

The antigen-antibody complex plays no part in oxidative phosphorylation once the precipitate has been removed. On the contrary, as shown by Table III, mitochondria which have adsorbed the albumin antigen and are then mixed with their respective antibody show a clear uncoupling of phosphorylations from oxidations, which seems to be enhanced by the addition of complement.

Mitochondria clearly show a high adsorbing power towards a heterologous protein such as horse serum albumin; the antigen is fixed by them even after washing with 0.25 *M* sucrose. The mitochondrial membrane is obviously damaged by the antigen-antibody reaction, as shown by the swelling, agglutination (Fig. 1 and 2) and by uncoupling of the P:O rate.

**Riassunto.** Mitochondri di fegato e rene di ratto adsorbono l'albumina del siero di cavallo; facendo agire su questi in secondo tempo l'immunsiero specifico anti-albumina, i mitocondri presentano: agglutinazione, rigonfiamento e dissociazione delle fosforilazioni dalle ossidazioni. L'autore mette in rilievo che la reazione antigen-anticorpo al livello mitocondriale, ne danneggia gravemente la struttura e la funzione.

Tab. III. Oxidative phosphorylation in mitochondria after adsorption of antigen, subsequently mixed with specific antibody.

| No. Exp. | Mitochondria isolated from | Additions                            | P:O rate |
|----------|----------------------------|--------------------------------------|----------|
| 1        | liver                      | 0.2 ml immun serum                   | 1.1      |
| 2        | liver                      | 0.2 ml immun serum                   | 1.80     |
| 3        | liver                      | 0.2 ml immun serum                   | 1.25     |
| 4        | liver                      | 0.2 ml immun serum                   | 1.40     |
| 5        | liver                      | 0.2 ml immun serum + 0.1 complement  | 0.50     |
| 6        | liver                      | 0.2 ml immun serum + 0.1 complement  | 0.53     |
| 7        | liver                      | 0.2 ml immun serum + 0.1 complement  | 0.35     |
| 8        | liver                      | 0.2 ml normal serum                  | 2        |
| 9        | liver                      | 0.2 ml normal serum                  | 2.69     |
| 10       | liver                      | 0.2 ml normal serum                  | 2.09     |
| 11       | liver                      | 0.2 ml normal serum                  | 2.25     |
| 12       | liver                      | 0.2 ml normal serum + 0.1 complement | 2.20     |
| 13       | liver                      | 0.2 ml normal serum + 0.1 complement | 1.85     |

L. MICHELAZZI

Department of General Pathology, University of Genova (Italy), April 4, 1961.

### Nachbargruppeneffekt des Pyridinringes beschleunigt alkalische Ester-Hydrolyse

Im Zusammenhang mit Untersuchungen über die Wirkungsweise von PAM (Pyridin-2-aldoxim-methojodid) war es notwendig, das reaktive Verhalten von Pyridinanalogen Cholinestern bei der alkalischen Hydrolyse kennenzulernen. Durch potentiometrische Titration bei konstantem pH<sup>1</sup> fanden wir, dass der Benzoesäureester I von 2-Hydroxymethyl-N-methylpyridiniumchlorid mit OH<sup>-</sup>-Ionen mehr als doppelt so schnell reagiert als der «aktivierte Ester»<sup>2</sup> Benzoylcholin II (vergleiche Tabelle I). Dieses Resultat schien zunächst überraschend; es wäre nämlich zu erwarten gewesen, dass sich der elektrostatische Effekt<sup>3</sup> beim Cholinester stärker auswirkt als bei

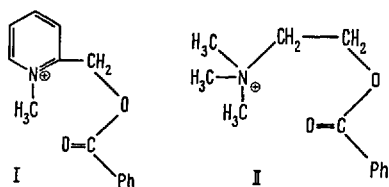


Fig. 1

Tab. I

| Versuch Nr. | 1                                          | 2    | 3    | 4     |
|-------------|--------------------------------------------|------|------|-------|
|             | $k_1 \cdot 10^2 \text{ (min}^{-1}\text{)}$ |      |      |       |
| Ester I     | 10,74                                      | 9,47 | 9,81 | 11,60 |
| Ester II    | 3,24                                       | 3,43 | 3,65 | 3,18  |

pH: 11,00 ± 0,03; Temperatur: 19,6°;  $c_0 = 0,025 \text{ Mol/l}$  (Anfangskonzentration des Esters in bidest. Wasser); Ionenstärke  $\mu = 0,5 \text{ Mol/l}$  NaCl. Aus dem Verlauf der Titrationskurven wurde nach dem zweiten (halbgraphischen) Verfahren von GUGGENHEIM<sup>4</sup> die Reaktionsgeschwindigkeitskonstante erster Ordnung  $k_1$  ermittelt.

