

aus teilweisen Umwandlungsvorgängen in der Kontaktzone hervor, daß die beschränkte Mischbarkeit das Ergebnis zweier sich schneidender, isodimorpher Schmelzkurven darstellt und daher die strukturelle Verschiedenheit der reinen Komponenten verschiedenen Formen entspricht. Danach besteht auch hier keine Veranlassung, diese Mischkrystallbildung unter die „anormalen“ Mischtypen zu stellen.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die Unterstützung dieser Arbeit.

142. Theodor Wieland: Über die Glutaminsäure aus Tumoren.

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für Medizin. Forschung, Heidelberg, Institut für Chemie.]
(Eingegangen am 16. Juli 1942.)

Die Befunde von F. Kögl und H. Erxleben, wonach in den sauren Hydrolysaten von Tumoren die Glutaminsäure teilweise racemisiert vorliegt^{1,2)}, sind in den letzten Jahren nicht unangefochten geblieben. Es waren vor allem amerikanische und englische Autoren, welche die Ergebnisse nicht bestätigen konnten³⁾. Allerdings wurde in diesen Laboratorien meist ein Verfahren zur Isolierung der Glutaminsäure angewandt, welches von dem von Kögl benützten abweicht. Während nämlich Kögl und Erxleben die Glutaminsäure entweder nach vorangegangener Butanolextraktion⁴⁾ oder nach Behandlung der Hydrolysate mit Cuprooxyd⁵⁾ und Konzentrieren direkt mit Chlorwasserstoff bei 0° als Hydrochlorid zur Abscheidung brachten, wurde von den ausländischen Forschern diese Aminosäure nach Foreman als Ca-Salz⁶⁾, oder in einer modifizierten Technik als Ba-Salz, in alkoholischer Lösung zusammen mit anderen Aminodicarbonsäuren gefällt. Die Abscheidung des Glutaminsäure-hydrochlorids erfolgte dann nach Zerlegung des Erdalkalisalz-Niederschlags. Bei diesem Vorgehen gelangt nach Kögl nur ein kleiner Teil der unnatürlichen *d*-Form zur Abscheidung, so daß ihm die Methode zur Auffindung partiell racemischer Glutaminsäure nicht geeignet

¹⁾ Ztschr. physiol. Chem. **258**, 57 [1939]; **261**, 154 [1939]; **263**, 107 [1940]; **264**, 108, 198, 220 [1940]; F. Kögl, Naturwiss. **30**, 46 [1942].

²⁾ F. Kögl, H. Erxleben u. A. M. Akkerman, Ztschr. physiol. Chem. **261**, 141 [1939].

³⁾ A. C. Chibnall, M. W. Rees, G. R. Tristram, E. F. Williams u. E. Boyland, Nature [London] **144**, 71 [1939]; A. C. Chibnall, M. W. Rees, E. F. Williams u. E. Boyland, ebenda **145**, 311 [1940]; Biochem. Journ. **34**, 285 [1940]; A. Konikova, Nature [London] **145**, 312 [1940]; S. Graff, Journ. biol. Chem. **130**, 13 [1939]; S. Graff, O. Rittenberg u. G. L. Foster, ebenda **133**, 745 [1940]. Diese Autoren benützten die „Isotopenverdünnungsmethode“ mit N¹⁵-haltiger *d*, *l*-Glutaminsäure. — G. E. Woodward, F. E. Reinhart u. J. Schoonover Dohan, Journ. biol. Chem. **138**, 677 [1941]; O. K. Behrens, F. Lipmann, M. Cohn u. D. Burk, Science **92**, 32 [1941], benützten zur Bestimmung von *d*-Glutaminsäure *d*-Aminosäure-oxydase.

⁴⁾ H. D. Dakin, Journ. biol. Chem. **44**, 499 [1920].

⁵⁾ E. Abderhalden u. D. Fuchs, Ztschr. physiol. Chem. **57**, 339 [1908].

