

Mit 10-proz. wäbr. Natronlauge gab eine Probe des Präparates im Gärröhrchen unter Entwicklung eines farblosen Gases, das sich als wasserlöslich erwies, eine farblose Lösung. Beim Ansäuern der alkal. Flüssigkeit mit Salzsäure entstand eine farblose Fällung, die beim Stehenlassen krystallinisch wurde: Prismen, die bei 276° unter Aufschäumen schmolzen und bei der Mischprobe mit einwandfreier Biliansäure keine Erniedrigung des Schmelzpunktes herbeiführten. Mit Diphenylamin-Schwefelsäure zeigte das Präparat Blaufärbung unter gleichzeitiger Gasentwicklung. — Nach dem Vorstehenden kann es keinem Zweifel unterliegen, daß das erhaltene Präparat identisch war mit der früher aus Biliansäure-dioxim und Salpetriger Säure hergestellten Pernitroso-biliansäure III.

4) 7.12-Dioximino-hydroxamoximhydratsäure $C_{24}H_{40}O_9N_4$ und Salpetrige Säure: Die Dioximinohydroxamoximhydratsäure kann, wie oben auseinandergesetzt wurde, auf 2 verschiedenen Wegen gewonnen werden. Für den vorliegenden Zweck wurde sie durch Behandeln der wie oben (Versuch 3) hergestellten Dioximinohydroxamsäure $C_{24}H_{37}O_8N_3$ mit Hydroxylamin nach früher gegebener Vorschrift⁶⁾ bereitet und in den bekannten farblosen Krystallblättchen erhalten. 0.5 g der Dioximinohydroxamoximhydratsäure wurden bei gewöhnl. Temp. mit 25 ccm Eisessig zusammengebracht und sofort 25 ccm Nitritlösung hinzugegeben. Die Verbindung ging dabei bald in Lösung, und es entstand eine anfangs hellgrüne, später fast farblose Flüssigkeit. Nach 1 Stde. u. 20 Min. bewirkte man durch Zusatz von 150 ccm Wasser eine farblose flockig-gallertige Fällung, die wie oben (Versuch 3) weiterbehandelt wurde. Ausb. 0.18 g. Zersp. unscharf 132°.



Das Präparat zeigte gegenüber 10-proz. wäbr. Natronlauge im Gärröhrchen sowie gegenüber Diphenylamin-Schwefelsäure dasselbe Verhalten wie die im Versuch 3 und die früher aus Biliansäuredioxim hergestellte Pernitrosobiliansäure. Wie bereits früher betont wurde¹⁾, muß es vorläufig dahingestellt bleiben, ob die blaue Farbreaktion mit Diphenylamin-Schwefelsäure auf einer geringfügigen Verunreinigung der Präparate beruht oder auf die Pernitrosogruppe ($>C:N(\rightarrow O).N:O$) selbst zu beziehen ist, die sich unter dem Einfluß der Schwefelsäure in gewissem Umfang in die Nitrimingruppe ($>C:N.N(\rightarrow O):O$) umlagern könnte, die dann die Farbreaktion liefert.

9. Theodor Wieland und Wolfgang Paul: Bestimmung von l- und d-Glutaminsäure im Hydrolysat von Brown-Pearce-Tumoren mit ^{15}N -Glutaminsäure.

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für Medizin, Forschung, Heidelberg, Institut für Chemie, und d. II. Physikal. Institut der Universität Göttingen.]

(Eingegangen am 15. November 1943.)

Vor einiger Zeit wurde die Methode der Abtrennung von Aminodicarbonsäuren aus Eiweißhydrolysaten mit Hilfe der sauren Al_2O_3 -Säule auf die Hydrolysendgemische einiger maligner Geschwülste angewandt¹⁾. Aus den Baryt-Eluaten ließ sich nach Entfernen des Bariums und Einengen die Glutaminsäure (Gls) als Hydrochlorid in etwa 80-proz. Ausbeute in erheblicher Reinheit zur Abscheidung bringen. Das Hydrolysat (7 Stdn. mit konz. Salzsäure unter Rückfluß) von 10 g Brown-Pearce-Gewebe (Kanin-

¹⁾ B. 75, 1001 [1942].

chen) ergab 0.7 g Gls, was bei Berücksichtigung der 80-proz. Ausbeute etwa einem Gehalt von 9% entsprach. Auf Grund der spezifischen Drehung enthielt diese rund 2% an *d*-Form.

Natürlich läßt sich über die Anwendbarkeit der Adsorptionsmethode erst dann etwas aussagen, wenn man den absoluten Gls-Gehalt eines Hydrolysenmisches mit Sicherheit kennt. Dieser ergibt sich bei Anwendung der „Isotopenverdünnungsmethode“, die grundsätzlich zur Bestimmung des Gehalts an jeder Substanz in einem Stoffgemisch anwendbar ist²⁾. In unserem Fall setzt man eine bestimmte Menge (*a* Mole) der mit einem stabilen Isotopen in bestimmter Konzentration (C_0 % = Zahl der Isotopenatome auf 100 Atome) dem Stoffgemisch zu, isoliert dann eine Probe von reiner *l*-Gls (als Hydrochlorid) und bestimmt deren Gehalt am Isotopen (C_l %). Beträgt die zu bestimmende Menge an *l*-Gls x_l Mole mit dem in der normalen Gls enthaltenen ¹⁵N-Gehalt des natürlichen Stickstoffs C_n % (= 0.37%), so enthält nach Zusatz von *a* Molen markierter *l*-Gls (2 *a* Molen *d*, *l*-Gls) das Hydrolysat (*a* + x_l) Mole *l*-Gls mit einem ¹⁵N-Gehalt von C_l %. Die im Gesamtansatz enthaltenen *g*-Atome ¹⁵N ($a \cdot C_0 + x_l \cdot C_n$) haben sich nach guter Durchmischung gleichmäßig auf die (*a* + x_l) Mole *l*-Gls verteilt, welche nun den ¹⁵N-Gehalt C besitzen. Es ist daher