I, weil wegen der vielseitigen Resonanzmöglichkeiten im N-Alkyl-pyridiniumsystem<sup>3</sup> die positive Ladung am Stickstoff teilweise intramolekular kompensiert ist. Der elektrostatische Effekt allein vermag also die gefundenen Tatsachen nicht zu deuten. Berücksichtigt man jedoch ausserdem, dass der Pyridinium-Ester, nicht aber der Cholinester zur nucleophilen Addition von Anionen befähigt ist<sup>4</sup>, so kommt man zu einer befriedigenden Erklärung. Wir nehmen an (vergleiche Figur 2), dass zunächst die Ester-Carbonylgruppe von der positiven Ladung angezogen und in räumliche Nachbarschaft zum Stickstoff gebracht wird (III) (elektrostatischer Effekt); dadurch wird die Polarisierung der C=O-Gruppe noch verstärkt und der Angriff durch das OH<sup>-</sup>-Ion erleichtert. Gleichzeitig erfolgt intramolekulare Addition des Carbonylsauerstoffs

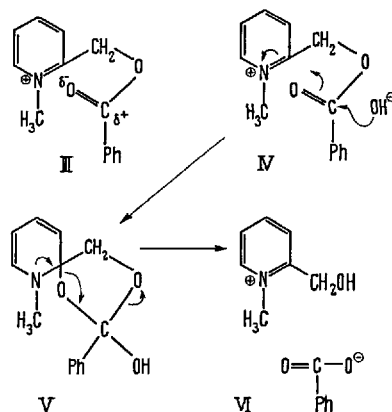


Fig. 2

<sup>1</sup> Zur pH-Stat-Methodik vgl. C. F. JACOBSEN, J. LÉONIS, K. LINDERSTRÖM-LANG und M. OTTESEN, *Methods of Biochemical Analysis* 4, 171 (1957).

<sup>2</sup> E. SCHÄTZLE, M. ROTTENBERG und M. THÜRKAUF, *Helv. chim. Acta* 42, 1708 (1959).

<sup>3</sup> F. KRÖHNKE, *Angew. Chem.* 65, 605 (1953).

<sup>4</sup> Vgl. die ausführliche Arbeit von K. WALLENFELS und H. SCHÜLY, *Liebigs Ann.* 621, 86 (1959).

an den Pyridinkern (IV). Das äusserst kurzlebige<sup>5</sup>, spirocyclische BENDER-Zwischenprodukt (V) stabilisiert sich jetzt unter Rückbildung des Pyridin-Systems zu den Endprodukten, Benzoesäure und Hydroxymethyl-N-methylpyridiniumchlorid (VI).

Präparative Durchführung der alkalischen Hydrolyse in  $H_2^{18}O$ -haltigem Wasser ergab die vom skizzierten Mechanismus geforderte, normale Isotopenverteilung; in der isolierten Benzoesäure findet man durch Decarboxylierung des Silbersalzes<sup>2</sup> und massenspektrometrische Analyse des  $CO_2$  die Hälfte des im  $H_2^{18}O$  enthaltenen schweren Sauerstoffs (vergleiche Tabelle II). Die Ähnlichkeit dieser Esterspaltung mit der kürzlich entdeckten oxydativ-bromierenden Hydrolyse von Tyrosin- und Tryptophan-Peptiden<sup>6,7</sup>, unter Beteiligung des desaromatisierten Ring-systems, ist augenfällig.

Tab. II. 2-Benzoyloxymethyl-N-methyl-pyridiniumchlorid (I), alkalische Hydrolyse in  $H_2^{18}O$  bei Zimmertemperatur, 22 und 70 h. Ansatz: 1 mMol Ester + 10 ml 0,1-N NaOH- $O^{18}$  (1,09%  $^{18}O$ );  $CO_2$  aus Bombe: 0,207%  $^{18}O$ .

| Versuch Nr.    | 1    | 2    | 3    | 4    |
|----------------|------|------|------|------|
| h              | 22   | 22   | 70   | 70   |
| Silbersalz, mg | 138  | 137  | 142  | 112  |
| % $^{18}O$     | 0,51 | 0,50 | 0,54 | 0,53 |

Substrate: 1. Benzoylcholin-chlorid, bezogen von Hoffmann-La Roche. 2. Pyridyl-2-carbonylbenzoat-methochlorid (I). Aus Pyridyl-2-carbonylbenzoat-hydrochlorid (Ia; F. 134–136°, uncorr.) erhielt man das Methojodid (Ib; F. 185–186°, uncorr.), und durch Ionen-Austausch schliesslich das Chlorid I (F. unscharf, Zers. bei ca. 180°); für Ia und I liegen gut stimmende CH, N- und Halogen-Analysen vor.

**Summary.** A structural analogue of benzoylcholine is prepared in which the trimethylamino group is replaced by a pyridine ring. Rate measurements are presented to demonstrate that the pyridinium ester I undergoes alkaline hydrolysis faster than the choline ester II. It is suggested that the abnormal rate is due to an unusual type of neighbouring group effect involving anchimeric participation of the pyridine ring.

ELSBETH SCHÄTZLE, H. URHEIM,  
M. ROTTENBERG und M. THÜRKAUF<sup>9</sup>

KTA, Laboratorium Wimmis (Bern), und Physikalisch-chemisches Institut der Universität Basel, 10. März 1961.