⁶⁾ F. W. Foreman, Biochem. Journ. **8**, 463 [1914].

erscheint. Bei der Wichtigkeit des Problems erschien es ratsam, ein neues Verfahren zur Isolierung von Glutaminsäure aus Tumorhydrolysaten heranzuziehen. Ein solches besteht in der Anwendung der sauren Al_2O_3 -Säule, an die Aminodicarbonsäuren beim Durchlaufen eines neutralen Aminosäuregemischs quantitativ adsorbiert werden⁷⁾.

Außer den Aminodicarbonsäuren gelangt auch Cystin auf der sauren Säule zur Abscheidung⁸⁾. Da eine Verunreinigung des Glutaminsäurehydrochlorids gerade mit dieser Aminosäure wegen der großen, entgegengesetzten spezif. Drehung (-205°) unerwünscht war, wurde ein Mittel gesucht, mit dem sich nur Cystin aus der sauren Säule eluieren läßt. Diese partielle Elution gelingt mit H_2S -gesättigtem Wasser, wobei das schwerlösliche Cystin zu Cystein reduziert wird, welches wie jede neutrale Aminosäure leicht aus der Säule abfließt. Die braunen Zersetzungsprodukte, welche bei der Hydrolyse mit HCl aus den Proteinen entstehen, werden ganz oben in der Säule in Form einer braunen Zone festgehalten, welche beim Kochen einer Probe mit neutralem Phosphatpuffer und einigen Tropfen Ninhydrin-Lösung nur eine schwache rotbraune Farbe gibt. Mit der Ninhydrinreaktion läßt sich auch die untere Grenze der adsorbierten Aminosäuren auf der aus dem Rohr gestoßenen Säule feststellen. Die braune oberste und die aminosäurefreie untere Zone werden abgetrennt, so daß man eine ziemlich reine aminosäurehaltige Zone nach dem Einfüllen in ein neues Rohr zu eluieren hat.

Zur vollständigen Elution der Aminodicarbonsäuren ist bei der Analyse von Eiweißhydrolysaten verdünnte Natronlauge benützt worden⁸⁾. Man bekommt dabei Na -Ionen in das Eluat, und beim Einleiten von HCl in die konz. Lösung scheidet sich neben dem Glutaminsäurehydrochlorid Kochsalz ab, welches sich auch durch mehrmaliges Umkrystallisieren nicht ganz entfernen läßt. Um diese Schwierigkeit zu umgehen, wurde Barytwasser zur Elution herangezogen. Das Ba -Ion läßt sich aus dem Eluat mit Schwefelsäure genau entfernen. Nach dem Abzentrifugieren und 2-maligem Auskochen des BaSO_4 -Niederschlags mit verd. Salzsäure kann nun im Vak. auf ein kleines Volumen eingeeengt und mit Chlorwasserstoff bei 0° das Hydrochlorid der Glutaminsäure abgeschieden werden. Der so erhaltene Niederschlag ist in den meisten Fällen so rein, daß er ohne weiteres zur Bestimmung der Drehung verwendet werden kann. Die Verwendung von Barytwasser hat allerdings den Nachteil, daß die Elution der Aminodicarbonsäuren nicht quantitativ ist, wohl infolge der Bildung von Ba -aluminat auf der Säule, das einen Teil der Ba -Salze der Aminodicarbonsäuren sehr festzuhalten scheint. Doch kann man auf diesen Teil ruhig verzichten, da die Drehung des eluierten Anteils sicherlich ein Abbild gibt vom Racemisierungsgrad der Glutaminsäure, wie sie im ursprünglichen Hydrolysat vorlag, es sei denn, daß ein Antipode an der optisch inaktiven Säule stärker zurückgehalten würde als der andere. Für diese Annahme gibt es aber keine Stütze. An einem Caseinhydrolysat wurde die Ausbeute an Glutaminsäure, welche man bei der Elution mit Barytwasser erreicht, zu etwa 80% bestimmt. Das aus dem Eluat gefällte Glutaminsäurehydrochlorid war fast rein weiß und wies eine spezif. Drehung von $+31.0^\circ$ in 9-proz. Salzsäure auf (Theorie: $+31.6^\circ$), war also praktisch rein.