$$a \cdot C_0 + x_l \cdot C_n = (a + x_l) \cdot C_l$$

daraus
$$x_l = \frac{C_0 - C_l}{C_l - C_n} \cdot a$$

Führt man statt des Isotopengehalts C_0 und C_l den Überschuß in Prozent an ¹⁵N über $C_n = 0.37\%$, also die Größen $C'_0 = C_0 - C_n$ und $C'_l = C_l - C_n$ ein, so wird

$$x_l = \left(\frac{C'_0}{C'_l} - 1 \right) a. \quad (1)$$

Um auch den absoluten Gehalt an *d*-Gls ermitteln zu können, wäre es theoretisch am einfachsten, eine Probe von reiner *d*-Gls nach Zusatz der markierten *d*, *l*-Gls zu isolieren. Dann wäre wie oben

$$x_d = \left(\frac{C'_0}{C'_d} - 1 \right) a. \quad (1a)$$

Die Isolierung einer reinen *d*-Probe ist jedoch bei einem Überschuß an *l*-Form kaum auszuführen. Aus der spezifischen Drehung jeder *d*-Gls-haltigen Probe läßt sich aber deren Anteil an *l*-Form ($P =$ Mole *l*-Gls: Mole Gesamt-Gls) bzw. an *d*-Form ($1 - P$) errechnen. Man kann dann den Isotopengehalt der *d*-Form (C_d) durch den oben erhaltenen Isotopengehalt der *l*-Form (C_l) und den der teilweise racemisierten Probe (C_r) ausdrücken:

$$C = P \cdot C_l + (1 - P) C_d$$

daraus
$$C_d = \frac{C_r - PC_l}{1 - P}$$

Setzt man diesen Ausdruck in (1a) ein, so folgt bei Verwendung der Überschuß-Konzentrationen über den ¹⁵N-Gehalt des natürlichen N_2 (C'_0 , C'_r , C'_l)

$$x_{d,l} = \left(\frac{C'_0(1 - P)}{C'_r - PC'_l} - 1 \right) a \quad (2)$$

Dieser Ausdruck vereinfacht sich für die Isolierung einer vollständigen racemischen Probe ($[\alpha]_D = 0$), wo $C_{d,l} = \frac{1}{2} C_d + \frac{1}{2} C_l$, zu:

$$x_{d,l} = \left(\frac{C'_0}{2C'_{d,l} - C'} - 1 \right) a \quad (3)$$

²⁾ D. Rittenberg u. G. I. Foster, Journ. biol. Chem. 133, 737 [1940].

Die Isotopen-Verdünnungsmethode unter Verwendung von ^{15}N -*d*, *l*-Gls haben bereits S. Graff, D. Rittenberg und G. L. Foster³⁾ zur Bestimmung der *l*- und *d*-Gls in Tumorhydrolysaten angewandt. Die Autoren setzten die markierte Gls den Proteinen aus verschiedenen malignen Geschwülsten nach 12-stdg. Hydrolyse mit 20-proz. Salzsäure zu, kochten noch weitere 3 Stdn., um die Einstellung des Gleichgewichts mit α -Pyrrolidon-carbonsäure zu gewährleisten (das allerdings beim Hydrolysen-pH nur zu etwa 1% auf der Seite des Anhydrids liegt⁴⁾) und arbeiteten dann nach der Foremanschen Methode auf *l*- und *d*, *l*-Gls-hydrochlorid auf. Die massenspektrometrische Auswertung der Stickstoffproben, die aus den verschiedenen Krystallisaten erhalten waren, ergab, daß bei einem Totalgehalt an Gls von etwa 10% nicht mehr als 1% der gesamten Gls aus *d*-Form bestand. In derselben Größenordnung lag der Wert für ein normales Eiweiß (Placenta). Später haben F. Kögl, H. Erxleben und G. J. van Veersen⁵⁾ unter Verwendung von deuterierter Gls die früheren aus der Drehung isolierter Proben abgeleiteten Befunde von F. Kögl und H. Erxleben⁶⁾, wonach im Hydrolysat maligner Tumoren erhebliche Mengen von *d*-Gls enthalten sind, einer Nachprüfung unterzogen. Diese ergab in Bestätigung früherer Ergebnisse, daß die Hydrolysate zahlreicher Tumoren größere Mengen (bis zu etwa 35% der Gesamtmenge) *d*-Gls enthielten. Wurde die deuterierte Gls erst nach 7-stdg. Hydrolyse zugesetzt und das Hydrolysat gleich aufgearbeitet, so ergab sich für Brown-Pearce-Eiweiß ein Totalgehalt von durchschnittlich 11,2% Gls und 3,35% *d*-Form, wurde sie hingegen 7 Stdn. „mithydrolysiert“, so ergaben sich insgesamt 12,8% Gls (3,7% *d*-Form). Noch höhere Werte an Gesamt-Gls wurden erhalten, wenn die Merksubstanz 20 Stdn. mitgekocht wurde (im Durchschnitt 17%), während der absolute Wert an *d*-Form etwa gleich blieb (3,7% im Durchschnitt aus 4 Analysen). Ähnliche Verhältnisse wurden bei anderen malignen Tumoren beobachtet. Die starken Abweichungen von den Ergebnissen der Amerikaner suchen Kögl und Mitarbeiter dadurch zu erklären, daß sie im Gegensatz zu jenen die Merksubstanz 20 Stdn. mitgekocht haben, wodurch die Moleküle der deuterierten Gls „die gleichen Umsetzungen und Bindungen eingehen müssen, wie die im Lauf der Hydrolyse aus dem Eiweißverband in Freiheit gesetzten Bausteine“. 3-stdg. Mitkochen der markierten Säure biete noch keine Gewähr für die wirklich vollständige Mischung der zugesetzten mit der durch Hydrolyse in Freiheit gesetzten Gls.

