

transport is therefore involved in the mucosal uptake of proline but is minimal or absent in the isolated muscle.

Discussion. The experiments reported here show that amino acids are not accumulated by an active transport mechanism by excised dog intestinal muscle. More surprisingly, there is a barrier to diffusion of amino acids from the mucosa into the muscle when the two tissues are incubated together (such as that described by LIFSON and PARSONS³ for sugars). After an hour's incubation, the amino acid, accumulated to a high degree in mucosal tissue, is found in lower concentration in the muscle cells. This is in agreement with our previous findings that the concentration in the muscle is the same whether it is separated from the mucosa before or after the incubation, but contrary to the results of CRANE and MANDLESTAM², who found that for sugars there was free diffusion from mucosa to muscle but amino acids were absorbed by the muscle against a concentration gradient. There may be a species difference (these authors used the hamster) and the hard thick muscle of the dog may present a severe barrier to diffusion.

These results clearly indicate that considerable care should be taken when interpreting the results of in vitro experiments on amino acid uptake because of the barrier which may exist to free diffusion between the component tissues in the samples. Whenever possible, such experiments should be carried out with pure mucosal tissue, especially in the cases where the tissue comes from a large animal, where variations in the proportion of mucosa to muscle can lead to large errors. The major advantages of the accumulation method of AGAR, HIRD, and SIDHU⁴ on

which this method is based, are the simplicity, the reproducibility and the possibility of using multiple parallels to increase the statistical significance of the results; these advantages are easily lost if allowance is not made for the properties of the muscle tissue in the fragments⁵.

Résumé. On a séparé le tissu intestinal en muqueuse et muscle, lesquels ont été incubés in vitro dans une solution d'acide aminé marqué; ainsi on a pu étudier l'absorption intracellulaire de l'acide aminé. On a trouvé que la musculature intestinale ne peut accumuler un acide aminé contre un gradient de concentration. Il semble qu'il existe dans le muscle une barrière contre la diffusion dont la signification est discutée.

J. W. L. ROBINSON,
J.-CL. JÉQUIER, and J.-P. FELBER

Laboratoire de Biochimie Clinique, Clinique Médicale
Universitaire, Lausanne (Suisse), le 10 juin 1964.

³ N. LIFSON and D. S. PARSONS, Proc. Soc. exp. Biol. Med. **95**, 532 (1957).

⁴ W. T. AGAR, F. J. R. HIRD, and G. S. SIDHU, Biochim. biophys. Acta **14**, 80 (1954).

⁵ **Acknowledgments.** We thank Dr. V. MIRKOVITCH, of the Département de Chirurgie Expérimentale, for providing the dogs' intestines. Mlle. M. STRAUM is thanked for her excellent technical assistance. This research was supported in part by a grant from the Nestlé Co. of Vevey.

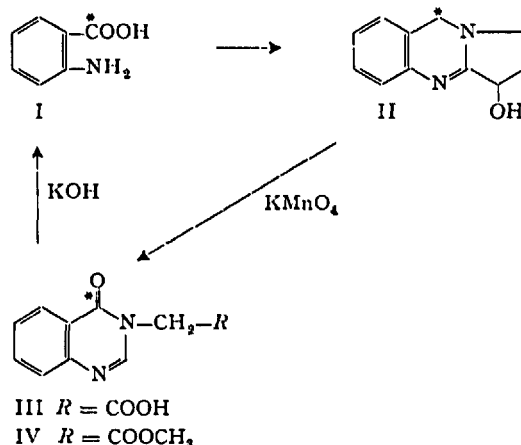
Über den Einbau von Anthranilsäure in Peganin

Zur kleinen Gruppe der Chinazolinalkaloide gehören die Pyrrolidinochinazoline vom Typ des Peganins = Vasicins. Das von HOOPER¹ in der indischen Acanthacee *Adhatoda vasica* Nees gefundene Vasicin (II) ist bisher in fünf Pflanzenfamilien nachgewiesen worden: Acanthaceae, Zygophyllaceae, Scrophulariaceae, Papilionaceae und Palmae. Bei den Zygophyllaceae kommen die Chinazoline vergesellschaftet mit β -Carbolinen vor.

