

94. Verteilung von markierten Molekeln in Kristallsuspensionen als analytisch und präparativ ausnutzbare Methode der Tracerchemie: Untersuchungen mit ^{14}C -markierten Aminosäuren

von C. H. Schneider

(24. I. 64)

1. Einleitung

Eine frühere Mitteilung [1]¹⁾ beschrieb das Verteilungsverhalten von radioaktiv markierten Leucinpräparaten, welche sich in Tracerquantitäten in der Lösungsphase von gut gerührten alkoholischen Kristallsuspensionen von L-, DL- und D-Leucin befanden. Es wurde gezeigt, dass die radioaktiven Molekeln aus der Lösung bis auf einen praktisch konstanten Rest in die kristalline Phase übergangen, vorausgesetzt, dass diese in hinreichender Menge zugesetzt war und die Fähigkeit besass die radioaktiven Molekeln aufzunehmen. Kristalline L- und D-Leucinphasen nahmen nur gelöstes Leucin der gleichen optischen Konfiguration auf, während kristallines DL-Leucin sowohl L- wie D-Leucinmolekeln aus der Lösung aufnahm. Die damit aufgezeigte Möglichkeit, Tracersubstanzen in derartigen Kristallsuspensionen zu verteilen und durch Ausnutzung der Stereospezifität des Verteilungsvorganges optische Isomere voneinander zu unterscheiden, ist analytisch wie auch präparativ von Interesse.

Eine elegante präparative Anwendung der stereospezifischen Verteilung ergibt sich bei der Umwandlung einer markierten racemischen Substanz in ein Präparat, in dem das eine markierte optische Isomere abgetrennt und durch nicht markiertes Isomere ersetzt wird. Zur Gewinnung eines derartigen Präparates würde es genügen das markierte Racemat in einem geeigneten Lösungsmittel mit nicht markierten Kristallen des im Schlusspräparat unerwünschten markierten optischen Isomeres zu rühren und durch mehrmalige Erneuerung der kristallinen Phase dafür zu sorgen, dass die Abtrennung des nicht erwünschten markierten Isomeres aus der Lösung vollständig wird. Das Verhältnis von nicht markiertem zu markiertem Isomeren im umgewandelten Präparat richtet sich nach dem Grad der Sättigung der zu Beginn hergestellten Lösung des racemischen Tracers. Die analytische Bedeutung geht über die quantitative Erfassung der markierten optischen Isomeren hinaus und erstreckt sich auch auf die Anwendung von geeigneten Kristallsuspensionen zu Homogenitäts- und Identitätsprüfungen von beliebigen Tracersubstanzen.

Experimentelle Befunde dieser Arbeit lassen erwarten, dass sich eine grosse Zahl von Kristallsuspensionen organischer Verbindungen zum Studium des Verteilungsverhaltens von markierten Molekeln eignen werden. Daher beansprucht das einfache Verfahren zur Untersuchung dieses Verhaltens in geeigneten Kristallsuspensionen, welches hier kurz als Kristallsuspensionsanalyse bezeichnet sei, ein allgemeines Interesse in der Analyse organischer Tracersubstanzen. Die vorliegende Arbeit wurde unternommen, um vermehrt Einblick in die Natur der Kristallsuspensionsverteilung zu erhalten und weitere kristallsuspensionsanalytische Systeme kennenzulernen. Es

¹⁾ Die Ziffern in eckigen Klammern verweisen auf das Literaturverzeichnis, Seite 864.

wird über eingehendere Untersuchungen an Leucin- und Tyrosinsystemen sowie über Verteilungsversuche mit den ^{14}C -markierten Aminosäuren L-Isoleucin, L-Valin, L-Alanin, L-Serin, L-Methionin, L-Asparaginsäure und L-Glutaminsäure berichtet.

2. Material und Methoden

Nicht markierte Aminosäuren: Es wurden Präparate von MANN RESEARCH LABORATORIES, New York, (beste Qualitäten) verwendet. L-Tyrosin *purissimum* wurde von FLUKA A.G., Buchs bezogen. Alle Aminosäuren wurden nach DUNN & ROCKLAND [2] umkristallisiert²⁾. Man achtete darauf die L- und D-Formen der verschiedenen Aminosäuren unter gleichen Bedingungen zu kristallisieren. «Zerriebene» Kristallpräparate wurden durch Zerreiben in einem Porzellanmörser hergestellt.

Markierte Aminosäuren: Die folgenden ^{14}C -markierten Aminosäuren mit verschiedenen spezifischen Aktivitäten wurden von NEW ENGLAND NUCLEAR CORPORATION, Boston, bezogen: L-Leucin-1- ^{14}C (25 mC/Millimol); ^{14}C -L-Tyrosin (369 mC/Millimol); ^{14}C -L-Isoleucin (246 mC/Millimol); L-Valin-1- ^{14}C (5,7 mC/Millimol); ^{14}C -L-Alanin (123 mC/Millimol); ^{14}C -L-Serin (123 mC/Millimol); L-Methionin-methyl- ^{14}C (14,5 mC/Millimol); ^{14}C -L-Asparaginsäure (164 mC/Millimol); ^{14}C -L-Glutaminsäure (205 mC/Millimol).

Durchführung der Verteilungsversuche: Das gewünschte Volumen Lösungsmittel (meist 15 oder 20 ml) wurde in einen verschliessbaren Zylinder von 2,5–3 cm Durchmesser gebracht, worauf die ^{14}C -markierte Aminosäure in Lösung (meist < 0,05 ml) unter Rühren mittels Magnetrührer hinzupipettiert wurde. Die Lösung, welche in der Regel 0,1–0,15 $\mu\text{C}/\text{ml}$ an Radioaktivität enthielt, wurde dann kurz weitergerührt, bevor ihr Proben zur Bestimmung ihrer Radioaktivität entnommen wurden. Auf die Probenentnahme folgte unmittelbar der Zusatz des Kristallpräparates. In gewissen Experimenten wurde zuerst die Kristallsuspension hergestellt und kurz (z. B. 15 Min.) gerührt, bevor die Tracerlösung hinzugefügt wurde. Dieses als «Vorrühren» bezeichnete Vorgehen wurde gelegentlich zur Veränderung der Kristallsuspensionsanalytischen Qualität von zerriebenen Kristallpräparaten verwendet. Das Lösungsmittel soll das Kristallmaterial nur sehr wenig lösen, so dass wohl Tracerquantitäten darin gelöst sein können, die Konzentration der von den Festkörpern stammenden Molekeln aber stets klein bleibt. Die stroboskopisch ermittelte Geschwindigkeit des Magnetrührers betrug – wo nichts anderes vermerkt ist – zwischen 400 und 600 Umdrehungen/Minute. Die Rührmagnete trugen eine zylindrische Polyvinylchloridumhüllung von 1 cm bis 1,5 cm Länge und 0,6 cm Durchmesser. Die Versuche wurden teils bei 20° teils bei 0° vorgenommen; bei ersteren stand das Rührgefäss in einem Wasserbad; bei tiefer Temperatur wurde in einer Kühltruhe mit einer Lufttemperatur von 0° gearbeitet, wobei das Rührgefäss in einem Sandbad von 0° (Temperatur kontrolliert) stand. Bei einzelnen Versuchen bei 20° wurde das Rühren durch konstantes Rollen der Versuchsgefässe auf einer Rollmaschine in einem Raum mit einer konstanten Temperatur von 20° ersetzt. Zur Ermittlung der in Lösung vorhandenen Radioaktivität wurde ungefähr 0,3 ml Kristallsuspension bei annähernd der Versuchstemperatur in einem verschlossenen Gefäss scharf zentrifugiert und vom klaren Überstand eine 0,1 ml Probe mittels Mikropipette in ein Szintillationszählglas mit Szintillatormischung übergeführt.

