

Effetto di butirrofenoni e di fenotiazine sull'accumulo di glicina in fettine di corteccia cerebrale di ratto

In un precedente lavoro¹ era stato dimostrato che nella corteccia cerebrale di ratto incubata *in vitro* con glutammato, aspartato o glicina l'aggiunta di triperidolo alla concentrazione $2 \times 10^{-4}M$ provocava un accumulo degli amminoacidi nel tessuto mentre non si verificava alcun aumento, rispetto al controllo, del contenuto di acqua. È sembrato pertanto interessante studiare se tale effetto sull'accumulo degli amminoacidi fosse comune anche ad altri neurolettici della serie dei butirrofenoni nonché alle fenotiazine.

Materiali e metodi. — Le condizioni sperimentali usate sono sostanzialmente quelle precedentemente descritte¹. 100 mg di fettine di corteccia cerebrale di ratti Wistar sono stati incubati con glicina- $U^{14}C$ (The Radiochemical Centre, Amersham, Gran Bretagna) per 60 min in O_2 , a $37^\circ C$. Il mezzo di incubazione era costituito da 1,2 ml di soluzione salina con tampone fosfato a pH 7,4 secondo Elliott-Henderson² (Na_2HPO_4 17,5 mM, NaCl 98,0 mM, KCl 27,0 mM, $MgSO_4$ 1,2 mM, KH_2PO_4 4,0 mM) nel quale era sciolta la glicina alla concentrazione 13,3 mM, a radioattività specifica 0,063 $\mu C/\mu mole$. In alcune esperienze il K^+ del mezzo di incubazione era completamente sostituito da Na^+ ; in altre esperienze il mezzo di incubazione conteneva anche $CaCl_2$ 3 mM. I derivati butirrofenonici (aloperidolo e triperidolo, forniti dai Laboratori del dott. Janssen, Beerse, Belgio) erano sciolti in acido lattico e la soluzione era successivamente neutralizzata con NaOH; acido lattico neutralizzato in concentrazione uguale veniva aggiunto ai rispettivi controlli. I derivati fenotiazinici (proclorperazina e tiopropazina, forniti dai Laboratori Rhône-Poulenc) erano usati come metansolfonati; ai rispettivi controlli si aggiungeva pertanto metansolfonato di sodio alla concentrazione uguale a quella del farmaco in esame. In tutte le esperienze fettine di cervello dello stesso ratto erano incubate in presenza ed in assenza del farmaco. La radioattività della glicina- $U^{14}C$ presente negli estratti era misurata con l'apparecchiatura Mark I (Nuclear, Chicago) a scintillatore liquido, usando il liquido Bray³.

Risultati e conclusioni. — Dalla Tab. I appare che tutti e quattro i farmaci studiati provocano un accumulo di glicina nel tessuto cerebrale. I butirrofenoni dimostrano un effetto statisticamente significativo già alla concentrazione $10^{-6}M$, mentre per i farmaci del gruppo delle fenotiazine l'effetto si manifesta alla concentrazione $10^{-4}M$; non sono state invece trovate differenze significative tra i farmaci appartenenti allo stesso gruppo. È da notare che la concentrazione $10^{-6}M$ si avvicina a quella presumibilmente raggiunta dai butirrofenoni nel tessuto cerebrale dopo la loro somministrazione *in vivo*⁴.

TABELLA 1.