Um diese Vermutung Kögls nachzuprüfen, war es entscheidend, die 20-stündige Hydrolyse mit Zusatz von ^{15}N -Glutaminsäure als Merksubstanz zu wiederholen. Der großen Freundlichkeit von Prof. Dr. K. Clusius, München, verdanken wir die Überlassung von 11,5 g Ammoniumchlorid mit einem Gehalt von 4,35% ^{15}N (= 3,98% Überschuß über den Gehalt des normalen Stickstoffs an ^{15}N von 0,37%). Zu diesem Präparat wurde in Wasser + PdO nach einer etwas modifizierten Knoop-Oesterlin-Synthese⁷⁾ eine natronalkalische, wäßrige Ketoglutarat-Lösung unter Schütteln mit H_2 zutropft, wonach in einer Ausbeute von etwa 60% *d*, *l*-Gls als Hydrochlorid isoliert wurde.

Da nach Kögl und Mitarbeiter das Eiweiß von Brown-Pearce-Tumoren besonders reich an *d*-Gls ist, ließen wir von Herrn Dr. J. Klinke, Oppau, dem wir auch hier unseren besten Dank ausdrücken möchten, vier Kaninchen mit diesem Tumor beimpfen und arbeiteten die Tumoren, nachdem sie eine genügende Größe erreicht hatten, von Nekrosen und Normalgewebe weitgehend befreit, genau nach der Köglschen Vorschrift auf. In seiner letzten Arbeit äußert Kögl die Vermutung, daß die Ausbeute an *d*-Gls vom p_H

³⁾ Journ. biol. Chem. **133**, 745 [1940].

⁴⁾ H. Wilson u. R. K. Cannan, Journ. biol. Chem. **119**, 309 [1937].

⁵⁾ Ztschr. physiol. Chem. **277**, 251 [1943].

⁶⁾ Ztschr. physiol. Chem. **258**, 57 [1939]; **261**, 154 [1939]; **263**, 107 [1940]; **264**, 108, 198, 220 [1940].

⁷⁾ Ztschr. physiol. Chem. **148**, 294 [1925].

während der Aufarbeitung der Hydrolysate abhängig sein könne, so daß die *d*-Gls bei Fraktionierung in schwach alkalischer (Foreman-Methode) oder neutraler Lösung (Al_2O_3 -Adsorption) nicht gefunden würde, während man sie bei der einfachen HCl -Fällung ohne weiteres erhalte. Deshalb wurden drei Parallelversuche unter Zusatz von ^{15}N -*d*,*l*-Gls-hydrochlorid vor der 20-stündigen Hydrolyse angesetzt, von denen 2 nach Kögls Vorschrift (K) und eine nach unserer Methode (W) aufgearbeitet wurden. Die Isolierung genügender Mengen reinen *l*-Gls-hydrochlorids verlief bei allen drei Ansätzen ohne Schwierigkeiten (K I a, K II a, W I a). Bei der großen Reinheit der durch Adsorption abgetrennten und als Hydrochlorid gefällten Gls ließ sich durch Krystallisation aus der berechneten Menge konz. Salzsäure auch leicht ein Präparat von $[\alpha]_D = 0.0 \pm 0.2^0$ gewinnen (W I b), was uns aus den Mutterlaugen der direkt abgeschiedenen Hydrochlorid-Fractionen nicht gelang. Wir erhielten aus beiden Ansätzen zusammen ein analysenreines Präparat mit starker Linksdrehung ($[\alpha]_D = -24.2^0$), doch reichte die Menge nicht aus, um daraus reine *d*-Form zu krystallisieren, so daß wir dieses Präparat zur Isotopenanalyse verwandten (K III b). Schließlich adsorbieren wir die Mutterlaugen der zweiten Hydrochlorid-Krystallisation des nach Kögl aufgearbeiteten Ansatzes an die saure Al_2O_3 -Säule und gewannen auf diese Weise eine weitere, rechtsdrehende Hydrochlorid-Fraktion (K W), deren ^{15}N -Gehalt ebenfalls bestimmt wurde.

Isotopen-Analyse: Die Bestimmung der ^{15}N -Konzentration erfolgte an dem aus den verschiedenen Proben nach Dumas in Freiheit gesetzten, über Lauge von CO_2 und durch Ausfrieren mit flüssiger Luft von Wasser und Kohlenwasserstoffen befreiten Stickstoff in einem Massenspektrometer, das speziell zur Messung von Isotopenverhältnissen gebaut ist (W. Paul⁸⁾). Die Gase wurden mit einer Töpler-Pumpe in ausgeheizte, luftleere Ampullen von etwa 50 ccm Inhalt, die mit einem Zerschmetterungsventil versehen waren, eingefüllt und durch Abschmelzen verschlossen. Nach dem Anschmelzen an die Gaszuführung des Massenspektrometers und Öffnen des Ventils wurde das Verhältnis der Molekülmassen 28 ($^{14}\text{N}^{14}\text{N}$): 29 ($^{14}\text{N}^{15}\text{N}$) analysiert. Treten bei der Dumas-Verbrennung ^{14}N -Atome (*n*) und ^{15}N -Atome (*m*) zu Stickstoffmolekeln zusammen, so ergeben sich solche der Massen 28 ($^{14}\text{N}^{14}\text{N}$), 29 ($^{14}\text{N}^{15}\text{N}$, $^{15}\text{N}^{14}\text{N}$) und 30 ($^{15}\text{N}^{15}\text{N}$). Ihre Mengen verhalten sich zueinander wie $n^2 : 2 n m : m^2$. Das gesuchte Verhältnis *n* : *m* ergibt sich aus

$$\frac{n^2}{2 n m} = \frac{^{14}\text{N}}{^{15}\text{N}}$$

$$\text{zu } \frac{n}{m} = 2 \frac{^{14}\text{N}}{^{15}\text{N}} \quad (4)$$

Daraus läßt sich der %-Gehalt an ^{15}N berechnen:

$$\% \text{ } ^{15}\text{N} = \frac{100}{\frac{n}{m} + 1} \quad (5)$$

Ergebnisse: Die Auswertung der ^{15}N -Analysen der verschiedenen Gls-Proben zeigt, daß in dem von uns verwendeten trock-