Bestimmung der Radioaktivität: Die Zählung der ^{14}C -markierten Aminosäuren erfolgte in einem Tri-Carb-Szintillationsspektrometer. Lösungsproben (in der Regel 0,1 ml) wurden zu 15 ml einer Mischung von Dioxan-*m*-Xylol (2:1) gegeben, welche 75 mg 2,5-Diphenyloxazol, 0,75 mg 1,4-[Bis-2-(5-phenyloxazolyl)]-benzol und 1,2 g Naphtalin enthielt. Diese Szintillationsmischung wurde vor der Zählung während einer definierten Zeit (in der Regel 2 bis 4 Std.) in der Kühltruhe des Tri-Carb-Spektrometers aufbewahrt. Die Zählhausbeute betrug um 70%. In einigen Versuchen wurden die Lösungsproben eingedampft, nach KALBERER-RUTSCHMANN in getrocknetem Zustand in Sauerstoff verbrannt und das radioaktive CO_2 in einem Toluolszintillationssystem gemessen [3]. Die Radioaktivität der unter Abschnitt 4.3 aufgeführten Extrakte von Aminosäurebodenkörpern wurde wie folgt bestimmt: beim Leucin wurden 5 ml jeder Fraktion zu 10 ml einer Mischung von Dioxan-*m*-Xylol (1:1) gegeben, welche 75 mg 2,5-Diphenyloxazol, 0,75 mg 1,4-[Bis-2-(5-phenyl-

²⁾ Kristallisationsbedingungen gemäss [2], Tabelle II, Seite 343; wo nur die DL-Aminosäure aufgeführt ist, wurden angenähert die hierfür beschriebenen Bedingungen angewandt. Bei Leucin wurde eine Alkoholkonzentration von 90% verwendet.

oxazolyl]-benzol und 1,2 g Naphtalin enthielt, und das resultierende Gemisch wurde im Szintillationsspektrometer gezählt; beim Tyrosin wurden 5 ml jeder Fraktion unter einer Infrarotlampe eingetrocknet und nach KALBERER-RUTSCHMANN [3] analysiert.

3. Kristallsuspensionsanalytische Prüfung der Homogenität markierter Aminosäuren. – Markiertes Leucin und Tyrosin, welche man auch zu anderem Zweck verwendete, wurden meist in 50- μ C-Mengen zu verschiedenen Zeiten bezogen. Die Homogenität einiger dieser Präparate, sowie des verwendeten Isoleucins wurde zur Zeit ihrer Verwendung in kristallsuspensionsanalytischen Verteilungsversuchen geprüft.

Je 20 ml Lösung der radioaktiven Aminosäure in 96-proz. Äthanol (Tyrosin in Wasser), welche etwa $2 \cdot 10^5$ cpm/ml an Radioaktivität enthielt, wurde mit 1 g der entsprechenden kristallinen, zerriebenen Aminosäure solange (mehrere Std.) gerührt, bis die Radioaktivität der Lösung nicht mehr abnahm. Dann gewann man die klare Lösung durch Zentrifugation, mass ihr Volumen und rührte erneut bis zur Konstanz der gelösten Radioaktivität mit frischer kristalliner Aminosäure, welche im gleichen Verhältnis wie beim ersten Mal zugesetzt wurde. Das Verfahren wurde ein drittes und nötigenfalls ein viertes Mal wiederholt, bis die Radioaktivität der Lösung nicht mehr messbar gesenkt werden konnte. Die in Lösung verbleibende Restaktivität betrug bei den untersuchten Leucin- und Tyrosinpräparaten zwischen 3% und 10% der Gesamtaktivität und 5% bei Isoleucin. Mit Rücksicht auf den später zu beschreibenden Spezifitätsverlust von zerriebenen Kristallpräparaten sind die so erhaltenen Werte als minimal anzusehen.

4. Untersuchungen an Leucin- und Tyrosinsystemen

4.1. Verteilungsversuche. Die Figuren 1 und 2 zeigen das Verhalten von gelöstem [14 C]-L-Leucin und [14 C]-L-Tyrosin in Kristallsuspensionen aus D- und L-Leucinkristallpräparaten bzw. aus D- und L-Tyrosinkristallpräparaten während mehrstündigen Rührens oder Rollens bei 20°. In Suspensionen von D-Leucin- und D-Tyrosinkristallen wird keine Aktivitätsabnahme in Lösung gefunden, während alle L-Kristallpräparate Radioaktivität aus der Lösung aufnehmen. Die Stereospezifität des Verteilungsvorganges, der in Leucinsuspensionen bei + 4° gefunden wurde [1], besteht also auch bei 20° und zwar nicht nur beim Leucin, sondern auch bei den Kristallen von

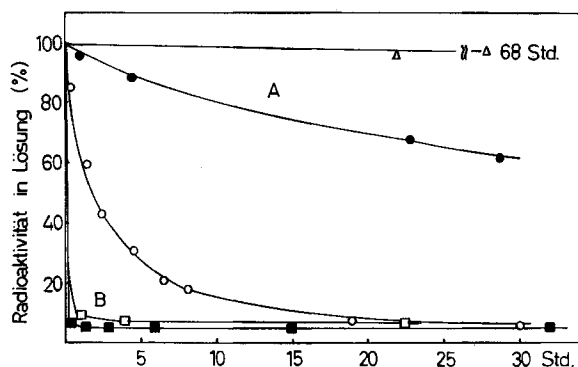


Fig. 1. Verteilung von [14 C]-L-Leucin in L- und D-Leucinkristallsuspensionen bei 20°

Die Suspensionen von je 1,0 g Kristallen in 20 ml 96-proz. Äthanol enthielten $1,5-2 \cdot 10^5$ cpm/ml (= 100%) an gelöster Radioaktivität vor Beginn jeder Verteilung. $\Delta-\Delta$ D-Leucin, unzerrieben, Suspension gerührt; $\bullet-\bullet$ (A) L-Leucin, unzerrieben, Suspension bei 12 Umdrehungen/Minute gerollt; $\circ-\circ$ L-Leucin, unzerrieben, Suspension gerührt; $\square-\square$ (B) L-Leucin, zerrieben, Suspension bei 12 Umdrehungen/Minute gerollt; $\blacksquare-\blacksquare$ L-Leucin (0,6 g), zerrieben, Suspension (12 ml) gerührt

optisch aktivem Tyrosin. Die Radioaktivitätsaufnahme ist bei zerriebenen L-Kristallen gegenüber den nicht zerriebenen Kristallen stark beschleunigt und zwar auch dann, wenn die äussere Bewegung der Kristallsuspension wie im Rollversuch mit zerriebenen Leucin (Kurve B, Fig. 1) sehr gering ist. Eine Betrachtung der Kurvenpaare A und B in Fig. 1 und A' und B' in Fig. 2 zeigt, dass zerriebene und nicht zerriebene

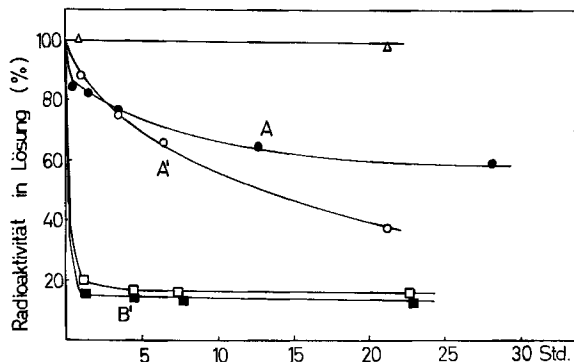


Fig. 2. Verteilung von $[^{14}\text{C}]$ -L-Tyrosin in L- und D-Tyrosinkristallsuspensionen bei 20°

Die Suspensionen von je 750 mg Kristallen in 15 ml Wasser enthielten $1,7\text{--}2 \cdot 10^5$ cpm/ml (= 100%) an gelöster Radioaktivität vor Beginn jeder Verteilung. $\Delta\text{--}\Delta$ D-Tyrosin, unzerrieben, Suspension gerührt; $\bullet\text{--}\bullet$ (A) L-Tyrosin, unzerrieben, Suspension bei 12 Umdrehungen/Minute gerollt; $\circ\text{--}\circ$ (A') L-Tyrosin, unzerrieben, Suspension gerührt; $\square\text{--}\square$ L-Tyrosin, zerrieben, Suspension bei 128 Umdrehungen/Minute gerollt; $\blacksquare\text{--}\blacksquare$ (B') L-Tyrosin, zerrieben, Suspension gerührt

Kristalle sich in der Geschwindigkeit der Radioaktivitätsaufnahme unter vergleichbaren Bedingungen so stark unterscheiden können, dass praktisch die gesamte aufzunehmende Radioaktivität in die zerriebenen Kristalle übergegangen ist, bevor eine nennenswerte Übertragung von Radioaktivität in die unzerriebenen Kristalle stattgefunden hat.

