



Deuterium als hulpmiddel bij de bepaling van glutaminezuur in de hydrolysaten van tumorproteïnen

<https://hdl.handle.net/1874/363588>

A. qu. 192, 1943

DEUTERIUM ALS HULPMIDDEL BIJ DE
BEPALING VAN GLUTAMINEZUUR
IN DE HYDROLYSATEN VAN
TUMORPROTEINEN



G. J. VAN VEERSEN

s.
echt

3

DEUTERIUM ALS HULPMIDDEL BIJ DE BEPALING VAN
GLUTAMINEZUUR IN DE HYDROLYSATEN VAN
TUMORPROTEINEN

Diss. Utrecht 1943

DEUTERIUM ALS HULPMIDDEL BIJ DE
BEPALING VAN GLUTAMINEZUUR
IN DE HYDROLYSATEN VAN
TUMORPROTEINEN

PROEFSCHRIFT

TER VERKRIJGING VAN DE GRAAD VAN
DOCTOR IN DE WIS- EN NATUURKUNDE
AAN DE RIJKS-UNIVERSITEIT TE UTRECHT,
OP GEZAG VAN DEN RECTOR MAGNIFICUS
L. VAN VUUREN, HOOGLEERAAR IN DE
FACULTEIT DER LETTEREN EN WIJSBE-
GEËRTE, VOLGENS BESLUIT VAN DE SE-
NAAT DER UNIVERSITEIT TEGEN DE
BEDENKINGEN VAN DE FACULTEIT DER
WIS- EN NATUURKUNDE TE VERDEDIGEN
OP MAANDAG 15 FEBRUARI 1943, DES
NAMIDDAGS TE 4 UUR

DOOR

GERARD JOHANNES VAN VEERSEN
GEBOREN TE OLDENZAAL

KEMINK EN ZOON N.V. — OVER DEN DOM — UTRECHT



AAN MIJN OUDERS

Het beëindigen van mijn studie aan de Utrechtsche Universiteit biedt mij een welkome gelegenheid, U, Hoogleraren, Oud-Hoogleraren en Lectoren in de Faculteit der Wis- en Natuurkunde, hartelijk dank te zeggen voor hetgeen Gij tot mijn wetenschappelijke vorming hebt bijgedragen.

In het bijzonder dank ik U, Hooggeleerde K ö g l, Hooggeachte Promotor, voor de voortdurende en intense belangstelling, welke ik van U bij mijn werk mocht ondervinden. Daarnaast weet ik het vertrouwen, dat U in mij stelde, te waardeeren. Ongetwijfeld heb ik het aan Uw energie en doorzettingsvermogen te danken, dat ik de moeilijkheden, welke zich bij mijn werkzaamheden voordeden, heb kunnen overwinnen. De tijd, gedurende welke ik als assistent aan Uw Laboratorium werkzaam mocht zijn, is, vooral door het persoonlijk contact met U, van zeer veel waarde voor mij geweest.

Zeergeleerde S t r e n g e r s, de jaren, waarin ik het voorrecht genoot, U bij Uw colleges te mogen assisteeren, zullen mij steeds een aangename herinnering blijven.

Zeergeleerde E r x l e b e n, voor de daadwerkelijke steun, welke ik van U mocht ontvangen bij de uitvoering van de in dit proefschrift beschreven experimenten, ben ik U zeer dankbaar.

Gaarne betuig ik ook jou, waarde K l e i n, mijn hartelijke dank voor je hulp alsmede de prettige samenwerking, welke ik met jou mocht hebben.

Tenslotte een woord van waardeering aan het personeel van het Organisch-Chemisch Laboratorium; het zijn vooral de heeren T i e l a n d en R u y g r o k, die mij bij de opbouw van de apparatuur met groote bereidwilligheid behulpzaam zijn geweest.

HOOFDSTUK I.

INLEIDING.

Wanneer de ontwikkeling van de verschillende gebieden der natuurwetenschappen in het laatste decennium wordt nagegaan, dan blijkt, dat er veelvuldig een opschuiving van problemen plaats vindt van minder exacte naar meer exacte vakken. Zoo zien wij, dat vraagstukken, voor welke de chemie tevergeefs heeft getracht een oplossing te vinden, heden ten dage met meer succes door de physica worden bewerkt. Aan de andere kant treffen wij een analoog verschijnsel aan bij vele biologische en medische problemen en wel moet hier veelal de chemie met haar methoden te hulp komen. Wie het ernstig om de vooruitgang der wetenschap te doen is, zal deze gang van zaken niet als een tekortkoming van zijn eigen vak beschouwen. Het gebruik maken der methodiek van zusterwetenschappen lijkt zelfs een gunstige compensatie tegenover de meestal onvermijdelijke specialisering, welke heden ten dage vrijwel ieder onderzoek met zich brengt.

Een indrukwekkend voorbeeld voor een dergelijke „synthese” vormt de toepassing van isotopen in de biochemische wetenschap. Aangezien ook in het onderwerp van deze dissertatie een isotoop een belangrijke rol speelt, moge in het kort iets over de geschiedenis van de isotopen worden vermeld.

Zooals bekend, verstaan we onder isotopen elementen, die niet-tegenstaande verschillend atoomgewicht, op dezelfde plaats van het periodieke systeem thuis behooren. Uit de theorie van Bohr is in combinatie met de experimenten van Moseley gebleken, dat het chemisch gedrag van een element door zijn kernlading, respectievelijk atoomnummer wordt bepaald, zoodat wij isotopen ook kunnen definiëeren als elementen met hetzelfde atoomnummer, maar met verschillend atoomgewicht. Men onderscheidt ze in stabiele en instabiele (radioactieve) elementen. De laatsten verdeelen we weer in kunstmatige en natuurlijke isotopen.

Alhoewel de benaming isotoop eerst omstreeks 1914 door

Soddy werd ingevoerd, begint de geschiedenis der isotopen reeds in de laatste jaren van de vorige eeuw, toen door Becquerel¹⁾, Curie en Schmidt de radioactieve elementen werden ontdekt. Immers de leden der radioactieve reeksen bleken natuurlijke instabiele isotopen te zijn van de zware elementen thallium, lood, bismuth en thorium. Het duurde geruime tijd, voordat men de isotopen van de lichtere elementen leerde kennen. Eerst in 1932 en navolgende jaren kreeg men de beschikking over de stabiele isotopen van waterstof, koolstof, stikstof, zwavel en zuurstof. Gelijkijdig daarmee verschenen tengevolge van de ontdekking der kunstmatige radioactiviteit door Curie, Joliot²⁾ en Fermi³⁾, de instabiele isotopen ten tooneele van koolstof, zwavel, phosphor, arseen, natrium, kalium, magnesium, calcium, de halogenen, ijzer, koper en goud.

De wijze, waarop de isotopen kunnen worden toegepast voor de studie van chemische reacties, werd omstreeks het jaar 1920 door G. von Hevesy aangegeven; aangezien de isotope elementen door gewone chemische middelen niet zijn te scheiden, kon bijvoorbeeld radioactief lood (thorium B) bij de bestudering van de zelfdiffusie van gesmolten lood als „indicator” worden gebruikt. Sindsdien is deze indicatormethode in vele onderzoeken en in allerlei variaties toegepast. Het feit, dat de eerste isotopen tot de zware elementen behoorden, veroorzaakte, dat de toepassing daarvan niet zoozeer op physiologisch als wel op analytisch-chemisch en fysisch-chemisch terrein lag. Uiteraard veranderde dit, toen de isotopen van de voor de physiologie zoo belangrijke elementen koolstof, waterstof, zuurstof, stikstof, zwavel en phosphor ter beschikking kwamen. Natuurlijk werden ook in de biochemie de isotopen in de eerste plaats volgens het indicatorprincipe toegepast. Hoe groot hier de behoefte aan een dergelijke methodiek was, blijkt duidelijk, wanneer wij nagaan, op welke wijze de betreffende vraagstukken in de periode vóór de ontdekking der isotopen van

1) Vgl. F. Ephraim. Anorganische Chemie (1934) 799.

2) I. Curie en F. Joliot, C. r. hebdomadaire Séances Acad. Sci. 198, 254 (1934).

3) E. Fermi, Nature 133, 757 (1934).

laatstgenoemde elementen moesten worden bestudeerd. Immers een van de voornaamste opgaven van het fysiologisch-chemisch onderzoek is de bestudeering van reacties, welke bij de opbouw en de afbraak der stoffen van de levende cel een rol spelen. In het algemeen moest men er vroeger mede volstaan, de bestanddeelen van het doode organisme alsmede van de uitscheidingsproducten te analyseeren. Ofschoon de op deze wijze verkregen staalkaart van natuurstoffen buitengewoon belangrijk was en is, kon men langs deze weg veelal niets te weten komen over de lotgevallen van de afzonderlijke verbindingen in het levende organisme. Een vooruitgang in deze richting kon slechts worden bereikt door in de verbinding, waarvan men de fysiologische afbraak wilde nagaan, een karakteristieke groep in te voeren, welke de latere identificatie in de uitscheidingsproducten moesten vergemakkelijken. Een typisch voorbeeld voor deze werkwijze zijn de onderzoekingen over de biologische oxydatie van vetzuren; F. Knoop⁴⁾ heeft hiervoor de phenylgroep toegepast, d.w.z. vetzuren met een C_6H_5 -rest op de ω -plaats gevoederd. Latere auteurs hebben voor hetzelfde doel bv. benzol-sulfo-methylamino- of cyclo-alkylgroepen gebruikt. Alhoewel op deze manier het belangrijke feit van de zgn. β -oxydatie der vetzuren kon worden ontdekt, is het bezwaar van de methodiek duidelijk. De „geëtiketteerde” verbindingen zijn voor het organisme niet alleen vreemde stoffen, maar bovendien ook wat hun moleculairgewicht en ten deele hun chemisch karakter betreft reeds zeer verschillend van de moleculen der natuurlijke vetzuren. Heden ten dage is het mogelijk dergelijke onderzoekingen met vetzuren uit te voeren, welke b.v. door deuterium zijn gemerkt; in dit geval is de kunstmatige verandering in de bouw van het molecuul slechts minimaal.

Een ander willekeurig gekozen voorbeeld moge aantonen, hoe de gebruikmaking van deuterium als indicator geschikt is, in twijfelachtige gevallen meteen een definitieve beslissing te brengen. In het jaar 1909 heeft Jaffé⁵⁾ na voeding van benzol, uit de urine van honden en konijnen in kleine hoeveelheden muconzuur kunnen isoleeren, dat hij als afbraakproduct

4) F. Knoop, Hofmeisters Beitr. 6, 150 (1905).

5) M. Jaffé, Z. physiol. Chem. 62, 58 (1909).

van benzol beschouwde. Böeseken⁶⁾ en Slooff wezen er echter op, dat bij de opensplitsing van de benzolring cis-cis-muconzuur zou moeten ontstaan, terwijl Jaffé het trans-trans-zuur had geïsoleerd; zij veronderstelden daarom, dat het trans-trans-zuur niet uit benzol, maar b.v. uit galactose zou zijn ontstaan. Eenige jaren later echter werd door Drummond⁷⁾ en Finar ontdekt, dat het aan urine toegevoegde cis-cis-muconzuur spoedig in het trans-trans-zuur overgaat. Nadat dus de vraag of het organisme van de hond inderdaad in staat is de theoretisch interessante omzetting van benzol in muconzuur uit te voeren, lange tijd een onderwerp van discussie bleef, konden K. Bernhard⁸⁾ en E. Gressly onlangs de kwestie voor goed ophelderen. Zij slaagden er namelijk in na voeding van deuteriobenzol een deuterium bevattend muconzuur te isoleren.

Een andere toepassing der isotopen ligt op zuiver analytisch terrein. Wanneer namelijk bij het bepalen van het gehalte van een substantie A in een mengsel de gewone analytische werkwijzen geen bevredigend succes hebben, kunnen we door aan het mengsel een bekende hoeveelheid met isotopen geïndiceerde stof A toe te voegen, uit de verdunning van de daarna geïsoleerde verbinding A, het totale gehalte berekenen.

Wat het aantoonen en bepalen van isotopen betreft, biedt het werken met radioactieve isotopen zekere voordeelen. In de teller van Geiger en Müller hebben we een eenvoudig te manipuleeren apparaat, dat met groote nauwkeurigheid het gehalte van het radioelement kan bepalen. Gezien de gevoeligheid van het toestel is het mogelijk met geringe isotoopconcentraties te werken, zoodat het niet noodzakelijk is van zeer actieve preparaten uit te gaan. Indien het alleen op de vraag aankomt, of een isotoop al of niet in een bepaald lichaamsdeel wordt opgenomen — bv. radioactieve phosphor in de tanden — kan men de isolering van zuivere verbindingen achterwege laten. Wil men echter uitmaken of hetzelfde isotoop bv. in lecithine wordt

6) J. Böeseken en G. Slooff, Proc. Acad. Sci. Amst. **32**, 1043 (1929).

7) J. C. Drummond en I. L. Finar, Biochem. J. **32**, 79 (1938).

8) K. Bernhard en E. Gressly, Helv. Chim. Acta **24**, 83 (1941).

ingebouwd, dan is de afscheiding van de zuivere verbinding slechts overbodig, indien de ruwe lecithinefractie niet radioactief zou zijn.

Een voorwaarde voor het gebruik van radioactieve isotopen is echter een voor het experiment gunstige halveeringstijd. Zoals tabel I toont, varieert deze grootte van een onderdeel van een seconde tot eenige maanden.

TABEL I. *)

Element	Halveeringstijd
${}^3_1\text{H}$	150-170 dagen
${}^{14}_6\text{C}$	20,5 minuten
${}^{24}_{11}\text{Na}$	14,8 uren
${}^{32}_{15}\text{P}$	14,3 dagen
${}^{35}_{16}\text{S}$	88 dagen
${}^{34}_{17}\text{Cl}$	33 minuten
${}^{42}_{19}\text{K}$	12,4 uren
${}^{45}_{20}\text{Ca}$	180 dagen
${}^{59}_{26}\text{Fe}$	47 dagen
${}^{82}_{35}\text{Br}$	34 uren
${}^{126}_{53}\text{I}$	13 dagen

Indien de halveeringstijd kort is, vergeleken met de duur van het experiment, dan zal aan het einde daarvan bijna alle activiteit van het radioactieve praeparat zijn verdwenen. Bij een lange halveeringstijd daarentegen is het aantal atomen, dat ontleedt, te gering om behoorlijk metingen te kunnen verrichten. Het is duidelijk, dat de toepassing van de radioactieve koolstof (${}^{14}\text{C}$) met een halveeringstijd van 20,5 minuten zeer bijzondere eischen stelt aan de keuze van de daar-

*) Vgl. J. H. Lawrence, Nature 145, 125 (1940).

mede te onderzoeken reacties. Toch konden Amerikaansche onderzoekers met dit isotoop in de laatste tijd reeds hoogst belangrijke resultaten bereiken.

Tegenover de eenvoudige analysemethodiek van de radioactieve isotopen, staat de meer ingewikkelde der stabiele isotopen. Behalve de in het volgende hoofdstuk te noemen methoden ter bepaling van deuterium, vermelden we hier de massaspectrometer van Blackney, waarmede het gehalte van de isotopen ^{15}N en ^{13}C wordt bepaald.

Wij verwijzen hier in het bijzonder naar de groote prestaties, welke door de school van Schoenheimer met behulp van ^2H (deuterium) en ^{15}N bij de studie van vele biochemische vraagstukken werden bereikt.

Het zou buiten het kader van deze inleiding vallen, een opsomming te geven van de vele onderzoekingen, welke onder toepassing van isotopen zijn uitgevoerd. Het eigenlijke onderwerp van dit proefschrift waartoe wij nu moeten overgaan, zal toonen, in hoeverre ook hierbij de nieuwe isotopen een rol hebben gespeeld.

In het voorjaar van 1939 verscheen een mededeeling van F. Kögl⁹⁾ en H. Erxleben onder de titel „Zur Aetiologie der malignen Tumoren”. In deze publicatie, welke in breede kringen zeer de aandacht heeft getrokken, werd een geheel nieuwe beschouwing over het wezen van de kwaadaardige groei gegeven.

Terwijl zich het biochemische kankeronderzoek in de laatste twintig jaren voornamelijk met de uitwendige oorzaken bezig hield, die, zooals bv. carcinogene koolwaterstoffen tot kanker kunnen leiden, was de nieuwe theorie gefundeerd op experimenteele feiten, welke ten nauwste samenhangen met chemische veranderingen in het inwendige der cel. De nieuwe onderzoekingen werden naar aanleiding van de volgende overwegingen uitgevoerd:

- a) Bij vele physiologisch werkzame stoffen, zooals hormonen (bv. adrenaline) en groeistoffen (bv. $\alpha(\beta^2\text{-indoyl})\text{-propionzuur}$) is gebleken, dat het biologisch effect van deze

9) F. Kögl en H. Erxleben, Z. physiol. Chem. 258, 57 (1939).

substanties ten nauwste samenhangt met de ruimtelijke rangschikking van de substituenten aan de asymmetrie-centra.

- b) De bestudeering van eiwitten had o.a. als resultaat opgeleverd, dat vrijwel alle in de natuur voorkomende proteïnen zijn opgebouwd uit aminozuren van dezelfde configuratie en wel de zgn. l-reeks.

De combinatie van deze feiten leidde tot de gedachte, dat de ontaarde groei misschien door een stereochemische verandering veroorzaakt zou kunnen zijn, met dien verstande, dat in proteïnen van kankergezwellen naast bouwsteen van de l-reeks, ook bouwsteen van de tegenovergestelde configuratie voorkomen. Inderdaad bleek bij de analyse van de aminozuren uit hydrolysaten van kankergezwellen, dat eenige eiwitbouwsteen ook in de onnatuurlijke vorm aanwezig waren. Hiermede was voor het eerst aan het doode materiaal een chemisch onderscheid tusschen het normale en het maligne weefsel aangetoond.

In experimenteel opzicht moest voor dit onderzoek elk aminozuur uit de hydrolysaten in chemisch zuivere vorm worden afgescheiden en daarna de specifieke draaiing worden bepaald. De gelijktijdige aanwezigheid van de antipoden moest door een depressie in de specifieke draaiing tot uiting komen. Aminozuren, waarvan bekend was, dat ze onder de omstandigheden van de zuur-hydrolyse gedeeltelijk racemiseeren, moesten natuurlijk in dit verband a priori buiten beschouwing blijven.

In het kort kunnen de resultaten van het eerste onderzoek van K ö g l en E r x l e b e n als volgt worden samengevat. De eiwitten van het normale weefsel zijn, voor zoover dit kon worden nagegaan, inderdaad alleen opgebouwd uit de aminozuren van de l-reeks. Ook de tumoreiwitten zijn hoofdzakelijk uit deze gewone bouwsteen samengesteld; overeenkomstig de verwachting kon echter uit de proteïnen van kankerweefsel ook een niet te verwaarlozen hoeveelheid van aminozuren der „onnatuurlijke” d-reeks worden geïsoleerd. Terwijl het percentage aan d-vorm bij leucine, lysine, oxy-glutaminezuur en valine slechts klein was, constateerde men bij het glutaminezuur een aanzienlijke concentratie van de d-antipode.

Op grond van deze feiten kwam K ö g l tot de opstelling van

een nieuwe kankertheorie. Volgens hem is de diepere oorzaak van de kanker gelegen in een beschadiging van de enzymssystemen, welke de opbouw en de afbraak van de eiwitten regelen. Het gevolg van die beschadiging is, dat de eiwitsynthetiserende fermenten niet alleen de natuurlijke, maar daarnaast ook onnatuurlijke aminozuren in de eiwitten van de cel inbouwen. Op zichzelf zou het optreden van partieel racemische proteïnen in de kankercel als bijkomstig verschijnsel kunnen worden beschouwd. Voortbouwende op de gedachten, welke tot de nieuwe richting hebben geleid, heeft K ö g l echter een reeks belangrijke argumenten genoemd, die er voor pleiten, dat zijn vondst inderdaad van zeer groot belang voor het kankervraagstuk is. Dit werd door tal van andere auteurs eveneens beseft en de nieuwe gezweltheorie werd het uitgangspunt van vele onderzoekingen, vooral op enzymatisch gebied. Ook andere onderzoekers waren er kennelijk van overtuigd, dat de genoemde resultaten zeker niet onbelangrijk zouden zijn, achtten het echter voor noodzakelijk de experimenteele grondslag, nl. het voorkomen van d-glutaminezuur als voornaamste onnatuurlijke bouwsteen der tumorproteïnen in eigen onderzoekingen te verifiëren.

Tegenover de enkele auteurs^{10), 11)}, aan wie het gelukt is, d-glutaminezuur uit hydrolysaten van kankergezwellen te isoleren, staan een lange reeks van chemici^{12), 13), 14), 15), 16), 17), 18), 19)}, die er niet in geslaagd zijn, het genoemde aminozuur in tumorhydrolysaten aan te toonen.

Aangezien de werkwijze van K ö g l en E r x l e b e n bij an-

10) L. E. Arnow en J. C. Opsahl, *Science* **90**, 257 (1939).

11) J. White en F. R. White, *J. Biol. Chem.* **130**, 435 (1939).

12) A. C. Chibnall en zijn medewerkers, *Nature* **144**, 71 (1939), **145**, 311 (1940). *Biochem. J.* **34**, 285 (1940).

13) J. M. Johnson, *J. Biol. Chem.* **132**, 781 (1940).

14) F. Lipmann en zijn medewerkers, *Science* **91**, 21 (1940), **92**, 32 (1940).

15) A. Konikowa, *Nature* **145**, 312 (1940).

16) S. Graff, *J. Biol. Chem.* **130**, 13 (1939).