⁸⁾ Eine genaue Veröffentlichung erfolgt demnächst in der Ztschr. Physik.

nen Mischprotein aus 4 Brown-Pearce-Tumoren im Durchschnitt 9.9% *l*-Glutaminsäure neben 0.5% *d*-Glutaminsäure enthalten sind (Tafel 1). Dabei macht es keinen nennenswerten Unterschied, ob die Hydrolysate nach der Köglschen Vorschrift oder mit der sauren Al_2O_3 -Säule aufgearbeitet wurden⁹⁾.

Tafel 1.

Probe	C	H	N	% ¹⁵ N* zuges. C'₀	d. Gls isol. C'₁, C'ₐ,ₑ, C'ᵣ	[α] _D	P	daraus ergibt sich ein Gehalt des Pro- teins in % an	
								<i>l</i> -Gls	<i>d</i> -Gls
KIa.....	32.52	5.41	7.48	3.98	1.02	+31.5	1.00	10.17	—
KIIa.....	32.86	5.69	7.59	3.98	1.06	+31.4	1.00	9.66	—
WIa.....	32.65	5.56	7.51	3.98	1.05	+31.5	1.00	9.79	—
WIIb.....	32.65	5.50	7.52	3.98	2.31	0.0	0.500	—	0.39
KIIIb.....	32.87	5.75	7.47	3.98	3.17	-24.2	0.116	—	0.54
KW.....	—	—	7.40	3.98	1.84	+10.6	0.67	—	0.53
ber.	32.71	5.50	7.63						

* Die Prozentgehalte an ¹⁵N sind als Überschuß über den im natürlichen Stickstoff enthaltenen Wert von 0.37% angegeben und in den Rechnungen verwendet. Je Ansatz (8.0 g Protein) wurden 0.700 g ¹⁵N-haltiges *d, l*-Gls-hydrochlorid zugesetzt.

Von der Gls des von uns analysierten Eiweißes sind also höchstens 5% *d*-Form. Diese Zahl stimmt mit der Menge an *d*-Form überein, die durch 20-stdg. Kochen von *l*-Gls mit konz. oder 20-proz. Salzsäure durch Racemisierung gebildet wird. O. K. Behrens, F. Lipmann, M. Cohn und D. Burk¹⁰⁾ beobachteten beim Kochen von *l*-Gls am Rückflußkühler mit 20-proz. Salzsäure die Bildung von 0.15% *d*-Form je Stunde (~ 3% in 20 Stunden). L. E. Arnow und J. C. Opsahl¹¹⁾ fanden nach 30 Stunden in 20-proz. Salzsäure 2.4%, nach 9 Stunden in konz. Salzsäure 2.2% *d*-Gls, M. Johnson¹²⁾ nach 35.5 Stunden in konz. Salzsäure unter Rückfluß, wobei durch Entweichen von HCl-Gas sich bald eine Konzentration von 20% einstellt, 4.65% *d*-Gls und V. Klingmüller¹³⁾ nach 7-stdg. gleicher Behandlung 3.5%, nach 20-stdg. Erhitzen mit 20-proz. Salzsäure 4.1% *d*-Form. Da alle diese Versuche unter verschiedenen Bedingungen ausgeführt und auf verschiedene Weise ausgewertet wurden, schien es angebracht, im Reihenversuch unter reproduzierbaren Verhältnissen die Racemisierung von *l*-Gls noch einmal zu untersuchen. Es wurden zu diesem Zweck Proben von etwa 1 g reinem *l*-Gls-hydrochlorid mit 40 ccm 20-proz. und konz. Salzsäure in verschlossenen Ampullen bestimmte Zeiten im Ölbad auf die Temperatur der Eiweißhydrolyse (108°) gebracht und nach Auffüllen mit Wasser auf ein genaues Volumen im 4-dm-Rohr polarisiert (Tafel 2 und Abbild. 1).

⁹⁾ Über die bei der Isotopen-Verdünnungsmethode auftretenden Fehler vergl. D. Rittenberg u. G. L. Foster, Fußn. 2.

¹⁰⁾ Science [New York] **92**, 32 [1940].

¹¹⁾ Journ. biol. Chem. **133**, 765 [1940].

¹²⁾ Journ. biol. Chem. **134**, 459 [1940].

¹³⁾ Ztschr. physiol. Chem. **278**, 97 [1943].

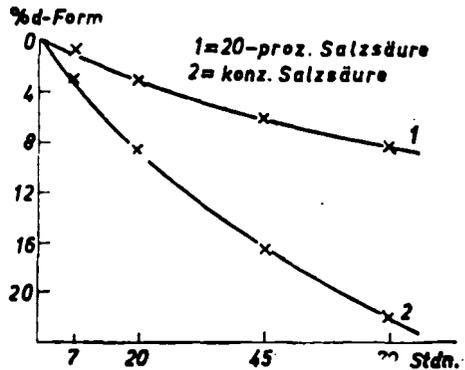
Tafel 2.

Einwaage g	Erhitzungs- dauer Stdn.	Salzsäure- Konz.	Endvol. ccm	α	$[\alpha]_D$	% d-Form
0.452	0	konz.	50	+0.88	+24.4	0
1.120	7	..	100	+1.03	+23.0	2.9
1.106	20	..	100	+1.89	+20.1	8.8
1.011	45	..	100	+0.66	+16.3	16.6
1.170	70	..	100	+0.62	+13.2	23.0
1.112	0	20%	40	+2.75	+24.7	0
1.077	7	..	40	+2.63	+24.4	0.8
1.038	20	..	40	+2.41	+23.2	3.2
1.041	45	..	40	+2.26	+21.7	6.3
1.030	70	..	40	+2.12	+20.6	8.5

Die Nullwerte wurden nach kurzem Anheizen auf 108° und sofortigem Abkühlen gemessen.