Als Baustein der Chinazoline im Pflanzenreich ist die Anthranilsäure (I) vermutet worden². Wir konnten vor einigen Jahren zeigen, dass Anthranilsäure-(¹⁴COOH) von steril aufgezogenen *Peganum harmala*-Pflanzen in Peganin eingebaut wird³. Die grösste spezifische Aktivität fanden wir in den Wurzeln. Wir haben damals keine Positionsklärung der Radioaktivität durchgeführt, so dass nicht bewiesen war, ob (I) als Ganzes zur Biosynthese von (II) Verwendung findet. Es bestand noch die Möglichkeit, dass Anthranilsäure decarboxyliert und das CO₂ unspezifisch in Peganin inkorporiert wurde.

Wir haben das Problem erneut aufgegriffen und Anthranilsäure-(¹⁴COOH) an bewurzelte Blätter von *Adhatoda vasica* Nees verfüttert. Das gebildete Peganin wurde isoliert, mit inaktivem Alkaloid verdünnt und in Anlehnung an SPÄTH und NIKAWITZ⁴ abgebaut (Figur). Die Ergebnisse zeigt die Tabelle. Das eingesetzte Peganin sowie die durch Abbau erhaltene Anthranilsäure haben praktisch die gleiche spezifische Aktivität. Somit ist bewiesen, dass zumindest von *Adhatoda vasica* die Anthranilsäure direkt in Peganin eingebaut wird.

Experimentelles. Anthranilsäure-(¹⁴COOH) wurde nach der Vorschrift von MUNSCH und SCHÜTTE⁵ hergestellt: *o*-Nitroanilin wurde diazotiert und mit einer Lösung von



¹ D. HOOPER, Pharm. J. **18**, 841 (1888).

² R. ROBINSON, *The Structural Relations of Natural Products* (Oxford 1955), p. 95.

³ D. GRÖGER und K. MOTHES, Arch. Pharm. **293**, 1049 (1960).

⁴ E. SPÄTH und E. NIKAWITZ, Ber. d. chem. Ges. **67**, 45 (1934).

⁵ D. MUNSCH und H. R. SCHÜTTE, Z. Chem. **3**, 230 (1963).

1/4 CuCN + 3/4 Na¹⁴CN durch Sandmeyer-Reaktion in *o*-Nitrobenzonitril-(¹⁴CN) übergeführt. Durch Verseifen der Nitrilgruppe und Reduktion der Nitrogruppe erhält man Anthranilsäure-(¹⁴COOH). Die spezifische Aktivität unseres Präparates betrug $1,06 \cdot 10^9$ Ipm/mMol.

21,5 mg Anthranilsäure-(¹⁴COOH) wurden an 10 drei Wochen alte bewurzelte Blätter über die Wurzel verfüttert. Nach 10 Tagen wurde der Versuch abgebrochen und das Pflanzenmaterial getrocknet. Trockengewicht der Wurzeln 1,37 g und der Blätter 3,44 g. Die Wurzeln wurden nach Alkalisieren 3 h mit Chloroform:Isopropanol (3:1) am Rückfluss erhitzt. Der Extrakt wurde eingengt, mehrfach mit 5%iger HCl ausgeschüttelt und das Alkaloid nach Alkalisieren (pH 9) mit CH₂Cl₂ extrahiert. Chromatographisch konnte nur Peganin nachgewiesen werden. Die quantitative Bestimmung nach GRÖGER und JOHNE⁶ ergab 16,6 mg Peganin. Zur eingengten Methylenchloridlösung wurden 95 mg inaktives Peganin hinzugegeben, und das Ganze wurde an einer Al₂O₃-Säule basisch «Woelm» chromatographiert. Eluiert wurde mit Chloroform:Methanol (9:1). Die Peganin enthaltenden Fraktionen wurden zur Trockne eingengt und einer Hochvakuumsublimation (10⁻² Torr, 135°C) unterworfen. Die erhaltenen 89 mg Peganin wurden nochmals mit 123 mg inaktivem Peganin verdünnt. Zum Abbau wurden 210 mg (II), welches eine konstante Radioaktivität zeigte, eingesetzt. Die Oxidation wurde in Anlehnung an SPÄTH und NIKAWITZ⁴ durchgeführt.