17) G. E. Woodward, F. E. Reinhart en J. S. Dohan, *J. Biol. Chem.* **138**, 677 (1941).

18) C. Dittmar, *Z. Krebsforschung* **49**, 397, 441 (1939).

19) H. Bayerle, *Biochem. Z.* **303**, 251 (1939).

dere auteurs experimenteele moeilijkheden opleverde, werden veelal andere methoden toegepast, welke door de Utrechtsche school voor het vraagstuk nog niet waren beproefd. In de regel werd echter telkens weer uitsluitend het l-glutaminezuur gevonden. Zodoende kwam een reeks van onderzoekers tot de overtuiging, dat de resultaten van K ö g l en zijn medewerkers niet juist zouden zijn en dat er tusschen normaal weefsel en kankergezwellen niet het gepostuleerde verschil zou bestaan.

K ö g l en E r x l e b e n isoleeren het glutaminezuur uit de hydrolysaten volgens een lang bekend voorschrift als het hydrochloride, door het eiwithydrolysaat na korte behandeling met cuprooxyde met chloorwaterstof te verzadigen. Na enting en eenige dagen bewaren bij 0°, scheidt zich het glutaminezuurhydrochloride kristallijn af. De opbrengst was daarbij oorspronkelijk slechts 3—4 % van het proteïnegewicht; hier zij echter reeds vermeld, dat naderhand meerdere routine en ervaring er toe leidden, dat de gemiddelde opbrengst op 9 % kon worden gebracht, zonder dat hierdoor in de verhouding der antipoden een essentieele verandering optrad.

De Engelsche en Amerikaansche auteurs gaven meestal de voorkeur aan de methode van F o r e m a n²⁰⁾. Bij deze werkwijze wordt het glutaminezuur in de vorm van zijn calcium- of bariumzout in water-alcohol-milieu gepraecipiteerd. Uit het neerslag wordt dan het glutaminezuur met behulp van zwavelzuur vrijgemaakt, waarna het eveneens als hydrochloride wordt gewonnen. Langs deze weg kan uit elk weefselproteïne glutaminezuur in een opbrengst van ongeveer 10 % worden verkregen, maar het is dan ook bij tumoren vrijwel de zuivere l-vorm.

Deze tegenstelling kon spoedig worden opgehelderd. Het gelukte K ö g l en E r x l e b e n²¹⁾ bij de hydrolysaten van tumoreiwit uit de moederloog van het neerslag der calciumzouten nog een hoeveelheid glutaminezuur als hydrochloride te isoleeren. Deze toonde de tegenovergestelde draaiing; blijkbaar heeft dus bij de methode van F o r e m a n onder de invloed van andere asymmetrische stoffen van het hydrolysaat een splitsing van dl-glutaminezuur in de antipoden plaats. Zoo kon uit het hy-

20) F. W. F o r e m a n, Biochem. J. 8, 463 (1914).

21) F. K ö g l en H. E r x l e b e n, Z. physiol. Chem. 264, 211 (1940).

drolysaat van een Brown-Pearce-tumor eerst 9,3 % l-glutaminezuur worden geïsoleerd en vervolgens uit de moederloog nog 3,6 % d-glutaminezuur. Hiermede was een maximum opbrengst aan glutaminezuur van 12,9 % bereikt en een der voornaamste tegenargumenten, nl. de geringe opbrengst bij de oorspronkelijke werkwijze uit de weg geruimd.

Ofschoon het aanvankelijk gerechtvaardigde bezwaar van de te kleine opbrengsten daarmee van de baan was, deed zich de behoefte gevoelen, de discussie op een exacte basis te stellen door het absolute gehalte aan l- en d-vorm in de hydrolysaten te bepalen. De weg werd gewezen door een noot van H. H. Ussing²²). Deze auteur bepaalde het leucine-gehalte in het hydrolysaat van haemoglobine door na racemisatie van de aminozuren een bepaalde hoeveelheid gedeutereerd dl-leucine toe te voegen. Uit het verminderde deuterium-gehalte van het daarna uit het mengsel geïsoleerde dl-leucine kon het gezochte absolute gehalte worden berekend. Naar aanleiding van deze mededeeling hebben F. Kögl²³), H. Erxleben en H. Herken het voornemen te kennen gegeven, door een overeenkomstige wijziging van dit principe het absolute gehalte van de eiwit-hydrolysaten aan l- en d-glutaminezuur te bepalen. Schrijver van dit proefschrift kreeg tot taak, de methodiek der deuteriumanalyse in ons laboratorium in te voeren en bovengenoemd werk in samenwerking met de groep van onderzoekers uit te voeren, die zich in het organisch-chemisch laboratorium der Rijksuniversiteit te Utrecht met het kankervraagstuk bezighoudt. Korte tijd nadat met de werkzaamheden een begin was gemaakt, kwam een publicatie van R. Schoenheimer²⁴), S. Ratner en D. Rittenberg in onze handen, waaruit bleek, dat deze auteurs de nieuwe analytische methode reeds iets vroeger en onafhankelijk van H. H. Ussing voor de bepaling van het leucine-gehalte der proteïnen van het ratten-organisme hadden toegepast. Natuurlijk heeft de installatie van de benodigde toestellen — vooral onder de tegenwoordige omstandigheden — vrij veel tijd gekost. Voordat wij zelf met de

22) H. H. Ussing, Nature **144**, 977 (1939).

23) Z. physiol. Chem. **263**, 113 (1940).

24) J. Biol. Chem. **130**, 703 (1939).

systematische bewerking van ons vraagstuk konden beginnen, verscheen een uitvoerige mededeeling van D. Rittenberg²⁵⁾ en G. L. Foster over de quantitative analyse door middel van de „isotope dilution”. Daarmee aansluitend publiceerden S. Graff²⁶⁾, D. Rittenberg en G. L. Foster een onderzoek, waarbij de nieuwe methode met ¹⁵N als indicator reeds was toegepast op het ons interesseerende vraagstuk van de glutaminezuur-bepalingen in de hydrolysaten van tumoreiwit. Tot onze verrassing hebben de genoemde auteurs in de zes door hun onderzochte hydrolysaten naast gemiddeld 10 % l-glutaminezuur maximaal slechts 0,1 % d-vorm gevonden. De auteurs hebben bij het uitvoeren der analyses het weefsel 12 uren gehydrolyseerd, een bepaalde hoeveelheid met ¹⁵N gemerkt dl-glutaminezuur toegevoegd en daarna nog 3 uren gekookt. De isoleering van het glutaminezuur werd volgens de methode van Foreman uitgevoerd; de scheiding der hydrochloriden van l- en dl-glutaminezuur kon door gefractioneerde kristallisatie uit het berekende volume 20-proc. zoutzuur worden bereikt en wel op grond van de in ons laboratorium door A. M. Akkerman²⁷⁾ bepaalde oplosbaarheid. Het massaspectrometrische onderzoek van de uit de glutaminezuurpreparaten in vrijheid gestelde stikstof leidde tot de genoemde conclusies over het glutaminezuurgehalte van de onderzochte tumorhydrolysaten.

Het resultaat van deze publicatie werd vooral in Amerika, maar ook elders, als definitieve weerlegging der onderzoekingen van Kögl en Erxleben beschouwd. Inderdaad maakten de beide Amerikaansche publicaties in experimenteel opzicht, alsmede door de zorgvuldige foutendiscussie een zeer overtuigende indruk. Onze werkgroep heeft zich natuurlijk bij alle aanvallen telkens weer de vraag gesteld, op welke wijze onze positieve uitkomsten tegenover deze negatieve resultaten zouden kunnen worden verklaard. Indien het om zuiver biologische proeven met een groote spreiding in de resultaten te doen was, waarbij de

25) J. Biol. Chem. **133**, 737 (1940).

26) J. Biol. Chem. **133**, 745 (1940).

27) F. Kögl, H. Erxleben en A. M. Akkerman, Z. physiol. Chem. **261**, 151 (1939).

conclusies statistisch worden afgeleid, of indien tumoren van verschillende soort steeds een en hetzelfde lage gehalte aan d-vorm zouden leveren, zou het gevaar van een vergissing vanzelfsprekend groot zijn geweest. In werkelijkheid werd echter in ons laboratorium gedurende drie jaren steeds weer zonder uitzondering gevonden, dat normale weefsels en myomen practisch alleen l-glutaminezuur leveren, dat niet metastaseerende entumoren (b.v. J e n s e n-sarcoom) 6 à 8 %, chemotumoren (b.v. met benzopyreen verwekt) circa 13 % en sterk metastaseerende entumoren (B r o w n-P e a r c e) ongeveer 25 % d-glutaminezuur geven, berekend op het in het geheel geïsoleerde glutaminezuur. Indien werkelijk geen causaal verband zou bestaan, had in de loop van het jarenlange onderzoek beslist bij normaal weefsel en myomen nu eens vrij veel d-vorm, daarentegen bij de zeer maligne B r o w n-P e a r c e-tumoren of bij levermetastasen soms uitsluitend de l-vorm moeten optreden. Dergelijke afwijkingen in de resultaten werden echter nooit geconstateerd.

De negatieve uitkomsten van de Amerikaansche onderzoekers moesten natuurlijk de een of andere concrete oorzaak hebben. Een nauwkeurige herhaling van dit onderzoek kwam reeds daarom niet in aanmerking, omdat wij niet de beschikking hadden over het stikstofisotoop ^{15}N . Onze taak moest dientengevolge daarin bestaan, dat wij de tot nu toe verkregen ervaringen over het optreden van het onnatuurlijke glutaminezuur in de hydrolysaten van tumoren door een andere quantitative methode controleerden, welke eveneens onafhankelijk was van de opbrengsten bij de isolering. Dit doel moest door gebruikmaking van deuterium als indicator te bereiken zijn.

HOOFDSTUK II.

DE DEUTERIUMANALYSE.

Sinds de ontdekking van deuterium, het isotoop van waterstof, door Urey²⁸⁾ en zijn medewerkers, zijn er diverse methoden ter bepaling van het gehalte van deuterium beschreven. De spectroscopische en massaspectroscopische methoden, welke tot de ontdekking van deuterium leidden, zijn alleen historisch van belang; toen immers kon met semi-quantitatieve methoden worden volstaan, omdat het er slechts om ging, het al of niet aanwezig zijn van het isotoop aan te toonen.

Het gehalte aan het zware isotoop wordt meestal bij water vastgesteld, aangezien deze verbinding in tegenstelling met waterstof op eenvoudige wijze zeer zuiver te bereiden is. Het meere deel der methoden is gebaseerd op het verschil in soortelijk gewicht van H₂O ($d_4^{20} = 0,9982$) en D₂O ($d_4^{20} = 1,1054$).

a) Wanneer we de beschikking hebben over een voldoende hoeveelheid water, kunnen we de dichtheid van het te onderzoeken watermonster het eenvoudigst met behulp van een pycnometer bepalen. Uit het dichtheidsverschil met gewoon water Δs bij 25°, laat zich het gehalte aan zwaar water, uitgedrukt in de molfractie N_{D₂O} berekenen uit de formule:

$$N_{D_2O} = \frac{9,257 \Delta s}{1 - 0,033 \Delta s}$$

Deze, oorspronkelijk door G. N. Lewis²⁹⁾ en D. B. Luten gevonden betrekking heeft tengevolge van nauwkeuriger dichtheidsbepalingen van D₂O diverse wijzigingen ondergaan. De onderzoekingen van L. G. Longsworth³⁰⁾, L. Tronstad³¹⁾

28) H. C. Urey, F. G. Brickwedde en G. M. Murphy, Phys. Rev. **39**, 164, 864 (1932); **40**, 1 (1932).

29) J. Am. Chem. Soc. **55**, 5062 (1933), Phys. Rev. **45**, 161 (1934).

30) J. Am. Chem. Soc. **59**, 1483 (1937).

31) Trans. Faraday Soc. **34**, 766 (1938).

en J. Brun en E. Swift³²⁾ hebben de formule van Lewis en Luten bovenstaande vorm gegeven.

b) Volgens G. N. Lewis³³⁾ en R. T. Macdonald kunnen we de dichtheid bepalen met behulp van een glazen drijver. Door de temperatuur³⁴⁾ te meten, waarbij de drijver juist zweeft, laat zich de densiteit van het water vaststellen. We kunnen ook de temperatuur fixeeren en de druk³⁵⁾ zoo kiezen, dat het glazen voorwerp zweeft. In beide gevallen gaat aan het gebruik een empirische ijking van de apparatuur vooraf. H. Fromherz³⁶⁾, R. Sonderhoff en R. Thomas hebben deze methodiek voor microbepalingen geschikt gemaakt. Door zowel druk als temperatuur te laten variëeren, verkregen zij een veel grootere analyse marge dan tot nog toe bij de zweefmethode mogelijk was.

c) Een elegante manier om het gehalte van deuteriumoxyde in water te bepalen is de druppelmethode. Deze werkwijze werd oorspronkelijk gebruikt door H. G. Barbour³⁷⁾ en W. F. Hamilton voor de bepaling van het soortelijke gewicht van serum en bloed. In principe komt deze methode hierop neer, dat men een klein druppeltje van het te onderzoeken vocht in een met het vocht onmengbare vloeistof langzaam laat vallen. De valsnelheid is een maat voor de dichtheid.

Het waren E. Vogt³⁸⁾ en W. F. Hamilton eenerzijds en K. Fenger-Eriksen³⁹⁾, A. Krogh en H. H. Ussing anderzijds, die deze werkmethode het eerst bij de deuterium-analyse toepasten. Belangrijke verbeteringen werden aangebracht door Schoenheimer⁴⁰⁾ en zijn medewerkers. Deze methode, welke wij ook bij ons eigen werk gebruikten, zal naderhand uitvoerig worden besproken.

32) J. Am. Chem. Soc. **61**, 198 (1939).

33) J. Chem. Phys. **1**, 341 (1933).

34) Vgl. H. Erlenmeyer, *Helv. Chim. Acta* **19**, 129 (1936).

35) Vgl. E. S. Gilfillan en M. Polanyi, *Z. physik. Chemie A.* **166**, 254 (1933).

36) *Ber. dtsch. chem. Ges.* **70**, 1219 (1937).

37) *Am. J. Physiol.* **69**, 654 (1924) en *J. Biol. Chem.* **69**, 625 (1926).

38) *Am. J. Physiol.* **113**, 135 (1935).

39) *Biochem. J.* **30**, 1264 (1936) en *Z. Elektrochemie* **44**, 8 (1938).

40) A. S. Keston, D. Rittenberg en R. Schoenheimer, *J. Biol. Chem.* **122**, 227 (1937).

d) Het verschil in brekingsindex van gewoon water ($n_D^{20} = 1,3330$) en van zwaar water ($n_D^{20} = 1,3284$) verschaft ons eveneens een middel om het gehalte aan deuteriumoxyde in water te bepalen. Meten we met een refractometer de brekingsindex van een D_2O-H_2O -mengsel, dan kunnen we evenals sub a) met behulp van een formule van Lewis²⁹⁾ en Lutten uit het verschil Δn van de brekingsindices met gewoon water het gehalte aan D_2O vaststellen.

$$N_{D_2O} = - \frac{\Delta n}{0,00445} \text{ (voor natriumlicht bij } 25^\circ \text{)}$$

N_{D_2O} geeft wederom de molfractie D_2O aan.

e) Aangezien de brekingsindex zeer gevoelig is voor temperatuurvariatiën, brengt het bepalen van de refractie-index moeilijkheden van practische aard met zich. Wil men de index bepalen met een nauwkeurigheid tot in de 6e decimaal, dan moet de temperatuur tot op $0,01^\circ$ constant worden gehouden. Zulks is voor een toestel als de refractometer niet eenvoudig. Dit bezwaar wordt vermeden, indien we voor de bepaling van de brekingsindex de interferometer gebruiken. Ook de interferometrische methode ter bepaling van het gehalte aan zwaar water werd door ons gebruikt en zal hierna worden behandeld.

f) Verder kan men door het bepalen van het warmtegeleidingsvermogen van een D_2-H_2 -, respectievelijk D_2O-H_2O -mengsel het gehalte aan deuterium vaststellen. Farkas⁴¹⁾ maakte bij dergelijke bepalingen gebruik van een D_2-H_2 -mengsel, terwijl Bonhoeffer⁴²⁾ en Hardeck⁴³⁾ de overeenkomstige analyse met een D_2O-H_2O -mengsel uitvoerden. Genoemde methode komt hierop neer, dat men van een draad, welke door een constante elektrische stroom wordt verhit en zich in een verdund milieu van D_2-H_2 -damp, respectievelijk D_2O-H_2O -damp bevindt, de weerstand meet. Het warmtegeleidingsvermogen van het gasmengsel bepaalt de temperatuur en dientengevolge de weerstand van de draad. De concentratie aan D_2 respectie-

41) H. Farkas, Z. physik. Chem. B 22, 344 (1933).

42) O. Reitz en K. F. Bonhoeffer, Z. Physik. Chem. B 4, 89 (1929); A. 174, 424 (1935).

43) P. Hardeck, Z. Elektrochemie 44, 3 (1938).

velijk D_2O in het gasmengsel bepaalt op haar beurt weer het warmtegeleidingsvermogen. Aldus is door een eenvoudige weerstandsmeting het gehalte aan deuterium vast te stellen.

Alvorens nu over te gaan tot een uitvoerige bespreking van de door ons gebruikte analysemethoden, lijkt het wenschelijk, eerst die werkzaamheden te beschrijven, welke verricht moeten worden om een volkomen zuiver D_2O-H_2O -mengsel te verkrijgen. Wij hadden bij ons werk veel steun aan de voortreffelijke publicaties, welke de school van Schoenheimer⁴⁴⁾ over de uitvoering van deuteriumanalyses heeft gebracht.

De verbranding.

De verbranding van de deuterium bevattende verbinding wordt uitgevoerd in een kwartsbuis van 80 cm lengte en 2 cm doorsnede. Deze is over een lengte van 50 cm gevuld met koperoxyde in draadvorm. Voor de verwarming dient een elektrische oven, welke de buis op een temperatuur van 750° à 800° kan houden. De relatief groote hoeveelheid koperoxyde alsmede de hooge temperatuur garandeeren een goede verbranding van het te onderzoeken materiaal, hetgeen van essentieel belang voor de analyse is. De verbranding geschiedt in een zuurstofatmosfeer. Ter verwijdering van waterstof en sporen organische verbindingen, leiden wij de zuurstof eerst door een kwartsbuis, eveneens gevuld met koperoxyde en verhitten met een elektrische oven van hetzelfde formaat als de eigenlijke verbrandingsoven^{*)}. Daarna passeert het gas twee met geconcentreerd zwavelzuur gevulde waschflesschen en vervolgens een vochtvanger, welke met vast koolzuur is gekoeld.

44) R. Schoenheimer en D. Rittenberg, J. Biol. Chem. **111**, 169 (1935).

A. S. Keston, D. Rittenberg en R. Schoenheimer, J. Biol. Chem. **122**, 227 (1937).

*) Er moge hier op worden gewezen, dat het moeilijk is, de zuurstof volkomen vrij te maken van waterstof en waterstofverbindingen. Ondanks onze voorzorgsmaatregelen blijkt een met normale snelheid doorgeleide zuurstofstroom in 2 uren tijds 1 à 1,5 mg water te geven. Aangezien wij een verbranding in ca. 25 minuten uitvoeren, veroorzaakt dit verschijnsel geen noemenswaardige fout in de analyse.

Het verbrandingswater wordt opgevangen in een U-vormige buis (A in fig. 1), welke met behulp van slijpstukken aan het einde van de kwartsbuis is bevestigd. A bevindt zich in een Dewar-vat met vast koolzuur als koelmiddel. De verbranding van 120 mg glutaminezuur-HCl geschiedt in ca. 7 minuten, waarna nog 18 à 20 minuten zuurstof wordt doorgeleid om het verbrandingswater quantitatief in de U-buis te brengen *).

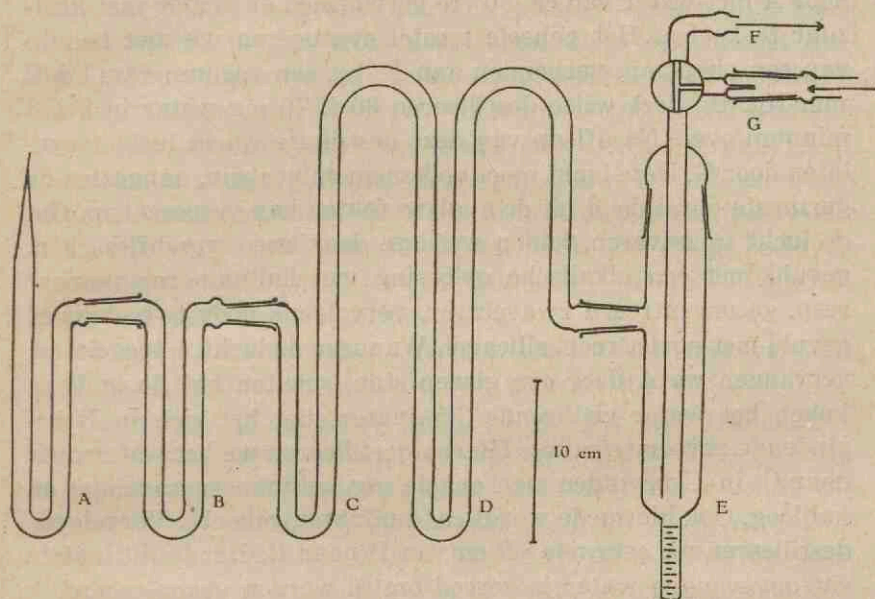


Fig. 1.

Zuivering van het verbrandingswater.