Wie man sieht, findet bei 108° eine beträchtliche Racemisierung von l-Gls statt. Daß die Abnahme der spezifischen Drehung nicht etwa von einer Zersetzung der l-Gls herrührt, konnte durch Isolierung von 36% d,l-Gls-hydrochlorid in analysenreiner Form aus einem 100 Stdn. erhitzten Ansatz gezeigt werden.

Will man aus den Modellversuchen auf die tatsächlichen Verhältnisse bei einer Eiweißhydrolyse unter Rückfluß schließen, so ist zu bedenken, daß ein großer Teil des HCl-Gases durch die basischen Gruppen des Proteins und der Aminosäuren gebunden wird, so daß nicht so viel entweicht wie beim Erhitzen von reiner HCl. Die in hoher Konzentration vorliegenden Aminosäure- und Peptidhydrochloride entfalten möglicherweise bei der hohen Temperatur eine zusätzliche racemisierende Wirkung, etwa wie auch Pyridinhydrochlorid eine der konz. Salzsäure ähnliche ätherspaltende Wirkung besitzt¹⁴⁾. Wir möchten daher annehmen, daß die tatsächliche Racemisierung von l-Gls bei der Proteinhydrolyse zwischen den Kurven 1 und 2 der Abbild. 1 zu suchen sein wird.



Abbild. 1. Racemisierung von l-Gls bei 108° in 20-proz. und konz. Salzsäure.

Wenn man von der Möglichkeit absieht, daß das von uns untersuchte Mischprotein aus einwandfrei als Brown-Pearce-Tumor diagnostizierten Geweben sich grundsätzlich von den von Kögl untersuchten Proteinen aus malignen Geschwülsten unterscheidet, so ist es schwer, eine befriedigende Erklärung für die Abweichungen unserer Befunde von den zahlreicher Utrechter Analysen, die mit deuterierter Gls angestellt wurden, zu finden. Kögl

¹⁴⁾ V. Prey, B. 74, 1219 [1941].

und Mitarbeiter stellten die deuterierte Gls ebenfalls nach der Knoop-Oesterlin-Synthese in D₂O-haltigem Wasser dar. Die isolierte D-haltige Gls enthielt noch „semilabil“ gebundenes Deuterium¹⁶⁾, das durch 20-stdg. Kochen mit konz. Salzsäure ausgetauscht wurde. Die so erhaltene stabile „Deuteroglutaminsäure“ wurde dann durch Krystallisation mit *l*- oder *d*-Gls im Überschuß in die optischen Antipoden zerlegt und den Proteinen vor der 20-stdg. Hydrolyse zugesetzt. Vielleicht ist es für die Stabilität der verbleibenden Deuteriumatome nicht gleichgültig, ob die Gls mit HCl allein oder mit den zahlreichen Hydrolysenprodukten eines Proteins + HCl 20 Stdn. gekocht wird. Wenn in diesem Fall ein weiterer Austausch von Deuterium gegen Wasserstoff stattfände, so wäre die am Ende isolierte Gls relativ ärmer an Deuterium, was auf eine größere Verdünnung mit Gewebe-Gls und damit auf einen höheren Gehalt der untersuchten Proteine an dieser Aminosäure schließen ließe. So läßt sich unter Umständen der überraschend hohe, mit Deutero-Gls erhaltene Totalgehalt (17%) erklären. Diese eventuelle Fehlerquelle scheidet bei Verwendung von ¹⁵N als Markierungsatom aus. Zur Prüfung dieser Hypothese müßte man „stabil“ deuterierte Gls mit einem gls-freien Eiweiß-Hydrolysat, das leicht durch Filtration durch saures Al₂O₃ erhalten werden kann, mit konz. Salzsäure kochen und dann ihren Deuteriumgehalt feststellen.

Es fällt natürlich auf, daß der *d*-Gls-Gehalt von Brown-Pearce-Tumoren unter Verwendung von Deutero-Gls konstant (etwa 3.5%) gefunden wird, gleichgültig, ob man die Merksubstanz nach der Hydrolyse zusetzt oder vor einer 7- oder 20-stdg. Hydrolyse, während der Gehalt an *l*-Gls um so höher erscheint, je länger man die Merksubstanz mitkocht. In dem weitgehend optisch einheitlichen Hydrolysendgemisch kann jedoch der hypothetische Deuteriumaustausch von *l*-Gls eine andere Geschwindigkeit haben als der von Deutero-*d*-Gls. Diese Vermutung ließe sich experimentell in der gleichen oben angedeuteten Weise nachprüfen.

Beschreibung der Versuche.

Synthese von ¹⁵N-haltigem *d, l*-Glutaminsäure-hydrochlorid.

Zu einer Suspension von 1.2 g PdO in einer Lösung von 11.4 g NH₄Cl (¹⁵N-Gehalt 4.35%) in 40 ccm Wasser wurde unter Schütteln mit H₂ in 4 Anteilen die Lösung von 5.0 g Ketoglutarsäure und 9.6 g Ätznatron in 50 ccm Wasser zugegeben. Nach 20 Stdn. waren 800 ccm H₂ aufgenommen (ber. 770 ccm). Um vom nicht umgesetzten NH₄Cl abzutrennen, wurde in der Kälte mit verd. Salzsäure neutralisiert, durch eine Säule von 500 g HCl-vorbehandeltem Al₂O₃ filtriert und mit 1 l Wasser nachgewaschen. Nach Elution der Ninhydrin-positiven Zone mit Barytwasser, Entfernen des Ba⁺⁺ mit H₂SO₄, Konzentrieren und Einleiten von HCl-Gas in der Kälte wurden 4.08 g rohes Gls-hydrochlorid erhalten, die 2-mal aus 20-proz. Salzsäure umkrystallisiert 3.5 g = 55% d. Th. reines Gls-hydrochlorid ergaben.