4.2. Ausnutzungsgrad kristalliner Präparationen. Unter dem Ausnutzungsgrad N einer kristallinen Phase im Zeitpunkt t während eines Verteilungsversuches verstehen wir den Bruchteil \bar{A}/A_0 der kristallinen Phase, innerhalb dessen Grenzen die in den Festkörper aufgenommenen radioaktiven Molekeln homogen verteilt sein müssten, um diesem Anteil die in der Lösung zu eben diesem Zeitpunkt bestehende spezifische Aktivität zu verleihen. Der Ausnutzungsgrad der kristallinen Phase strebt in einem Verteilungsversuch von Null gegen den theoretischen Maximalwert von Eins im Endgleichgewicht, welches durch die homogene Verteilung der radioaktiven Molekeln in Lösung und gesamtem Festkörper und durch gleiche spezifische Aktivitäten beider Phasen gekennzeichnet ist. Er lässt sich aus der Beziehung $A^*/\bar{A} = a^*/a_0$ für jeden in Lösung verbleibenden Anteil der Gesamtradioaktivität ermitteln:

$$N = \frac{\bar{A}}{A_0} = \frac{a_0 A^*}{A_0 a^*} \quad 1)$$

Hierbei bedeuten A^* und a^* radioaktiv markierte austauschbare Mengen im Festkörper bzw. in Lösung; A_0 und a_0 bezeichnen Totalmengen (markiert und nicht markiert) der festen Phase bzw. des Gelösten und \bar{A} bedeutet eine Menge kristalliner

Phase, die mit der Lösung im Gleichgewicht steht und somit bei homogener Verteilung der in der festen Phase vorhandenen Molekeln die gleiche spezifische Aktivität aufweist wie die Lösung. Bei der praktischen Auswertung der Beziehung ist zu berücksichtigen, dass die ins System gebrachte Radioaktivitätsmenge ρ' neben der gesamten austauschbaren Aktivität ρ eine nicht in die feste Phase aufnehmbare Restaktivität i der flüssigen Phase enthalten kann, so dass die in der Lösung beobachtbare Radioaktivität r' um den Betrag i grösser ist als r , die austauschbare Aktivität in Lösung. Es wird dann:

$$N = \frac{a_0}{A_0} \cdot \frac{\rho' - r'}{r' - i} \tag{2)}$$

Ausnutzungsgrad von Leucin- und Tyrosinpräparaten in Verteilungsexperimenten

Kristallpräparate	Bewegung der Kristallsuspensionen	Zeitdauer Std.	N%
L-Tyrosinnadeln	Rühren \sim 500 U/min	158	5,9
L-Tyrosinnadeln	Rühren \sim 500 U/min	\sim 350	7,3
L-Tyrosin zerrieben I	Rollen 108 U/min	2	5,7
L-Tyrosin zerrieben II	Rühren \sim 500 U/min	46	13,9
L-Tyrosin zerrieben III	Rühren \sim 500 U/min	135	6,6
L-Leucinkristalle	Rühren \sim 500 U/min	30	37
L-Leucin zerrieben I	Rühren \sim 500 U/min	3	41
L-Leucin zerrieben II	Rühren \sim 500 U/min	10	32

Die Tabelle enthält die Ausnutzungsgrade einiger L-Leucin- und L-Tyrosin-Präparate, welche in verschiedenen Verteilungsversuchen einen ziemlich konstanten Radioaktivitätsgehalt erreichten. Die Ausnutzung der L-Tyrosinpräparate schwankte zwischen 5% und 14%, und diejenige der L-Leucinpräparate zwischen 30% und 40%. Führt man in die früher für ein Verteilungssystem im Endgleichgewicht abgeleitete Gleichung [1]³⁾

$$a^* = \frac{\alpha}{A_0/a_0 + 1},$$

den Austauschgrad N_t zu einem beliebigen Zeitpunkt

$$N_t = \frac{a_0}{A_0} \cdot \frac{A^*(t)}{a^*(t)},$$

welcher für eine gegebene Kristallpräparation experimentell zu ermitteln ist, ein, so erhält man die Beziehung 3), welche für ein gegebenes Verhältnis A_0/a_0 und bei Kenntnis des von der Kristallpräparation zu einem beliebigen Zeitpunkt erreichten Ausnutzungsgrad den in Lösung verbleibenden Anteil der austauschbaren radioaktiven Substanz in diesem Zeitpunkt (a_t^*/α) angibt:

$$\frac{a_t^*}{\alpha} = \frac{1}{A_0 N_t/a_0 + 1} \tag{3)}$$

Beziehung 3) kann praktisch zur Ermittlung von Restaktivitäten benutzt werden.

4.3. *Fraktionierte Extraktion von radioaktiven Bodenkörpern.* Einige der in den Verteilungsversuchen verwendeten Tyrosin- und Leucinkristallpräparate wurden zum Schluss isoliert und bei konstanter Temperatur (20°) mit aufeinanderfolgenden

³⁾ Mit α wird die Totalmenge der austauschbaren markierten Substanz bezeichnet.

Portionen Lösungsmittel extrahiert, wobei die Radioaktivität und der Abdampfrückstand (Aminosäuregehalt) jeder Fraktion ermittelt wurden. Die bei zwei L-Tyrosinbodenkörpern erhaltenen Ergebnisse sind in Figur 3 dargestellt.

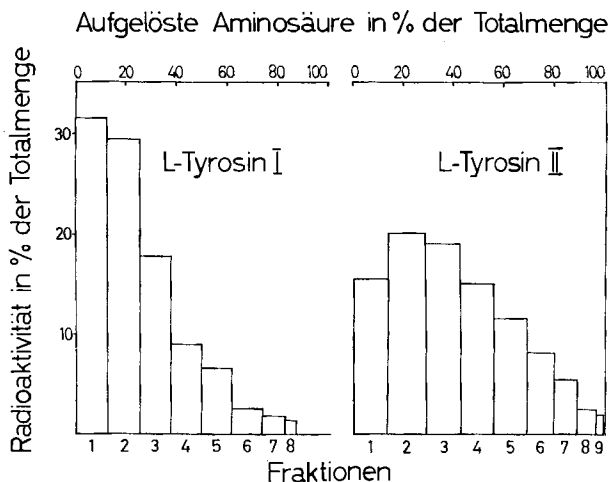


Fig. 3. *Fractionierte Extraktion von L-Tyrosinbodenkörpern*
 Präparat I (206 mg), total aufgelöst nach 8 Extraktionen mit je 50 ml Wasser. Präparat II (160 mg), total aufgelöst nach 9 Extraktionen mit je 40 ml Wasser. Siehe Text.