Na afloop van de verbranding wordt de capillair, waarin de U-buis eindigt, dichtgesmolten en een stukje koperdraad van $\frac{1}{2}$ cm lengte aan het verbrandingswater toegevoegd. Dit heeft ten doel het bij de oxydatie ontstane halogeen te binden. Wanneer het verbrandingswater ca. 20 uren met het koper in aan-

*) Ingeval bloed, urine of andere vloeistoffen van biologische aard worden geanalyseerd, destilleeren we eerst in vacuo het vocht af en leiden het destillaat door de verbrandingsbuis.

raking is geweest, wordt — indien een stikstofhoudende verbinding was verbrand — een overmaat BaCO_3 toegevoegd om het in dit geval gevormde salpeterzuur te neutraliseeren. De verdere zuivering van het verbrandingswater geschiedt met behulp van de „destillation-train”, het in fig. 1 geschetste toestel.

Uit de U-buis A wordt het water overgedestilleerd naar buis B, waarin zich enkele mg chroomtrioxyde bevinden. Dit geschiedt door A met water van ca. 30° te verwarmen en B met vast koolzuur te koelen. Het geheele toestel evacueeren we met behulp van een oliepomp, verbonden aan F, tot een vacuum van 1 à 2 mm Hg. Op deze wijze destilleeren 60 à 70 mg water in 2 à 3 minuten over. Na afloop van deze destillatie wordt lucht toegelaten door G. Deze lucht moet volkomen zuiver zijn, aangezien de geringste onreinheid bij de analyse fouten kan veroorzaken. Om de lucht te zuiveren, leiden we deze door twee waschflesschen, gevuld met een alkalische oplossing van kaliumpermanganaat resp. geconcentreerd zwavelzuur, vervolgens door twee buizen, gevuld met noriet resp. silicagel. Wanneer de lucht is toegelaten, vervangen we A door een glazen stop, smelten het ijs in B en koken het water gedurende 3 minuten met het zich in B bevindende chroomtrioxyde. Hierna destilleeren we het water over naar C. In C bevinden zich enkele mg kaliumpermanganaat en kaliloog. Ook hiermede wordt ca. 4 minuten gekookt. Vervolgens destilleeren we over naar D en van D naar E. Het in dit laatste vat opgevangen water is gereed om te worden geanalyseerd.

Het zuiveren van het verbrandingswater is een der belangrijkste onderdeelen van de analyse. De verontreinigingen moeten met de uiterste zorg uit het water worden verwijderd. Hoe gevoelig beide analysemethoden zijn voor onzuiverheden, moge geïllustreerd worden door het feit, dat enkele gamma's HNO_3 of KOH in 50 mg water de bepalingen merkbaar beïnvloeden.

Het destillatieapparaat is gemaakt van Jenaglas en voorzien van normaal-slijpstukken No. 7; alleen aan vat E bevindt zich een slijpstuk No. 15. Het reinigen van het glaswerk, o.a. ook van de pipetten, voor het transport van het water, geschiedt met chroomzuur. Na grondig spoelen met leidingwater en gedestilleerd water wordt gedurende 30 minuten gestoomd, waarna het drogen plaats vindt in een gasoven bij ca. 150° .

dit alles is
den afzetter
van B

u kan
mijde water
CO₂

De Interferometer.

Voor een uitvoerige beschrijving en gebruiksaanwijzing van de interferometer moge worden verwezen naar een publicatie van Adams⁴⁵⁾. In het kort kan van het toestel het volgende worden gezegd. Wit licht van een 4-Volts gloeilampje wordt door een optisch systeem in twee cohaerente lichtbundels gescheiden, welke — evenwijdig aan elkaar — twee zich naast elkaar bevindende cuvetten doorloopen. Door een spiegel worden beide stralen teruggekaatst en passeeren nogmaals beide cuvetten. Daarna komen beide lichtbundels tot interferentie en geven een beeld, dat door een loupe kan worden geobserveerd. Deze loupe wordt gevormd door een cilindrische lens, waardoor het interferentiebeeld alleen in horizontale richting wordt vergroot. Op deze manier is het mogelijk een goede beeldvergrooting te verkrijgen, terwijl daarnaast het euvel van een lichtzwak beeld wordt vermeden.

Bevinden zich in beide cuvetten vloeistoffen met verschillende brekingsindices, dan zal het verschil hiervan een differentie in de weglengte der beide lichtstralen veroorzaken, hetgeen zich manifesteert in een verschuiving van het interferentiebeeld. Deze verschuiving kan men waarnemen ten opzichte van een gefixeerd interferentiebeeld, dat gevormd wordt door twee cohaerente lichtbundels, uitgaande van dezelfde lichtbron. Deze bundels doorloopen dezelfde weg als beide bovengenoemde, met dit verschil echter, dat ze beide cuvetten aan de onderkant passeeren.

De vloeistof met de grootste brekingsindex verlengt de optische weg, waardoor een phaseverschuiving plaats vindt, welke een verschuiving van het interferentiebeeld veroorzaakt. De verandering in de optische weg tengevolge van het verschil in brekingsindex kan nu worden gecompenseerd met behulp van een glazen plaatje, dat in beweging wordt gebracht door een trommel, welke van een schaalverdeling van 0 tot 3000 is voorzien. Met behulp van deze compensator wordt het verschoven interferentiebeeld op zijn oude plaats teruggebracht.

Voor de uitvoering van de analyse brengen we in beide cu-

45) Vgl. L. H. Adams, J. Am. Chem. Soc. 37, 1181 (1915).

vetten gewoon water en bepalen die stand van de trommel, waarbij de twee interferentiebeelden met elkaar tot dekking zijn gebracht. Dit is de nulstand van de interferometer. Hierna brengen we in één der beide cuvetten het te analyseeren D_2O - H_2O -mengsel. Het nu verschoven interferentiebeeld wordt met de compensator op zijn oude plaats teruggebracht en de stand van de trommel afgelezen. Dit aantal schaaldeelen wordt verminderd met het aantal schaaldeelen van de nulstand. Het aldus verkregen getal is een maat voor het verschil in brekingsindex tusschen het D_2O - H_2O -mengsel en gewoon water. Het geeft een direct meetresultaat weer, dat met behulp van een ijkcurve in een analytische waarde, uitgedrukt in gewichtsprocenten D_2O , kan worden omgezet. (Zie fig. 2).

TABEL II.

Opl. No.	Gew. % D_2O	Schaaldeelen Interferometer
1	0	0
2	0,38	66
3	0,76	133
4	1,14	199 (179)
5	1,53	267 (247)
6	1,86	306
7	2,28	375
8	2,66	445

Het aflezen van de schaaldeelen op de trommel kan reeds 2 à 3 minuten na het vullen der cuvetten plaats vinden. Wanneer het temperatuurevenwicht nog niet bereikt is, blijkt dit duidelijk uit de scheeve stand der interferentiestreepjes. Om dergelijke stoornissen te vermijden bewaren wij de interferometer, het voor de trog bestemde water, de ijkoplossingen enz. in één vertrek.

Bij de interferometrische bepaling dient men rekening te houden met een optisch verschijnsel dat in 1912 door Marc⁴⁶⁾ werd ontdekt. Teneinde dit verschijnsel duidelijk te maken, moeten we het interferentiebeeld nauwkeuriger beschrijven. Het

46) Vgl. R. Marc, Chem.-Ztg. 36, 539 (1912).

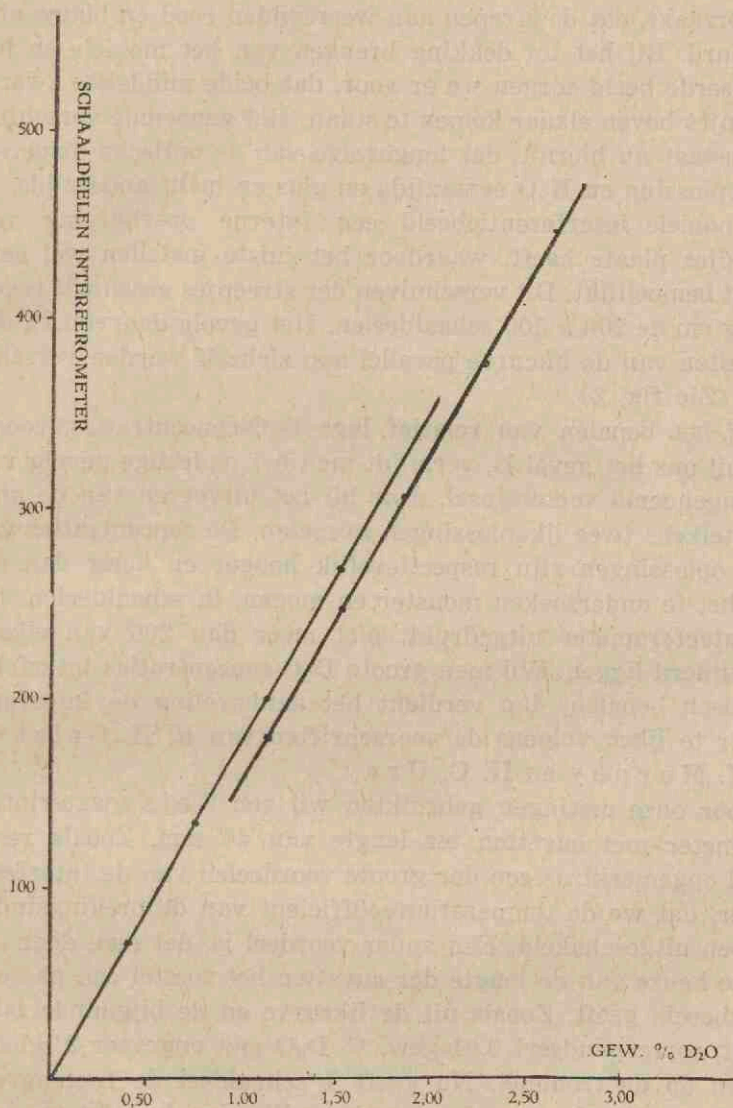


Fig. 2.

beeld, ontstaan door interferentie der beide lichtstralen, bestaat uit een centrale witte streep en daarnaast twee zwarte streepjes; naar links en rechts komen dan beurtelings witte en zwarte streepjes voor, welke meer en meer wazig worden. De dispersie

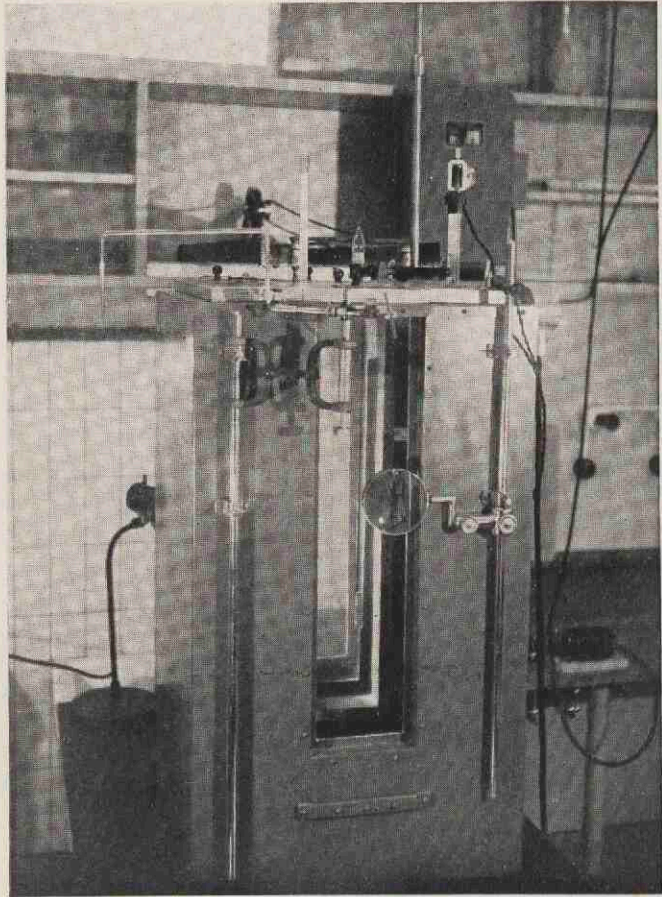
veroorzaakt, dat de strepen aan weerszijden rood en blauw zijn gekleurd. Bij het tot dekking brengen van het mobiele en het gefixeerde beeld zorgen we er voor, dat beide middelste zwarte streepjes boven elkaar komen te staan. Het genoemde verschijnsel bestaat nu hieruit, dat tengevolge van de optische dispersie van oplossing en H_2O eenerzijds en glas en lucht anderzijds, in het mobiele interferentiebeeld een interne opschuiving van streepjes plaats heeft, waardoor het juiste instellen wel eens wordt bemoeilijkt. Dit verschuiven der streepjes geschiedt regelmatig om de 200 à 300 schaaldeelen. Het gevolg daarvan is, dat gedeelten van de ijkcurve parallel aan zichzelf worden verschoven. (Zie fig. 2).

Bij het bepalen van relatief lage D_2O -concentraties, zooals dat bij ons het geval is, vermijdt men het nadeelige gevolg van bovengenoemd verschijnsel, door bij het uitvoeren van de analyse telkens twee ijkoplossingen te meten. De concentraties van deze oplossingen zijn respectievelijk hooger en lager dan die van het te onderzoeken monster en mogen, in schaaldeelen van de interferometer uitgedrukt, niet meer dan 200 van elkaar verwijderd liggen. Wil men groote D_2O -concentraties interferometrisch bepalen, dan verdient het aanbeveling de interferometer te ijken volgens de voorschriften van R. H. Crist⁴⁷⁾, G. M. Murphy en H. C. Urey.

Voor onze metingen gebruikten wij een Zeiss-waterinterferometer met cuvetten ter lengte van 40 mm. Zooals reeds werd opgemerkt, is een der groote voordeelen van de interferometer, dat we de temperatuurcoëfficiënt van de brekingsindex hebben uitgeschakeld. Een ander voordeel is, dat men door een juiste keuze van de lengte der cuvetten het toestel een passend meetbereik geeft. Zooals uit de ijkcurve en de bijgaande tabel blijkt, correspondeert 0,01 gew. % D_2O met ongeveer 2 schaaldeelen op de trommel. Nu geeft 1 schaaldeel de foutengrens aan, waarmede kan worden ingesteld. We zien dus, dat we door van een 40 mm cuvet gebruik te maken de voor ons doel vereischte nauwkeurigheid bereiken. Met een cuvet van 80 mm lengte wordt weliswaar de nauwkeurigheid verdubbeld, maar eveneens de benodigde hoeveelheid water.

Op de aldus beschreven manier laat zich in 0,4 cm³ water

47) J. chem. Phys. 2, 112 (1934).



De afbeelding laat duidelijk de valvuis zien, welke zich in de binnenste tank bevindt. Rechts boven is de electro-thermo-regulateur bevestigd, terwijl ongeveer in het midden de Beckman-thermometer is aangebracht.

Aan de voorkant is met behulp van een burettenklem de pipet bevestigd.

Op de achtergrond zijn de synchroommotor en de beide roeders zichtbaar.

het gehalte aan D_2O met een relatieve fout van 0,5 à 1 % bepalen.

De druppelmethode.

In een glazen buis ter lengte van 55 cm en met een diameter van 1 cm bevindt zich o-fluoortoluol, dat als het met water onmengbare valmedium dienst doet. Op de buis bevinden zich op afstanden van 9 en 24 cm van de bodem geëtste ringen; over de afstand van deze ringen wordt de snelheid van het vallende druppeltje gemeten. Op de bodem der buis bevindt zich Na_2SO_4 om het o-fluoortoluol droog te houden. De buis is door middel van een staaf aan het plafond van de kamer bevestigd, om de invloed van de trillingen, welke door de synchroommotor worden veroorzaakt, zooveel mogelijk te elimineeren. De valbuis moet volkomen loodrecht worden opgehangen.

Voor een goede analyse is het noodzakelijk, dat tijdens het experiment de temperatuur van het o-fluoortoluol tot op $0,001^\circ$ constant wordt gehouden. Dit bereikten wij met een thermostaat *) van de volgende constructie. (Zie ook de afbeelding op pag. 23). In een groote tank van 48 cm lengte, 48 cm breedte en 80 cm hoogte, waarvan de wanden met isolatiemateriaal zijn voorzien, bevindt zich een kleinere tank (afmetingen resp. 18, 18 en 62 cm). In de wanden zijn strooken glas aangebracht, om observatie mogelijk te maken. Met behulp van een elektrische thermoreguleator laat zich de temperatuur in de groote tank tot op $0,01^\circ$ regelen. De binnentank vertoont schommelingen, welke de $0,001^\circ$ niet overschrijden, hetgeen we met een Beckman-thermometer controleerden. In beide tanks bevinden zich roerders, aangedreven door een synchroommotor.

Voor het uitvoeren van de analyse brengen we het gereinigde D_2O-H_2O -mengsel in een pipet⁴⁸⁾, welke aan de thermostaat is bevestigd. Met behulp van deze pipet kunnen druppeltjes worden verkregen met een constant volume van $6,3 \text{ mm}^3$. De druppeltjes worden op de volgende manier in de valbuis gelanceerd. Het uiteinde van de pipet wordt zorgvuldig gereinigd

*) De thermostaat met toebehooren werd geleverd door de firma Inventum te Bilthoven.

48) In gebruik bij de microtitratie-apparatuur van Linderström-Lang, Chem. Weekblad 36, 4 (1939).

en juist tot onder het oppervlak van het o-fluoortoluol gebracht. Door een zeker aantal omwentelingen van de metalen stempel wordt een druppel water uit de pipet geperst. Door deze iets op te heffen, waardoor het uiteinde van de pipet boven het oppervlak van het o-fluoortoluol komt, laat het druppeltje los en valt langzaam naar beneden. Met een chronometer meten we de tijd T , welke het druppeltje noodig heeft om van de eene op de buis aangebrachte ring tot de andere te komen. De valsnelheid, waarvoor we $1000/T$ nemen, is nu een maat voor het D_2O -gehalte van het geanalyseerde water.

Bij iedere analyse bepalen we de valsnelheden van twee ijkoplossingen, wier D_2O -concentraties respectievelijk hoger en lager zijn, dan van het te onderzoeken monster. De redenen, waarom wij dit doen, zijn de volgende:

1) De constructie van de thermostaat garandeert een constante temperatuur gedurende enkele uren. Over lange perioden echter varieert de temperatuur van de thermostaat met de kamertemperatuur. Aangezien de valsnelheid sterk afhankelijk is van de temperatuur, schakelen we de invloed hiervan uit, door steeds contrôle toe te passen met behulp van de ijkoplossingen.

2) Zooals reeds werd opgemerkt, bevindt zich in de valbuis Na_2SO_4 op de bodem, om het o-fluoortoluol droog te houden. Dit verhindert echter niet, dat in het vochtgehalte hiervan toch variaties kunnen optreden, welke eveneens invloed op de valsnelheid uitoefenen.

Hoewel de ijkcurve (zie fig. 3) niet lineair is, mogen we het tusschen twee punten liggende deel van de curve als een rechte beschouwen.

Uit de drie experimenteele gegevens, nl. de valsnelheden van de beide ijkoplossingen en van het onbekende mengsel, laat zich door interpolatie het gezochte D_2O -gehalte berekenen.

De temperatuur van de thermostaat kiezen we zoodanig, dat een druppel H_2O voor het afleggen van de ca. 15 cm bedragende afstand ongeveer 180 seconden noodig heeft. Voor de ijkoplossingen vinden we de valtijden en valsnelheden, zooals deze in tabel III worden vermeld.

Voor iedere analyse is het noodig van ca. 4 druppels de val-

snelheid te meten. De afwijkingen in de snelheden zijn zoodanig, dat met een relatieve fout van 1 % het D_2O -gehalte kan worden bepaald. Voor de druppelmethode is ca. $0,05 \text{ cm}^3$ water noodig.

TABEL III:

OpI. No.	Gew. % D_2O	T (sec.)	1000/T
1	0	183,- \pm 2 *)	5,50
2	0,37	96,- \pm 1	10,4
3	0,84	60,5 \pm 0,5	16,5
4	1,10	50,- \pm 0,4	20,0
5	1,59	40,4 \pm 0,3	24,8
6	1,94	35,5 \pm 0,2	28,2
7	2,38	30,5 \pm 0,2	32,8
8	2,79	27,2 \pm 0,1	36,8

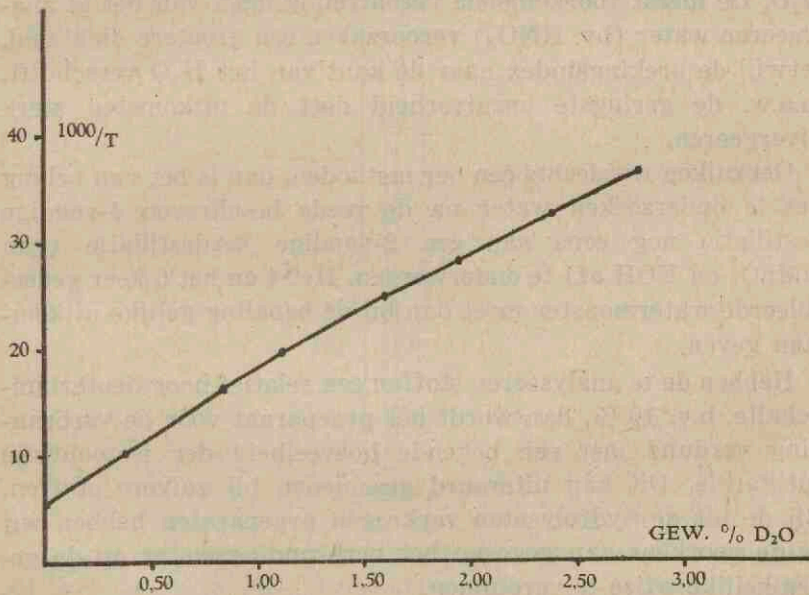


Fig. 3.

