicate a direct attack of the oxygen of the aminoalcohol on the phosphorus of the cyclic phosphate rather than an attack of the amino-N followed by a N to O migration.

Acknowledgement. The authors wish to express their appreciation to the American Cancer Society for a grant which made this work possible.

CH. DEKKER and J. LECOCQ*

Department of Biochemistry, University of California, Berkeley, October 3, 1958.

Résumé

Il a été trouvé que l'éthylène glycol phosphate cyclique réagit en solution aqueuse avec plusieurs amino-2 alcools pour donner les phosphodiester résultants d'une transesterification.

⁵ $R_p = R_f$ of new compound/ R_f of ethylene glycol cyclic phosphate.

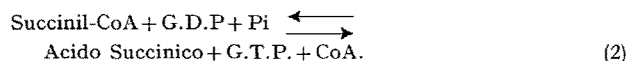
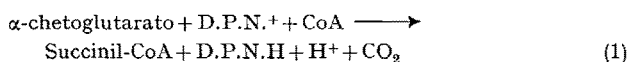
⁶ Quantitative data are difficult to obtain because of the partial titration of the amino group in the region pH 4–8.

* Present address: Laboratoire de Chimie biologique, Faculté de Pharmacie, Paris.

Il guanositrifosfato quale attivatore dei sistemi enzimatici ossidasici dei grassi

Nota III

Nelle note precedenti^{1,2} si è formulata l'ipotesi che l' α -chetoglutarato attivi i sistemi enzimatici ossidasici dei grassi tramite il guanositrifosfato (G.T.P.) che viene sintetizzato durante l'ossidazione dell' α -chetoglutarato stesso secondo le seguenti reazioni:



Con le ricerche qui riferite si è tentato di convalidare o meno tale ipotesi determinando l'eventuale potere attivatore del G.T.P. in confronto di quello dell' α -chetoglutarato, dell'A.T.P. o dell'A.T.P. più succinato.

Metodi. Sono stati impiegati due lotti di cavia: uno in condizioni di alimentazione, l'altro in condizioni di digiuno da 120 ore. L'intensità dell'azione del sistema enzimatico ossidasico dei grassi, preparato dal fegato secondo il metodo di LEHNINGER³, è stata dedotta, mediante la tecnica descritta nelle note precedenti, dalla quantità di O₂ consumata per ossidare l'acido caprilico (vedi Tabella, colonna A). Si è determinato anche l'acido acetacetico formatosi (metodo di GREENBERG e LESTER⁴; modificato da BARKULIS e LEHNINGER⁵), e dai valori trovati si è calcolata la quantità di O₂ teoricamente occorsa per la sua formazione (vedi Tabella, colonna B). Il G.T.P. è stato impiegato nella quantità di 10 μM /100 mg di preparato enzimatico secco, quantità corrispondente a quella che si forma teoricamente durante il processo di ossidazione dell' α -chetoglutarato calcolando P/O = 1. L'A.T.P. è stato impiegato nella quantità di 10 e di 65 μM .

Risultati e discussione. Impiegando preparati enzimatici estratti da fegati di cavia in condizioni di alimentazione, risulta che il G.T.P. alla concentrazione di 10 μM /100 mg di preparato enzimatico secco (quantità corrispon-

¹ M. SACCHETTO e C. R. ROSSI, Exper. 14, 253 (1958).

² C. R. ROSSI e M. SACCHETTO, Exper. 14, 254 (1958).

³ A. L. LEHNINGER, J. biol. Chem. 161, 437 (1945).

⁴ L. A. GREENBERG e D. LESTER, J. biol. Chem. 154, 177 (1944).

⁵ S. S. BARKULIS e A. L. LEHNINGER, J. biol. Chem. 199, 339 (1951).

Azione del G.T.P., dell' α -chetoglutarato e dell'A.T.P. sui sistemi enzimatici ossidativi dei grassi (fegato di cavia). I valori sono espressi in μM di O_2 /100 mg di preparato enzimatico secco. Tempo di prova 20 min

A = μM di O_2 consumate globalmente dal sistema enzimatico per ossidare l'acido caprilico.

B = μM di O_2 consumate per la sola formazione di acido acetacetico.

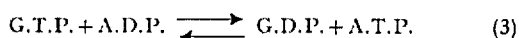
Condizioni sperimentali

Attivatore	Alimentazione normale		Digiuno da 120 h	
	A	B	A	B
G.T.P. (10 μM)	9,80	7,10	8,78	7,95
α -chetoglutarato	10,20	8,00	9,02	7,89
A.T.P. (10 μM)	2,00	1,60	0	0
A.T.P. (65 μM)	10,80	9,60	6,60	5,98
A.T.P. + succinato (65 μM A.T.P.)*	10,34	7,80	6,00	3,36

* 10 μM di A.T.P. aggiunte direttamente al sistema enzimatico + 55 μM sintetizzate tramite l'ossidazione fosforilante del succinato.

dente a quella che si forma teoricamente durante il processo di ossidazione dell' α -chetoglutarato calcolando P/O = 1) attiva l'ossidazione degli acidi grassi con la stessa intensità dell' α -chetoglutarato. Invece l'A.T.P., aggiunto alla stessa concentrazione di 10 μM , attiva il sistema enzimatico assai meno intensamente.