**Effetto di butirrofenoni e di fenotiazine sull'accumulo di glicina
nelle fettine di corteccia cerebrale di ratto**

Concentrazione del farmaco M	Butirrofenoni		Fenotiazine	
	Aloperidolo	Triperidolo	Proclorperazina	Tiopropazina
	(μmoli di glicina/100 mg di tessuto/h)			
0	2,07 ± 1,92 (2)	1,84 ± 0,06 (10)	1,92 ± 0,08 (10)	1,93 ± 0,06 (6)
10 ⁻⁶	2,20 ± 0,10 (3)	2,17 ± 0,03 (4)	1,97 ± 0,15 (4)	1,86 ± 0,06 (5)
10 ⁻⁵	2,37 ± 0,10 (3)	2,61 ± 0,15 (4)	2,11 ± 0,08 (4)	2,07 ± 2,07 (2)
10 ⁻⁴	2,97 ± 0,17 (3)	2,78 ± 2,87 (2)	2,42 ± 0,13 (4)	2,52 ± 2,53 (2)

Condizioni sperimentali: 100 mg di fettine di corteccia cerebrale di ratto sono stati incubati a 37° in O₂ in 1,2 ml di soluzione salina con tampone fosfato² pH 7,4, contenente glicina-U-¹⁴C a radioattività specifica 0,063/μC/μmole. Nelle parentesi è indicato il numero delle esperienze; nel caso di due determinazioni sono riportati i singoli valori, nel caso di 3 o più determinazioni viene riportato il valore medio ± deviazione standard.

TABELLA 2.

**Effetto del K⁺ e del Ca⁺⁺ sull'accumulo di glicina nelle fettine
di corteccia cerebrale di ratto incubate in presenza e in assenza di triperidolo.**

K ⁺ e Ca ⁺⁺ nel mezzo di incubazione		Numero di esperienze	Glicina nell'estratto (μmoli/100 mg di tessuto/h)	
K ⁺	Ca ⁺⁺		senza triperidolo	con triperidolo 10 ⁻⁴ M
+	—	4	1,84 ± 0,06	2,83 ± 0,04
—	—	5	1,58 ± 0,03	2,62 ± 0,09
+	+	3	1,83 ± 0,13	2,55 ± 0,03
—	+	3	1,64 ± 0,10	2,47 ± 0,04

Condizioni sperimentali come quelle descritte nella Tabella 1. Nelle esperienze senza K⁺, KCl e KH₂PO₄ sono stati sostituiti, rispettivamente da NaCl e NaH₂PO₄. Nelle esperienze con Ca⁺⁺ al tampone è stato aggiunto CaCl₂ 8 mM. Vengono riportati i valori medi ± deviazione standard.

Dalla Tabella 2 risulta evidente che l'accumulo di glicina dovuto al triperidolo è indipendente dalla composizione ionica del mezzo di incubazione: infatti sia in assenza di K⁺ che in presenza di Ca⁺⁺ l'effetto del farmaco rimane inalterato.

22 luglio 1968.

GIAN LUIGI GATTI, INES MASI,
HANNA MICHALEK e FRANCESCO POCCHIARI
*Laboratori di Chimica Terapeutica
e Laboratori di Chimica Biologica*

¹ MICHALEK, H., G. L. GATTI & F. POCCHIARI, *Biochem. J.*, **110**, 237 (1958).

² ELLIOTT, K. A. C. & N. HENDERSON, *J. Neurophysiol.*, **11**, 473 (1948).

³ BRAY, G. A., *Anal. Biochem.*, **1**, 279 (1960).

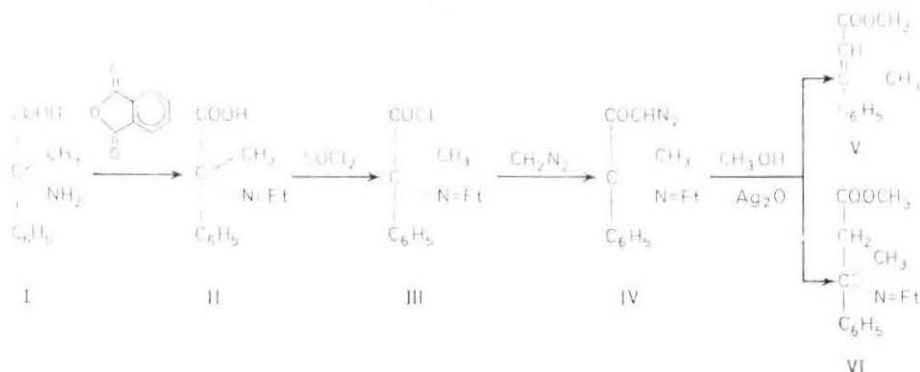
⁴ SOUDJN, W., I. VAN WIJNGAARDEN & F. ALLEWYN, *Europ. J. Pharmacol.*, **1**, 47 (1967).