Beschikken we over een voldoende hoeveelheid water, dan kunnen we, beide bovengeschetste methoden gebruikend, met

*) De foutengrens geeft aan, binnen welke tijdsmarge de valtijden liggen, wanneer we 4 à 5 druppels van een bepaalde ijkoplossing in successie laten vallen.

één analyse volstaan, mits de beide uitkomsten niet meer dan 0,02 gew. % D_2O verschillen. Voor het uitvoeren van de analyse worden eerst de 0,4 cm^3 water in de interferometer gebracht en het D_2O -gehalte bepaald. Daarna zuigen we uit de cuvet 0,04 à 0,05 cm^3 water in de pipet op, om vervolgens met de druppelmethode het D_2O -gehalte te meten. Geven beide, van elkaar onafhankelijke methoden, dezelfde uitkomsten, dan is dit een bewijs voor de zuiverheid van het geanalyseerde water. Het groote voordeel van de door Schoenheimer beschreven methodiek is, dat twee verschillende fysische grootheden van het water als indicator voor het D_2O -gehalte worden gebruikt, nl. de brekingsindex en het soortelijke gewicht. Nu is het specifieke gewicht van zwaar water grooter dan van gewoon water, terwijl optisch gesproken, laatstgenoemde stof dichter is dan D_2O . De meest voorkomende verontreinigingen van het te analyseren water (bv. HNO_3) veroorzaken een grootere dichtheid, terwijl de brekingsindex naar de kant van het H_2O verschuift, m.a.w. de geringste onzuiverheid doet de uitkomsten sterk divergeeren.

Gebruiken we slechts één der methoden, dan is het van belang het te onderzoeken water na de reeds beschreven 4-voudige destillatie nog eens aan een 2-voudige herdestillatie (van $KMnO_4$ en KOH af) te onderwerpen. Het 4 en het 6 keer gedestilleerde watermonster moet dan bij de bepaling gelijke uitkomsten geven.

Hebben de te analyseren stoffen een relatief hoog deuteriumgehalte, b.v. 10 %, dan wordt het praeparaat vóór de verbranding verdund met een bekende hoeveelheid der isotoopvrije substantie. Dit kan uiteraard geschieden bij zuivere stoffen. Bij de uit de hydrolysaten verkregen praeparaten hebben wij er de voorkeur aan gegeven het verbrandingswater op de gebruikelijke wijze te verdunnen.

Het komt vaak voor, dat er voor een analyse slechts weinig materiaal ter beschikking staat. Gebruiken we het destillatie-apparaat, zoals fig. 1 weergeeft, dan wordt het zuivere D_2O — H_2O -mengsel eerst met behulp van een pipet uit E overgebracht naar een klein reageerbuisje, om daarna in de pipet te worden opgezogen. Om verliezen bij het transport van het water te vermijden, kan het in fig. 4 geschetste toestel worden gebruikt,

dat in de plaats van E (fig. 1) komt. Hierdoor zijn we in staat, om een analyse uit te voeren met het verbrandingswater verkregen uit 70 à 80 mg glutaminezuur-HCl. Het zal duidelijk zijn, dat in dit geval slechts de druppelmethode kan worden gebruikt, als zijnde de methode, welke de geringste hoeveelheid water vereischt. Uiteraard is in dergelijke gevallen ook geen duplobepaling na herdestillatie mogelijk, zoodat voor de contrôle het herhalen van de geheele analyse noodzakelijk is.

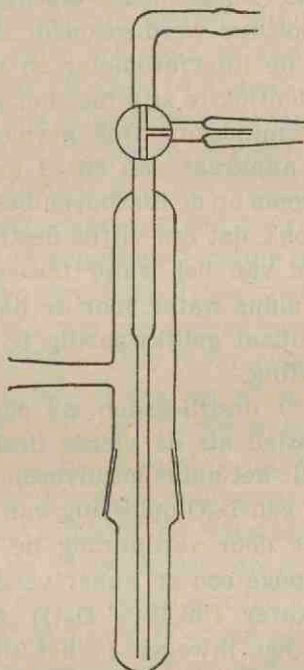


Fig. 4.

Opgemerkt moge worden, dat alle gewone waterstofverbindingen 0,02 at. % deuterium bevatten. Met onze analyses bepalen we dus steeds de overmaat van het aanwezige isotoop. Gezien het geringe bedrag aan natuurlijk voorkomend isotoop, behoeven wij bij onze calculatie daarmede geen rekening te houden.

Het bereiden van de ijkoplossingen.

Een oplossing van KOH en KMnO_4 (ca. 3%) in gewoon

leidingwater kookten we gedurende eenige uren in een rondbodern, voorzien van een terugvloeikoeler; daarna destilleerden we in een glasapparatuur het water af. Aangezien bij het destilleeren van een alkalische vloeistof vaak sporen alkali mee overgaan, werd deze bewerking herhaald. Voor de derde keer destilleerden we het water in een vacuum van ± 18 mm Hg over. Tenslotte werd het water nog in een speciaal toestel van Jenaglas bij 2 à 3 mm gedestilleerd. Door verwarming tot 30° destilleerde het water zonder kookverschijnselen over in een vat, dat met vast koolzuur werd gekoeld. Het aldus verkregen water bleek volgens de interferometer en volgens de druppel-methode volkomen identiek te zijn met het gezuiverde verbrandingswater van glutaminezuur. Ook gewoon leidingwater gaf na destillatie in het apparaat van fig. 1 geen verschil te zien met het water, verkregen op de hierboven beschreven wijze. Verder overtuigden wij ons, dat een vijfde destillatie geen verandering in de zuiverheid van het water teweegbracht. Herhaalde malen bereidden we aldus water voor de ijkoplossingen. Steeds bleek het vierde destillaat gelijkwaardig te zijn met het water van een vorige bereiding.

Het zware water *) destilleerden we één maal over onder dezelfde omstandigheden als de vierde destillatie van gewoon water plaats vond. Uit het aldus gezuiverde H_2O en D_2O maakten we door inwegen een D_2O -oplossing van ca. 3 gew. % D_2O . Hieruit bereidden we door verdunning de andere ijkoplossingen. Een voorbeeld moge een en ander verduidelijken.

1,7497 g zwaar water (99,48% D_2O) werd gemengd met 51,1972 g H_2O . Bij het inwegen is het niet noodzakelijk de gewichten op het gewicht in vacuo te corrigeren. Het verschil in soortelijk gewicht tusschen H_2O en D_2O is zoo klein, dat door genoemde correctie geen invloed op de percentages D_2O der ijkoplossingen wordt uitgeoefend. Het zware water bevatte

*) Het zware water, dat wij gebruikten, was afkomstig van de Norsk Hydro-Elektrisk Kvaestofaktieselskab en werd ons door de I. G. Farbenindustrie A. G. Werk Elberfeld welwillend ter beschikking gesteld. Het D_2O gehalte was berekend met behulp van de waarde voor het soortelijke gewicht van 100-proc. D_2O , waarvoor $d_4^{20} = 1,10541$ (zie Trans. Faraday Soc. 34, 769 (1938)). Het bevatte 99,48 gew. % D_2O ($d_4^{20} = 1,10485$).

99,48 gew. %, d.i. 1,7406 g D₂O. Het gewichtspercentage D₂O van de aldus bereide ijkoplossing No. 8 bedroeg:

$$\frac{1,7406}{51,1972 + 1,7497} \cdot 100 \% = 3,287 \%$$

Uit deze oplossing werden door verdunning met H₂O een serie ijkoplossingen met afnemende D₂O-concentratie bereid.

Het is van belang op te merken, dat de uitkomsten van de deuteriumanalyse voor onze doeleinden, nl. het bepalen van het gehalte aan glutaminezuur in hydrolysaten, wat betreft de absolute grootte, niet juist behoeven te zijn. Zou bv. het zware water van de Norsk Hydro 97,0 gew. % D₂O bevatten in plaats van de door ons in rekening gebrachte 99,48 %, dan zou dat in ons geval niet de geringste invloed hebben. Immers alle deuteriumanalyses zouden dan een relatief gelijke afwijking vertoonen, welke tengevolge van het voorkomen van de breuk C₀/C₁ in de op pag. 44 genoemde formule niet het minste effect op de uitkomsten der weefselanalyses zouden hebben.

In dit verband is ook nog een andere kwestie te discussieeren. Het electrolytisch bereide D₂O bevat naast ca. 100 % van het zware isotoop van waterstof ook nog meer dan het normale gehalte aan het zuurstofisotoop ¹⁸O. Nu worden de gedeutereerde verbindingen verbrand met zuurstof van de normale isotopen-samenstelling, zoodat het verbrandingswater uit H₂O en D₂O bestaat, waarvan de zuurstof de normale isotopenverhouding heeft. Moet nu bij de vergelijking van dit verbrandingswater en de ijkoplossingen een correctie worden aangebracht? Volgens een publicatie van K. Wirtz ⁴⁹⁾ is het soortelijke gewicht van electrolytisch bereid 100-proc. D₂O $d_{20}^{20} = 1,10737 \pm 0,00001$ en van D₂O met de normale verhouding van de zuurstofisotopen $d_{20}^{20} = 1,10726 \pm 0,00001$. Nu correspondeert een dichtheidsverschil van 1 in de 6de decimaal met 0,001 gew. % D₂O, 1 in de 5de decimaal ongeveer met 0,01 gew. % D₂O. Bij 100-proc. D₂O is het verschil in beide genoemde „D₂O-variëteiten” 1 in de 4de decimaal. Onze ijkoplossingen zijn bereid uit electrolytisch verkregen D₂O met gewoon water en bevatten maximaal 3 gew. % D₂O. Het verschil in dichtheid wordt dus ca. 30 maal

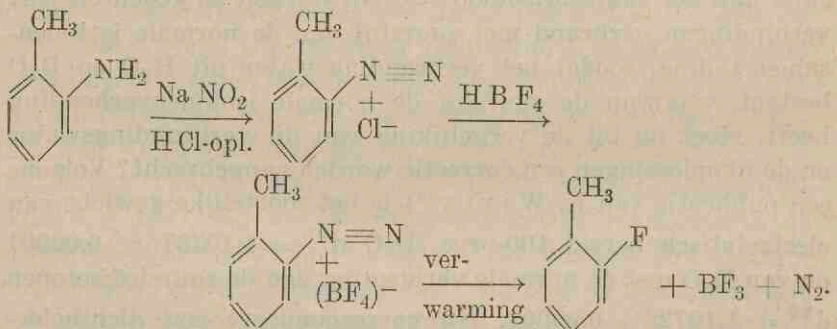
49) K. Wirtz, Naturw. 30, 330 (1942).

zoo klein, d.w.z. 3 in de 6^{de} decimaal. Dit komt overeen met 0,003 gew. % D₂O, hetgeen binnen de proeffout valt.

Aangezien wij de verschillende ijkoplossingen voor de bepalingen liefst zoo lang mogelijk wilden gebruiken, moesten wij controleeren of ook na maanden bewaren door de invloed van de glaswand resp. de bestanddeelen van de lucht of door toevallige verontreinigingen een, zij het ook lichte, verandering optrad. Te dien einde werden de ijkoplossingen eenige keeren per maand overgedestilleerd. Op een enkele uitzondering na, bleken ze echter volgens de uitkomsten van de interferometer en van de druppelmethode zelfs na een jaar volkomen goed te zijn. De oplossingen werden in een exsiccator in Jena-stopfleschjes van 50 cm³ bewaard.

Het reinigen van het gebruikte glaswerk geschiedde met behulp van kokend salpeterzuur, gevolgd door spoelen met gewoon en gedestilleerd water, waarna nog gedurende 30 minuten werd gestoomd.

Het in de valbuis gebruikte o-fluortoluol bereidden wij analoog aan het door G. Balz⁵⁰⁾ en G. Schiemann bij het para-derivaat beschreven reactie overeenkomstig het volgende schema:



Bij de reiniging van het ruwe o-fluortoluol verdient het aanbeveling om in plaats van water een oplossing van Na₂SO₄ te gebruiken, aangezien bij gebruikmaking van water als waschmiddel een moeilijk te scheiden mengsel van o-fluortoluol en water ontstaat tengevolge van het geringe verschil in soortelijk gewicht der beide genoemde stoffen. Het o-fluortoluol werd

50) Ber. dtsch. chem. Ges. 60, 1186 (1927).

gedroogd op Na_2SO_4 en bij ca. 80 mm overgedestilleerd. Kookpunt 50° bij 78 mm, terwijl de opbrengst berekend op het o-toluidine, 60 % bedroeg.

Naderhand werd ons een hoeveelheid o-fluortoluol welwillend ter beschikking gesteld door de I. G. Farbenindustrie A. G. Werk Elberfeld.

HOOFDSTUK III.

a) Bereiding van de gedeutereerde glutaminezuren.

Voor de bereiding van deuterium bevattende verbindingen staan in beginsel twee wegen open, waarvan wij eerst de uitwisselingsmethode willen bespreken. Hieronder verstaan we het uitwisselen van in de verbinding voorkomende protiumatomen tegen deuteriumatomen onder invloed van chemische agentia en katalysatoren. De hechtheid, waarmee waterstofatomen aan verschillende elementen zijn gebonden, toont uiteraard groote variaties; deze zijn echter ook bij de C—H-bindingen te constateeren al naar gelang van de overige substituenten in de nabijheid. Wij kunnen in eerste instantie onderscheid maken tusschen labiel en stabiel gebonden waterstofatomen. Van de eerstgenoemde waterstofbindingen noemen we die van het type -OH, -COOH, -NH₂, -C≡CH, welke met deuteriumatomen vrijwel momentaan uitwisselen. Ook waterstofatomen op de zgn. α-plaats van verbindingen met een carbonylgroep

$$\begin{array}{c} | \\ (-\text{C}-\text{CH}) \\ || \quad | \\ \text{O} \end{array}$$
 toonen vrij snelle uitwisseling, kennelijk tengevolge

van de keto-enol-tautomerie. Tot het tweede type, de stabiele waterstofbindingen behooren in het algemeen de alifatische en aromatische C—H-bindingen. Steeds echter kunnen naburige activeerende groepen, zooals carboxyl-, nitrogroepen enz. een labiliseerende invloed uitoefenen. Daardoor ontstaan de zgn. semilabiele C—H-bindingen⁵¹). Deze binding is daardoor gekenmerkt, dat het waterstofatoom eerst na kortere of langere tijd bij verhitting in zuur of alkalisch milieu uitwisselt. Het zijn dan ook vooral deze waterstofatomen, welke bij katalytische uitwisseling door deuteriumatomen worden vervangen. Vanzelfsprekend beteekent het vermogen tot uitwisseling van

51) Vgl. J. Biol. Chem. 125, 2 (1938).

H-atomen tegen D-atomen, dat ook omgekeerd de overeenkomstige deuterioverbinding onder analoge omstandigheden tot protiumverbindingen kunnen worden omgezet.

Bereiding van l-, resp. d-deuterio-glutaminezuur door uitwisseling.

0,5 g $\text{PtO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ werd in 4 cm^3 D_2O met electrolytisch bereid deuteriumgas gereduceerd, de katalysator met de bovenstaande vloeistof in een Cariusbuis gebracht en na toevoeging van 3 g l- resp. d-glutaminezuur (in het vervolg met GZ aangeduid) en 3 cm^3 geconcentreerd zoutzuur dichtgesmolten. Daarna hebben we de buis gedurende 9 dagen bij 95° geschud. Voor de isoleering werd de lichtgele oplossing na affiltreren van het platina in vacuo ingedampt en ter verwijdering van het labiel gebonden deuterium nog 3 maal — telkens na toevoeging van 20 cm^3 water — afgedampt. Het residu hebben wij in 25 cm^3 water opgelost en de oplossing met geconcentreerde ammonia geneutraliseerd (congo). Het afgescheiden vrije GZ werd in 30 cm^3 heet water opgelost en na toevoeging van hetzelfde volume warme alcohol overnacht in de koelkast bewaard. Opbrengst l-GZ 2,56 g; spec. draaiing $[\alpha]_{\text{D}} = + 31,7$ (5-proc. oplossing in 9-proc. zoutzuur). Deuteriumgehalte 6,50 at. %. Opbrengst d-GZ 2,30 g; spec. draaiing $[\alpha]_{\text{D}} = - 31,6$. Deuteriumgehalte 5,66 at. %.

Het aldus bereide GZ heeft de eigenschap, dat het zijn deuterium door koken met bv. zoutzuur weer verliest. Dit wordt door de volgende proef gedemonstreerd. Wij kookten 600 mg d-GZ.HCl (5,10 at. % D) opgelost in 12,5 cm^3 20-proc. zoutzuur gedurende 12 uren, waarna wij uit een derde deel van de oplossing het GZ.HCl isoleerden. Dit bleek 2,30 at. % D te bevatten. Vervolgens werd het resterende deel van de oplossing drooggedampt en wederom gedurende 8 uren met ca. 8 cm^3 zoutzuur verhit. Het uit de helft van deze oplossing geïsoleerde GZ.HCl bevatte nog maar 1,38 at. % D. Het laatste gedeelte der oplossing, werd gedurende 40 uren gekookt, waarna het GZ.HCl nog slechts een deuteriumgehalte van 0,25 at. % had.

Terwijl wij bij de uitwisselingsreacties van de overeenkomstige protiumverbinding moeten uitgaan, hebben we bij de

tweede weg voor de bereiding van deuteriumverbindingen een synthese uit andere stoffen uit te voeren, waar bv. bij een hydrolyse van D_2O en bij een reductie van D_2 gebruik wordt gemaakt.

Aangezien bij de bereiding van gedeutereerd GZ volgens de uitwisselingsmethode practisch geen racemisatie optreedt, is het langs deze weg mogelijk de gedeutereerde antipoden van GZ in handen te krijgen. Zooals boven werd aangetoond, heeft het door uitwisseling verkregen GZ echter het nadeel, dat het bij koken met zoutzuur deuterium verliest. Het kon daarom bij de proteïne-analysen eerst na de hydrolyse worden toegevoegd. Bij de isoleering van GZ uit hydrolysaten van weefsels moet o.a. herhaaldelijk uit zoutzuur worden omgekristalliseerd; het was niet buitengesloten, dat hierbij deuterium verloren zou gaan, zoodat een te hoog gehalte aan GZ zou worden verkregen. Hoewel de resultaten van onze eerste serie analyses volstrekt niet in die richting wezen, trachtten wij toch het genoemde gevaar door bereiding van GZ met stabiel gebonden deuterium-atomen uit te schakelen.

Aangezien volgens de ervaringen van de literatuur de op de α -plaats van de aminozuren gebonden waterstof als stabiel mag gelden, hebben wij in de eerste plaats de deutereering van het oxim van α -ketoglutaarzuur onderzocht. Deze verbinding, welke we volgens het voorschrift van C. R. H a r i n g t o n⁵²⁾ en S. S. R a n d a l l verkregen, hebben wij in ijsazijnoplossing met deuteriumgas en platina gereduceerd. Om het bij de reactie ontstane water weg te nemen, voegden wij aan het reactiemengsel Na_2SO_4 toe. Het gevormde GZ bleek slechts 1 at. % deuterium te bevatten, terwijl theoretisch 11,1 at. % te verwachten was. Dit lage deuterium-gehalte moet kennelijk aldus worden verklaard, dat er een uitwisseling plaats had tusschen het deuteriumgas en het labiel gebonden waterstofatoom in de carboxylgroep van de ijsazijn. Volgens de vergelijking $D_2 + 2 CH_3COOH \rightleftharpoons H_2 + 2 CH_3COOD$ wordt het deuteriumgas met de lichte waterstof gemengd. Dit euvel kon gedeeltelijk worden vermeden door als oplosmiddel ijsazijn te gebruiken, dat 80 à 90 % CH_3COOD bevatte.

52) Biochem. J. 25, 1917 (1931).

Het op deze wijze bereide GZ bevatte 6 at. % deuterium, hetwelk inderdaad stabiel was gebonden. Het nadeel van deze bereidingsmethode was echter, dat de hydreeering met deuterium onder de laatstgenoemde omstandigheden omstreeks drie weken duurde. Terwijl wij nog met de verdere bestudeering van deze reactie bezig waren, bereikten ons twee korte mededeelingen⁵³⁾ uit het laboratorium van Schoenheimer, volgens welke door katalytische hydreeering van α -ketoglutaarzuur met deuteriumgas in tegenwoordigheid van ammoniak — dus volgens de reactie van Knoop — dl-GZ met stabiel gebonden D-atomen kon worden bereid. Aangezien deze korte publicaties geen nadere experimenteele details bevatten, was het niet mogelijk, precies dezelfde werkwijze te volgen. Wij verkregen bij de in gewoon water met deuteriumgas en palladium uitgevoerde reductie dl-GZ met 10,5 at. % D. De Amerikaanse auteurs bereikten onder hun omstandigheden een deuteriumgehalte van 15,4 at. %. Wij zelf konden eerst na toevoeging van D_2O aan het reactiemengsel tot een even hoog D-gehalte komen. Een ander verschil is bij het koken van de praeparaten met geconcentreerd zoutzuur te constateeren. Hierbij vonden de Amerikaanse auteurs ook na een proefduur van vijf dagen geen verlies aan D, terwijl bij ons het D-gehalte in de eerste twaalf uur b.v. van 12,3 op 11,6 at. % daalde, bij verder verhitten echter constant bleef. Blijkbaar heeft onder de omstandigheden van onze proeven ook de γ -plaats — welke volgens de ervaringen van de Amerikaanse onderzoekers voor een semi-labele binding alleen in aanmerking komt — door uitwisseling een weinig D opgenomen. Vermoedelijk zijn deze kleine verschillen door iets afwijkende eigenschappen van de katalysatoren te verklaren.