<sup>5</sup> M. L. BENDER, J. Amer. chem. Soc. 73, 1626 (1951).

<sup>6</sup> E. J. COREY und L. F. HAEFELE, J. Amer. chem. Soc. 81, 2225 (1959). – G. L. SCHMIR, L. A. COHEN und B. WITKOP, J. Amer. chem. Soc. 81, 2228 (1959).

<sup>7</sup> W. B. LAWSON, A. PATCHORNIK und B. WITKOP, J. Amer. chem. Soc. 82, 5918 (1960). – A. PATCHORNIK, W. B. LAWSON, E. GROSS und B. WITKOP, J. Amer. chem. Soc. 82, 5923 (1960).

<sup>8</sup> E. A. GUGGENHEIM, Phil. Mag. [7] 2, 538 (1926).

<sup>9</sup> Der eine von uns (M. Th.) ist der Schweiz. Kommission für Atomwissenschaft (KAW) zu Dank verpflichtet. Das verwendete  $H_2^{18}O$  wurde mit Hilfe von Präzisions-Destillierkolonnen gewonnen, welche im Rahmen eines Forschungsprogrammes der SKA (Schweiz. Kommission für Atomenergie) entwickelt und in früheren Arbeiten beschrieben wurde<sup>10</sup>. Herrn ERNST WENGER danken wir für zuverlässige Mitarbeit beim Messen und Rechnen.

<sup>10</sup> W. KUHN, Chem. Ing. Techn. 1957, 6. – P. BAERTSCH und W. KUHN, Techn. Rundschau 1954, Nr. 52.

## Observations on the Fate of Oral 4-Hydroxytryptophan in Man<sup>1</sup>

It is known that 4-hydroxytryptophan (4-HTP) is an excellent substrate for mammalian dopadecarboxylase<sup>2</sup>. The urine of rats given 4-HTP, by oral or subcutaneous route, contains a number of 4-HTP metabolites, among which are 4-hydroxytryptamine (4-HT), 4-hydroxyindoleacetic acid (4-HIAA), and their O-glucuronides<sup>3</sup>.

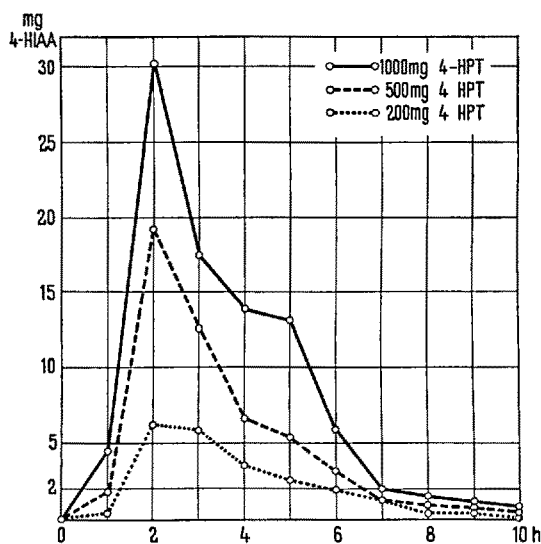
This communication is intended to give a concise account of the fate of 4-HTP given by mouth in man. Three doses of 200, 500, and 1000 mg of DL-4-HTP, dissolved in a little water, were ingested by one of us (E.) at intervals of 7 days. Urine was collected and measured every hour for 12 h, and then in the following 12 h period.

Chromatograms of suitably concentrated or diluted urine were run, using prevalently the *n*-butanol: acetic acid: water mixture (4:1:5) and 4-hydroxyindole spots were developed with the NNCD reagent (2-chloro-4-nitro-1-diazobenzene- $\alpha$ -naphthalene sulphuric acid) or with diazotized *p*-nitroaniline. Semi-quantitative estimation of 4-HTP and 4-HIAA was carried out on paper chromatograms by visual comparison of the spots given by different amounts of urine with the spots given by known amounts of pure synthetic 4-HTP or 4-HIAA. 4-HT was estimated, both by paper chromatography and by bioassay.

In order better to separate and individualize the 4-HTP metabolites, pooled urine was passed through an alumina column and eluted with descending concentrations of ethanol.

The main results may be summarized as follows: (a) oral DL-4-HTP, in doses up to 1 g, had no obvious pharmacological effects in man. (b) 4-HIAA was by far the

most important metabolite of 4-HTP found in urine after the oral administration of the amino acid. The total amount of free 4-HIAA was 95–100 mg after 1000 mg



Urinary excretion of 4-HIAA after oral administration, at 0 time, of 200, 500, and 1000 mg of DL-5-HTP.

<sup>1</sup> Supported by a grant from the Rockefeller Foundation, New York.

<sup>2</sup> V. ERSFAMER, A. GLÄSSER, C. PASINI, and G. STOPPANI, Nature 189, 483 (1961).

<sup>3</sup> V. ERSFAMER, A. GLÄSSER, M. B. NOBILI, and C. PASINI, Exper. 16, 506 (1960).