Eliminazione in una trasposizione di Wolff

Nell'ambito delle ricerche stereochemiche svolte nel nostro laboratorio abbiamo intrapreso lo studio della correlazione stereochemica fra l'acido 2-ammino-2-fenil-propionico (I) e il suo omologo superiore, l'acido 3-ammino-3-fenil-butyrico mediante una trasposizione di Wolff. È ben noto che questa reazione si compie con la ritenzione totale o quasi totale della configurazione primitiva^{1,2} ed è stata ampiamente applicata da BALENOVIĆ e Coll.³⁻⁵ per la trasformazione di α -ftalimmido acidi in nuovi β -ammino acidi otticamente attivi.

Per la reazione dell'ammino acido (I) di configurazione nota^{6,7} con l'anidride ftalica si forma l'acido 2-fenil-2-ftalimmido-propionico (II). Questo composto è stato trasformato nel cloruro di 2-fenil-2-ftalimmido-propionile (III). L'azione del diazometano sul prodotto III porta all'1-diazo-3-fenil-3-ftalimmido butan-2-one (IV) con buona resa.

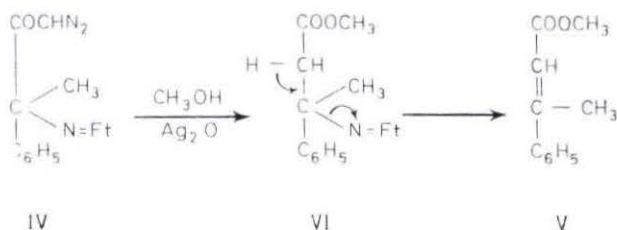
La reazione di questo composto con metanolo bollente e Ag_2O diede un prodotto denso e scuro che venne cromatografato su colonna d'allumina. Si ottenne così il 2-metil-cinnamato di metile (V) con una resa del 36 % (a 20°C per 9 ore: resa 10 %) invece dell'atteso 3-fenil-3-ftalimmido-butyrate di metile (VI).



La conferma della struttura assegnata al composto (V), da noi ottenuto, viene fornita dal confronto delle sue caratteristiche spettroscopiche (I.R. e U.V.) con quelle di un campione autentico di 2-metil-cinnamato di metile. I due campioni hanno inoltre un medesimo comportamento cromatografico.

Il composto (V) si forma probabilmente dall'intermedio (VI), non isolato, attraverso una reazione di eliminazione. Questa eliminazione può essere facilitata dalla

coniugazione del sistema presente nel composto (V) e come presentato nello schema seguente :



Parte sperimentale.

Gli spettri I.R. furono misurati con uno spettrofotometro Perkin-Elmer Infra-red Mod. 137 e quelli nell'U.V. sono stati registrati con uno spettrofotometro Perkin-Elmer Mod. 450.

I punti di fusione sono stati determinati all'apparecchio di Kofler e sono corretti.

Acido 2-fenil-2-ftalimmido propionico (II). — Una miscela di g 9,90 di acido 2-ammino-2-fenil propionico (I)⁸, g 6,88 di anidride ftalica in 300 ml di toluolo e 3 ml di trietilammina viene scaldata a ricadere in un apparecchio Dean-Stark fino a separazione della quantità teorica d'acqua (8 ore). Si raffredda e si evapora il solvente a pressione ridotta. Poi si aggiungono a freddo 90 ml d'acqua e 3 ml di HCl concentrato e si pone sotto forte agitazione per 5 ore. Si ottiene un prodotto solido grezzo avente p.f. 188-190°C. Per ricrostallizzazione da alcool-acqua (4:3) si ottengono g 14,7 (83 %) di acido 2-fenil-2-ftalimmido propionico che fonde a 192-193°C (*).