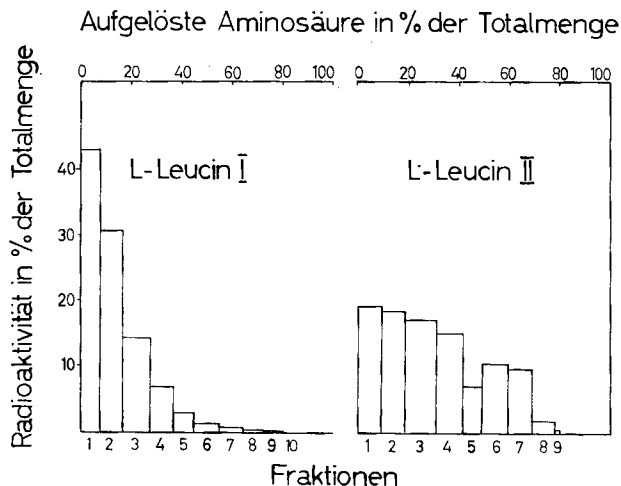


Fig. 4. *Fractionierte Extraktion von L-Leucinbodenkörpern*
 Präparat I (200 mg), total aufgelöst nach 10 Extraktionen mit je 50 ml 96-proz. Äthanol. Präparat II (200 mg), total aufgelöst nach 9 Extraktionen mit je 50 ml 96-proz. Äthanol. Siehe Text

Präparat I entstammte einem nadeligen L-Tyrosin (0,75 g), welches in 15 ml Wasser mit $2 \mu\text{C}$ gelöstem $[^{14}\text{C}]$ -L-Tyrosin 48 Std. bei 20° gerührt worden war. Am Schluss befanden sich 80% der Radioaktivität im Festkörper. Präparat II entstammte einem nadeligen L-Tyrosin, welches in einem gleichen Versuch 350 Std. gerührt worden war und 92% der Radioaktivität aufgenommen hatte. In beiden Präparaten waren die radioaktiven Molekeln derart angeordnet, dass sie in allen

Fractionen enthalten waren. Präparat I entliess die Hauptmenge der Radioaktivität (79%) und 37% seiner Masse in die drei ersten Fraktionen. Eine gleiche, hier nicht dargestellte Verteilung wurde übrigens von einem zerriebenen L-Tyrosin (0,75 g) gewonnen, das in einem zylindrischen Gefäss in 15 ml Wasser mit 2 μC gelöstem [^{14}C]-L-Tyrosin 77 Std. bei 20° mit 12 Umdrehungen/Minute gerollt worden war und dabei 89% der Radioaktivität aufgenommen hatte. L-Tyrosin II entliess 42% seiner Masse, aber nur 54% der Radioaktivität in die drei ersten Fraktionen. Die Radioaktivitätsverteilung in den Fraktionen erscheint im Vergleich zu der mit Präparat I erhaltenen abgeflacht.

Die entsprechenden Ergebnisse sind für zwei L-Leucinbodenkörper in Fig. 4 dargestellt.

L-Leucin I entstammte einem Bodenkörper (1,0 g), der in 20 ml 96-proz. Äthanol mit 2 μC gelöstem [^{14}C]-L-Leucin 40 Std. bei 20° gerührt worden war. Am Schluss befanden sich wie schon nach 16-stündiger Rührdauer 94% der Radioaktivität im Festkörper. Das Präparat entliess 88% seiner Radioaktivität und 28% seiner Masse in die ersten drei Fraktionen. Die restliche Radioaktivität befand sich in den übrigen Fraktionen mit Ausnahme der beiden letzten (9 und 10), welche praktisch inaktiv waren. Eine ähnliche, hier nicht aufgeführte Verteilung lieferte ein zerriebenes L-Leucin (1,0 g), das in 20 ml 96-proz. Äthanol mit 3 μC gelöstem [^{14}C]-L-Leucin bei 20° 7 Std. bis zur Aufnahme von 91% der Radioaktivität gerührt worden war. L-Leucin II stammte von einem L-Leucinpräparat (1,0 g), welches in 20 ml 96-proz. Äthanol mit 2 μC gelöstem [^{14}C]-L-Leucin ungefähr 350 Std. bei 20° gerührt worden war. Präparat II lieferte 31% seiner Masse, aber nur 55% seiner Radioaktivität in die ersten drei Fraktionen. Die Radioaktivitätsverteilung in den Fraktionen erscheint gegenüber der von Präparat I gelieferten stark verflacht.

Die Extrakte der zerriebenen bzw. nicht zerriebenen nadeligen Tyrosinbodenkörper und der zerriebenen bzw. nicht zerriebenen Leucinbodenkörper, welche für einige Stunden oder wenige Tage in Kristallsuspensionsexperimenten eingesetzt waren, zeigten eine ähnliche Radioaktivitätsverteilung. Auch die Verflachung der Verteilung, welche in Bodenkörpern nach vieltägiger Rührdauer gefunden wurde, ist dem Tyrosin und Leucin gemeinsam. Die Tatsache, dass ein Drittel der Kristallphase aufgelöst werden muss, damit der Grossteil der aufgenommenen Radioaktivität extrahiert ist, zusammen mit dem Befund, dass auch die meisten späteren Fraktionen Radioaktivität enthielten, deutet auf ein allgemeines und tiefes Eindringen der markierten Molekeln in die Kristallphase. Die Verflachung der Radioaktivitätsverteilung in den Extrakten der vieltägig gerührten Bodenkörper legt ihrerseits Zeugnis ab, über das fortgesetzte Eindringen der markierten Molekeln in die Kristallkörper. Sie scheint in erster Linie aber ein direkter Hinweis auf fortgesetzte Umkristallisationsvorgänge im Festkörper unter den Bedingungen der Kristallsuspensionsexperimente, welche gemäss röntgenographischem Befund (vgl. Abschnitt 4.5) zu keinen Kristallstrukturumwandlungen Anlass geben. Ob hierbei auch Diffusionsvorgänge im Festkörper von Bedeutung sind, ist eine offene Frage.

4.4. *Mikroskopische Untersuchungen.* Im Lichtmikroskop beobachtete man an Leucin- und an Tyrosinkristallen auffällige Veränderungen nach dem Einsatz in Verteilungsversuchen (s. Fig. 5–8). Die L-Tyrosinnadeln zerfallen in relativ kurze Stücke, an welche kleinste Bruchstücke angelagert sind, und die L-Leucinkristalle weisen nach dem Gebrauch mehrheitlich abgerundete Begrenzungen und ebenfalls angelagerte kleinste Bruchstücke auf. Eine Zerteilung von L-Tyrosinnadeln wurde nicht nur nach starkem Rühren sondern auch nach langsamem Rollen (12 Umdrehungen/Minute) von Kristallsuspensionen in zylindrischen Gefässen beobachtet. Unter diesen Bedingungen verteilt sich gelöstes [^{14}C]-L-Tyrosin immer noch langsam zwischen die beiden Phasen der Kristallsuspension (vgl. Fig. 2, Kurve A).

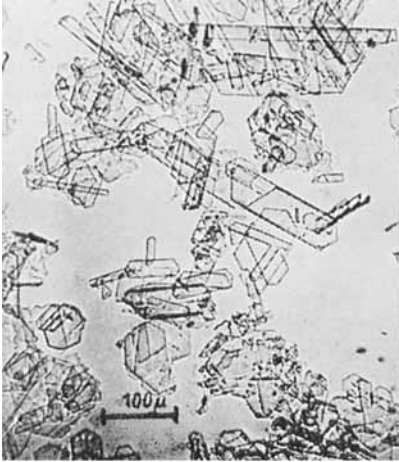


Fig. 5. L-Leucinpräparat vor Gebrauch zu Verteilungsversuchen (150 \times)

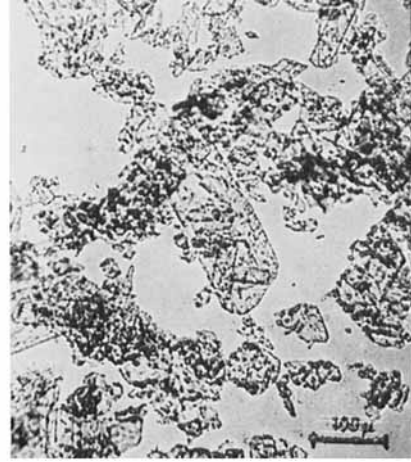


Fig. 6. L-Leucinpräparat nach zweitägigem Rühren in Kristallsuspension (1 g in 20 ml 96-proz. Äthanol) bei 20°. Rührgeschwindigkeit: 500 Umdrehungen/Minute; 150 \times