De bereiding van het deuterio-GZ volgens de synthese van Knoop werd op ons laboratorium uitgewerkt door Dr. A. J. Klein⁵⁴⁾; onder zijn leiding werden later de relatief groote hoeveelheden, welke wij voor ons onderzoek benodigden in het practicum gesynthetiseerd. Gaarne betuig ik hem ook op deze

53) S. Ratner, D. Rittenberg en R. Schoenheimer, *J. Biol. Chem.* **135**, 357 (1940). D. Rittenberg, S. Ratner en H. D. Hoberman. *J. Am. Chem. Soc.* **62**, 2249 (1940).

54) Diss. A. J. Klein. Utrecht 1942.

plaats mijn welgemeende dank voor de belangrijke steun, op deze wijze ondervonden.

Bereiding van deuterio-GZ volgens de synthese van K n o o p.

10,22 g α -keto-glutaarzuur werden met 2,45 g palladiumoxyde, 122,5 cm³ H₂O en 32,9 cm³ 25-proc. ammonia gedurende twaalf uren in een deuteriumatmosfeer geschud. Hierbij werden \pm 1800 cm³ deuterium opgenomen. Het palladium filtreerden wij na afloop van de reactie af, waarna wij de oplossing in vacuo droogdampden. Het residu werd opgenomen in een hoeveelheid water, zoodat de verkregen, eenigszins troebele oplossing een volume had van 25 cm³. Deze oplossing werd vervolgens geneutraliseerd met 37-proc. zoutzuur op congopapier, waarbij het GZ uitkristalliseerde.

Het zuiveren geschiedde door eenige malen omkristalliseeren van het hydrochloride in 20-proc. zoutzuur. Opbrengst 7 g. Het deuteriumgehalte van het vrije GZ bedroeg 10,47 at. %.

Zooals reeds werd opgemerkt, is het voor onze doeleinden noodzakelijk, dat het gedeutereerde GZ slechts stabiel gebonden deuterium bevat. Wij hebben daarom het volgens de reactie van K n o o p bereide GZ vóór het gebruik bij de analyse eerst gedurende 20 uren met 20-proc. zoutzuur gekookt. Daarbij worden de semilabel gebonden deuteriumatomen door waterstofatomen vervangen. Aanvankelijk voerden wij de tumoranalyses aldus uit, dat wij het gedeutereerde dl-GZ aan het hydrolysaat toevoegden. Op deze wijze bepaalden we in één hydrolysaat tegelijk het gehalte aan l- en d-GZ. Om later te vermelden redenen zijn wij ertoe overgegaan, in plaats van de dl-verbinding de met deuterium gemerkte antipoden toe te passen. Deze kunnen op zeer gemakkelijke wijze worden verkregen door het hydrochloride van het „zware” dl-GZ met een gelijke hoeveelheid van het hydrochloride der „lichte” l- of d-vorm te mengen en uit de berekende hoeveelheid 20-proc. zoutzuur om te kristalliseeren. Op deze wijze scheidt zich de in overmaat aanwezige antipode af; zijn deuteriumgehalte is natuurlijk slechts half zoo groot als dat van het uitgangsmateriaal.

Bereiding van de optisch-actieve deuterio-glutaminezuren.

Het als uitgangsmateriaal gebruikte synthetische dl-GZ.HCl

bevatte na 20 uren koken met zoutzuur en twee maal omkristalliseeren 9,5 at. % D. Bij 40 g van dit praeparaat werden 18,1 g l-GZ.HCl gevoegd en uit 800 cm³ 20-proc. zoutzuur omgekristalliseerd. Het verkregen kristallisaat, 27,2 g, hebben we ter verwijdering van nog aanwezig dl-GZ.HCl omgekristalliseerd, waarna 18,1 g l-GZ.HCl overbleef. Spec. draaiing $[\alpha]_D$: + 31,5; deuteriumgehalte 5,00 at. %. De moederloogen werden vereenigd en ingedampt tot een volume van 800 cm³. Na toevoeging van 18,1 g d-GZ.HCl en omkristalliseeren verkregen we 22,7 g GZ.HCl, welke bij een hernieuwde omkristallisatie 17,7 g d-GZ.HCl opleverden. Spec. draaiing $[\alpha]_D$: — 31,4; deuteriumgehalte 4,80 at. %.

b) De bereiding van deuterium.

Wij bereidden deuteriumgas door electrolyse van D₂O⁵⁵). De bij de electrolyse gebruikte platina-electroden hadden een oppervlak van ca. 2,5 cm². Om het zware water geleidend te maken, voegden we per gram D₂O 0,02 cm³ gec. zwavelzuur toe. Aangezien het niet mogelijk is, het deuterium zonder meer van uit het electrolysevat te transporteeren, gebruikten wij een toestel*), dat een combinatie vormt van een Toeppler-pomp en een deuteriumrecipient (zie fig. 4). De ontleding van het zware water vindt plaats in het electrolysevat A, dat gedurende de electrolyse met ijswater wordt gekoeld. De spanning tusschen de beide elektroden bedraagt 60 Volts. Het aan de kathode ontwikkelde deuteriumgas passeert de CaCl₂-buis B om daarna door verdringing van het kwikzilver bij kraan K₁ in de recipient C te worden opgevangen. Bij het begin der electrolyse is C (volume ca. 125 cm³) geheel met kwikzilver gevuld. De driewegkraan K₂ staat zoo, dat verbinding wordt gemaakt tusschen C en de hevel D. Deze hevel is zoodanig bevestigd, dat het kwikoppervlak bij p slechts een fractie van een millimeter hooger staat dan bij q. Het zal duidelijk zijn, dat het ontwikkelde

55) Vgl. R. Schoenheimer en zijn medewerkers. J. Biol. Chem. 111, 169 (1935) en A. McLean en Roger Adams, J. Am. Chem. Soc. 58, 807 (1936).

*) Het principe van dit toestel werd ons medegedeeld door Dr. A. H. W. Aten. Voor deze en andere eveneens voor ons van belang zijnde raadgevingen, spreken wij hierbij onze erkentelijkheid uit.

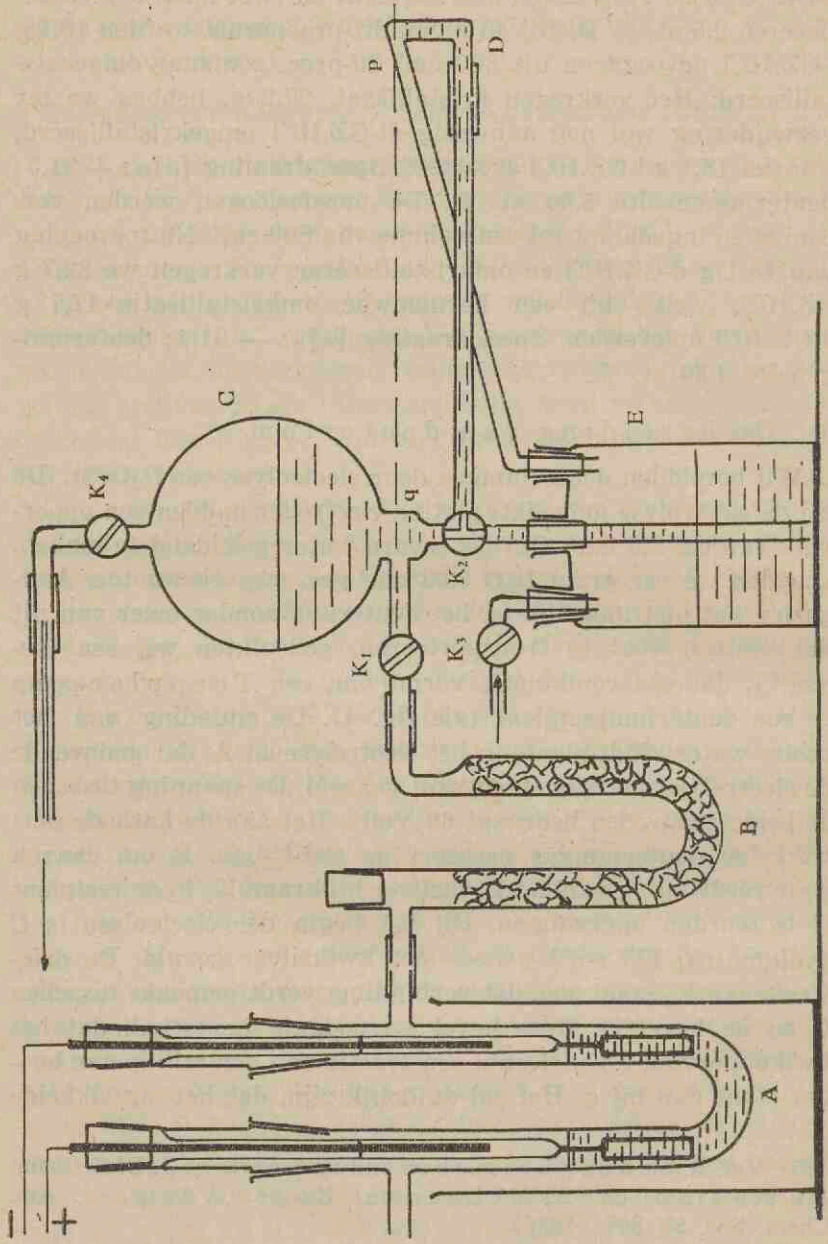


Fig. 4.

deuteriumgas slechts een zeer kleine druk behoeft uit te oefenen om zich bij kraan K_1 een weg te banen naar vat C. Kraan K_4 is gesloten, terwijl kraan K_3 geopend is. Wanneer C geheel is gevuld met deuterium, wordt de electrolyse stopgezet en de kranen K_1 en K_4 gesloten. Willen we nu het gas over persen naar het hydreerings-toestel, dan brengen we met behulp van een stikstofbom bij kraan K_3 een druk aan van 0,5 à 1 atm. Door de kraan K_2 zoo te stellen, dat er verbinding is tusschen de Woulfscbe flesch E en vat C, wordt het gas door de nu geopende kraan K_4 via een capillair in het reactievat geperst.

c) De isoleering van GZ uit de tumoren.

Het bepalen van het GZ-gehalte volgens de in dit werk beschreven methode vergt zooveel tijd en moeite, dat het niet goed mogelijk is, al de benoodigde werkzaamheden door één persoon te laten uitvoeren. Eenerzijds vraagt het isoleeren van GZ uit weefselhydrolysaten speciale bedrevenheid, anderzijds is de deuteriumanalyse een allesbehalve eenvoudige procedure. Weliswaar worden de analyses seriegewijze uitgevoerd, echter is dit alleen mogelijk wanneer alle onderdeelen van de analyse, zooals de verbranding, de zuivering van het verbrandingswater etc. voortdurend worden gecontroleerd. Doordat de isoleering van de GZ-paeparaten uit de weefsels werd uitgevoerd door Mej. Dr. H. Erxleben en de analytische werkzaamheden door schrijver van dit proefschrift, konden in de beschikbaar staande tijd veel meer gevallen worden onderzocht, dan door een enkele experimentator. Gaarne dank ik Mej. Dr. H. Erxleben ook op deze plaats voor de aangename en vruchtbare wijze van samenwerken.

De opwerking van het weefsel geschiedde als volgt. Het van duidelijk necrotische deelen bevrijde tumorweefsel werd met behulp van een Latapie-molen fijngemalen. Om er van verzekerd te zijn, dat het geïsoleerde GZ oorspronkelijk uitsluitend als bouwsteen van het proteïne aanwezig was, hebben wij de volgende fractionneering toegepast. De weefselmassa werd met de zesvoudige gewichtshoeveelheid 0,9-proc. NaCl-oplossing en een weinig toluol geschud en 24 uren in de koelkast bewaard. Door centrifugeeren scheidde wij het onoplosbare gedeelte der eiwitten van het oplosbare en waschten

eerstgenoemde fractie telkens twee maal met respectievelijk water, alcohol en aether uit. Aan de NaCl-oplossing voegden wij daarna het vier à vijfvoudige volume 96-proc. alcohol toe en lieten het geheel wederom 24 uren in de ijskast staan. Het uit oplosbare eiwitten bestaande neerslag werd uitgewasschen met 75-proc. alcohol, vervolgens met 96-proc. alcohol en daarna met aether.

Het uitwasschen van het proteïnemateriaal moet zorgvuldig geschieden; zulks met het oog op de storende werking van achtergebleven NaCl bij het isoleeren van het GZ. Immers het GZ wordt tot kristallisatie gedwongen in een sterk zoutzuur milieu, m.a.w. onder omstandigheden, waarbij ook NaCl uit zijn oplossing kristalliseert.

De beide eiwitfracties werden samengevoegd en in vacuo boven P_2O_5 gedroogd. Het gehalte aan GZ werd steeds op het op deze wijze gedroogde eiwit berekend.

Het droge materiaal werd met de drie-voudige gewichtshoeveelheid 37-proc. zoutzuur gehydrolyseerd. Om later te vermelden redenen hebben wij de hydrolysetijd van 7 uren op 20 uren gebracht. In het laatste geval kristalliseerde het GZ moeilijker en langzamer uit. Wanneer het dan ook niet om het absolute gehalte van l- en d-GZ te doen is, verdient de 7-urige hydrolyse de voorkeur.

Na afkoeling van het hydrolysaat voegden we een gelijk volume water toe en filtreerden de grove humusdeelen af. Om het zoutzuur zoo veel mogelijk te verwijderen, werd de zwart gekleurde oplossing in vacuo drooggedampt, hetgeen na toevoeging van gedestilleerd water eenige malen werd herhaald. De achtergebleven donkerbruine stroop losten we in de tienvoudige hoeveelheid water op en schudden deze oplossing ter verwijdering van humusstoffen bij kamertemperatuur met een geringe overmaat Cu_2O -poeder. Laatstgenoemde substantie werd in de loop van ongeveer 10 minuten toegevoegd, totdat de kleur van de laatste portie onveranderd bleef. De onoplosbare koperverbindingen werden afgefiltreerd, het filtraat met zoutzuur aangezuurd en ter verwijdering van de koperionen gedurende ongeveer drie kwartier H_2S ingeleid. De geel gekleurde oplossing, die na filtratie overbleef, kon door koken met noriet worden ontkleurd. Onder vacuum werd tot een visceuze stroop inge-

dampt en deze in een erlenmeyer-kolfje van het 2- à 3-voudige volume overgebracht. Bij het uitvoeren van deze bewerkingen in andere laboratoria heeft men het GZ waarschijnlijk vaak in een veel te verdunde stroop laten uitkristalliseeren, waardoor de oplossing wel aan l- maar niet aan d-GZ.HCl was oververzadigd. Voor de praktische uitvoering kunnen volgende opmerkingen en raadgevingen van dienst zijn. De stroop heeft de juiste consistentie, wanneer het overgieten in het erlenmeyer-kolfje ca. twee uren in beslag neemt. Indien men de kolf vóór het uitgieten op het waterbad verwarmt, kan men het grootste deel van de stroop ook met behulp van een pipet overbrengen. Voor het naspoelen mogen bij de gebruikelijke hoeveelheden hoogstens 1 à 2 cm³ water worden gebruikt. Wanneer de stroop zich in het kolfje bevindt, wordt deze bij 0° met HCl-gas verzadigd. Voor het inleiden gebruike men een nauw buisje. De bellen van het HCl-gas stijgen slechts langzaam naar de oppervlakte; ook hieruit kan men zien hoe viskeus de stroop moet zijn. In de practijk zal het niet moeilijk vallen, aan de hand van bovengenoemde gegevens de juiste concentratie te vinden. Voor alle zekerheid echter geven wij nog het volgende getallenvoorbeeld: uit 8 g gedroogd proteïnemateriaal werden 7,1 à 7,3 g stroop verkregen en hierbij in totaal 3 cm³ water toegevoegd.

Daarna entten wij met l- en d-GZ.HCl en bewaarden het met een kurk afgesloten kolfje in de koelkast (—2°). In de regel werd het uitgekristalliseerde GZ.HCl na vier dagen afgefiltreerd; onder zekere omstandigheden moet men 7 of, bij wijze van uitzondering, 14 dagen wachten, voordat zich de normale kristallen hebben gevormd. Het affiltreeren van de kristalbrei, welke zich in de viskeuze stroop bevindt, voerden wij aldus uit, dat we het kolfje omgekeerd boven het glasfilter (G 3) bevestigden, zoodat de taaie massa langzamerhand vanzelf op het filter liep. Na scherp afzuigen werd met een weinig op 0° afgekoeld zoutzuur gewasschen en het uit kleurlooze kristallen bestaande hydrochloride in vacuo boven NaOH gedroogd. Het filtreeren duurt lange tijd; vaak komt het voor, dat in de kristalbrei op het filter sleuven ontstaan, waardoor verder afzuigen geen nut meer heeft. In dat geval roert men onder toevoeging van enkele druppels ijskoud geconcentreerd zoutzuur de brei

door elkaar, tengevolge waarvan weer een homogene laag wordt gevormd.

Ter verkrijging van een tweede kristallisaat dampten we de moederloog wederom tot een taaie stroop in en verzadigden opnieuw bij 0° met HCl-gas. Na herhaald enten en bewaren in de koelkast kon na 4 à 7 dagen een tweede fractie van het GZ.HCl worden afgefiltreerd. In de regel hadden we aan twee fracties voldoende. Slechts zelden kwam het voor, dat we ter verkrijging van een derde of vierde fractie genoemde bewerking moesten herhalen. Voor het omkristalliseeren werden de aldus verkregen fracties vereenigd en uit zoo weinig mogelijk 20-proc. zoutzuur omgekristalliseerd. Dit voerden wij aldus uit, dat we het ruwe hydrochloride in een kolfje met weinig zoutzuur aan de kook brachten en de laatste kristallen met een druppel zoutzuur oplosten. De op deze wijze bij het kookpunt verzadigde oplossing werd na afkoeling met l- en d-GZ.HCl geënt en tenminste gedurende 24 uren in de ijskast bewaard. Van het verkregen kristallisaat bepaalden we de specifieke draaiing. Betreffende de opbrengst bij het omkristalliseeren zij er wederom met klem op gewezen, dat het gewichtsverlies slechts 10, maximaal 15 % mag bedragen.

Uit de specifieke draaiing van het geïsoleerde GZ kan worden berekend, uit hoeveel 20 proc. zoutzuur men moet omkristalliseeren om een scheiding tusschen l- en dl-GZ.HCl teweeg te brengen. Wij voerden dit aldus uit, dat het eerst uitkristalliseerende l-GZ.HCl nog een weinig van de dl-verbinding bevatte. Aangezien het dl-GZ.HCl twee maal zoo goed oplosbaar is als het l-GZ.HCl, laat eerstgenoemde verbinding zich vrij gemakkelijk door eenige malen omkristalliseeren verwijderen.

Om er zeker van te zijn, dat een bepaald praeparaat uit zuiver dl-GZ bestond, werd voor en na het omkristalliseeren gecontroleerd of inderdaad geen optische draaiing te constateeren was. Indien het praeparaat een kleine overmaat aan l- of d-GZ bevatte, zou dit in het nieuwe kristallisaat geconcentreerd worden, hetgeen door het bepalen van de specifieke draaiing onmiddellijk aan het licht zou treden. Het l-GZ.HCl werd omgekristalliseerd tot constante specifieke draaiing. Deze werd doorgaans bepaald van een 5 proc. oplossing van het vrije GZ in 9 proc. zoutzuur. Van de aldus gezuiverde praeparaten van l- en dl-

GZ.HCl werden C-, H- en N-analysen uitgevoerd en indien deze in orde waren, het deuteriumgehalte bepaald.

Op de hier beschreven methode is het met een weinig routine relatief eenvoudig om GZ met een opbrengst van ca. 9 % betrokken op het droge eiwit, te isoleren. Met nadruk moge er op worden gewezen, dat het bij het analyseeren volgens de verdunningsmethode natuurlijk niet zoozeer op een hooge opbrengst, wel echter op volkomen zuivere praeparaten aankomt.

d) Berekening en foutendiscussie.

Voordat we overgaan tot het bespreken van de berekening en de mogelijke fouten, welke bij de analyse een rol kunnen spelen, moge ter toelichting van de in de deuterium-chemie gebruikelijke uitdrukkingen, het volgende worden vermeld.

Wanneer we met een mengsel van D_2O en H_2O te doen hebben, drukken wij het gehalte aan deuteriumoxyde uit in gewichtsprocenten D_2O (gew. % D_2O). Mengt men 10 g D_2O met 90 g H_2O , dan is dit een mengsel, dat 10 gew. % D_2O bevat.

Hebben we nu te doen met organische verbindingen, waarvan één of meerdere atomen waterstof door deuterium zijn vervangen, dan bestaat er ook een andere manier om het deuteriumgehalte aan te geven. Veronderstellen we, dat van een verbinding als GZ.HCl ($C_5H_{10}O_4NCl$) met 10 waterstofatomen, 1 H-atoom is vervangen door 1 D-atoom. In dat geval zeggen we, dat het molecuul 10 atoomprocenten deuterium (at. % D.) bevat. Wordt een gedeutereerde organische verbinding verbrand, dan zal het verbrandingswater eenzelfde atoomprocentage deuterium hebben als het verbrande uitgangsmateriaal. Een verbinding, als het bovengenoemde GZ.HCl, welke 1 D-atoom bevat op 10 waterstofatomen*), zal bij de verbranding een mengsel van D_2O en H_2O geven, waarin zich op iedere 10 waterstofatomen 1 deuteriumatoom m.a.w. 10 at. % D bevindt.