Spettro I.R. (KBr): C=O 5,60 e 5,80 μ .

Analisi :

trov. % :	C 69,14 ;	H 4,54 ;	N 4,83 ;
per C ₁₇ H ₁₃ NO ₄ calc. :	69,14 ;	4,44 ;	4,75.

Cloruro di 2-fenil-2-ftalimmido propionile (III). — Grammi 16,4 di acido 2-fenil-2-ftalimmido propionico e g 39,3 di cloruro di tionile vengono riscaldati a 70°C per 2 ore. Quindi l'eccesso di SOCl₂ viene eliminato sotto vuoto. Il residuo, costituito da un liquido denso, cristallizza da una miscela di benzene-etere di petrolio (1:3), p.f. 71-74°C. Per ripetute cristallizzazioni dalla stessa miscela di solventi, si ottengono g 11,8 (68 %) di cloruro (III) avente p.f. 74,5-76°C.

Spettro I.R. (KBr): C=O 5,52, 5,60 e 5,80 μ .

1-diazo-3-fenil-3-ftalimmido butan-2-one (IV). — Una soluzione benzenica di g 9,40 del cloruro di 2-fenil-2-ftalimmido propionile, raffreddata a 0°C, viene addizionata di una soluzione di diazometano in etere anidro. La miscela si lascia per 12 ore a 20°C. Indi si eliminano i solventi a pressione ridotta e si cristallizza da una miscela di acetato di etile-etere di petrolio (1:2). Si ottengono g 7,7 (80 %) di cristalli gialli a p.f. 134-136°C.

Spettro I.R. (KBr): C—N₂ 3,23 e 4,73 μ ; C=O 5,62, 5,85 e 6,15 μ .

Analisi :

trov. % :	C 67,78 ;	H 4,18 ;	N 13,07 ;
per C ₁₈ H ₁₃ N ₃ O ₃ calc. :	67,71 ;	4,11 ;	13,16.

(*) U'PHAM & DERMER⁹ riportano p.f. 186-187°C.

2-metil-cinnamato di metile (V). — Grammi 2.2 di diazoacetone (IV) si sciolgono in 30 ml di metanolo assoluto, si aggiungono g 0,9 di Ag_2O e si scalda a riflusso per 6 ore. La soluzione si raffredda, si filtra su celite e si elimina l'alcool. Il residuo, denso, di colore marrone scuro, si scioglie in benzene e viene cromatografato su g 45 di allumina di attività III. Eluendo con solo benzene si ottengono g 0,4 (36 %) di 2-metile cinnamato di metile, liquido incolore con gradevole odore di frutta a p.e. 126°C a 10 torr, $n_D^{20} = 1,5489$. Dopo 2 ore cristallizza spontaneamente e fonde a $26-27^\circ\text{C}$. Spettro U.V. (etanolo): mass. 215 m μ ($\log \epsilon = 4,03$); 266 m μ ($\log \epsilon = 4,15$). Spettro I.R. (velo liquido): $\text{C}=\text{O}$ 5,88 μ ; $\text{C}=\text{C}$ 6,18 e 11,48 μ .

L'A. ringrazia la Sig.ra Angela Bau per la sua collaborazione in questa ricerca.

25 agosto 1968.