⁷⁾ Th. Wieland, Ztschr. physiol. Chem. **273**, 24 [1942].

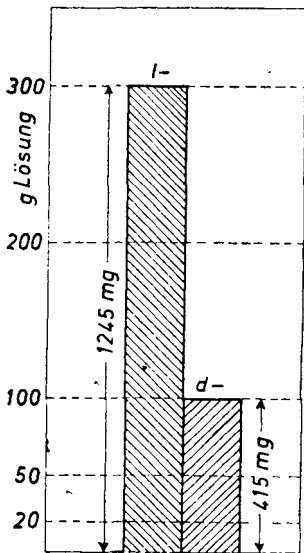
⁸⁾ Th. Wieland, Naturwiss. **30**, 374 [1942].

Nach diesen Erfahrungen wurde nun das Protein von fünf Impftumoren und praktisch einheitlichen menschlichen Lebermetastasen sowie des anhaftenden gesunden Lebergewebes gemäß der Kögl'schen Arbeitsweise mit konz. Salzsäure hydrolysiert und nach dem weitgehenden Abdampfen des Chlorwasserstoffs im Vak. und dem Neutralisieren mit Natronlauge auf Glutaminsäure aufgearbeitet. Die Hauptmenge des Glutaminsäure-hydrochlorids schied sich nach dem erstmaligen Einleiten von Chlorwasserstoff und längerem Stehenlassen ab. Nach dem Abfiltrieren dieser ersten Fraktion, Einengen der Mutterlauge im Vak. und neuerlichem Sättigen mit HCl erhielt man eine erheblich kleinere zweite Fraktion, die auch so rein war, daß ihre Drehung ohne vorheriges Umkrystallisieren bestimmt werden konnte.

Die Tatsache, daß beide Fraktionen ohne vorheriges Umkrystallisieren zur Drehungs-Bestimmung herangezogen werden können, ist von großer Wichtigkeit, da man beim Umkrystallisieren eines Gemisches von viel *l*- und wenig *d*-Glutaminsäure-hydrochlorid einen Bodenkörper erhält, in dem verhältnismäßig noch mehr *l*-Komponente vorliegt. Das ergibt sich aus den Bestimmungen der Löslichkeit von *d*-, *l*- und *d,l*-Glutaminsäure-hydrochlorid in Salzsäure, die Kögl vorgenommen hat²⁾. Es zeigte sich, daß *d,l*-Glutaminsäure-hydrochlorid sich nicht als schwerlösliches Racemat, sondern als racemisches Gemisch (Konglomerat) abscheidet, d. h., daß die Krystallisation aus verschiedenen Individuen, nämlich aus *l*-Glutaminsäure-hydrochlorid- und *d*-Glutaminsäure-hydrochlorid-Krystallen besteht. Die beiden Krystallarten zeigen gleiche Löslichkeit in gesättigter Salzsäure. Da von jedem Antipoden bei 0° nur 0.415 g in 100 g gesättigter Lösung enthalten sind, die gesättigte Lösung also zu 99.585% aus gesättigter Salzsäure besteht, gilt die Löslichkeitsangabe praktisch auch für die Löslichkeit jeder Komponente in der gesättigten HCl-Lösung der anderen. Das heißt, es löst sich in demselben Volumen gesättigter Salzsäure bei 0° von beiden Komponenten gleich viel auf: Die Löslichkeit des racemischen Gemisches *d,l*-Glutaminsäure-hydrochlorid ist, wie durch Versuche gefunden wurde, doppelt so groß wie die der reinen Antipoden. Sättigt man daher ein bestimmtes Volumen der wäbr. Lösung von viel *l*- und wenig *d*-Glutaminsäure bei 0° mit HCl, so wird sich in der ersten Krystallisation vorwiegend *l*-Glutaminsäure-hydrochlorid abscheiden, während von der *d*-Form nur eine relativ viel geringere Menge (um die die Löslichkeit des *d*-Glutaminsäure-hydrochlorids überschritten ist) zur Ausfällung gelangt. Beim Umkrystallisieren verschiebt sich also, worauf Kögl ausdrücklich hinweist, das Verhältnis von *l*- und *d*-Form zugunsten der im Überschuß vorhandenen. Es ergibt sich aus dieser Tatsache, daß zur Beurteilung des Racemisierungsgrades das Drehungsvermögen der ersten Krystallfraktion nicht maßgebend ist, wenn man das Hydrochlorid aus zu viel Lösungsmittel fällt. Zeigt jedoch die erste Fraktion schon einen, wenn auch nur kleinen Gehalt an *d*-Glutaminsäure, so muß die zweite Fraktion, die nach dem Einengen und neuerlichem Sättigen mit HCl erhalten wird, sehr viel reicher an *d*-Glutaminsäure sein und im Idealfall zu gleichen Teilen aus *d*- und *l*-Form bestehen. Voraussetzung dabei ist, daß man durch gutes Impfen mit *d*- und *l*-Glutaminsäure-hydrochlorid Übersättigung an einer Komponente ausschließt. Übersättigungserscheinungen treten allerdings in den immerhin noch ziemlich unreinen Lösungen leicht auf.