*) Waterstof moeten we hier opvatten als een mengsel van protium (1H) en deuterium (2H).

Aangezien we eenerzijds met gew. % D₂O en anderzijds met at. % D te doen hebben, is het wenschelijk over een formule te beschikken, welke het verband tusschen deze beide weer- geeft. Een dergelijke mogelijkheid verschaft ons onderstaande betrekking:

$$\text{at. \% D} = \frac{900 \cdot \text{gew. \% D}_2\text{O}}{1000 - \text{gew. \% D}_2\text{O}} \quad 56)$$

Voor kleine percentages beteekent deze formule:

$$\text{at. \% D} = 9/10 \text{ gew. \% D}_2\text{O}.$$

Het analyseeren van een weefsel met behulp van de verdun- ningsmethode wordt nu als volgt uitgevoerd. Bij het begin van de hydrolyse van a g (gewicht van het gedroogde eiwit) weef- sel, voegen we b g gedeutereerd l-GZ met C₀ at. % D toe. Na afloop van de hydrolyse wordt eerst het l-GZ geïsoleerd. Dit GZ is een mengsel van het toegevoegde l-GZ en het uit het eiwit afkomstige GZ. Veronderstellen we, dat dit praeparaat C₁ at. % D bevat, dan laat zich uit deze gegevens het gehalte aan l-GZ in het proteïne berekenen. b g gedeutereerd l-GZ mengt zich met x g GZ uit het weefsel, zoodat de evenredigheid geldt:

$$b : (b + x) = C_1 : C_0$$

$$\text{Dus:} \quad x = (C_0/C_1 - 1) \cdot b \quad (1)$$

Het gehalte y aan l-GZ in het weefseleiwit kunnen we nu procentsgewijze als volgt uitdrukken:

$$y = (C_0/C_1 - 1) \cdot b/a \cdot 100 \% \quad (2)$$

Het gehalte aan d-GZ bepalen we analoog door gedeutereerd d-GZ toe te voegen. Het geïsoleerde mengsel van l- en d-GZ.HCl wordt gesplitst in l- en dl-GZ.HCl. Het dl-GZ.HCl wordt ge- analyseerd. Aangezien van het praeparaat de helft uit l-GZ be- staat, dat geen deuterium bevat, moeten we, om het deuterium- gehalte te vinden van d-GZ, de gevonden waarden met twee vermenigvuldigen.

56) Ook met behulp van een eenvoudige grafiek laat zich at. % D in gew. % D₂O omzetten. Vgl. W. Frank en J. Mönch, Ann. 550, 12 (1941).

In de practijk voegen we meestal het gedeutereerde GZ in de vorm van het hydrochloride toe. Voor C_0 en C_1 vullen we dan het deuteriumgehalte van GZ.HCl in. Bevat een praeparaat van vrij GZ 5,00 at. % D, dan zal het deuteriumgehalte bij omzetting in het hydrochloride $9/10 \cdot 5,00$ at. % D = 4,50 at. % D bedragen.

Zooals we hebben gezien, bepalen we het gehalte aan GZ met behulp van de formule 2. De fouten, welke gemaakt worden bij het afwegen van het weefselproteïne en van het toegevoegde gedeutereerde GZ, zijn zoo klein vergeleken met de fouten van de deuteriumanalyse, dat we deze bij de foutendiscussie buiten beschouwing mogen laten.

Wanneer we aannemen, dat de te analyseren stoffen zuiver zijn, wordt de fout in y uitsluitend bepaald door de fouten in C_0 en C_1 . Bij de deuteriumanalyse moeten we met een gemiddelde relatieve fout van 1 % rekening houden. Beneden 0,40 at. % D wordt de fout grooter.

We willen nu nagaan, welke invloed de verhouding C_0/C_1 op de fout uitoefent. Stellen we $C_0 = 5,00$ at. % D en nemen we voor C_1 respectievelijk 0,50, 1,00, 1,50, 2,00 en 2,50 at. % D, dan vinden we voor de relatieve fout in y resp. 2,2, 2,5, 2,9, 3,3 en 4,0 %. Hieruit blijkt, dat de fout het kleinst is bij een hooge waarde van de breuk C_0/C_1 . Deze fout nadert asymptotisch de waarde van 2,0 %. Een hooge waarde van de genoemde breuk bereiken we door een gedeutereerd GZ met een hoog deuteriumgehalte te gebruiken.

Men moet rekening houden met het feit, dat deze beschouwing betreffende de proeffout slechts op één analyse betrekking heeft, m.a.w. wanneer we van het toegevoegde en het geïsoleerde GZ slechts één analyse uitvoeren, hebben we een minimale fout van 2 %. We kunnen de fout kleiner maken door van een voldoende hoeveelheid van het toe te voegen gedeutereerde GZ uit te gaan. Hiermede bereiken we, dat we van het gemerkte GZ, door het uitvoeren van meerdere deuteriumanalyses, het deuteriumgehalte nauwkeurig (met een fout kleiner dan 1 %) kunnen vaststellen. Wordt nu dit GZ bij een reeks weefselanalyses gebruikt dan kunnen we C_0 in de formule als een constante opvatten. Dit heeft tengevolge, dat de bovengenoemde reeks van relatieve fouten nagenoeg wordt gehalveerd

en dat bij een gunstige verhouding van C_0/C_1 de relatieve fout in y tot 1 % nadert.

Dat wij er de voorkeur aan gaven de antipoden van het gedeutereerde GZ aan het hydrolysaat toe te voegen in plaats van de dl-verbinding, heeft de volgende reden. Wanneer we gedeutereerd dl-GZ toevoegen, wordt het geïsoleerde GZ gesplitst in l- en dl-GZ. Eerst bepalen we het gehalte C_1 in l-GZ, om daarna met behulp van het deuteriumgehalte C_{dl} van de dl-verbinding, gebruik makende van de formule

$$2 C_{dl} = C_d + C_1 \quad (3)$$

het deuteriumgehalte C_d van het d-GZ te berekenen. Voegen we aan het hydrolysaat gedeutereerd d-GZ toe, dan stelt de analyse van het geïsoleerde dl-GZ ons alleen reeds in staat C_d te bepalen. Immers, aangezien het l-GZ geen deuterium bevat ($C_1 = 0$), laat zich C_d uit formule 3 berekenen. Het zal duidelijk zijn, dat de fout in het laatste geval kleiner is dan in het eerste.

Gaan we de zuiverheid van de diverse, bij de weefselanalyse voorkomende substanties na, dan moeten we beginnen met op te merken dat het uitgangsmateriaal, nl. het gedroogde weefselproteïne, naast variabele hoeveelheden anorganische zouten, nog andere stoffen bevat, waardoor een zekere onnauwkeurigheid wordt teweeg gebracht. Zooals reeds werd opgemerkt betrekken we de percentages GZ op dit materiaal. Andere auteurs berekenen het eiwitgehalte uit het totale stikstofgehalte van het hydrolysaat door vermenigvuldiging met 6,25. Ook in dit geval is het werkelijke eiwitgehalte vermoedelijk geringer.

De als „indicator” gebruikte praeparaten mogen op grond van de bovengenoemde analytische controle als volkomen zuiver worden beschouwd. Het uit de hydrolysaten geïsoleerde GZ kan verontreinigd zijn met anorganische zouten of andere aminozuren. Eerstgenoemde verontreinigingen spelen bij de analyse geen rol, mits het praeparaat onverdund wordt verbrand. Verontreinigingen van organische aard kunnen een fout veroorzaken. Aangezien echter het geïsoleerde GZ door elementairanalyse en specifieke draaiing op zijn zuiverheid wordt gecontroleerd, kan hierbij slechts sprake zijn van kleine fouten.

Een eerste vereischte voor een goede analyse is, dat het toege-

voegde gedeutereerde GZ zich volkomen mengt met het in het hydrolysaat aanwezige GZ. In verband hiermede moet men rekening houden met het evenwicht, dat er bestaat tusschen GZ en pyrrolidon- α -carbonzuur. Op grond van de experimenten van H. Wilson⁵⁷⁾ en R. Keith Cannan hebben S. Graff²⁶⁾, D. Rittenberg en G. L. Foster het noodig geacht na de toevoeging van het gemerkte GZ nog 3 uren te koken, „to insure equilibration of the added glutamic acid with pyrrolidone-carboxylic acid”. Bij het analyseeren van fibrine hebben genoemde onderzoekers het gemerkte GZ één keer ook vóór de hydrolyse toegevoegd; dit had echter geen invloed op de resultaten, zoodat zij in het vervolg bij eerstgenoemde werkwijze bleven.

In het volgende hoofdstuk zullen we de ervaringen bespreken, die we zelf hebben opgedaan betreffende de beslissende rol, welke de volledige menging van toegevoegd en aanwezig GZ bij de analyse speelt.

57) J. Biol. Chem. 119, 309 (1937).

HOOFDSTUK IV.

RESULTATEN VAN DE WEEFSELANALYSEN.

Zooals wij hadden verwacht, kon vanaf de eerste bepalingen in hydrolysaten van tumoren op overtuigende wijze een gehalte aan d-GZ worden aangetoond en ook wat betreft de hoeveelheid, vertoonden de uitkomsten geen belangrijke afwijking met de vroegere resultaten van K ö g l en E r x l e b e n. Natuurlijk hebben wij aanvankelijk de 7-urige hydrolyse toegepast en het hydrolysaat — na toevoeging van gedeutereerd GZ — opgewerkt volgens de in ons laboratorium beproefde wijze. Aangezien wij bij de eerste reeks analyses slechts de beschikking hadden over uitwisselings-GZ, moest het koken van de zure oplossing, ter verkrijging van een betere menging, worden vermeden. Daarentegen hadden wij bij deze praeparaten van deuterio-GZ het voordeel, dat de analyses reeds konden worden uitgevoerd door de l- en de d-vorm gescheiden toe te voegen.

De resultaten van de eerste reeks analyses vinden we in tabel IV. De laatste kolom vermeldt de „racemisatiegraad”. Door deze grootheid wordt aangegeven, hoeveel procent van de totale hoeveelheid GZ in de dl-vorm voorkomt. In de vroegere publicaties van K ö g l⁵⁸⁾ en E r x l e b e n werd ter karakteriseering van de onderzochte tumoren het percentage d-vorm van de totale hoeveelheid GZ vermeld, welke waarde de helft bedraagt van de racemisatiegraad. Weliswaar moeten wij het als een nadeel beschouwen, dat de naam racemisatiegraad de indruk wekt, alsof een partieele racemiseering van het GZ (bv. ten gevolge van de hydrolyse) had plaats gevonden, hetgeen hier heelemaal niet het geval is. Integendeel, het begrip racemisatiegraad dient tot uitdrukking te brengen hoeveel dl-GZ er naast l-GZ, reeds als bouwsteen der proteïnen, voorkomt.

Uit de resultaten van tabel IV blijkt, dat de racemisatiegraad der onderzochte tumoren een goede overeenstemming vertoont met die waarden, welke vroeger werden verkregen met be-

58) F. K ö g l en H. E r x l e b e n, Z. physiol. Chem. 264, 108 (1940).

No.	Weefsel	Gew. proteïne in g		Toegevoegd gedent. GZ. HCl				Geïsoleerd GZ. HCl			Percentage GZ			Racem. graad %
		l-	d-	Gew. in mg		At % D		Cl	At % D	Ca	l-	d-	totaal	
				l-	d-	l-	d-							
1a	Brown-Pearce-tumor (konijn)	9,5	106	6,36	6,75	1,55	1,24	8,1	4,1	12,2	67,2			
b		9,5		6,59		1,67						1,75	7,4	2,7
2	Brown-Pearce (konijn)	6,-	(dl)	6,36	6,75	1,26	2,02	11,8	1,7	13,5	25,2			
3a	Benzopyreen-tumor (rat)	5,5	50	5,10	5,85	0,56	1,79	8,9	1,25	10,2	24,6			
b		5,5		5,10		1,34						2,69	12,3	1,3
4a	Benzopyreen-tumor (rat)	4,-	37,5	5,10	5,85	0,99	2,92	9,1	1,1	10,2	21,6			
b		5,5		5,10		1,20						2,43	10,6	1,3
5a	Benzopyreen-tumor (rat)	4,-	74,9	6,38	6,50	1,50	1,70	9,-	1,1	10,1	21,8			
b		5,5		5,10		5,85						1,18	2,25	10,4
6a	Benzopyreen-tumor (rat)	3,5	50	5,10	5,85	0,99	1,48	12,5	3,8	16,3	46,6			
b		5,5		5,10		5,85						1,41	16,2	50,6
7a	Benzopyreen-tumor (rat)	5,-	81,2	5,10	5,85	1,01	1,58	4,5	0,06	4,5	2,-			
b		5,-		5,10		5,85						1,46	5,8	2,4
8a	Flexner-tumor (rat)	10,-	(dl)	6,66	6,75	0,59	4,75	9,7	0,4	10,1	8,-			
9a	Flexner-tumor (rat)	3,5	50	5,10	5,85	1,18	2,25	10,4	1,2	11,6	20,6			
10a	Prim. long-tumor (mensch)	5,-	81,2	5,10	5,85	0,99	1,48	12,5	3,8	16,3	46,6			
b		5,-		5,10		5,85						1,41	16,2	50,6
11a	Levermetastasen (mensch)	5,-	81,2	5,10	5,85	1,01	1,58	4,5	0,06	4,5	2,-			
12a	Norm. organen en weefs. (rat)	10,-	218,5	5,10	5,85	1,46	5,65	5,8	0,07	5,8	2,4			
b		10,-		5,10		5,85						1,46	5,8	2,4
13a	Norm. lever (konijn)	7,5	218,5	5,10	5,85	1,45	5,59	5,-	0,07	5,-	2,8			
b		7,5		5,10		5,85						1,45	5,59	2,8
14a	Norm. spierweefs. (konijn)	10,-	218,5	6,66	6,75	0,59	4,75	9,7	0,4	10,1	8,-			
b		11,-		6,66		6,75						9,7	10,1	8,-
15a	Lymphatische leucose (milt)	8,-	93,7	6,66	6,75	0,59	4,75	9,7	0,4	10,1	8,-			

TABEL V.

Weefselanalyses met behulp van het gedeutereerde GZ volgens K n o o p, toegevoegd bij het begin van de 7-urige hydrolyse.

No.	Weefsel	Gew. proteïne in g	Toegevoegd gedeut. dl-GZ. HCl		Geïsoleerd GZ. HCl		Percentage GZ			Racem. graad %
			Gew. in mg	At % D	At % D		l-	d-	totaal	
					Cl	Cd				
16	Brown-Pearce	5,-	31,2	8,46	0,20	0,44	10,3	4,6	14,9	61,8
17	Brown-Pearce	5,-	68,7	8,46	0,61	1,05	7,1	3,9	11,-	71,-
18	Brown-Pearce	5,-	150	8,46	1,13	2,33	7,8	3,2	11,-	58,2
19	Brown-Pearce	4,-	250	8,46	1,97	3,49	8,2	3,6	11,8	61,-

hulp van de specifieke draaiing; in het bijzonder valt het op, dat we evenals vroeger bij de B r o w n-P e a r c e-tumoren wederom een twee keer zoo groote racemisatiegraad als bij de benzopyreen-tumoren van de rat aantreffen. Wel was het opmerkelijk, dat het totale gehalte aan GZ niet hoger werd gevonden, ofschoon door K ö g l²²⁾ en E r x l e b e n uit hydrolysaten van B r o w n-P e a r c e-tumoren reeds 12,9 % GZ waren geïsoleerd. Dat onze werkmethode in kwantitatief opzicht inderdaad nog niet geheel en al voldeed, blijkt uit de percentages l-GZ, gevonden in normaal weefsel, welke beslist te laag zijn.

Ondertusschen kregen wij de beschikking over het volgens de K n o o p'sche reactie bereide deuterio-GZ, hetwelk — na op de reeds beschreven wijze te zijn behandeld — bij koken met zoutzuur geen deuterium verliest. De toevoeging van dit GZ kon nu bij het begin van de hydrolyse geschieden. Zooals tabel V toont, had dit noch op de opbrengst aan GZ, noch op de racemisatiegraad eenige invloed; bij analyse No. 16 vinden we de opbrengst, bij analyse No. 17 daarentegen de racemisatiegraad hoger dan in de andere gevallen. Ter verklaring van de lage percentages l-GZ in de onderzochte hydrolysaten van normale weefsels, zouden we kunnen aanvoeren, dat de hydrolyse van deze proteïnen langzamer verloopt. Natuurlijk kan men eerst het absolute gehalte verwachten, wanneer alle peptide-

bindingen van GZ zijn opengesplitst; in eerste instantie was het daarom onze taak de invloed van langere duur van de hydrolyse na te gaan. Bij de volgende experimenten hydrolyseerden wij de weefselproteïnen in totaal gedurende 20 uren, en wel werd telkens 10 g materiaal (normaal kalfshart) 17 uren gehydrolyseerd, waarna naast 187 mg van het stabiele deuterio-GZ-HCl 225 mg gewoon d-GZ werden toegevoegd; welke bij de analyse moesten worden teruggevonden. Hierna werd de zoutzure oplossing nog 3 uren gekookt, zooals dat bij de analyses van S. Graff, G. L. Foster en D. Rittenberg ter bereiking van het evenwicht met pyrrolidon- α -carbonzuur was geschied. De beide op deze wijze uitgevoerde analyses gaven een zeer merkwaardige uitkomst; weliswaar vonden wij een gehalte van 14 resp. 14,7 % l-GZ, daarentegen konden we van de toegevoegde 225 mg d-GZ slechts 60 resp. 59 mg terugvinden. Het was onder deze omstandigheden alleszins begrijpelijk, dat een op analoge wijze uitgevoerde analyse van een Brown-Pearce-tumor, waarbij geen gewoon d-GZ was toegevoegd, eveneens een belangrijk tekort aan d-GZ leverde. Hier vonden we naast 10,5 % l-GZ slechts 1,3 % d-GZ, hetgeen overeenkomt met een racemisatiegraad van 22 %. Het ligt voor de hand om in de verrassende uitkomsten van de laatstgenoemde experimenten een verklaring te zien voor de negatieve resultaten der Amerikaansche auteurs; immers het feit, dat ongeveer 2/3 deel van het toegevoegde gewone d-GZ „verdwijnt”, kan niet worden genegeerd. Of hierbij nog andere factoren een rol spelen, zou door proeven op grootere schaal moeten worden uitgemaakt, hetgeen niet het primaire doel van ons werk was. In ieder geval is de conclusie gerechtvaardigd, dat een gedeelte van het d-GZ in het hydrolysaat onder de bovengenoemde proefomstandigheden in een dergelijke vorm voorkomt, welke een volkomen menging met het toegevoegde „zwarte” d-GZ niet of niet voldoende mogelijk maakt.

Dat hierbij het pyrrolidon- α -carbonzuur een rol kan spelen, is niet ondenkbaar. Weliswaar wordt volgens de onderzoekingen van H. Wilson⁵⁷⁾ en R. Keith Cannan het pyrrolidon- α -carbonzuur in sterk zuur milieu (2 n-zoutzuur) practisch volledig in GZ omgezet. Volgens deze auteurs bereikt men een hydrolyse van het anhydried door genoemde oplossing ge-

durende 1 à 2 uur bij 100° te verhitten. Men dient echter niet te vergeten, dat genoemde onderzoekers het evenwicht bestudeerd hebben aan zuivere oplossingen, m.a.w. wij achten het niet toelaatbaar de resultaten van dergelijk experiment zonder meer toe te passen op een ingewikkeld systeem, als een eiwithydrolysaat. Hierbij komt nog, dat wij meerdere malen met het uitzonderlijke gedrag van een hydrolysaat hebben kennis gemaakt. Wij willen in dit verband wijzen op de bij de methode van Foreman geconstateerde splitsing van het dl-GZ onder invloed van het asymmetrische milieu van het hydrolysaat. Uit een en ander mogen we concludeeren, dat de omstandigheden, waaronder Graff en zijn medewerkers hun analyses hebben uitgevoerd, met name het koken gedurende 3 uren om het evenwicht te bereiken, geen garantie biedt voor een volkomen menging van het toegevoegde gedeutereerde en het aanwezige GZ.

In aansluiting met genoemde experimenten voerden wij een reeks modelproeven uit met pyrrolidon- α -carbonzuur. Eenerzijds onderzochten wij de snelheid, waarmede het evenwicht tusschen pyrrolidon- α -carbonzuur en GZ wordt bereikt, anderzijds voegden wij pyrrolidon- α -carbonzuur toe aan eiwithydrolysaten om het effect daarvan na te gaan. Eerstgenoemde proeven lieten zich eenvoudig uitvoeren, door het dl-pyrrolidon- α -carbonzuur te mengen met een der gedeutereerde antipoden van GZ. Na een week opgelost te zijn geweest in 20-proc. zoutzuur, bij 0° , werd de oplossing geconcentreerd en het GZ geïsoleerd. Uit de vermindering in het deuteriumgehalte van laatstgenoemde stof liet zich berekenen welk deel van het pyrrolidon- α -carbonzuur zich had omgezet. De resultaten van deze proeven stemden, voor zoover vergelijking mogelijk is, dusdanig met die van Wilson en Keith Cannan overeen, dat onder de genoemde omstandigheden het pyrrolidon- α -carbonzuur zich voor ca. $2/3$ deel in GZ had omgezet.