JUAN A. GARBARINO (*)

*Departamento de Química de la Facultad
de Ciencias Físicas y Matemáticas de la
Universidad Católica de Chile, Santiago.*

- ¹ LANE, J. F., J. WILLENZ, A. WEISSBERGER & E. S. WALLIS. *J. Org. Chem.*, **5**, 276 (1940).
- ² BALENOVIĆ, K., N. BREGANT & D. CERAR. *J. Chem. Soc.*, 3982 (1956).
- ³ BALENOVIĆ, K. & I. JAMBREŠIĆ. *Chem. Ind. London*, 1673 (1955).
- ⁴ BALENOVIĆ, K. & N. STIMAC. *Croat. Chem. Acta*, **29**, 153 (1957).
- ⁵ BALENOVIĆ, K., I. JAMBREŠIĆ & J. RANEGAJEC. *Croat. Chem. Acta*, **29**, 87 (1957).
- ⁶ CRAM, D. J., L. K. GASTON & H. JÄGER. *J. Am. Chem. Soc.*, **83**, 2183 (1961).
- ⁷ DAHN, H. & J. A. GARBARINO. *Bull. Soc. Vaudoise Sci. Nat.*, **70**, 27 (1968).
- ⁸ STEIGER, R. E. *Org. Syntheses*, J. Wiley & Sons Inc., New York, **3**, 88 (1955).
- ⁹ UPHAM, S. D. & O. C. DERMER. *J. Org. Chem.*, **22**, 779 (1957).

(*) Già ospite dei Laboratori di Chimica Biologica negli anni 1959-60.

Carotenoid incorporation into rhodoxanthin by *Epicoccum nigrum* Link

The recognition of rhodoxanthin, 3,3'-diketo-*retro*- β -carotene, as one of the pigments next to β -carotene, γ -carotene and the acidic carotenoid torularhodin in *Epicoccum nigrum*, started a series of studies concerning with carotenogenesis in general and the biosynthesis of this unique *retro*-compound in particular^{1,4}.

Studies on the effect of light and temperature on carotenoid formation already made in evidence the close relationship between β -carotene and rhodoxanthin. The addition of diphenylamine enabled the authors to develop the hypothesis on the formation of rhodoxanthin from β -carotene² concerning as intermediate steps the formation of 3-hydroxy- β -carotene, 3,3'-dihydroxy- β -carotene and 3,3'-dihydroxy-*retro*- β -carotene.

In the present paper the results will be described as to the incorporation of labelled and inert carotenoids into *Epicoccum nigrum* Link.

Materials and Methods. — Culture conditions, extraction and purification methods were carried out as described elsewhere¹. Incubations were done with mature mycelium adding the carotenoid pigments in an ethanolic solution, never exceeding 0.15 ml, after 60 hr of growth. To control experiments the same volume of ethanol was added. The mycelium was harvested after 24 or 48 hr, filtered over a Buchner filter and washed gently with water-methanol (9:1, v/v) till colorless to eliminate traces of adsorbed and not metabolized pigments. In general less than 1 μ g per 100 ml of culture medium was recovered, indicating an almost complete absorption.

Extractions and purifications of the radioactive material were identical to those previously described. The carotenoids were purified by column chromatography till constant specific activity, expressed in dpm/ μ g. The radioactivity was measured in a Liquid Scintillation Counter (Mark 1, Nuclear Chicago, Des Plaines, Ill., U.S.A.) using Bray-solution⁵ as scintillation liquid. The carotenoid pigments were decolorized exposing them to sunlight before counting.

The radioactive labelled precursors were synthesised biologically incubating *Epicoccum nigrum* for 24 hr with *dl*-(2-¹⁴C) mevalonic acid.

Results and Discussion. — After 40 hr of incubation the pH of the culture medium was between 4 and 5 and returned to the value of 7 after 72 hr of incubation. Since carotenoids are stable only at pH 6.5-8, substrates were added to the culture in the second phase.

First of all lycopene (Table 1), of which by diphenylamine treatment was shown that it made part of the potential carotenoid patrimony of *Epicoccum nigrum*, was tested. Incubations for 24 hr resulted in an overall increase of the four pigments. Especially γ -carotene had an important relative increase of 64 %, while also β -carotene increased. After 48 hr γ -carotene had a relative increase of only 17 % and β -carotene of 41 %. This shift might be due to a further metabolism of γ -carotene to β -carotene. Also torularhodin increased after 48 hr. Although rhodoxanthin did not increase

TABLE 1.

