

Results and discussion. Preparation of *p*-methoxybenzyl chloroformate was first reported by JONES and YOUNG³. We reinvestigated their reaction conditions using Silica gel G thin-layer chromatography with benzene as the developing solvent. Reaction between phosgene and anisyl alcohol in ether was found to be very fast even at below 0°C. The stability of the chloroformate formed was as follows: (1) It was stable at below 0°C when diluted with ether to about 1 mol/400 ml. (2) In more concentrated solution, the chloroformate was less stable and evolution of CO₂ was observed even at below 0°C. (3) It decomposed gradually in dilute etherial solution, even at -10°C, on addition of chloroform.

Finally, practical conditions for the preparation of the chloroformate were established as described above. The chloroformate solution should be stored in a deep freezer and used within a few days.

In the Schotten-Baumann reactions with amino acids, addition of water-soluble solvents, such as tetrahydrofuran or a lower-alkyl alcohol, increased the reaction rate, as in the same reactions with *t*-alkyloxycarbonyl chloride⁶, but addition of these materials was not essential. The products which did not crystallize at this stage were obtained as dicyclohexylamine salts. Then, after reextraction with ethyl acetate, some of them were recovered as

crystals of free Z(OMe)-amino acids by shaking their salts with NH₂SO₄. The Z(OMe)-amino acids synthesized in this way are shown in Table 1.

This procedure seems especially suitable for large-scale preparation, although good results have not yet been obtained with serine.

Zusammenfassung. *p*-Methoxybenzyloxycarbonylhydrazid und *p*-Methoxybenzyloxycarbonylaminosäuren konnten durch die Schotten-Baumannsche Reaktion mit *p*-Methoxybenzyloxycarbonylchlorid als Reagens direkt synthetisiert werden. Die Reaktionsbedingungen für die Darstellung des Reagens wurden verbessert und seine Stabilität wurde untersucht.

S. SAKAKIBARA, I. HONDA,
M. NARUSE and M. KANAOKA

*Institute for Protein Research, Osaka University,
Kita-ku, Osaka (Japan), 30 December 1968.*

⁶ S. SAKAKIBARA, I. HONDA, K. TAKADA, M. MIYOSHI, T. OHNISHI and K. OKUMURA, Bull. Chem. Soc. Japan 42, 809 (1969).

Beeinflussung der ATPase aminspeichernder Granula von Nebennierenmark und Milznerven durch Thallium

Bei der Thalliumintoxikation des Menschen kommt es in einem Teil der Fälle zu Blutdrucksteigerung und Tachykardie^{1,2}, die durch α - und β -Rezeptorenblocker antagonistisch beeinflussbar sind³. Dabei wurde eine erhöhte Ausscheidung von Noradrenalin, in geringerem Masse auch von Adrenalin und 3-Methoxy-4-hydroxymandelsäure, im Harn beobachtet^{3,4}. Die Symptome lassen sich als ein «erhöhter Erregungszustand des sympathischen Nervensystems»³ deuten. Eine tierexperimentelle Nachahmung dieser Veränderungen gelang uns in Versuchen an Ratten bisher nicht.

Verschiedene ATPasen werden durch Tl⁺ (Rattenerythrozyten⁵, Kaninchennieren⁶) und durch Tl⁺⁺⁺ (Rattenleber-Mitochondrien⁷) stimuliert. Der Effekt des einwertigen Thalliums ist durch seine Ähnlichkeit mit dem gleichsinnig wirkenden K⁺-Ion erklärbar^{5,6}. Auch für die intrazelluläre Anreicherung von Thallium^{8,9} wird seine Beförderung durch den ATP-abhängigen K⁺-Transportmechanismus diskutiert⁵.

Da Thallium ins Zellinnere aufgenommen wird, liegt ein möglicher Angriffspunkt in den aminspeichernden Organellen chromaffiner Zellen oder peripherer Nervenendigungen. Sie enthalten eine Mg⁺⁺-abhängige, durch Na⁺ und K⁺ nicht aktivierbare ATPase, der eine entscheidende Rolle beim Transport der Amine zugeschrieben wird^{10,11}. Wir untersuchten deshalb die Wirkung ein- und dreiwertiger Thalliumionen auf die Granula-ATPasen des Nebennierenmarks (NNM) und der Milznerven von Rindern.

Die Brenzcatechinamin-Granula des NNM wurden nach TAUGNER und HASSELBACH¹², die der Milznerven nach BURGER et al.¹¹ (60 000-g-Sediment) durch Ultrazentrifugation präpariert. Die Partikeln wurden in 0,3 M Saccharose resuspendiert, so dass 10 ml 1 g NNM (175–390 µg

Protein/ml Suspension) bzw. 3 g Milznerven (250–400 µg Protein/ml Suspension) entsprachen.