Bij de proeven, waarbij het pyrrolidon- α -carbonzuur aan hydrolysaten werd toegevoegd, trachtten wij door sterke verdunning na afloop der hydrolyse gunstige omstandigheden te scheppen voor de dissociatie van het eventuele complex, bestaande uit d-GZ (resp. d-pyrrolidon- α -carbonzuur) en een onbekende asymmetrische substantie. Daarna werd eerst het

gedeutereerd GZ toegevoegd en de ca. 70-voudig verdunde oplossing nog 3 uren gekookt. Al deze experimenten brachten ons echter niet verder, zoodat wij hierop niet nader zullen ingaan.

Wij bereikten ten slotte ons doel door een simpele wijziging in de tot nu toe gebruikte werkwijze, waardoor wij in staat waren het gewone d-GZ, dat we aan een normaal weefsel toevoegden, nagenoeg quantitatief terug te vinden. Het bleek namelijk, dat alle moeilijkheden omzeild konden worden door het gedeutereerde zoowel als het gewone d-GZ bij het begin van de hydrolyse toe te voegen. Immers daardoor werd bereikt, dat zoowel het toegevoegde GZ als wel het gedurende de hydrolyse in vrijheid gestelde GZ aan dezelfde invloeden blootstaan.

Men zal zich afvragen, waarom de analyses vermeld in tabel V, niet reeds betere resultaten hadden opgeleverd, aangezien ook daar vóór de hydrolyse het gedeutereerde GZ werd toegevoegd. Men dient echter niet buiten beschouwing te laten, dat hierbij slechts 7 uren werd gehydrolyseerd, hetgeen volgens onze ervaringen beslist te kort is om een volledige eiwit-hydrolyse te bewerkstelligen.

Behalve het toevoegen vóór de hydrolyse en de 20-urige hydrolyse moeten we nog met een derde factor rekening houden. Hoewel niet van zooveel beteekenis, komt deze toch de betrouwbaarheid van de analyses ten goede. Wij hebben n.l., evenals bij de eerste reeks analyses, telkens bij duplobepalingen het gedeutereerde l- resp. d-GZ toegevoegd, welke nu echter stabiel gebonden deuterium bevatten, gezien de bereiding uit het volgens de synthese van Knoop verkregen dl-GZ.

Door deze onafhankelijke uitvoering van de analyses bereikten we, dat een eventueele fout bij de bepaling van l-GZ geen invloed heeft op de waarde van d-GZ.

De analyses van enkele normale weefsels vinden we in tabel VI.

Zooals uit de tabel blijkt, werden van de toegevoegde hoeveelheden d-GZ gemiddeld 97 % teruggevonden; het kleine tekort

TABEL VI.

Analysen van normaal weefsel, waarin bij de aanvang van de 20-urige hydrolyse naast stabiel, deuterium bevattend l- en d-GZ.HCl, gewoon d-GZ.HCl werd toegevoegd.

No.	Weefsel	Gew. Proteïne in g	Toegevoegd GZ. HCl					Geisol. GZ. HCl		Gewicht terugge- vonden gewoon d-GZ.HCl in mg	Percen- tage GZ		Racemisatie graad %	
			gedeuteerd				gewoon d-	At. % D			l-	d-		
			Gew. in mg		At % D			Cl	Cd					
			l-	d-	l-	d-								
20a	Normaal rattenor- ganisme	6,-	300		4,45			400	0,91			15,6		
b		6,-		300		4,65			2,08	371			(-0,4)	(-5)
21a	Normaal rattenor- ganisme	6,-	300		4,45			400	0,92			15,3		
b		6,-		300		4,65			2,02	391			(-0,1)	(-1,2)
22a	Normaal kalfshart	7,-	230		5,00			400	0,83			13,2		
b		6,-		300		4,80			2,07	396			0,0	0,0
23a	Normaal kalfshart	7,-	230		5,00			400	0,80			13,8		
b		6,-		300		4,80			2,09	389			(-0,1)	(-0,7)
24a	Mensche- lijke placenta (à terme)	6,-	300		4,45			400	1,04			13,1		
b		6,-		300		4,65			1,97	408			0,1	1,6
25a	Mensche- lijke placenta (à terme)	6,-	300		4,45			400	1,08			12,5		
b		6,-		300		4,65			2,06	377			(-0,3)	(-4,6)

verklaart de in de tabel voorkomende negatieve waarden van de racemisatiegraad. Wanneer we de vele bewerkingen, die bij de analyse een rol spelen, in aanmerking nemen, mogen we de resultaten als zeer bevredigend beschouwen. In tabel VII treffen we een reeks op analoge wijze uitgevoerde analyses van verschillende typen van gezwellen aan.

Tabel VII bevat o.a. de analyses van eenige menselijke gezwellen. Zoals vroeger reeds door K ö g l ⁵⁹⁾ en E r x l e b e n was meegedeeld, werd uit de hydrolysaten van goedaardige myoomgezwellen vooral leucine met een duidelijke depressie van

59) F. K ö g l en H. E r x l e b e n Z. physiol. Chem. 261, 154 (1939).

TABEL VII.

Analysen van tumoren, waarin bij de aanvang van de 20-urige hydrolyse stabiel deuterium bevattend l- en d-GZ werden toegevoegd.

No.	Weefsel	Gew. proteïne in g	Toegevoegd ge-deut. GZ. HCl.				Geïsol. GZ.HCl.		Percentage GZ			Racem.-graad %
			Gew. in mg		At % D		At % D		l-	d-	totaal	
			l-	d-	l-	d-	Cl	Cd				
26a b	Brown-Pearce	10,- 8,-	550 500		2,73 2,99		0,67 1,62		13,5 4,2	17,7	48,-	
27a b	Brown-Pearce	10,- 6,-	550 410		2,73 2,99		0,69 1,79		13,- 3,7	16,7	44,-	
28a b	Benzo-pyreen	9,- 11,-	550 550		2,73 2,99		0,79 2,04		12,- 1,9	13,9	27,4	
29a b	Methyl-cholan-treen (rat)	6,- 8,-	300 300		4,45 4,65		1,05 3,06		13,- 1,6	14,6	22,-	
30a b	Methyl-cholan-treen (rat)	6,- 8,-	300 300		4,45 4,65		1,05 3,06		13,- 1,6	14,6	22,-	
31a b	Primaire Flexner-Jobling-ca (rat)	6,- 10,-	300 300		4,45 4,65		0,94 0,95 2,98 2,92		14,9 14,7 1,34 1,42	16,2 16,1	17,-	
32a b	Flexner-Jobling-metastasen (rat)	5,- 7,-	300 300		4,45 4,65		1,20 1,20 2,64 2,66		13,- 2,6 2,6	15,6	33,4	
33a b	Uterus-myoom (mensch)	6,- 8,-	300 400		4,45 4,65		0,92 0,92 4,36		15,3 0,3	15,6	3,6	
34a b	Uterus-myoom (mensch)	6,- 8,-	300 400		4,45 4,65		0,98 0,98 4,43		14,2 0,2	14,4	2,8	
35a b	Levermetastasen Adeno-ca	8,- 7,-	270 300		5,00 4,80		0,84 2,34		13,4 3,6	17,-	42,4	
36a b	Levermetastasen ca-Simplex	8,- 7,-	270 300		5,00 4,80		0,93 2,44		11,8 3,3	15,1	43,7	
37a b	Ovariaal-ca.	8,- 7,-	270 300		5,00 4,80		0,79 2,23		14,4 4,-	18,4	43,5	

TABEL VIII.

C-, H- en N-analysen der GZ.HCl praeparaten.

C-, H- en N-analyse berekend voor GZ.HCl : 32,70% C,
5,49% H en 7,64% N.

Weef- sel An. No.	C- en H-analyse					N-analyse				
	Gew. verbr. stof in mg	mg CO ₂	mg H ₂ O	% C	% H	Gew. verbr. stof in mg	cm ³ N ₂	t in °C	p in mm Hg	% N
1a	4,080	4,88	2,01	32,62	5,51	4,048	0,265	22	766	7,64
1b	4,089	4,92	1,98	32,82	5,42	4,345	0,297	24	749	7,74
2a	3,855	4,62	1,88	32,69	5,46	3,990	0,262	23	765	7,62
2b	4,201	5,03	2,05	32,66	5,46	4,219	0,274	22	765	7,56
3a	3,938	4,71	1,92	32,62	5,46	4,661	0,305	22	765	7,62
3b	3,849	4,61	1,88	32,66	5,47	4,184	0,277	22	765	7,71
4a	4,474	5,35	2,22	32,61	5,55	3,826	0,256	29	764	7,60
4b	3,970	4,77	1,94	32,77	5,47	2,984	0,199	29	764	7,58
5a	4,162	4,99	2,05	32,70	5,51	4,046	0,273	29	766	7,69
5b	4,180	5,03	2,04	32,82	5,46	3,402	0,226	29	766	7,57
6a	3,893	4,66	1,95	32,65	5,60	4,294	0,292	30	764	7,70
6b	4,398	5,28	2,18	32,74	5,55	3,318	0,227	29	764	7,77
7a	3,888	4,67	1,94	32,76	5,58	4,768	0,326	30	764	7,74
7b	4,120	4,94	2,02	32,70	5,49	4,098	0,274	29	764	7,60
8a	4,189	5,02	2,06	32,68	5,50	4,465	0,295	21	765	7,72
8b	4,768	5,70	2,31	32,60	5,42	4,178	0,276	21	765	7,72
9a	4,420	5,29	2,14	32,64	5,42	4,272	0,277	23	770	7,58
9b	4,257	5,11	2,07	32,74	5,44	2,992	0,198	22	764	7,70
10a	4,498	5,38	2,19	32,62	5,45	4,762	0,313	23	770	7,68
10b	4,002	4,81	1,93	32,78	5,40	4,276	0,279	22	764	7,59
11a	4,183	5,01	2,03	32,66	5,43	4,454	0,292	23	764	7,60
11b	4,356	5,25	2,12	32,87	5,45	4,649	0,308	23	764	7,68
12a	4,566	5,44	2,22	32,49	5,44	4,557	0,292	22	770	7,51
12b	4,528	5,43	2,20	32,71	5,44	3,705	0,249	28	766	7,68
13a	4,094	4,88	1,97	32,51	5,38	4,477	0,295	22	770	7,72
13b	4,061	4,89	1,98	32,84	5,46	4,101	0,276	27	769	7,75
14a	4,360	5,12	2,19	32,63	5,62	4,452	0,296	23	770	7,77
14b	4,102	4,91	2,05	32,64	5,59	3,568	0,236	28	766	7,56
15a	4,340	5,20	2,12	32,68	5,47	4,638	0,302	22	772	7,65
15b	4,401	5,29	2,16	32,78	5,49	4,561	0,298	22	772	7,68
16a	4,328	5,19	2,13	32,70	5,51	4,661	0,311	26	769	7,71
16b	4,268	5,14	2,15	32,84	5,64	4,201	0,275	24	768	7,60
17a	4,103	4,92	2,01	32,70	5,48	3,834	0,256	25	769	7,74
17b	4,055	4,87	1,98	32,75	5,46	4,477	0,294	25	768	7,60

Zie vervolg tabel pagina 57

Vervolg tabel pagina 56

Weefsel An. No.	C- en H-analyse					N-analyse				
	Gew. verbr. stof in mg	mg CO ₂	mg H ₂ O	% C	% H	Gew. verbr. stof in mg	cm ³ N ₂	t in °C	p in mm Hg	% N
18a	4,443	5,33	2,17	32,72	5,46	3,970	0,263	24	769	7,70
18b	4,500	5,41	2,20	32,79	5,47	4,570	0,300	25	768	7,60
19a	4,154	5,01	2,03	32,89	5,47	3,946	0,263	25	764	7,67
19b	4,290	5,15	2,11	32,74	5,50	4,196	0,278	26	765	7,61
20a	4,432	5,31	2,18	32,68	5,50	4,826	0,317	21	768	7,71
20b	4,758	5,70	2,33	32,67	5,48	3,982	0,269	26	763	7,74
21a	4,679	5,60	2,29	32,64	5,48	4,492	0,302	26	764	7,72
21b	4,035	4,84	1,97	32,71	5,46	4,711	0,310	22	760	7,61
22a	3,550	4,26	1,75	32,73	5,52	4,362	0,293	26	770	7,77
22b	4,208	5,06	2,05	32,79	5,45	4,910	0,327	22	762	7,73
23a	2,093	2,59	1,05	32,45	5,61	2,550	0,170	24	769	7,75
23b	4,600	5,51	2,25	32,67	5,47	4,804	0,318	24	769	7,70
24a	4,581	5,48	2,22	32,63	5,42	4,532	0,303	23	771	7,82
24b	4,570	5,53	2,22	33,00	5,44	4,723	0,317	23	772	7,86
25a	4,162	5,03	2,04	32,96	5,48	4,178	0,279	22	776	7,89
25b	4,239	5,10	2,07	32,81	5,46	4,681	0,313	21	770	7,78
26a	3,844	4,61	1,87	32,71	5,44	4,425	0,291	22	762	7,63
26b	4,631	5,56	2,26	32,74	5,46	4,602	0,300	23	768	7,60
27a	4,770	5,69	2,31	32,53	5,42	4,330	0,285	22	773	7,75
27b	4,379	5,23	2,14	32,57	5,47	4,760	0,309	22	774	7,65
28a	4,405	5,29	2,17	32,75	5,51	5,185	0,344	21	764	7,74
28b	4,363	5,24	2,14	32,75	5,49	4,219	0,284	22	757	7,76
29a	3,812	4,58	1,87	32,77	5,49	4,402	0,287	23	768	7,60
29b	4,328	5,19	2,13	32,70	5,51	4,660	0,311	26	769	7,71
30a	4,652	5,54	2,27	32,48	5,46	4,478	0,300	22	774	7,90
30b	4,093	4,87	1,95	32,51	5,37	4,475	0,294	22	769	7,72
31a	4,564	5,42	2,23	32,50	5,44	4,556	0,291	22	770	7,51
31b	4,445	5,30	2,20	32,46	5,54	4,100	0,270	21	778	7,81
32a	4,175	4,99	2,02	32,56	5,41	4,417	0,292	21	778	7,84
32b	4,494	5,40	2,19	32,77	5,45	4,903	0,317	22	764	7,52
33a	4,250	5,10	2,07	32,73	5,45	5,031	0,344	22	747	7,78
33b	4,243	5,10	2,08	32,78	5,48	4,457	0,295	22	766	7,72
34a	4,922	5,91	2,42	32,75	5,50	4,779	0,314	22	771	7,71
34b	4,349	5,22	2,16	32,73	5,56	4,242	0,276	21	774	7,69
35a	3,866	4,63	1,88	32,66	5,44	3,918	0,260	26	768	7,66
35b	4,409	5,28	2,16	32,66	5,48	4,604	0,305	24	769	7,70
36a	4,114	4,93	2,01	32,68	5,47	4,591	0,305	21	766	7,78
36b	4,289	5,16	2,09	32,81	5,45	4,208	0,280	25	769	7,71
37a	4,494	5,34	2,25	32,41	5,60	5,067	0,322	23	770	7,69
37b	4,569	5,47	2,25	32,65	5,51	4,620	0,306	24	769	7,70

de specifieke draaiing geïsoleerd, terwijl de racemisatiegraad van GZ slechts een zeer geringe waarde had. Ook dit vinden we bevestigd bij onze quantitative bepalingen. Daarentegen zien we bij de geanalyseerde kwaadaardige gezwellen, zooals we verwacht hadden, een hooge racemisatiegraad.

Wat de praktische fout der weefselanalyses aangaat, kunnen we zeggen, dat de werkelijke waarde van het gehalte aan l- of d-GZ in de proteïnen 0,5 % hooger of lager kan zijn, dan werd gevonden. Voor het totaalgehalte aan GZ in tumorproteïnen wordt de foutenmarge grooter, aangezien hierbij in uiterste gevallen de fouten van twee onafhankelijke bepalingen moeten worden opgeteld; wanneer dus het totaalgehalte 17% is, zal de werkelijke waarde tusschen 16 en 18% liggen.

Van de GZ.HCl praeparaten vermelden we in tabel VIII de uitkomsten der C-, H- en N-analyses, welke werden uitgevoerd door den Heer P. J. H u b e r s te Amsterdam.

Aangezien wij voor onze deuteriumanalyses relatief groote hoeveelheden tumorweefsel noodig hadden, konden wij in de tijd, die ons ter beschikking stond, slechts enkele menselijke gevallen onderzoeken, waarover wij konden beschikken dank zij de vriendelijke medewerking van de heeren Dr. B. J. M a n s e n s (St. Canisiusziekenhuis te Nijmegen), Prof. Dr. P. N i e u w e n h u i j s e (Pathologisch Instituut der Rijks-Universiteit te Utrecht) en Prof. Dr. K. d e S n o o (Gynaecologische kliniek der Rijks-Universiteit te Utrecht). Verder danken wij Dr. A. d e M i n j e r voor het histologisch onderzoek en de voorbereidende werkzaamheden aan het materiaal uitgevoerd.

Klinische gegevens.

Analyse No. 35. Levermetastasen van een 68-jarige vrouw; adenocarcinoom met tamelijk uitgebreide necrose. Primair galblaascarcinoom.

Analyse No. 36. Levermetastasen van een 47-jarige vrouw; eenigszins pailomateus gebouwd, zeer polymorphcellig carcinoom. Primair longcarcinoom.

Analyse No. 37. Ovariaaltumor met kwaadaardige epitheelwoekering, welke deels solide, deels adenomateus van bouw is. Op enkele plaatsen zijn in het epitheel groote, met een slijmachtige massa gevulde holten gevormd.

HOOFDSTUK V.

SLOTBESCHOUWING.

Wanneer wij onze resultaten vergelijken met die van andere onderzoekers, valt het op, dat afgezien van het voorkomen van d-GZ in tumor-hydrolysaten, het totale gehalte aan GZ in hydrolysaten van weefsels algemeen veel hoger is. Gaan wij na, hoeveel GZ als bestanddeel van weefselproteïnen vroeger werd gevonden, dan blijkt dat gemiddeld 10 % te zijn van het gewicht aan gedroogd proteïne. Zoo vonden A. C. Chibnall⁶⁰⁾, M. W. Rees, E. F. Williams en E. Boyland in doorsnede 10 % GZ met als maximum 12,1 % in een ossenhart. S. Graff²⁶⁾, D. Rittenberg en G. L. Foster verkregen bij hun analyses met ¹⁵N gemiddeld 10,2 %, met als hoogste waarde 11,8 %. Hierbij moet worden opgemerkt, dat genoemde auteurs gedurende 15 uren hydrolyseerden, terwijl bij ons deze bewerking 20 uren in beslag nam. Uit een recente publicatie van E. Abderhalden⁶¹⁾ blijkt, dat hij opbrengsten aan GZ verkrijgt, die varieren van 8,5 tot 11,5 %. Th. Wieland⁶²⁾ bereikt met behulp van chromatographie een opbrengst van gemiddeld 8,2 %. In beide gevallen werd ongeveer gedurende 7 uren gehydrolyseerd.

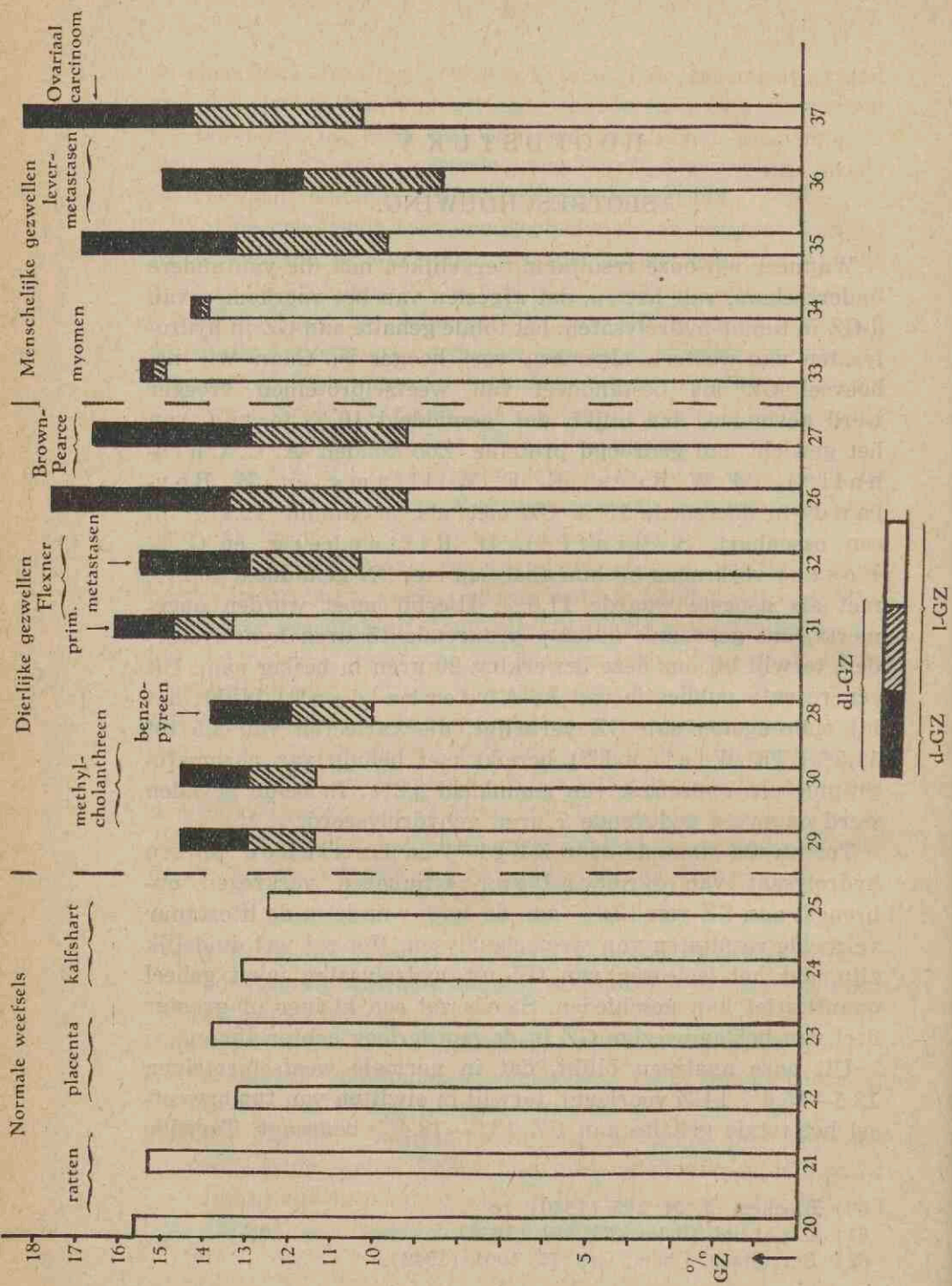
Tot nu toe staat de door Kögl²¹⁾ en Erxleben bij een hydrolysaat van Brown-Pearce-tumoren verkregen opbrengst aan GZ van 12,9 % aan de spits van de in de literatuur vermelde resultaten van weefselanalyses. Het zal wel duidelijk zijn, dat het isoleren van GZ uit hydrolysaten nooit geheel quantitatief kan geschieden. Steeds zal een kleiner of grooter deel van het aanwezige GZ in de moederloog achterblijven.