C₅H₉O₄N, HCl (183.6). Ber. C 32.71, H 5.50, N 7.63.

Gef. „ 32.73, „ 5.37, „ 7.53 (Mikro-Dumas).

¹⁵N-Gehalt 4.35%.

¹⁶⁾ D. Rittenberg, A. S. Keston, R. Schoenheimer u. G. L. Foster, Journ. biol. Chem. **125**, 1 [1938].

Aus dem Filtrat der Adsorption konnte nach Eindampfen das nicht umgesetzte ^{15}N -haltige NH_4Cl zusammen mit NaCl quantitativ zurückgewonnen werden, das in diesem Zustand für weitere derartige Synthesen zu gebrauchen ist.

Hydrolysen.

Das nach der Vorschrift von Kögl gewonnene, fettfreie, trockne Proteinmaterial wurde in 3 Anteilen von je 8.0 g mit 0.7 g ^{15}N -haltigem *d,l*-Gls-hydrochlorid und 30 ccm konz. Salzsäure am Rückflußkühler 20 Stdn. im gelinden Sieden gehalten.

1) Aufarbeitung nach Kögl: Die von 2 Ansätzen durch öfteres Abdampfen mit Wasser im Vak. erhaltenen Sirupe wurden mit Wasser verdünnt, mit Cu_2O geschüttelt, bis sie nicht mehr sauer auf Kongo reagierten, nach dem Filtrieren mit H_2S entkupfert, im Vak. zur honigartigen Konsistenz eingedampft und dann mit HCl -Gas unter Eiskühlung gesättigt. Nach Animpfen mit *l*-Gls-hydrochlorid wurde 4 Tage im Eisschrank stehengelassen, dann einen Tag im Eisraum (2°) abgesaugt und das rohe Hydrochlorid aus wenig 20-proz. Salzsäure umkrystallisiert. Nach weiteren 24 Stdn. wurden die Krystallisate (920 und 900 mg) abgesaugt. Sie enthielten laut Drehung 8 bzw. 13% *d*-Form, welche durch Umkrystallisieren aus etwas mehr 20-proz. Salzsäure entfernt wurden.

K I a: 600 mg, $[\alpha]_D^{20}$: +31.5 $^\circ$.

3.715 mg Sbst.: 4.430 mg CO_2 , 1.795 mg H_2O . — 3.670 mg Sbst.: 0.240 ccm N_2 (762 mm, 26°). — Gef. C 32.52, H 5.41, N 7.48.

K II a: 520 mg, $[\alpha]_D^{20}$: +31.4 $^\circ$.

4.070 mg Sbst.: 4.905 mg CO_2 , 2.070 mg H_2O . — 4.106 mg Sbst.: 0.273 ccm N_2 (758 mm, 25°). — Gef. C 32.86, H 5.69, N 7.59.

Nach Einengen der sirupösen Filtrate und Einleiten von HCl -Gas bei 0° wurden aus beiden Ansätzen je 100 mg weiterer Gls-hydrochlorid-Krystalle gewonnen, die nach dem Absaugen zusammen 2-mal aus 20-proz. Salzsäure umkrystallisiert wurden.

K III b: 105 mg, $[\alpha]_D^{20}$: —24.2 $^\circ$.

3.485 mg Sbst.: 4.200 mg CO_2 , 1.795 mg H_2O . — 4.030 mg Sbst.: 0.264 ccm N_2 (752 mm, 23°). — Gef. C 32.87, H 5.75, N 7.47.

2) Aufarbeitung mit der sauren Al_2O_3 -Säule: Das Hydrolysat wurde nach Abdampfen im Vak. mit Wasser auf 100 ccm aufgefüllt, mit NaOH neutralisiert und am nächsten Tag nach Abfiltrieren der ausgeschiedenen Huminflocken durch 300 g HCl -vorbehandeltes Al_2O_3 filtriert. Nach Waschen mit 500 ccm Wasser wurde die Ninhydrin-positive Zone mit gesättigtem Barytwasser eluiert, bis nach phenolphthaleinalkal. Reaktion des Eluats noch 30 ccm abgefließen waren. Das schwach alkal. Eluat wurde mit H_2SO_4 genau neutralisiert, vom ausgeschiedenen $\text{Al}(\text{OH})_3$ filtriert, nach 2-maligem Auskochen des Niederschlags mit Wasser mit H_2SO_4 kongosauer gemacht und darauf im Vak. auf 30 ccm eingengt. Nun wurde alles Ba^{++} mit H_2SO_4 ausgefällt und nach dem Zentrifugieren und 2-maligem Auskochen des BaSO_4 mit wenig 2-n. HCl bei 0° HCl -Gas eingeleitet. Die ausgeschiedenen Krystalle (860 mg) wurden nach 2 Tagen abgesaugt und aus 20-proz. Salzsäure umkrystallisiert.

W I a: 700 mg, $[\alpha]_D^{20}$ + 31.5°.

3.725 mg Sbst.: 4.460 mg CO₂, 1.805 mg H₂O. — 3.506 mg Sbst.: 0.230 ccm N₂ (752 mm, 22°). — Gef. C 32.65, H 5.56, N 7.51.