Obwohl die Löslichkeit des Glutaminsäure-hydrochlorids in dem Stoffgemisch, welches das Eluat aus der sauren Säule darstellt, eine größere ist als in reiner Salzsäure (Löslichkeitsbeeinflussung durch andere Aminodicarbonsäuren), werden die Überlegungen auch für dieses System gelten. Anders scheinen die Verhältnisse dann zu sein, wenn in der Lösung außer sauren noch andere, besonders basische Aminosäuren, vorhanden sind, die möglicherweise zur bevorzugten Abscheidung einer Komponente Veranlassung geben können. Bei der Arbeitsweise von Kögl krystallisiert das Glutaminsäure-hydrochlorid aus einer Lösung, die entweder noch alle Aminosäuren (Cu₂O-Methode⁵) oder neben den Aminodicarbonsäuren noch die Hexonbasen (Butylalkohol-Methode⁶) enthält. Nach Adsorption an der sauren Al₂O₃-Säule enthält das Eluat neben Glutaminsäure nur Aminodicarbonsäuren.

Zur Beurteilung des Racemisierungsgrades von Glutaminsäure in Eiweißhydrolysaten ist in unserem Falle vor allem die Drehung der zweiten Hydrochlorid-Fraktion maßgebend. Scheidet sich hier ein nur wenig racemisiertes Hydrochlorid ab, so kann die erste Fraktion keine *d*-Glutaminsäure enthalten haben. Zeigt die erste Fraktion dennoch eine Erniedrigung der spezif. Drehung, so ist diese auf Verunreinigungen anderer Art zurückzuführen.



Abbild. Zusammensetzung der Bodenkörper, die sich bei gegebener Menge an *l*- und *d*-Glutaminsäure aber verschiedener Menge an Lösungsmittel abscheiden (Sättigung mit HCl, 0°).

Diese Verhältnisse sind in der Abbild. graphisch für das System *d*- und *l*-Glutaminsäure-hydrochlorid in gesättigter Salzsäure bei 0° dargestellt. Die beiden schraffierten Rechtecke stellen zwei verschiedene Mengen von *d*- und *l*-Glutaminsäure-hydrochlorid dar. Die Flächeninhalte oberhalb der gestrichelten Horizontallinien geben die Mengen an beiden Antipoden, die sich aus den jeweils links davon stehenden Lösungsmengen ausscheiden. Aus 100 g Lösung z. B. scheidet sich reine *l*-Form (830 mg) ab, aus 50 g Lösung ein Gemisch von 1038 mg *l*- und 208 mg *d*-Form. Die zweiten Fraktionen, die man aus 20 g Lösung erhält, bestehen dann aus 333 mg *l*- und 333 mg *d*-Form, wenn zuerst auf 100 g Lösung eingeeengt worden war, bzw. aus 125 mg *l*- und 125 mg *d*-Form, wenn die erste Krystallisation nach dem Einengen auf 50 g Lösung abgetrennt war.