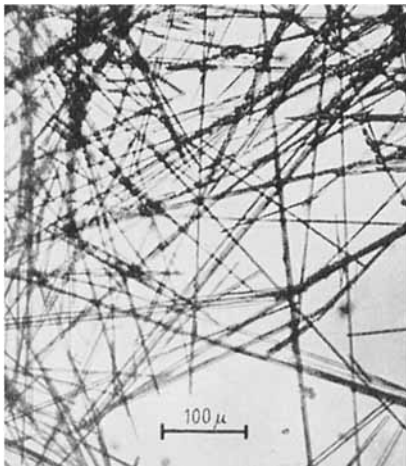


Fig. 7. L-Tyrosinpräparat vor Gebrauch zu Verteilungsversuchen (160 \times)

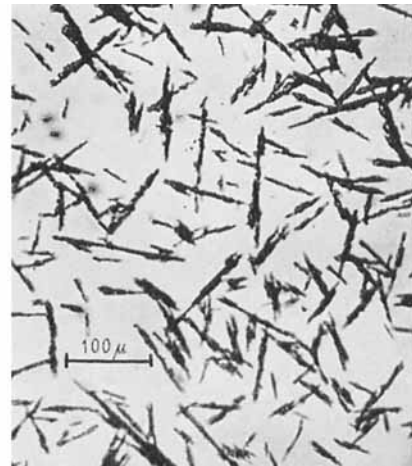


Fig. 8. L-Tyrosinpräparat nach viertägigem Rühren in Kristallsuspension (1 g in 20 ml Wasser) bei 20°. Rührgeschwindigkeit: \sim 500 Umdrehungen/Minute; 160 \times

4.5. Röntgenographische Untersuchungen wurden an L-Leucin- und L-Tyrosin-kristallen vor und nach den Verteilungsexperimenten durch Pulveraufnahmen auf einer vierfach-GUINIER-Kamera (Fa. NONIUS, Delft) mittels Cu K_{α} -Strahlung gemacht. Unbehandelte L-Leucinkristalle (zerriebene und nicht zerriebene) und unzerriebenes L-Leucin, welches in Suspension (1,0 g in 20 ml 96-proz. Äthanol mit 2 μ C [14 C]-L-Leucin) 40 Std. bei 20° mit 500 Umdrehungen/Minute gerührt worden war, zeigten keinen Unterschied in der Struktur. Ebenfalls identisch waren die Strukturen

von L-Tyrosinnadeln (zerrieben und unzerrieben) und von unzerriebenem L-Tyrosin, welches in Suspension (0,75 g in 15 ml Wasser mit $2 \mu\text{C}$ ^{14}C -L-Tyrosin) ungefähr 350 Std. bei 20° mit 500 Umdrehungen/Minute gerührt worden war. Die Verteilung der Radioaktivität war in beiden Versuchen erwartungsgemäss. Die beobachteten Verteilungen kommen demnach ohne Phasenumwandlung des Bodenkörpers zustande.

4.6. Zur kristallsuspensionsanalytischen Spezifität des Leucins. ^{14}C -L-Leucin bzw. ^{14}C -L-Isoleucin wurden in identischen Kristallsuspensionen von L-Leucin verteilt. Es zeigte sich, dass auch ^{14}C -L-Isoleucin von den L-Leucinkristallen aufgenommen wird, wenn auch beträchtlich weniger rasch, als ^{14}C -L-Leucin. Fig. 9 zeigt die Ab-

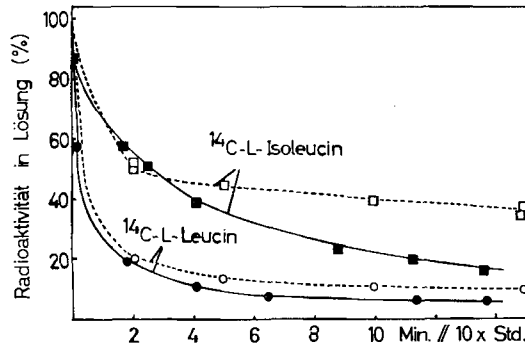


Fig. 9. Verteilung von ^{14}C -L-Leucin und ^{14}C -L-Isoleucin in L-Leucinkristallsuspensionen bei 20° . Die Suspensionen von je 1,0 g L-Leucinkristallen in 20 ml 96-proz. Äthanol enthielten $1,1 \cdot 10^5$ cpm/ml (= 100%) an gelöstem ^{14}C -L-Leucin oder $1,3 \cdot 10^5$ cpm/ml (= 100%) an gelöstem ^{14}C -L-Isoleucin vor Beginn jeder Verteilung. Rührgeschwindigkeit: 400 Umdrehungen/Minute. $\square-\square$ ^{14}C -L-Isoleucin und $\circ-\circ$ ^{14}C -L-Leucin in Suspensionen aus zerriebenem Leucin, Zeitskala in Minuten. $\blacksquare-\blacksquare$ ^{14}C -L-Isoleucin und $\bullet-\bullet$ ^{14}C -L-Leucin in Suspensionen aus nicht zerriebenem Leucin, Zeitskala in $10 \times$ Std.

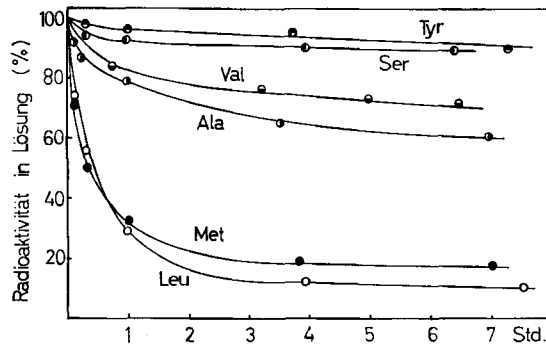


Fig. 10. Verteilung verschiedener ^{14}C -L-Aminosäuren in L-Leucinkristallsuspensionen bei 20° . Die Suspensionen enthielten 15 ml 96-proz. Äthanol und 750 mg zerriebenes L-Leucin, welches während 15 Min. vorgeführt wurde. Rührgeschwindigkeit: ~ 500 Umdrehungen/Minute. Die gelöste Radioaktivität zu Beginn jedes Verteilungsexperimentes (= 100%) ist für jede Kurve angegeben: $\circ-\circ$ ^{14}C -L-Leucin, $6 \cdot 10^5$ cpm/ml; $\bullet-\bullet$ ^{14}C -L-Methionin, $1 \cdot 10^5$ cpm/ml; $\circ-\circ$ ^{14}C -L-Alanin, $1 \cdot 10^5$ cpm/ml; $\bullet-\bullet$ ^{14}C -L-Valin, $2,5 \cdot 10^5$ cpm/ml; $\bullet-\bullet$ ^{14}C -L-Serin, $1,5 \cdot 10^5$ cpm/ml; $\bullet-\bullet$ ^{14}C -L-Tyrosin, $2 \cdot 10^5$ cpm/ml

nahme der gelösten Radioaktivität in Suspensionen aus zerriebenem L-Leucin sowie ein entsprechendes Kurvenpaar, das in Suspensionen aus nicht zerriebenem L-Leucin erhalten wurde. Suspensionen von DL-Leucin nahmen $[^{14}\text{C}]$ -L-Isoleucin ebenfalls langsamer als $[^{14}\text{C}]$ -L-Leucin auf. In L-Isoleucinsuspensionen andererseits war kein sicherer Unterschied in der Aufnahme von $[^{14}\text{C}]$ -L-Isoleucin und $[^{14}\text{C}]$ -L-Leucin festzustellen. Wie Fig. 10 zeigt, nehmen L-Leucinkristalle auch noch folgende weitere Aminosäuren auf: $[^{14}\text{C}]$ -L-Serin, $[^{14}\text{C}]$ -L-Methionin, $[^{14}\text{C}]$ -L-Valin und $[^{14}\text{C}]$ -L-Tyrosin. $[^{14}\text{C}]$ -L-Methionin wird auffallend rasch eingebaut. Dagegen werden $[^{14}\text{C}]$ -L-Tyrosin und $[^{14}\text{C}]$ -L-Serin nur sehr langsam aufgenommen. Die übrigen Aufnahmegeschwindigkeiten sind ähnlich wie diejenigen des hier nicht besonders aufgeführten $[^{14}\text{C}]$ -L-Isoleucins.