Si potrebbe prospettare che il G.T.P. abbia agito tramite l'A.T.P. che avrebbe potuto sintetizzarsi, per azione di una transfosforilasi, secondo la seguente reazione:



e che la più intensa azione del G.T.P., in confronto di quella dell'A.T.P., sia dovuta al fatto che l'A.T.P. viene sintetizzato gradatamente dal G.T.P. e quindi potrebbe risentire in minor misura delle attività fosfatasiche. Ci sembra però che quest'ultima ipotesi possa essere esclusa perché lo stesso fenomeno avrebbe dovuto verificarsi anche quando si impiega come attivatore succinato o fumarato i quali, come si è già detto in altra nota¹, agiscono pure sintetizzando gradatamente A.T.P. tramite il processo della fosforilazione ossidativa.

Che il G.T.P. e l' α -chetoglutarato agiscano indipendentemente dall'A.T.P. è confermato anche dal fatto che l'intensità di azione dei sistemi enzimatici preparati da fegati di cavia a digiuno da 120 h rimane praticamente invariata quando l'attivatore è rappresentato dall' α -chetoglutarato o dal G.T.P., invece è intensamente diminuita quando l'attivatore è rappresentato dall'A.T.P. o dal succinato più A.T.P.

In definitiva si può concludere che, impiegando fegato di cavia, il G.T.P. e l' α -chetoglutarato attivano il sistema enzimatico ossidativo dei grassi con le stesse modalità, ed ambedue indipendentemente dall'A.T.P.

M. SACCHETTO e C. R. ROSSI

Istituto di Chimica Biologica, Università di Padova, il 16 settembre 1958.

Summary

In guinea-pig liver, G.T.P. and α -ketoglutarate both activate enzyme systems of fatty acid oxidation in the same way, and both act independently of A.T.P.

Amino Acids in *Nopalea cochinellifera*

The plant referred to as *Opuntia* sp. in a previous communication¹ has been identified as *Nopalea cochinellifera*. Besides enzymes, the plant has been examined for carbohydrates, organic acids, and amino acids.

The present communication is a report of the qualitative as well as quantitative amino acid make up of the phylloclade of the plant.

Cactus plants have been analysed for their total nitrogen content by DUCLOUX², for protein content by BENJAMIN and OLD³, and also by BONSMAN and MARÉ⁴. PICCOLI⁵ has estimated crude proteins of some varieties of *Opuntia*.

The present study was undertaken to throw some more light on the nitrogenous constituents of a cactus plant, as such detailed information is not available about this group of plants.

Method. Free amino acids were identified in the alcoholic extracts of the fresh phylloclade of the plant by two-dimensional paper chromatographic technique of CONSDEN, GORDON, and MARTIN⁶, using 80% phenol for the first development followed by PARTRIDGE's solvent⁷ for the second development.

Besides the relative mobilities of the amino acids, appropriate reagents were used to confirm the presence of different amino acids.

For total amino acid composition 50 mg of the dried defatted plant material were hydrolysed with 3 cm³ of 6 N hydrochloric acid for 24 h.

After the removal of HCl in the usual manner, the hydrolysate was kept overnight in a dessicator over KOH to remove last traces of HCl. The thin film was then taken up in distilled water, filtered and made up to 5 ml.

Total nitrogen in the hydrolysate was estimated by semimicro Kjeldahl's method. Some of the amino acids were estimated by the circular paper chromatographic technique of GIRI⁸ *et al.*, and the remaining amino acids were estimated by buffered paper chromatographic technique as described by KRISHNAMURTHY and SWAMINATHAN⁹.

Results. The following amino acids were identified in the alcoholic extract of the fresh plant material.

1. Leucines, 2. Phenyl-alanine, 3. Valine, 4. Methionine, 5. τ -amino butyric acid, 6. proline, 7. α -alanine, 8. glutamic acid, 9. threonine, 10. glycine, 11. serine, 12. lysine, 13. cystine.

Total amino acids. 1 cm³ of the hydrolysate contained 0.143 mg of total nitrogen.

The following Table gives the quantities of individual amino acids in 100 g of the dried plant material.

¹ R. W. P. MASTER, *Naturwiss.* 43, 401 (1956).

² E. H. DUCLOUX, *Rev. Facultad cienc. quim. Univ. La Plata* 6, 43 (1930).

³ M. S. BENJAMIN, and A. N. OLD, *Agr. Gaz. N. Wales*, 50, 240, 276 (1939).

⁴ H. C. BONSMAN and G. S. MARÉ, *Union S. Africa, Dept. agr. Forestry Bull.* 236, 71 (1942).

⁵ G. PICCOLI, *Agr. Coloniale (Italy)* 37, 267 (1943).

⁶ R. CONSDEN, A. H. GORDON, and A. J. P. MARTIN, *Biochem. J.* 37, XIII (1944).

⁷ S. M. PARTRIDGE and R. G. WESTALL, *Biochem. J.* 42, 238 (1948).

⁸ K. V. GIRI, A. N. RADHAKRISHNAN, and C. S. VAIDYANATHAN, *J. ind. Inst. Sci.* 35, 145 (1953).

⁹ K. KRISHNAMURTHY and M. SWAMINATHAN, *J. Sci. industr. Res. [C]* 14 (5), 79 (1955).