In der Tafel 1 sind die Ausbeuten an Glutaminsäure und die spezif. Drehungen in 9-proz. Salzsäure von Glutaminsäure-hydrochlorid-Fractionen aus den Hydrolysaten

von normalen und Tumor-Proteinen, die mit dem neuen Verfahren erhalten wurden, angegeben.

Man sieht, daß alle sechs untersuchten Tumorproteine eine Glutaminsäure liefern, die entsprechend dem Drehungsvermögen der ersten und zweiten Hydrochlorid-Krystallisation zu etwa

99% aus der natürlichen *l*-(+)-Glutaminsäure besteht. Die Erniedrigung der spez. Drehung in der ersten Fraktion von Nr. 7 muß auf einer Verunreinigung beruhen, da die zweite Fraktion die für reines *l*-Glutaminsäure-hydrochlorid geforderte spezif. Drehung von $+31.6^\circ$ in 9-proz. Salzsäure aufweist. Die Abweichungen von diesem theoretischen Wert liegen innerhalb der Meßgenauigkeit, und außerdem handelt es sich, wie schon er-

Tafel 1.

Glutaminsäure (GS) aus Normal- und Tumor-Proteinen.

Nr.	g	Protein	1. Fraktion		2. Fraktion		Gesamt-Ausbeute in % des Proteins	Anteil von <i>d</i> -GS in % der isoliert. GS	
			GS g	$[\alpha]_D$	GS g	$[\alpha]_D$		gef.	nach Kögl
1	9.2	Casein (Hammarsten)	1.48	$+31.0^\circ$	0.08	$+30.0^\circ$	17.0	<2	—
2	10.0	Normale Leber ... (Mensch)	0.67	$+30.7^\circ$	0.09	$+29.5^\circ$	7.6	<2	—
3	17.0	Jensen-Sarkom .. (Ratte)	1.25	$+30.5^\circ$	0.11	$+27.5^\circ$	8.0	<2	4.8 bis 7.3
4	20.0	Walker-Carcinom (Ratte)	1.47	$+30.5^\circ$	0.15	$+28.0^\circ$	8.1	<2	7.0
5	20.0	Rous-Sarkom ... (Huhn)	1.25	$+30.8^\circ$	0.09	$+30.0^\circ$	6.7	<2	6.3
6	20.0	Flexner-Carcinom (Ratte)	1.62	$+31.0^\circ$	0.07	$+30.0^\circ$	8.5	<2	7.1
7	10.0	Brown-Pearce- Tumor (Kaninchen)	0.64	$(+29.6^\circ)$	0.06	$+31.6^\circ$	7.0	(2.0)	24.3 44.5
8	10.0	Lebermetastasen .. (Mensch)	0.80	$+30.2^\circ$	0.05	$+28.6^\circ$	8.5	<2	43.7
9	10.0	Rous-Sarkom + 400 mg <i>d, l</i> -GS	0.95	$+26.3^\circ$	0.19	-3.0°	11.4		12.5
10	4.5	Casein + 225 mg <i>d, l</i> -GS	0.80	$+29.5^\circ$	0.07	0.0°	19.2		7.1

wähnt, bei allen Präparaten um Rohkristallisate von allerdings erheblicher Reinheit. Nr. 9 gibt die Daten für einen Versuch zum Wiederauffinden von 200 mg *d*-Glutaminsäure, die als 400 mg *d, l*-Form vor der Adsorption dem Hydrolysat von Rous-Sarkom-Protein zugesetzt waren. Es sind hierbei in der ersten Fraktion 58.0 mg, in der zweiten, durch unvermeidliche Übersättigung der Mutterlauge an *d*-Form etwas linksdrehenden Fraktion, 84.0 mg, im ganzen also 142.0 mg *d*-Glutaminsäure erhalten worden. Da die Baryt-Elution nur 80% der gesamten Glutaminsäure erfaßt, waren 160 mg *d*-Glut-

aminsäure zu erwarten. Somit sind etwa 90% der erwarteten, d. h. 72% der zugesetzten *d*-Glutaminsäure, wiedergefunden worden.