5. Untersuchungen an weiteren Aminosäuren

Die Stereospezifität des Verteilungsvorganges, die in Leucin- und Tyrosinsuspensionen gefunden wurde, konnte mit der gleichen Technik ebenfalls in Suspensionen optisch aktiver Kristalle von Isoleucin, Valin, Asparaginsäure, Glutaminsäure und Methionin beobachtet werden. Während in den L-Kristallsuspensionen die gelöste Radioaktivität der markierten L-Aminosäure auf einen kleinen, praktisch konstanten Rest sank, blieb sie in den D-Kristallsuspensionen in der Lösungsphase. Die Rührversuche mit jeder markierten Aminosäure wurden nacheinander unter gleichen Bedingungen, mit dem gleichen Rührmagnet und dem gleichen Rührgefäß durchgeführt (s. Fig. 11–15).

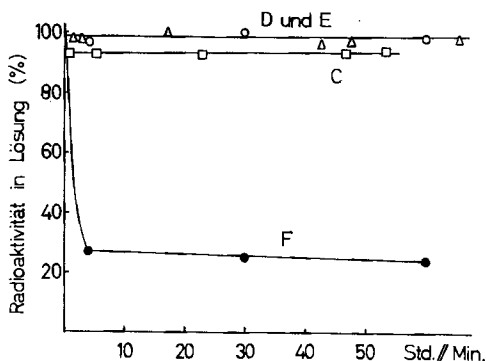


Fig. 11. Verteilung von $[^{14}\text{C}]$ -L-Isoleucin in L- und D-Isoleucinkristallsuspensionen bei 20°. Die Suspensionen von je 750 mg Kristallen in 15 ml 96-proz. Äthanol enthielten $1,5 \cdot 10^5$ cpm/ml (= 100%) an gelöster Radioaktivität vor Beginn jeder Verteilung. □—□ (C) D-Isoleucin, zerrieben (Zeitskala in Std.); Δ—Δ (E) D-Isoleucin, nicht zerrieben (Zeitskala in Std.); ○—○ (D) D-Isoleucin, zerrieben und 15 Min. im Lösungsmittel vorgerührt (Zeitskala in Min.). ●—● (F): Nach Abschluss von Versuch D wurden 3 ml der Lösungsphase mit einer 15 Min. vorgeführten Suspension von 200 mg zerriebenem L-Leucin in 2 ml Äthanol versetzt und 60 Min. gerührt

Eine Beobachtung allgemeiner Natur betrifft den partiellen Verlust der kristallsuspensionsanalytischen Spezifität, der beim Zerreiben der Kristallpräparate auftritt. Es zeigte sich, dass bei Verwendung von zerriebenen D-Präparaten zu Beginn ein rascher, begrenzter Aktivitätsabfall in der Lösung der markierten L-Aminosäure eintritt. Dieser Abfall betrug etwa 7% im Falle des Isoleucins und erreichte 15% bei Asparaginsäure und Methionin. Eine nachträgliche Überprüfung bei Tyrosin ergab

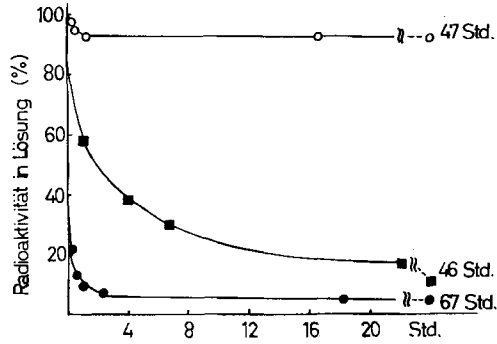


Fig. 12. Verteilung von $[^{14}\text{C}]$ -L-Valin in L- und D-Valinkristallsuspensionen bei 20° . Die Suspensionen von je 1,0 g Kristallen in 15 ml 96-proz. Äthanol enthielten $2 \cdot 10^5$ cpm/ml (= 100%) an gelöster Radioaktivität vor Beginn jeder Verteilung. ●—● L-Valin, zerrieben und während 15 Min. vorgerrührt; ■—■ L-Valin, nicht zerrieben; □—□ D-Valin, zerrieben, 15 Min. vorgerrührt

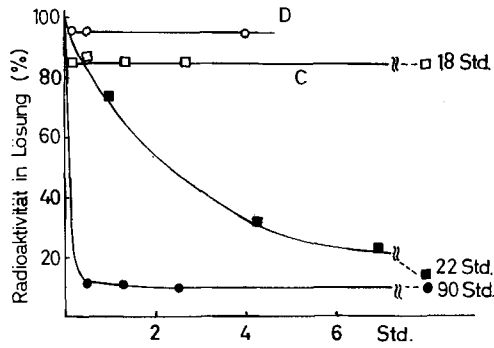


Fig. 13. Verteilung von $[^{14}\text{C}]$ -L-Asparaginsäure in L- und D-Asparaginsäurekristallsuspensionen bei 20° . Die Suspensionen von je 750 mg Kristallen in 15 ml 50-proz. Äthanol enthielten $\sim 1,3 \cdot 10^5$ cpm/ml (= 100%) an gelöster Radioaktivität vor Beginn jeder Verteilung. ●—● L-Asparaginsäure, zerrieben; ■—■ L-Asparaginsäure, nicht zerrieben; □—□ (C) D-Asparaginsäure, zerrieben; ○—○ (D) D-Asparaginsäure, zerrieben, 15 Min. vorgerrührt

einen unspezifischen Abfall in der Grössenordnung von 5%. Eine Reduktion des Effektes lässt sich erreichen durch eine Vorbehandlung der zerriebenen Kristalle in der Weise, dass die Kristallpräparate vor Beginn des Verteilungsexperimentes kurz (z. B. 15 Min.) mit dem Lösungsmittel gerührt werden. Beispiele für die Wirkung dieser Behandlung finden sich bei den Isoleucin-, Asparaginsäure- und Methioninversuchen (Kurven C und D der Figuren 11, 13 und 15). Kein messbarer Aktivitätsabfall ist dagegen zu erwarten, wenn unzerriebene Kristalle verwendet werden, wie sich zum Beispiel aus den Versuchen mit D-Isoleucinsuspensionen (Kurve E, Fig. 11) schliessen lässt.

Alanin und Serin ergaben ein abweichendes Bild, indem bei 20° ebenso wie bei 0° die markierten L-Aminosäuremolekeln aus der Lösungsphase der Kristallsuspensionen sowohl in die L- als auch in die D-Aminosäurekristalle überführt wurden. Die markier-

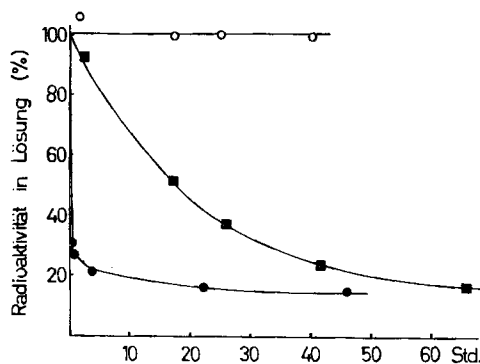


Fig. 14. Verteilung von $[^{14}\text{C}]$ -L-Glutaminsäure in L- und D-Glutaminsäurekristallsuspensionen bei 20° . Die Suspensionen von je 750 mg Kristallen in 15 ml 50-proz. Äthanol enthielten $\sim 8 \cdot 10^4$ cpm/ml (= 100%) an gelöster Radioaktivität vor Beginn jeder Verteilung. ■—■ L-Glutaminsäure, nicht zerrieben; ●—● L-Glutaminsäure, zerrieben; ○—○ D-Glutaminsäure, zerrieben, 15 Min. vorgerührt