**Incorporation of lycopene, γ -carotene and β -carotene into carotenoids
of « *Epicoccum nigrum* ».**

Carotenoids	LYCOPENE (added 48.0 $\mu\text{g}/100$ ml of culture medium)				γ -CAROTENE (added 40.2 $\mu\text{g}/100$ ml of culture medium)				β -CAROTENE (added 58.4 $\mu\text{g}/100$ ml of culture medium)			
	After 24 hr of incubation		After 48 hr of incubation		After 24 hr of incubation		After 48 hr of incubation		After 24 hr of incubation		After 48 hr of incubation	
	CON.	EXP.	CON.	EXP.	CON.	EXP.	CON.	EXP.	CON.	EXP.	CON.	EXP.
β -Carotene	4.21 ± 0.29	5.03 ± 0.27	5.11 ± 0.21	7.21 ± 0.51	4.11 ± 0.28	4.67 ± 0.17	5.42 ± 0.20	6.04 ± 0.22	4.26 ± 0.31	47.69 ± 3.27	5.04 ± 0.41	39.23 ± 2.55
γ -Carotene	1.12 ± 0.26	1.84 ± 0.31	1.24 ± 0.33	1.45 ± 0.29	0.98 ± 0.08	9.87 ± 1.24	6.91 ± 0.19	8.20 ± 0.91	1.12 ± 0.15	1.29 ± 0.09	1.01 ± 0.32	1.17 ± 0.10
Rhodoxanthin	3.78 ± 0.12	4.12 ± 0.19	3.95 ± 0.29	4.09 ± 0.31	4.66 ± 0.14	4.98 ± 0.19	4.78 ± 0.11	5.11 ± 0.20	3.60 ± 0.24	7.63 ± 0.39	4.12 ± 0.21	6.82 ± 0.43
Torularhodin	0.98 ± 0.11	1.01 ± 0.14	1.24 ± 0.09	1.45 ± 0.09	1.25 ± 0.08	1.45 ± 0.10	1.65 ± 0.14	1.69 ± 0.09	0.88 ± 0.09	0.94 ± 0.11	1.14 ± 0.08	1.09 ± 0.10

The amounts of the single carotenoids were determined after separation on a cellulose column followed by final purifications on magnesium oxide-Celite 503 (1:1, w/w) columns using their $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ values at their maximum of absorption in hexane. The values are given in μg of pigment per 100 ml of culture medium. They are the mean of four experiments ($\pm$ S.E.M.).

significantly, one may deduce from the general trend towards increment, that lycopene is a precursor of the four pigments.

Then the incorporation of γ -carotene, which according to the biosynthetic scheme proposed by PORTER & LINCOLN ⁶ follows lycopene, was measured. After 24 hr significant increments were observed in β -carotene and torularhodin, whereas after 48 hr γ -carotene and rhodoxanthin increased significantly. Obviously metabolic and catabolic reactions interfered, but γ -carotene may be considered as precursor of the other three pigments.

Using β -carotene as precursor, an impressive increase of rhodoxanthin was registered as well after 24 hr as after 48 hr of incubation. The increase of γ -carotene, might be due to the relative instability of β -carotene, which causes the incorporation of degradation pieces into the other pigments. In this way one might also explain the rather insignificant increase of torularhodin, which according to SIMPSON, NAKAYAMA & CHICHESTER ⁷ derives from γ -carotene.

For the synthesis of the labelled carotenoids *dl*-(2-¹⁴C) mevalonic acid, common precursor of all these pigments, was used. Results are given in Table 2.

The incorporation experiments (Table 3) with γ -carotene showed that this compound is the general precursor of the other three pigments. The ratio of specific activities between β -carotene and γ -carotene of 0.32 confirmed that these two compounds are on the same biosynthetic pathway, as already proposed by PORTER & LINCOLN ⁶.