Die in der 8. Spalte von Tafel 1 angegebenen Gesamtausbeuten an Glutaminsäure sind, wie oben erwähnt, als 80% des wahren Gehalts an GS anzusehen. Der letztere stimmt dort, wo ein Vergleich möglich ist, mit dem nach der N^{15} -Methode von S. Graff und Mitarbeitern³⁾ errechneten sehr gut überein: Walker-Carcinom 10.10% GS (Al_2O_3) und 11.77% GS (N^{15}), Flexner-Carcinom 10.65% GS (Al_2O_3) und 10.15% GS (N^{15}).

Isolierung von Glutaminsäure aus Proteinhydrolysaten.

a g Protein werden mit 3a ccm konz. Salzsäure (d 1.19) 7 Stdn. am Rückflußkühler hydrolysiert. Dann wird im Vak. zur Trockne verdampft, der Rückstand in wenig Wasser aufgenommen, von neuem abgedampft, und dieses Verfahren noch 2-mal wiederholt. Nun löst man in 10a ccm Wasser und macht mit Natronlauge genau neutral (p_H 7, Universal-Indicatorenpapier E. Merck). Die braune Lösung scheidet beim Stehen über Nacht einen Teil der Huminstoffe aus, von denen am anderen Tag abfiltriert wird.

Nach gutem Nachwaschen des Niederschlages mit Wasser gießt man die braune Lösung auf eine feucht eingefüllte und festgesaugte saure Al_2O_3 -Säule⁷⁾ von 50 g Al_2O_3 pro g hydrolysierten Proteins. Unter schwachem Saugen läßt man dann das Hydrolysat, anschließend pro g Protein 20 ccm Wasser, 50 ccm H_2S -gesättigtes Wasser und wieder 50 ccm Wasser durchlaufen. Zum Schluß saugt man die Flüssigkeit weitgehend aus der Säule und bringt das Adsorptionsmittel möglichst zusammenhängend auf einen Bogen Papier. Die oberste dunkelbraune Zone wird dann abgeschnitten. Durch Aufkochen von Proben des Säulenmaterials mit etwas neutralem Phosphatpuffer und einigen Tropfen Ninhydrin-Lösung wird die untere Grenze der adsorbierten Aminosäuren festgestellt. Dort wird ebenfalls abgetrennt und das aminosäurehaltige Material in Wasser aufgeschlämmt und unter schwachem Saugen in ein neues Rohr gefüllt.

Wenn die Säule, immer von Wasser bedeckt, festgesaugt ist, gießt man kaltgesättigtes Barytwasser nach. Dabei tritt die Elution ein, welche sich am Wandern von bräunlichen Zonen verfolgen läßt. Sobald das abtropfende Eluat eben Reaktion auf Ba-Ionen gibt, wechselt man das Auffanggefäß und sammelt das Eluat bis zur starken Rötung von Phenolphthalein-Papier. Die blaßgelbe Lösung wird im Vak. auf 5a ccm eingengt und mit verd. H_2SO_4 genau von Ba-Ionen befreit. Das $BaSO_4$ wird abzentrifugiert, 2-mal mit einigen ccm 2-n. HCl ausgekocht und zentrifugiert.

Die vereinigten Zentrifugate engt man nun auf 2 ccm pro g Protein ein und sättigt das Konzentrat bei 0° mit Chlorwasserstoff. Unter gutem Reiben mit einigen Kryställchen *d*- und *l*-Glutaminsäure-hydrochlorid scheidet sich die Hauptmenge des Glutaminsäure-hydrochlorids ab. Die Fällung wird durch 24 Stdn. langes Stehenlassen bei 0° vervollständigt. Man saugt sie dann auf einer Glasfrittennutsche ab, wäscht mit wenig kalter konz. Salzsäure, dann mit wenig Aceton und Äther. Anschließend wird im Exsiccator über Ätznatron getrocknet. Die wäßr. Mutterlauge wird im Vak. auf ein Drittel eingengt und von neuem unter Impfen mit *d*- und *l*-Glutaminsäure-hydrochlorid bei 0° mit HCl gesättigt. Zur vollständigen Abscheidung der