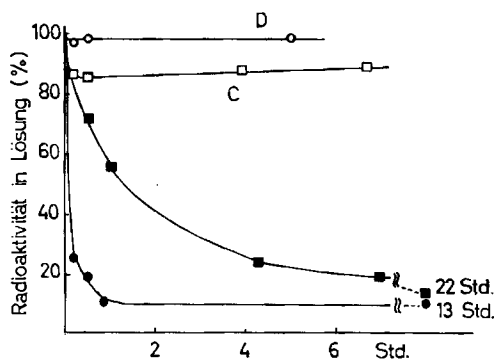


Fig. 15. Verteilung von $[^{14}\text{C}]$ -L-Methionin in L- und D-Methioninkristallsuspensionen bei 20° . Die Suspensionen von je 1,0 g Kristallen in 15 ml 96-proz. Äthanol enthielten $\sim 1,2 \cdot 10^5$ cpm/ml (= 100%) an gelöster Radioaktivität vor Beginn jeder Verteilung. ●—● L-Methionin, zerrieben; ■—■ L-Methionin, nicht zerrieben; □—□ (C) D-Methionin, zerrieben; ●—● (D) 10 ml 96-proz. Äthanol, 750 mg D-Methionin zerrieben, 15 Min. vorgerührt

ten Molekeln wurden rascher in die Kristalle mit der gleichen optischen Konfiguration eingebaut, als in die Kristalle der Antipoden (s. Fig. 16 und 17). Der Unterschied der Übergangsgeschwindigkeiten ist bei Alanin beträchtlich, bei Serin dagegen recht gering.

6. Diskussion

Die kristallsuspensionsanalytische Verteilung von markierten Molekeln zwischen Lösung und Kristallphase ist nur verständlich, wenn man einen intensiven Stofftransport zwischen Lösung und Festkörper annimmt. Da die Lösung an Material der Kristallphase gesättigt ist, muss dieser Transport ausgeglichen sein, d.h. in jedem Zeitintervall müssen ebenso viele Molekeln aus der Lösung in die Kristallphase eingebaut werden wie aus der Kristallphase in die Lösung übertreten.

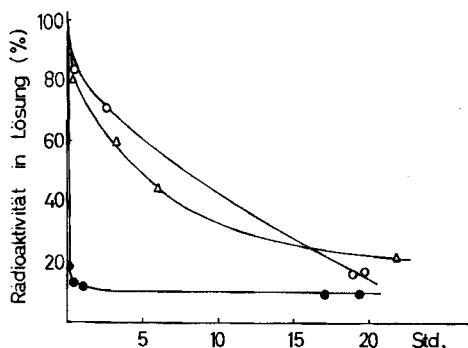


Fig. 16. Verteilung von $[^{14}\text{C}]$ -L-Alanin in L- und D-Alaninkristallsuspensionen
Die Suspensionen von je 1,0 g zerriebenen Kristallen, welche 15 Min. vorgerührt wurden, in 15 ml 96-proz. Äthanol enthielten $9 \cdot 10^4$ cpm/ml (= 100%) an gelöster Radioaktivität vor Beginn jeder Verteilung. ●—● L-Alanin, 20°; ○—○ D-Alanin, 20°; △—△ D-Alanin, 0°

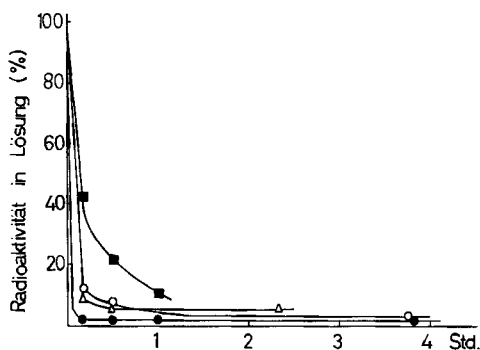


Fig. 17. Verteilung von $[^{14}\text{C}]$ -L-Serin in L- und D-Serinkristallsuspensionen
Die Suspensionen von je 750 mg Kristallen in 15 ml 96-proz. Äthanol enthielten $1 \cdot 10^5$ cpm/ml (= 100%) an gelöster Radioaktivität vor Beginn jeder Verteilung. ●—● L-Serin, zerrieben, 20°; ■—■ L-Serin, nicht zerrieben, 20°; ○—○ D-Serin, zerrieben, 20°; △—△ D-Serin, zerrieben, 0°

An einem Stoffaustausch zwischen Festkörper und Lösung können verschiedenartige Vorgänge beteiligt sein (s. z.B. die Zusammenstellung bei BUSER [4]). Hierzu gehören Oberflächenaustausch, Austausch im Gitter, Austausch an Aktivstellen, Kristallphasenumwandlung und Umkristallisation ohne Umwandlung. In den Kristallsuspensionen, welche mit unzerriebenen Kristallen hergestellt wurden, sind die beobachteten Verteilungen zunächst nicht ohne weiteres verständlich. Dass ein Stoffaustausch zwischen Lösung und Festkörper dank einer Kristallphasenumwandlung von einer polymorphen Form in eine andere zustande käme, wird bei den L-Leucin- und L-Tyrosinsystemen durch die röntgenographischen Resultate ausgeschlossen. Auch ein Oberflächenaustausch könnte bei den unzerriebenen Kristallen kein genügendes Ausmass annehmen, da deren spezifische Oberfläche hierfür viel zu klein ist. Wenn auf der anderen Seite in Suspensionen von zerriebenen Kristallen, die somit eine grosse Zahl von Kristallbruchstücken enthalten, die Verteilungen relativ rasch vor sich gehen, so müssen diese Bruchstücke für den intensiven Stoffaustausch

zwischen Lösung und Festkörper verantwortlich sein. Die Tatsache, dass in Kristallsuspensionen von zerriebenem Tyrosin oder Leucin die Radioaktivitätsaufnahme der festen Phase in einer Zeitspanne praktisch beendet ist, in welcher noch kein nennenswerter Übergang von Radioaktivität in die unzerriebenen Kristalle von vergleichbaren Systemen stattgefunden hat, erlaubt den Schluss, dass bei einer erfolgreichen Tracerverteilung keine weiteren Prozesse, als die mit Kristallbruchstücken gekoppelten, mitzuwirken brauchen. Da in Suspensionen aus unzerriebenen Kristallen bei dem benutzten Rühr- oder Rollverfahren eine grosse Zahl von kleinen und kleinsten Bruchstücken entsteht, ist anzunehmen, dass dieser Vorgang beim Zustandekommen der Kristallsuspensionsanalytischen Verteilung in derartigen Suspensionen von entscheidender Bedeutung ist.

Zu den Austauschprozessen, welche an das Vorhandensein von Bruchstücken in den Kristallsuspensionen gebunden sind, zählen Umkristallisationen ohne Strukturumwandlung, d. h. Auflöse- und Abscheidungsvorgänge, die auf Grund verschiedener Löslichkeit verschieden grosser Partikel zustande kommen, ferner das «Ausheilen» der Unregelmässigkeiten und der durch mechanische Einwirkung verletzten Oberfläche der einzelnen Kristallbruchstücke, welches wiederum mit Auflösung und Abscheidung verbunden ist, und weiter der Oberflächenaustausch.