The label of β -carotene was found principally in rhodoxanthin, although the incorporation ratio rhodoxanthin : β -carotene was 0.23. This result might indicate that one has to envisage a type of compartmentalisation in this reaction sequence, just as it seems to occur between β -carotene and torularhodin. This seems to be quite plausible because the reaction between γ -carotene and β -carotene is a mere ring closure, whereas in the other reactions enzymes with different synthetic capacities are involved.

TABLE 2.

**Incorporation of dl-(2-¹⁴C) mevalonic acid into the single carotenoids
of « *Epicoccum nigrum* ».**

Carotenoids	Time of incubation (hr)			
	1	2	4	24
β-Carotene	2981 ± 184	4323 ± 521	10167 ± 1427	24135 ± 4219
γ-Carotene	3547 ± 401	7128 ± 938	10412 ± 1681	12124 ± 1041
Rhodoxanthin	66 ± 10	294 ± 34	477 ± 31	958 ± 82
Torularhodin	239 ± 20	1725 ± 159	3189 ± 414	12760 ± 1572

The data are given in specific activities expressed in dpm/μg. Labelled mevalonic acid, 50 μl of a 2 ml solution of 4.82 mC/mM, was added to the medium after 72 hr of mycelial growth.

TABLE 3.

**Incorporation of labelled carotenoids into the single carotenoids
of « *Epicoccum nigrum* ».**

Carotenoids	γ-Carotene- ¹⁴ C	β-Carotene- ¹⁴ C	Rhodoxanthin- ¹⁴ C	Torularhodin- ¹⁴ C
β-Carotene	10250 ± 1850	3873 ± 450	52 ± 10	41 ± 9
γ-Carotene	31800 ± 2565	95 ± 15	90 ± 24	25 ± 5
Rhodoxanthin	486 ± 59	894 ± 59	4572 ± 327	< 1
Torularhodin	2009 ± 143	75 ± 12	70 ± 9	2194 ± 101

The data are given in specific activities expressed in dpm/μg. They are the mean of three experiments (± S.E.M.). The labelled material was added after 72 hr of mycelial growth followed by incubation for 24 hr. β-Carotene-¹⁴C had a specific activity of 2.74 μC/μmol, γ-carotene-¹⁴C of 23.5 μC/μmol, rhodoxanthin-¹⁴C of 4.24 μC/μmol, and torularhodin of 12.4 μC/μmol.

For the sake of justice also the incorporation of labelled torularhodin and rhodoxanthin has been studied. As could be expected almost all of the labels were recovered in these two compounds and only small amounts in the other pigments.

From the obtained results one may deduce that the scheme of PORTER & LINCOLN⁶ can be completed beginning from lycopene, via γ-carotene and β-carotene with the direct step from β-carotene to rhodoxanthin.

December 22, 1968

OLGA GRIBANOVSKI-SASSU

and FREDRIK H. FOPPEN

Department of Biological Chemistry

¹ FOPPEN, F. H. & O. GRIBANOVSKI-SASSU, *Biochem. J.*, **106**, 97 (1968).

² FOPPEN, F. H. & O. GRIBANOVSKI-SASSU, *Biochim. Biophys. Acta*, **176**, 357 (1969).

³ GRIBANOVSKI-SASSU, O. & F. H. FOPPEN, *Phytochemistry*, **6**, 907 (1967).

⁴ GRIBANOVSKI-SASSU, O. & F. H. FOPPEN, *Phytochemistry*, **7**, 1605 (1968).

⁵ BRAY, G. A. *Anal. Biochem.*, **1**, 279 (1960).

⁶ PORTER, J. W. & R. E. LINCOLN, *Arch. Biochem. Biophys.*, **27**, 390 (1950).

⁷ SIMPSON, K. L., T. O. M. NAKAYAMA & C. O. CHICHESTER, *J. Bacteriol.*, **88**, 1688 (1964).