Die Mutterlauge von W I a wurde auf 10 ccm eingengt und neuerlich mit HCl-Gas bei 0° gesättigt. Nach 2 Tagen wurde abfiltriert und der wenig rechtsdrehende Niederschlag (760 mg, $[\alpha]_D^{20}$: + 9.90°) bei 0° zur Lösung des Gls-hydrochlorids mit 30 ccm konz. Salzsäure 1 Stde. geschüttelt. Nach dem Abfiltrieren zeigte der Filtrerrückstand $[\alpha]_D^{20}$: + 30.0°, die Mutterlauge wurde auf 7.0 ccm eingedampft und mit HCl-Gas bei 0° gesättigt. Nach 2 Tagen wurde abgesaugt.

W I b: 350 mg, $[\alpha]_D^{20}$: ± 0.0°.

3.325 mg Sbst.: 3.980 mg CO₂, 1.635 mg H₂O. — 3.865 mg Sbst.: 0.254 ccm N₂ (761 mm, 25°). — Gef. C 32.65, H 5.50, N 7.52.

Gesamtausb. an Roh-Gls-hydrochlorid: 1620 mg (920 mg nach Abzug der ¹⁵N-haltigen Gls-HCl) = 9.25% des Trockenproteins.

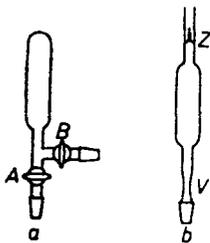
Die sirupösen Mutterlauge(n) der Krystallisationen K I b und K II b wurden nach Verdünnen und Neutralisieren ebenfalls durch die saure Al₂O₃-Säule laufen gelassen. Aus der Aminodicarbonsäurezone erhielt man nach Eluieren mit Barytwasser 530 mg Gls-hydrochlorid vom $[\alpha]_D^{20}$: + 13.5°. Leider fiel diese Fraktion einem Laborunfall zum Opfer, doch ließen sich aus der Mutterlauge nach Einengen noch weitere 100 mg Gls-hydrochlorid gewinnen, die aus 20-proz. Salzsäure umkrystallisiert wurden.

K W: 60 mg, $[\alpha]_D^{20}$: + 10.6°.

3.644 mg Sbst.: 0.237 ccm N₂ (764 mm, 27°). — Gef. N 7.40.

Massenspektrometrische Analyse.

1) Gewinnung der N₂-Proben: Je 50 mg Gls-hydrochlorid wurden in der Makro-Dumas-Apparatur 1/2 Stde. mit CuO verbrannt und das N₂-Gas in einem mit Schliiff versehenen Azotometer über 30-proz. Natronlauge aufgefangen. Nach beendeter Verbrennung wurde das Gas in eine

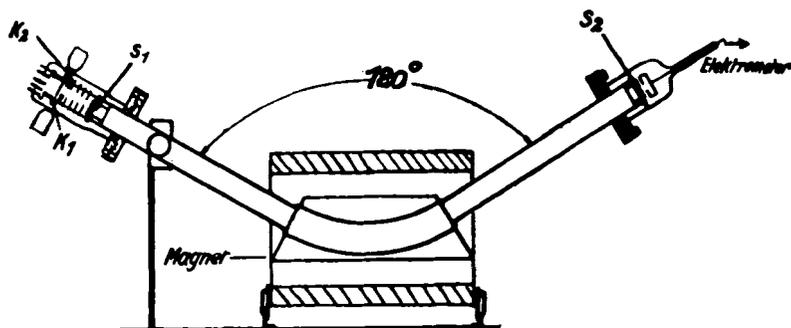


Abbild. 2.

luftfrei gepumpte Ampulle, die mit zwei Hähnen versehen war (s. Abbild. 2a), eingelassen. Nach Schließen von Hahn A und Lösen vom Azotometer wurde die Ampulle an eine Töpler-Pumpe angesteckt und 1 Stde. in flüssiger Luft gekühlt. Dann wurde nach Öffnen von Hahn B das Gas mit der Töpler-Pumpe in eine luftleer gepumpte Ampulle (Abbild. 2b) mit Zerschmetterungsventil (Z) übergeführt. In dieser kam es nach Abschmelzen bei V zur massenspektrometrischen Analyse. Nach Anschmelzen an das Massenspektrometer kann das Ventil Z durch Zerschmettern mit einem magnetisch hochgehobenen Eisenstückchen geöffnet werden (Abbild. 2, a und b).

2) Ausführung der Analysen: Das für die Isotopenanalyse verwendete Massenspektrometer zeigt folgende charakteristische Merkmale (Abbild. 3): Das zu untersuchende Gas wird durch Stoß pendelnder Elektronen ionisiert. Die Elektronen, die von der Kathode K₁ emittiert werden, fliegen durch ein Anodenkästchen hindurch, kehren vor der zweiten Kathode

K_2 um und fliegen zurück. Um zu vermeiden, daß sie direkt auf die Anode gelangen, werden sie durch ein magnetisches Längsfeld geführt. Auf ihrem Weg ionisieren sie die zu untersuchenden Gasmoleküle, die durch ein Gitter aus dem Anodenkästchen herausgezogen werden und durch eine elektrostatische Zylinderlinse auf den Spektrometerspalt S_1 konzentriert werden.



Abbild. 3. Massenspektrometer für die Isotopenanalyse.