zweiten Fraktion läßt man 48 Stdn. bei 0° stehen. Das Absaugen und Trocknen des Niederschlags erfolgt wie vorher. Die Bestimmung der Drehung geschah nach Herstellen einer etwa 5-proz. Lösung in 9-proz. Salzsäure. Die erhaltenen spezif. Drehungen wurden durch Multiplikation mit dem Faktor $\frac{\text{Glutaminsäure-hydrochlorid}}{\text{Glutaminsäure}} = \frac{183.55}{147.08}$ auf die spezif. Drehungen der freien Glutaminsäure, wie sie in Tafel 1 angegeben sind, umgerechnet.

Tafel 2.

Drehungen der isolierten Glutaminsäure-hydrochloride in 9-proz. Salzsäure (1-dm-Rohr, 20°).

Glutaminsäure-hydrochlorid aus	1. Fraktion		2. Fraktion	
	Konz. in %	α	Konz. in %	α
Casein (Hammarsten)	5.00	+ 1.25 ⁰	5.00	+ 1.22 ⁰
Normales Lebergewebe (Mensch)	5.08	+ 1.25 ⁰	4.65	+ 1.10 ⁰
Jensen-Sarkom	5.00	+ 1.22 ⁰	5.00	+ 1.10 ⁰
Walker-Carcinom	5.00	+ 1.23 ⁰	6.23	+ 1.40 ⁰
Rous-Sarkom	5.00	+ 1.24 ⁰	5.50	+ 1.33 ⁰
Flexner-Carcinom	4.96	+ 1.24 ⁰	5.00	+ 1.22 ⁰
Brown-Pearce-Tumor	5.09	+ 1.18 ⁰	3.85	+ 0.98 ⁰
Lebermetastasen	5.14	+ 1.24 ⁰	3.05	+ 0.70 ⁰
Rous-Sarkom + 400 mg <i>d,l</i> -Glutaminsäure	4.98	+ 1.05 ⁰	5.05	+ 0.12 ⁰
Casein + 225 mg <i>d,l</i> -Glutaminsäure	5.20	+ 1.23 ⁰	2.50	0.00 ⁰

Die Elementaranalyse der 2. Fraktion aus Versuch 9 ergab:

3.850 mg Sbst.: 4.610 mg CO₂, 1.940 mg H₂O. — 4.079 mg Sbst.: 0.283 ccm N₂ (24°, 749 mm).

C₅H₉O₄N. HCl (183.55). Ber. C 32.69, H 5.49, N 7.63.

Gef. „ 32.66, „ 5.64, „ 7.88.

Herkunft und Vorbereitung der Tumorproteine.

Die Jensen-Sarkome, für die wir Hrn. Dr. F. Lynen zu danken haben, waren in München von Nekrosen weitgehend befreit und in Alkohol konserviert worden. Sie wurden in unserem Institut durch die Fleischmaschine gedreht und als Brei mehrmals mit Alkohol, dann mit Äther ausgekocht und an der Luft getrocknet. Die Proteine aus Walker-Carcinom, Rous-Sarkom und Flexner-Carcinom hatte Hr. Dr. O. Westphal, Göttingen, analog vorbereitet und uns dankenswerterweise überlassen. Für die Proteine aus Brown-Pearce-Tumor, Lebermetastasen und normalem Lebergewebe möchte ich hier Hrn. Dr. H. Bayerle, München, bestens danken. Sie waren in frischem Zustande zu Brei zermahlen und mit Wasser 3-mal 15 Min. zum Sieden erhitzt, abfiltriert, hierauf mit Alkohol, Äther gewaschen und getrocknet worden.

Bei der Ausführung der Versuche hat mich Frä. L. Wirth eifrig unterstützt.