Die Inkubationsansätze zur Bestimmung der ATPase-Aktivität enthielten:

0,1 ml 0,001 N HCl (Kontrollen) bzw. TlCl₃ oder Tl₂SO₄ in 0,001 N HCl
0,3 ml 8,3 × 10⁻³ M MgSO₄ in 0,4 M Tris-Acetat-Puffer pH 7,4
0,4 ml Granulasuspension
0,2 ml Tris-ATP (0,0125 M Na-freies ATP in 0,3 M Tris-Acetat-Puffer pH 7,4).

¹ J. L. ALLSOP, Australas Ann. Med. 2, 144 (1953).

² S. MOESCHLIN, *Klinik und Therapie der Vergiftungen*, 4. Aufl. (Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1964).

³ K. D. BOCK, P. MERGUET, G. SCHLEY, H. J. SCHÜMANN, J.-G. RAUSCH-STROOMANN, V. HOCEVAR, E. SCHRÖDER und T. MURATA, Dt. med. Wschr. 93, 2119 (1968).

⁴ S. TILLMAN, Svenska Läkartidn. 49, 1523 (1952).

⁵ P. J. GEHRING und P. B. HAMMOND, J. Pharmac. exp. Ther. 155, 187 (1967).

⁶ J. S. BRITTON und M. BLANK, Biochim. biophys. Acta 159, 160 (1968).

⁷ G. HOLLUNGER, Acta pharmac. tox. 16, 347 (1960).

⁸ J. L. MULLINS und R. D. MOORE, J. gen. Physiol. 43, 759 (1960).

⁹ P. J. GEHRING und P. B. HAMMOND, J. Pharmac. exp. Ther. 145, 215 (1964).

¹⁰ N. A. HILLARP, Acta physiol. scand. 43, 82 (1958).

¹¹ A. BURGER, A. PHILIPPU und H. J. SCHÜMANN, Arch. Pharmak. exp. Path. 262, 208 (1969).

¹² G. TAUGNER und W. HASSELBACH, Arch. Pharmak. exp. Path. 255, 266 (1966).

Einfluss von Tl^+ und Tl^{+++} auf die ATPase-Aktivität von NNM- und Milznervengranula

	Kontrollen	$10^{-6} M$	$2 \times 10^{-6} M$	$5 \times 10^{-6} M$	$10^{-5} M$	$3 \times 10^{-5} M$	$10^{-4} M$	$10^{-3} M$
NNM-ATPase, Tl^+	100				107,6 (1)		107,6 (1)	$101,6 \pm 1,7$ (3)
Milznerven-ATPase, Tl^+	100				98,8 (1)		99,6 (1)	$101,2 \pm 0,4$ (3)
NNM-ATPase, Tl^{+++}	100	108,3 (1)			$102,4 \pm 2,6$ (3)	$76,0 \pm 4,2$ (4)	$58,4 \pm 4,0$ (5)	$34,9 \pm 10,5$ (3)
Milznerven-ATPase, Tl^{+++}	100	$99,2 \pm 1,9$ (5)	$101,4 \pm 0,9$ (6)	$82,6 \pm 1,7$ (3)	$58,5 \pm 1,3$ (9)		$34,0 \pm 1,5$ (6)	$28,3 \pm 2,1$ (3)
				$p < 0,005$	$p < 0,0001$		$p < 0,0001$	$p < 0,01$

Die Aktivität der Kontrollen wurde gleich 100 gesetzt. $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$. In Klammern: Zahl der Versuche. Signifikanzberechnung: *t*-Test für abhängige Stichproben.

Nach 15 min Vorinkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe der *Tris*-ATP-Lösung gestartet. Nach 20 min (Milznerven) bzw. 30 min (NNM) Inkubation wurde das Eiweiss mit 5 ml 0,3 NHClO_4 gefällt und das entstandene Orthophosphat im Überstand nach FISKE und SUBBAROW¹³ gemessen. Leerwerte: ohne Granula inkubiertes ATP und ohne ATP inkubierte Granula-suspension. Protein wurde nach LOWRY et al.¹⁴ mit Labtrol als Standard bestimmt. Die Enzymaktivität wurde in $\mu\text{g Phosphor}/\text{mg Protein} \times \text{Inkubationszeit}$ berechnet.