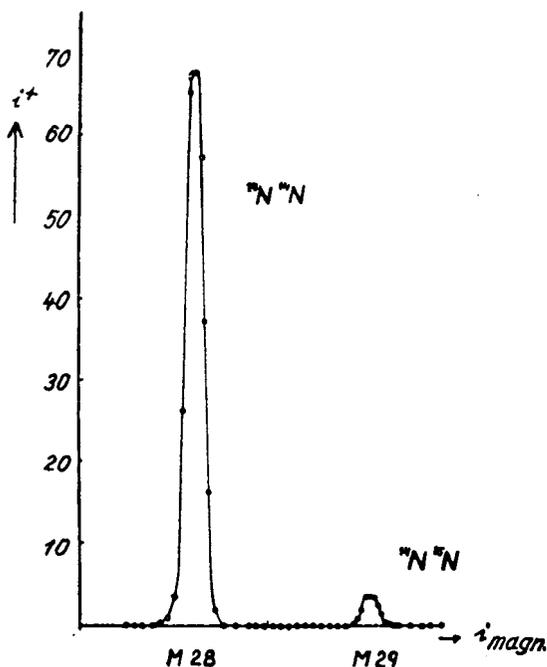
Die Ionen, die alle die gleiche Geschwindigkeit entsprechend der Beschleunigungsspannung von 1000 V erhalten haben, treten nun divergent in den magnetischen Analysator, ein Sektorfeld von 60° , ein, durchlaufen hier eine Kreisbahn, deren Radius je nach der Masse der Ionen verschieden ist und werden hinter dem Feld in der Ebene des Spaltes S_2 durch die Linsenwirkung des magnetischen Feldes wieder vereinigt. Enthält das durch den Spalt S_1 tretende Ionenbündel z. B. die Massen 28 und 29, so entstehen in der Spaltebene S_2 2 Bilder des Spaltes S_1 . Man verändert nun die Magnetfeldstärke so, daß abwechselnd die eine und die andere Masse durch den Spalt S_2 fällt und vergleicht die auf den Auffänger fallenden Ionenströme miteinander.

Bei der verwendeten Versuchsanordnung beträgt der Ablenkradius 20 cm, die Spalte S_1 und S_2 sind 0,2 bzw. 0,4 mm breit. Zur Messung der Ionenströme wurde ein Röhrenelektrometer mit einer max. Empfindlichkeit von 10^4 cm/V verwendet. Es wurde in folgender Reihenfolge gemessen: Nullpunkt des Elektrometers, Maximalintensität der Masse 28, Masse 29 und Nullpunkt. Für eine Meßreihe wurden 5—10 Einzelmessungen gemacht, aus denen die Ergebnisse gemittelt wurden. Um beide Intensitätsmaxima mit gleicher Genauigkeit zu messen, wurde mit 2 verschiedenen Empfindlichkeiten des Elektrometers gearbeitet; die beiden Meßbereiche wurden mit einem Stöpselwiderstand gegeneinander geeicht.

Fehler im Mischungsverhältnis $^{14}\text{N}:^{15}\text{N}$ können dadurch entstehen, daß die Massen 28 und 29 nicht nur durch das zu untersuchende Gas, sondern auch durch Beimengungen von CO (28) und Kohlenwasserstoffen (C_2H_4 , C_2H_5 -Radikal aus dem Dichtungsfett) belegt sind. Deshalb wurde die gesamte Apparatur mehrere Stunden bei 300° ausgeheizt. Das Stickstoffgas strömte durch eine Capillare und eine mit flüssiger Luft gekühlte Glaswendel in die Ionenquelle. Auf diese Weise gelang es, den Untergrund, der durch Fremd-Ionen hervorgerufen wird, auf weniger als 1% der Ionenintensität der Stickstoffmoleküle herabzusetzen. Da er übrigens bei allen Messungen gleich stark vorhanden war, wurden dadurch entstehende Fehler ausgeschlossen.

Meßergebnisse.

Von jeder Stickstoffprobe wurden mehrere Meßreihen an verschiedenen Tagen durchgeführt. Es wurden folgende Ergebnisse erhalten:



Abbild. 4. Spektrogramm d. Stickstoffprobe W I b.

Probe*)	$^{14}\text{N} : ^{15}\text{N}$	% ^{15}N
Merksubstanz	22.0	4.35 ± 0.05
K I a	70.8	1.39 ± 0.01
K II a	68.8	1.43 ± 0.01
W I a	68.5	1.44 ± 0.02
W I b	36.4	2.68 ± 0.03
K III b	27.2	3.54 ± 0.03
K W	44.2	2.21 ± 0.02

*) 2 Proben wurden immer abwechselnd ausgemessen und zwischendurch wurde zur Kontrolle eine bereits früher gemessene Probe wiederholt. Die angegebenen Fehlergrenzen sind nicht die mittleren quadratischen Fehler, sondern ungefähr das 3-fache dieses Wertes. Auf diese Weise ist unkontrollierbaren kleinen systematischen Fehlern Rechnung getragen.

In Abbild. 4 ist ein „Spektrogramm“ der Probe W I b dargestellt. Beide Ionenströme sind hier mit gleicher Empfindlichkeit des Röhrenelektrometers gemessen.

Als Beispiel für die Genauigkeit der Messungen sind nachstehend die Daten der Meßreihe am Stickstoff aus Probe K I a angegeben: $^{28}\text{N} : ^{29}\text{N} = 34.9; 35.1; 35.9; 35.5; 35.1; 35.0; 35.7; 35.8; 35.6; 35.5$ (Mittel 35.4).

Frl. L. Wirth und Frl. H. Fremerey danken wir sehr für die eifrige Mithilfe.

10. Hans Brockmann und Hermann Junge: Über Benzopyryliumverbindungen, II. Mittel.*): Acylierung und Methylierung.

[Aus dem Institut für Organ. Chemie und Biochemie der Reichsuniversität Posen.]
(Eingegangen am 8. November 1943.)

Bei der Bearbeitung der „Drachenblut“-Farbstoffe Dracorubin¹⁾ und Dracorhodin²⁾, die nach unseren Befunden 2-Phenyl-benzopyryliumderivate sind, wurde auch ihre Acylierung und Methylierung untersucht. Dabei haben wir diese Reaktionen zum Vergleich bei einigen einfachen Vertretern der 2-Phenyl-benzopyrylium-Reihe durchgeführt. Als Modellschubstanz wählten wir zunächst das gut kristallisierende und in seinen Absorptions-

*) I. Mittel.: B. 76, 1028 [1943].

¹⁾ H. Brockmann u. R. Haase, B. 69, 1950 [1936]; 70, 1733 [1937].

²⁾ H. Brockmann u. H. Junge, B. 76, 751 [1943].