Das Alkaloid wurde in 150 ml Aceton p.a. gelöst. Zu dieser Lösung wurden in 4 Portionen insgesamt 430 mg

KMnO₄ hinzugefügt, das Ganze wurde 4 h geschüttelt. Die entstandene 4-Oxo-3,4-dihydro-chinazolyl-3-essigsäure (III) haben wir extrahiert und nach Vertreiben des Lösungsmittels mit Diazomethan verestert (= (IV)). Das Rohprodukt wurde mit 20%iger KOH 40 min bei 95°C erhitzt. Nach dem Erkalten haben wir mit HCl neutralisiert und das Ganze mit Pufferlösung auf pH 3,5 eingestellt. Es wurde erschöpfend mit Äther extrahiert, danach das Lösungsmittel stark eingengt und die Anthranilsäure auf DC-Platten gereinigt (Kieselgel G «Merck», angerührt mit 0,5%iger KOH; Lösungsmittelsystem Chloroform:Methanol:Eisessig (85:13:2)). Vom Adsorbens liess sich (I) mit einer Mischung von Methanol:Aceton:Eisessig (8:2:1) eluieren. Das Eluat wurde zur Trockne gebracht, der Rückstand mit Pufferlösung pH 3,5 aufgenommen und mit Äther ausgeschüttelt. Der Ätherrückstand ergab 45 mg Anthranilsäure, die mehrfach im Hochvakuum sublimiert wurde. Smp. 144°C. Der Mischschmelzpunkt zeigte keine Depression. Das IR-Spektrum stimmte völlig mit einer authentischen Probe überein. Alle Radioaktivitätsmessungen erfolgten in unendlich dünner Schicht mittels des Methandurchflusszählers der Firma Friessecke und Höpfner.

Summary. Anthranilic acid-(¹⁴COOH) was administered to rooted leaves of *Adhatoda vasica* Nees. The isolated alkaloid peganine = vasicine was degraded according to the method of SPÄTH and NIKAWITZ (Figure). The anthranilic acid obtained showed the same specific radioactivity as the alkaloid. Therefore anthranilic acid must be regarded as a direct precursor of peganine in *A. vasica* Nees.

Spezifische Radioaktivität des eingesetzten Peganins und der durch Abbau erhaltenen Anthranilsäure

Substanz	Spez. Aktivität Ipm/mMol	% der Gesamtaktivität
Peganin	$1,79 \cdot 10^6$	100
Anthranilsäure	$1,78 \cdot 10^6$	99,2

D. GRÖGER, S. JOHNE
und K. MOTHES

Deutsche Akademie der Wissenschaften, Institut für Biochemie der Pflanzen, Halle (Saale, DDR), 11. September 1964.

⁶ D. GRÖGER und S. JOHNE, Festschrift K. MOTHES, im Druck.

Pathway of Glucose Oxidation in Leucocytes Incubated in Different Conditions

According to BECK¹ the respiration of polymorphonuclear leucocytes incubated in phosphate medium is mainly related to the phosphogluconate oxidation pathway by means of a NADP⁺-NADPH shuttle between it and the cytochrome chain. Experimental work carried out in this laboratory demonstrated that the respiration of resting polymorphonuclear leucocytes is very low and sensitive to amytal, antimycin and cyanide when the cells are incubated in phosphate medium and CO₂ is absorbed in KOH; it is dramatically increased, and turns out to be inhibited by amytal, but antimycin- and cyanide-insensitive, when the incubation is performed in Ringer bicarbonate containing glucose^{2,3}. Since both bicarbonate and glucose are needed for this oxidative switch to be produced, the Crabtree effect, which is clearly shown in

phosphate solution, no longer appears in the presence of bicarbonate².

This finding led to the hypothesis that in the presence of bicarbonate-CO₂ the carboxylation of pyruvate to malate, in cooperation with NADPH, would be allowed by the continuous supply of pyruvate through glycolysis not controlled by an efficient oxidative phosphorylation². If this is so, an increased activity of the HMP pathway must be expected in the presence of bicarbonate, through regeneration of NADP⁺. Since malic-dehydrogenase would ultimately transfer electrons to NAD⁺, such carboxylative transhydrogenation could explain the oxidative switch exhibited by leucocytes in the presence of glucose and bicarbonate.

¹ W. S. BECK, J. biol. Chem. 232, 251, 271 (1958).

² M. ZATTI and F. ROSSI, Ital. J. Biochem. 10, 19 (1961).

³ F. ROSSI and M. ZATTI, Exp. Cell Res. 25, 182 (1961).