Uit onze analyses blijkt, dat in normale weefselproteïnen 12,5—15,6 % l-GZ voorkomt, terwijl in eiwitten van tumorweefsel het totale gehalte aan GZ 13,9—18,4 % bedraagt. Terwille

60) Biochem. J. **34**, 285 (1940).

61) Z. physiol. Chem. **275**, 151 (1942).

62) Ber. dtsch. Chem. Ges. **75**, 1001 (1942).



van de overzichtelijkheid zijn de resultaten van de tabellen VI en VII in fig. 5 grafisch voorgesteld. Men ziet duidelijk, dat de karakteristieke verschillen tusschen normaal en tumor-weefsel boven het niveau van 10% liggen, hetgeen tot nog toe als de maximumwaarde van het gehalte aan GZ werd aangenomen. Verder blijkt, dat het d-GZ soms een aliquote hoeveelheid l-vorm vervangt, terwijl het in andere gevallen additief bij de normale l-vorm bij komt.

Zooals reeds in de inleiding werd gezegd, waren een reeks auteurs niet in staat geweest, d-GZ uit hydrolysaten van tumoren te isoleeren, waardoor het voorkomen van genoemd aminozuur in de proteïnen van maligne weefsels werd betwijfeld. Ons werk had ten doel het aantoonen en bepalen van d-GZ in hydrolysaten van tumoren in vergelijking met die van normaal weefsel. In tegenstelling met de vele negatieve resultaten van andere auteurs, konden de in de eerste⁹⁾ en tweede²⁵⁾ publicatie van Kögl en Erxleben gegeven uitkomsten nu op zeer overtuigende wijze worden bevestigd. Normaal weefsel blijkt niettegenstaande 20-urige hydrolyse slechts weinig of geen d-GZ te bevatten. Volgens de vroegere publicaties van Kögl en Erxleben beschouwde men een weefsel nog als normaal, wanneer het uit het weefselhydrolysaat geïsoleerde GZ-paerparaat een racemisatiegraad van 4% had en wel gezien de proeffout, welke de bepaling van de specifieke draaiing met zich brengt. Wij verwachten, dat door verbetering in de analysemethodiek in zijn geheel deze marge kan worden verkleind.

Van belang is verder het feit, dat de racemisatiegraad van het GZ uit tumoren, gevonden volgens de nieuwe methode, nagenoeg overeenstemt met die, welke de oude werkwijze ons verschafte. Wij bedoelen hierbij de gevallen, waarbij gedurende 7 uren werd gehydrolyseerd. De verwachting, dat de racemisatiegraad zou toenemen, wanneer we de hoeveelheden d- en l-GZ quantitatief zouden kunnen bepalen, zien we niet bevestigd. Reeds de uitkomsten verkregen door middel van de specifieke draaiing gaven de juiste verhouding der beide antipoden in het hydrolysaat weer. Ter verklaring hiervan moeten we uitgaan van de in de publicatie van Kögl²⁵⁾, Erxleben en Akkerman vermelde gegevens omtrent het door laatstgenoemde onderzochte „ternaire” systeem van l-, d-GZ.HCl en

20-proc. zoutzuur bij 0°. Daarbij bleek, dat het dl-GZ een racemisch mengsel (conglomeraat) vormt, hetgeen beteekent, dat beide antipoden onafhankelijk van elkaar uitkristalliseeren. Bij oververzadigde oplossingen, zooals wij deze bij een tot een stroop ingedampt hydrolysaat hebben, komt de hogere concentratie aan l-GZ in de praktijk daardoor tot uiting, dat de kristallisatie van deze antipode met meer waarschijnlijkheid eerder zal beginnen, dan van de d-vorm. Bij het bereiken van de toestand, waarbij de moederloog niet meer oververzadigd is, zal deze nog slechts gelijke hoeveelheden van de l- en de d-vorm bevatten. Uiteraard is het niet isoleerbare deel voor de d-vorm relatief grooter dan voor de l-vorm. Wanneer echter het grootste deel van het GZ is gewonnen, speelt dit slechts een kleine rol, zoodat het gedeelte van het GZ, dat is uitgekristalliseerd beide antipoden in de nagenoeg juiste verhouding zal bevatten. In praeparatief opzicht dient men echter ook met twee andere factoren rekening te houden. Indien, zooals dit in het begin bij Kögl en Erxleben het geval was, de opbrengst niet groot is, zal de moederloog voor een of voor beide antipoden niet oververzadigd zijn en de bovenbeschreven eindtoestand niet zijn bereikt. Hierbij komt nog dat het asymmetrische milieu van het hydrolysaat heel goed een verschillende invloed kan uitoefenen op het kristallisatievermogen van het l- en het d-GZ.HCl.

Deze omstandigheden in aanmerking genomen, is de overeenstemming tusschen de vroegere resultaten en de nu verkregen uitkomsten zeer bevredigend te noemen. De eenige afwijking wordt gevormd door het feit, dat een racemisatiegraad van 80 %, welke vroeger in zekeren zin karakteristiek was voor zeer maligne weefsels, nu niet meer wordt aangetroffen. Het is niet onmogelijk, dat deze afwijking door redenen van biologische aard moeten worden verklaard. Anderszins lijkt ons de uitlegging, dat bij de vroegere experimenten het d-GZ bij het uitkristalliseeren een, zij het toevallige, voorsprong heeft gehad, niet in strijd met de theorie.

Aangezien het voorkomen van d-GZ in hydrolysaten van tumoren nu afdoende bewezen geacht mag worden, blijft het een vraag waarom de isoleering van de d-vorm zoo afhankelijk is van de gebruikte methode. In hun zesde mededeeling wezen Kögl²¹⁾ en Erxleben er reeds op, dat de splitsing van

het racemaat bij de methode van Foreman zich laat verklaren door aan te nemen, dat het d-GZ door de een of andere asymmetrische substantie wordt gebonden. De ervaring, welke wij hebben opgedaan, zijn hiermee niet in strijd. Het spreekt van zelf, dat niet willekeurige hoeveelheden d-GZ op die manier worden vastgehouden; het feit, dat diverse auteurs de d-vorm wel bij modelproeven, maar niet in hydrolysaten van tumoren hebben gevonden, zou door genoemde werkhypothese plausibel gemaakt kunnen worden. Wanneer het toevoegen geschiedt na de hydrolyse of kort voor het moment, dat men het GZ gaat isoleren, kan ook de tijd een rol spelen, aangezien dan bij het praecipiteeren van de calcium-glutaminaten of bij de chromatographische adsorptie het toegevoegde d-GZ nog niet geheel en al behoeft te zijn gebonden. Toekomstige onderzoekingen zullen moeten uitmaken, in hoeverre genoemde hypothesen juist zijn en welke de aard van de asymmetrische verbinding is. Het is opvallend, dat zich de praktische moeilijkheden bij die methoden voordoen, waarbij de isoleering van het GZ in zwak alkalisch (Foreman) of neutraal (Th. Wieland) milieu plaats vindt, terwijl wij bij onze methode het GZ.HCl in sterk zure oplossing tot kristallisatie brengen.

Bij beschouwing van de verschillende tabellen blijkt, dat in de gevallen, waarbij het gedeutereerde GZ vóór de hydrolyse werd toegevoegd, de racemisatiegraad bij 7-urige duur der hydrolyse grooter is, dan bij 20-urige hydrolysetijd. (Vergl. de analyses No. 16, 17, 18 en 19 uit tabel V met No. 26 en 27 uit tabel VII). Hetzelfde kunnen we zeggen van de menselijke levermetastasen. (Analyse No. 35). Vonden we bij 7-urige hydrolyse resp. 8,6 % l- en 3,4 % d-GZ met een racemisatiegraad van 56,7 %, bij 20-urige hydrolyse blijken deze waarden resp. 13,4 %, 3,6 % en 42,4 % te zijn. Ook hier dus een verlagening van de racemisatiegraad tengevolge van de langere duur der hydrolyse. Uit deze getallen zien we, dat bij 20-urige hydrolyse het percentage l-GZ aanzienlijk toeneemt, in tegenstelling met het percentage d-GZ, dat nagenoeg dezelfde waarde blijft behouden. Afgezien van het laatste geval, nl. dat van de levermetastasen, hebben de genoemde analyses het bezwaar, dat voor de uitvoering niet van een en hetzelfde proteïnemateriaal was uitgegaan. Om dit bezwaar uit de weg te ruimen, hebben wij

een aantal omentum-metastasen van Brown-Pearce-konijnen verzameld en de na de gebruikelijke opwerking verkregen droge producten goed gemengd. Zodoende hadden wij voldoende homogeen materiaal ter beschikking om in duploproeven na te gaan, welke invloed de 7- en de 20-urige hydrolyse op de analyse heeft. De resultaten vinden we in tabel IX vermeld.

TABEL IX.
Analyse van Brown-Pearce-tumoren.

A. Hydrolysetijd: 7 uren.												
No.	Gew. prot. in g	Toegevoegd gedeut. GZ.HCl				Geïsoleerd GZ.HCl		Percentage GZ			Racemisatiegraad %	
		Gew. in mg		At. % D		At. % D		l-	d-	tot.		
		l-	d-	l-	d-	Ci	Cd					
38a	8,-	325	300	5,00	4,80	1,15	2,36	10,9	3,5	14,4	48,6	
b	7,-											
39a	8,-	325	300	5,00	4,80	1,15	2,46	10,4	3,3	13,7	48,2	
b	7,-											
B. Hydrolysetijd: 20 uren.												
40a	8,-	325	300	5,00	4,80	0,96	2,30	13,7	3,7	17,4	42,5	
b	7,-											
41a	8,-	325	300	5,00	4,80	0,99	2,43	13,2	3,3	16,5	40,-	
b	7,-											

Zooals men ziet, is de racemisatiegraad bij de 7-urige hydrolyse steeds duidelijk grooter. Omtrent de oorzaak van dit verschijnsel kunnen we het volgende opmerken. Het is niet onwaarschijnlijk, dat de proteïnen, waarin d-aminozuren als bouwsteenen voorkomen door koken met zoutzuur sneller worden afgebroken, dan de natuurlijke l-proteïnen. Hierop wijst ook het feit, dat bij een hydrolyseduur van 7 uren de tumorproteïnen in meerdere mate worden gehydrolyseerd dan de normale weefselproteïnen (zie tabel IV). Bovengenoemd verschijnsel zou verklaard kunnen worden door aan te nemen, dat in tumorweefsel behalve de proteïnen, welke uit partieel racemische aminozuren zijn samengesteld, ook eiwitten voorkomen, die geheel en al uit l-aminozuren zijn opgebouwd, b.v. normaal bindweefsel. Het belangrijkste voor ons is echter de conclusie, welke

- laten consumeeren en het overgebleven GZ als de d-vorm te identificeeren ²⁷).
- 3) Door het GZ (zoowel de l-als de d-vorm) volgens de derde scheidingsmethode van P a s t e u r te isoleeren ²⁷).
 - 4) Door tumorproteïnen te voederen aan een hond. Het GZ verkregen uit de peptiden, die met urine en faeces waren uitgescheiden, bleek overwegend uit de d-vorm te bestaan ⁶⁴).
 - 5) Door uit een tumorhydrolysaat eerst volgens de F o r e m a n-methode het l-GZ te verwijderen, waarna volgens de reeds beschreven methode uit de moederloog GZ werd geïsoleerd, dat voor het meerendeel uit d-GZ bestond ²¹).
 - 6) Door het d-GZ met behulp van d-aminozuur-oxydase aan te toonen ⁶⁵).
 - 7) Als laatste methode kunnen we nu de nagenoeg quantitative methode met gedeutereerd GZ noemen.

Aangezien een reeks auteurs in de hydrolysaten van tumoren geen of geen noemenswaardige hoeveelheid d-GZ konden aantonen, echter wel omstreeks 10 % van het proteïnegewicht aan het gewone l-GZ werd gevonden, meende men de door de Utrechtsche school met de methode 1 tot 6 verkregen resultaten als onjuist te mogen beschouwen. Meestal liet men in het midden, op welke wijze onze positieve resultaten moesten worden verklaard, doch werd soms het vermoeden uitgesproken, dat het geobserveerde dl-GZ door racemisatie in vitro — dus op triviale wijze — zou zijn ontstaan. Door de in dit proefschrift beschreven quantitative analyses zijn echter de bovengeschetste tegenwerpingen ontzenuwd. We konden nu het bewijs leveren, dat in werkelijkheid in de hydrolysaten van tumoren zelfs nog meer l-GZ aanwezig is, dan de opponenten hebben aangetoond. Daarnaast vonden wij echter de d-vorm in een concentratie overeenkomstig de vroeger aangegeven verhouding van l tot d. In

64) F. K ö g l e n H. E r x l e b e n, Z. physiol. Chem. 264, 108 (1940).

65) F. K ö g l, H. H e r k e n e n H. E r x l e b e n, Z. physiol. Chem. 264, 220 (1940).

de toekomst kan een aanval niet meer op de isoleering van 10 % l-GZ steunen; eerst wanneer iemand erin slaagt om bv. in hydrolysaten van Brown-Pearce-tumoren 16—18 % van het proteïnegewicht aan l-vorm aan te toonen, zou een nieuw steekhoudend tegenargument zijn gevonden.

SAMENVATTING.

Door F. Kögl en H. Erxleben werd in 1939 het voorkomen van d-glutaminezuur in hydrolysaten van tumorproteïnen aangetoond. Het feit, dat normaal weefselproteïne geen of uiterst weinig d-glutaminezuur als bouwsteen bevat, leidde in combinatie met bovengenoemde vondst tot een nieuwe kankertheorie, welke in staat lijkt, belangrijke eigenschappen van kwaadaardige gezwellen beter dan tot nu toe begrijpelijk te maken.

Alhoewel het „onnatuurlijke” d-glutaminezuur op verschillende methoden in hydrolysaten van tumoren werd aangetoond, bleef door de vele negatieve resultaten van andere auteurs twijfel hieromtrent bestaan. Om deze strijdvraag definitief tot een oplossing te brengen, werd op exacte wijze het absolute gehalte van l- en d-glutaminezuur in hydrolysaten van normaal resp. tumor-weefsel bepaald. Hiervoor gebruikten wij de „verdunningsmethode” met behulp van deuterium als indicator. Te dien einde werd gedeutereerd glutaminezuur aan het hydrolysaat toegevoegd en na terugwinning van het glutaminezuur uit de vermindering van de deuteriumconcentratie het gehalte aan beide antipoden van glutaminezuur vastgesteld.

De deuteriumanalyses voerden wij uit met behulp van de door A. S. Keston, D. Rittenberg en R. Schoenheimer uitgewerkte methodiek. Hierbij bepaalt men op twee verschillende manieren, nl. met de interferometer en met de druppelmethode het deuteriumgehalte.

Aangetoond werd, dat de werkwijze, volgens welke door S. Graff, D. Rittenberg en G. L. Foster met ^{15}N als indicator het gehalte aan glutaminezuur in hydrolysaten werd bepaald, aan bedenkingen onderhevig is.

Volgens de uitkomsten van onze analyses bevatten hydrolysaten van normaal weefsel (rattenorganisme, kalfshart en placenta) 12,5—15,6% l-glutaminezuur, terwijl daarnaast praktisch geen d-glutaminezuur voorkomt. Volgens opgaven in de literatuur kon tot nog toe in de hydrolysaten van normale

weefselproteïnen gemiddeld slechts 10 % l-glutaminezuur worden aangetoond.

De verschillende gezweltypen laten zich karakteriseeren door hun racemisatiegraad, d.i. het percentage dl-glutaminezuur betrokken op de totale in het hydrolysaat voorkomende hoeveelheid glutaminezuur. Van de door ons onderzochte gezwellen bedroeg de racemisatiegraad bij:

goedaardige uterus-myomen	3—4 %
primaire Flexner-Jobling carcinoom	17 %
chemotumoren: methylcholanthreen	22 %
benzopyreen	27 %
menschelijke metastasen	42—44 %
Brown-Pearce metastasen	40—48 %

Met deze resultaten worden de bevindingen van Kögl en Erxleben volkomen bevestigd.

7.

I N H O U D.

	Pag.
I. Inleiding	1
II. De deuteriumanalyse	13
III. a) Bereiding van de gedeutereerde glutaminezuren.	32
b) De bereiding van deuterium	37
c) De isoleering van glutaminezuur uit de tumoren	39
d) Berekening en foutendiscussie	43
IV. Resultaten van de weefselanalysen	48
V. Slotbeschouwing	59
Samenvatting	68

INDEX

Page

1. The 1

2. The 2

3. The 3

4. The 4

5. The 5

6. The 6

7. The 7

8. The 8

9. The 9

10. The 10

11. The 11

12. The 12

13. The 13

14. The 14

15. The 15

16. The 16

17. The 17

18. The 18

19. The 19

20. The 20

21. The 21

22. The 22

23. The 23

24. The 24

25. The 25

26. The 26

27. The 27

28. The 28

29. The 29

30. The 30

31. The 31

32. The 32

33. The 33

34. The 34

35. The 35

36. The 36

37. The 37

38. The 38

39. The 39

40. The 40

41. The 41

42. The 42

43. The 43

44. The 44

45. The 45

46. The 46

47. The 47

48. The 48

49. The 49

50. The 50

51. The 51

52. The 52

53. The 53

54. The 54

55. The 55

56. The 56

57. The 57

58. The 58

59. The 59

60. The 60

61. The 61

62. The 62

63. The 63

64. The 64

65. The 65

66. The 66

67. The 67

68. The 68

69. The 69

70. The 70

71. The 71

72. The 72

73. The 73

74. The 74

75. The 75

76. The 76

77. The 77

78. The 78

79. The 79

80. The 80

81. The 81

82. The 82

83. The 83

84. The 84

85. The 85

86. The 86

87. The 87

88. The 88

89. The 89

90. The 90

91. The 91

92. The 92

93. The 93

94. The 94

95. The 95

96. The 96

97. The 97

98. The 98

99. The 99

100. The 100

M. 1629

STELLINGEN.

I

De wijze, waarop door Graff, Rittenberg en Foster met behulp van ^{15}N als indicator, het gehalte van glutaminezuur in hydrolysaten van tumoren werd bepaald, is aan bedenkingsonderhevig.

S. Graff, D. Rittenberg en G. L. Foster, *J. Biol. Chem.* **133**, 745 (1940).

II

De bewering van Barbulescu, dat bij het Donnan-evenwicht de kolloïde stof invloed zou uitoefenen op de diffusiesnelheid van de electrolyten door het membraan, leidt tot tegenstrijdige conclusies.

N. Barbulescu, *Kolloïd-Z.* **99**, 78 (1942).

III

De conclusies, die Boorsma en zijn medewerkers uit hun onderzoekingen over de ontleding van glucose door Cl. Tetani trekken, worden door de proeven van Tasman en Pondsman zeer onwaarschijnlijk gemaakt.

A. Tasman en A. B. F. A. Pondsman, *Antonie van Leeuwenhoek* **7**, 169 (1941).

IV

Bij de bestudeering van de structuur der pernitrosogroep verdient het aanbeveling van de parachor volgens de formule van Sugden gebruik te maken.

R. Fusco en G. Trisoglio, *Atti. R. Acad. Italia, Rend. cl. Sci. fisiche, mat. natur.* **2**, 618 (1941).

V

Ook de zuiver klassieke statistiek voert tot het optreden van een symmetriegetal in de uitdrukking voor de entropie.

A. Sommerfeld, Hand- und Jahrbuch der chemischen Physik. Bd. 3 (deel 2). Hoofdstuk III (1939).

P. Ehrenfest en V. Trkal, Verslagen der Koninklijke Academie der Wetenschappen, Amsterdam 28, 906 (1920).

VI

De opvatting van Nielsen en Hartelius over de methode ter bepaling van biotine volgens Kögl en zijn medewerkers is onjuist.

N. Nielsen en V. Hartelius, Biochem. Z. 311, 317 (1942).

VII

De resultaten van de experimenten van Karrer, betreffende de werking van d-aminozuur-oxydase op d-aminozuren, dienen nader te worden bevestigd.

P. Karrer, H. Koenig en R. Appenzeller, Helv. 25, 911 (1942).

VIII

De structuurformule, welke door Kalnin aan het „acetonanil van Knoevenagel” wordt toegekend, moet als onjuist worden beschouwd.

P. Kalnin. A. 523, 118 (1936).



D
U
19