In der Tabelle ist die ATPase-Aktivität in Gegenwart von Thallium in Prozent der Aktivität der Kontrollansätze angegeben. Die Phosphatbildung betrug in den Kontrollansätzen von NNM-Granula $65,5 \pm 3,4 \mu\text{g P}/\text{mg Protein} \times 30 \text{ min}$ ($n = 5$), in denen von Milznervengranula $139 \pm 6 \mu\text{g P}/\text{mg Protein} \times 20 \text{ min}$ ($n = 9$). ATP wurde also unter Berücksichtigung der verschiedenen Inkubationszeiten durch die Nervengranulasuspension etwa dreimal so rasch umgesetzt wie durch die NNM-Granula. Tl^+ bis zu $10^{-3} M$ beeinflusste die ATPasen beider Granulaarten nicht. Durch Tl^{+++} dagegen wurde die Granula-ATPase des NNM ab $3 \times 10^{-5} M$, die der Milznerven ab $5 \times 10^{-6} M$ signifikant und konzentrationsabhängig gehemmt.

Die Hemmung könnte, ausser durch eine spezifische Reaktion mit dem Enzym, auch durch eine unspezifische eiweissdenaturierende Wirkung der Schwermetallionen zustande kommen. Wir zentrifugierten deshalb thallium-haltige Granulasuspensionen ($600 \text{ g} \times 20 \text{ min}$) und bestimmten das Eiweiss im Sediment. Durch Tl^+ (10^{-6} bis $10^{-3} M$) und Tl^{+++} (10^{-6} bis $10^{-5} M$) wurde kein Eiweiss gefällt, bei $10^{-4} M$ Tl^{+++} erschien Spuren, bei $10^{-3} M$ Tl^{+++} praktisch das gesamte Protein der Suspension im Niederschlag. Die ATPasen werden also durch Tl^{+++} -Konzentrationen inhibiert, bei denen noch keine messbare Eiweisspräzipitation auftritt.

Die Hemmung der Granula-ATPase durch Tl^{+++} könnte zu einer verminderten Speicherfähigkeit für Amine und damit zu ihrer vermehrten Freisetzung führen. Die ATPase der Noradrenalin speichernden Nervengranula ist fast zehnfach empfindlicher als die der überwiegend Adrenalin speichernden NNM-Granula. Dem entspricht der Befund, dass bei Thalliumvergiftung stark die Nor-

adrenalin-, nur gering die Adrenalinausscheidung im Harn gesteigert ist³.

Bei der Intoxikation des Menschen wird einwertiges Thallium inkorporiert. Nach der stark toxischen Dosis von $10 \text{ mg/kg } \text{Tl}^+$ beträgt die Konzentration im Organismus bei gleichmässiger Verteilung und fehlender Ausscheidung etwa $5 \times 10^{-5} M$. Selbst bei wesentlich höherer Konzentration beeinflusst einwertiges Thallium die Granula-ATPase nicht, dreiwertiges Thallium dagegen bewirkt in dieser Konzentration eine deutliche Hemmung. HOLLUNGER⁷ nimmt an, einwertiges Thallium müsse im Organismus in dreiwertiges übergehen. Untersuchungen zu dieser Frage sind, soweit uns bekannt, bisher nicht durchgeführt worden. Eine weitere Voraussetzung für eine Rolle des Tl^{+++} bei der vermehrten Aminausschüttung ist, dass sein Oxidationspotential im Zellmilieu herabgesetzt ist bzw. dass es nicht in freier Form mit den Aminen in Kontakt kommt; denn durch $10^{-4} M$ Tl^{+++} wird, wie wir feststellten, Noradrenalin rasch oxidiert.

Summary. ATPases of the amine storing granules from bovine adrenal medulla and splenic nerves are inhibited by Tl^{+++} 3×10^{-5} and $5 \times 10^{-6} M$, respectively. Tl^+ up to $10^{-3} M$ is ineffective. By Tl^{+++} in concentrations of $10^{-4} M$ or more, proteins are precipitated, so that the enzyme inhibitor by these concentrations is unspecific. If Tl^+ is oxidized to Tl^{+++} in the organism, the inhibition of granular ATPase may be responsible for the alterations of the catecholamine metabolism observed in thallium intoxication.

A. BURGER und K. STARKE

Pharmakologisches Institut des Klinikums Essen
der Ruhr-Universität, 43 Essen (Deutschland),
29. Januar 1969.

¹³ C. H. FISKE und Y. SUBBAROW, *J. biol. Chem.* **66**, 375 (1925).

¹⁴ O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR und R. J. RANDALL, *J. biol. Chem.* **193**, 265 (1951).