Um den Beitrag des Oberflächenaustausches am Gesamtaustausch abschätzen zu können, haben wir die spezifische Oberfläche eines zerriebenen L-Leucins und eines zerriebenen L-Tyrosins bestimmt⁴⁾. Beim Leucin betrug sie 4,5 m²/g, beim Tyrosin 5,9 m²/g. Berechnet man den Flächenbedarf pro Molekel (O_m) aus Molekulargewicht (M), Kristalldichte (d) und AVOGADRO'scher Zahl (Z) gemäss $O_m = (M/dZ)^{2/3}$, so erhält man für Leucin $3,2 \cdot 10^{-15}$ cm² und für Tyrosin $3,5 \cdot 10^{-15}$ cm². Durch Division der Kristalloberfläche pro Gramm durch den Flächenbedarf pro Molekel erhält man die Anzahl Molekeln, die die äusserste Molekelschicht der Oberfläche von 1 g Kristallpulver besetzen. Beim Leucinpräparat sind dies $1,4 \cdot 10^{19}$ Molekeln, also 3 mg Substanz, beim Tyrosinpräparat $1,7 \cdot 10^{19}$ Molekeln, somit 5 mg Substanz. Nimmt man an, dass bei einer Kristallsuspensionsanalytischen Verteilung allein die äusserste Molekelschicht der Kristalloberfläche sich mit der Lösung ins Austauschgleichgewicht setzt, so wäre der Ausnutzungsgrad des Leucinpräparates 0,3%, derjenige des Tyrosinpräparates 0,5%. Da der Oberflächenaustausch nur einige wenige Molekelschichten erfassen kann, sind die maximalen Ausnutzungsgrade, die sich aus dem blossen Oberflächenaustausch ergeben, höchstens kleine Vielfache dieser Werte. Nun sind die experimentell beobachteten Ausnutzungsgrade bei Tyrosin etwa 10mal, bei Leucin etwa 100mal grösser. Demnach ist der Oberflächenaustausch bei Tyrosinbruchstücken wohl von Bedeutung, bei Leucinbruchstücken trägt er dagegen nur unwesentlich zum Gesamtaustausch bei. Die Auflöse- und Abscheidungsvorgänge, so weit sie durch «Ausheilen» unregelmässiger Oberflächen oder durch die Löslichkeitsunterschiede bei verschieden grossen Teilchen bedingt sind, scheinen also beim Leucin – weniger beim Tyrosin – eine wichtige Rolle zu spielen.

⁴⁾ Die Grösse der Oberfläche wurde am Institut für anorganische, analytische und physikalische Chemie der Universität Bern nach der BRUNAUER-EMMETT-TELLER-Methode durch Adsorption von N₂ bestimmt. Herrn Prof. W. FEITKNECHT danke ich für die Anregung zu dieser ergänzenden Untersuchung.

Die Verteilungsversuche mit verschiedenen Aminosäuren haben gezeigt, dass der Verteilungsvorgang in Kristallsuspensionen bei einer ganzen Reihe von Aminosäuren vollständig stereospezifisch ist. Diese vollständige kristallsuspensionsanalytische Spezifität lässt sich analytisch zu quantitativen Bestimmungen ausnutzen. Zur Charakterisierung der optischen Aktivität eines Leucintracers beispielsweise genügt es den Tracer einmal in L- und einmal in D-Leucinkristallsuspension zu rühren und die erhaltenen Radioaktivitätsabnahmen der Lösungen miteinander zu vergleichen, um eine mässige bis starke Racemisierung feststellen zu können. Zur Erfassung kleiner Mengen des einen optischen Isomeres des Tracers, beispielsweise der D-Form in einem L-Präparat, würde man zuerst das L-Isomere durch Rühren mit mehrfach erneuerter nicht markierter L-Kristallphase völlig entfernen und dann das in Lösung übrigbleibende radioaktive Material in D-Kristallsuspension mit nötigenfalls mehrfach erneuerter Kristallphase auf seinen Gehalt an radioaktiver D-Form prüfen. Die wichtigsten Begrenzungen zur genauen Erfassung kleinster Mengen der D-Form würden bei diesem Verfahren gegeben sein durch die Genauigkeit der Radioaktivitätsmessung und durch radioaktive Verunreinigungen des Tracerpräparates, welche von der L-Phase unvollständig weggenommen und zusammen mit dem D-Isomeren in die D-Kristallphase aufgenommen werden könnten.

Der vollständigen kristallsuspensionsanalytischen Spezifität steht gegenüber eine unspezifische, durch die relative Geschwindigkeit des Vorganges charakterisierbare Aufnahme markierter L-Molekeln in die entsprechenden D-Kristalle bei Alanin und Serin und einer Anzahl markierter L-Aminosäuremolekeln in die Kristalle von L-Leucin. Der Einbau der verschiedenen markierten L-Aminosäuren in die kristalline Phase von L-Leucinsuspensionen zeigt, dass zum Teil beträchtliche Unterschiede in den Aufnahmegeschwindigkeiten erwartet werden können. Das Experiment weist daher auch hin auf eine Beziehung zwischen der Struktur von ähnlichen markierten Molekeln in Lösung und der Geschwindigkeit des Übergangs dieser Molekeln in eine geeignete Kristallphase.

Die Prüfung der Identität oder Nichtidentität zweier markierter Verbindungen mittels Kristallsuspensionsanalyse wird sich unabhängig von der Art der kristallsuspensionsanalytischen Spezifität mit geeigneten Kristallphasen durchführen lassen. Nichtidentität zweier Tracersubstanzen ergibt sich sofort aus der verschiedenen Einbaugeschwindigkeit der Tracer in eine geeignete Kristallphase. Zum Nachweis der Identität zweier markierter Verbindungen wird man in mehreren Kristallsuspensionen das gleiche Verteilungsverhalten und die gleiche Einbaugeschwindigkeit in die kristalline Phase feststellen müssen. Hierbei wird man Kristallphasen verwenden, die – abgesehen vom Isotopengehalt – aus dem gleichen Material bestehen wie die Tracer, ferner Kristalle, welche aus den Tracern strukturell nahestehenden Molekeln aufgebaut sind, und von denen einige Sorten die markierten Molekeln aufnehmen können, andere dagegen nicht.

Wie weit sich Kristalle höhermolekularer Stoffe in bezug auf kristallsuspensionsanalytische Spezifität und Einbaugeschwindigkeit mit den hier untersuchten Systemen vergleichen lassen, bleibt zu prüfen. Es ist daher eine offene Frage, ob sich das kristallsuspensionsanalytische Verfahren beispielsweise bei Identitäts- oder Nichtidentitätsprüfungen radioaktiv gemachter Proteine bewähren kann.

Ausgeführt mit Mitteln des SCHWEIZ. NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG (KAW-Projekt Nr. 142). Ich danke Herrn Prof. Dr. H. AEBI für die Unterstützung dieser Arbeit. Die röntgenographischen Untersuchungen und die mikrophotographischen Aufnahmen verdanke ich dem Institut für anorganische, analytische und physikalische Chemie der Universität Bern; Herrn Dr. H. R. OSWALD danke ich für die hierbei geleistete Mitarbeit. Fräulein U. MOSER danke ich für gewissenhafte Mithilfe bei den Versuchen.

SUMMARY

The partition between solution and solid phase of several ^{14}C -labeled amino acids initially present in tracer amounts in the solution phase of stirred suspensions of crystalline amino acids was studied. The partitions examined were stereospecific since the labeled L-amino acid molecules were readily taken up from the solution phase by the corresponding L-crystals whereas the isomeric D-crystals incorporated the labeled L-molecules at a reduced rate (as exemplified by alanine and serine) or did not incorporate labeled L-molecules at all. If a sufficiently large excess of crystalline phase as compared to the amount of solute is employed and if incorporation takes place the radioactivity in solution decreases to a small and practically constant fraction of its initial value. The incorporation of various labeled L-amino acids into a crystalline L-leucine phase was also studied. The rate of uptake was characteristic for each amino acid. The partition experiments can be performed easily and may be used for analytical and preparative purposes. From studies of leucine and tyrosine systems it is concluded that the partitions observed depend on dissolution and crystallisation processes coupled with crystal fragments which are present or formed during the stirring in the crystal suspension.

Medizinisch-chemisches Institut
der Universität Bern

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] C. H. SCHNEIDER, *Biochim. biophys. Acta* **65**, 521 (1962).
 - [2] M. S. DUNN & L. B. ROCKLAND, *Advances in Protein Chemistry* **3**, 295 (1947).
 - [3] F. KALBERER & J. RUTSCHMANN, *Helv.* **44**, 1956 (1961).
 - [4] W. BUSER, *Helv.* **37**, 2334 (1954).
-