

(in order to prevent fluorine losses in the form of HF by reaction of CaF_2 with water vapor when heat treating the powder mixtures), before the grinding, weighing and mixing. The powders and the mixtures were always stored in desiccators with $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$. Each sample was placed in a small Pt envelope and suspended in the hot zone of a vertical Pt 40 % Rh-wound furnace for a period of 60–120 min. The flow properties of the sample at the experimental temperature was estimated from the shape of the sample after quenching. One half of each sample was prepared for microscopic examination and the other half was used for obtaining X-ray powder photographs with a Guinier camera. The flow property, the microstructure, and the phase analysis were all combined for estimating the position of the liquidus. The results are shown in Fig. 1.

The liquidus has a lowest point at 1320° corresponding to a composition of 60 % TiO_2 + 14 % CaO + 26 % CaF_2 . When fully melted samples were cooled to room temperature, three phases appear in all the samples examined: TiO_2 (rutile), CaF_2 , and $\text{CaO} \cdot \text{TiO}_2$.

The shape of the liquidus curve to the right of the lowest point in Fig. 1 is remarkably horizontal from 26 to 95 % CaF_2 . This seems to indicate the presence of a two-liquid area, possibly the same two-liquid field that was reported for the binary system TiO_2 - CaF_2 (Ref. 6) between 55 % TiO_2 + 45 % CaF_2 and 6 % TiO_2 + 94 % CaF_2 .

1. Roth, R. S. *J. Res. Natl. Bur. Std. A* **61** (1958) 440.
2. Mukerji, J. J. *Am. Ceram. Soc.* **48** (1965) 210.
3. Budnikov, P. P. and Tresvyatskii, S. G. *Dokl. Akad. Nauk. SSSR* **89** (1953) 431.
4. Eitel, W. *Zement* **27** (1938) 469.
5. Bååk, T. *Acta Chem. Scand.* **8** (1954) 1727.
6. Hillert, L. *Acta Chem. Scand.* **19** (1965) 1516.
7. Kelley, K. K. *U. S. Bur. Mines Bull.* **584** (1960).
8. Hillert, L. *Acta Chem. Scand.* **18** (1964) 2411.
9. Hillert, L. *Acta Chem. Scand.* **19** (1965) 1774.

Received September 24, 1965.

β, γ -Dihydroxyglutaminsäure III*

ASMUS L. MÜLLER und KARI UUSHEIMO

*Laboratorium der Stiftung für chemische
Forschung, Biochemisches Forschungs-
institut, Helsinki, Finland*

β, γ -Dihydroxyglutaminsäure (I) wurde erstmals in diesem Laboratorium von Virtanen und Ettala^{1,2} isoliert und charakterisiert. Diese Autoren konnten papierchromatographisch zeigen, dass I verhältnismässig weitverbreitet ist und als freie Aminosäure in einer Vielzahl von Pflanzen in geringer Konzentration vorhanden ist.³

Das wachsende Interesse an dieser Substanz veranlasste uns, die früheren Befunde zu überprüfen und nach einer einfachen Methode zur Isolierung von I zu suchen.

Isolierung von I aus Lepidium-Samen. Alle Operationen sind unter Ausschluss direkter Sonneneinstrahlung in dunklen Gefässen vorzunehmen.

2 kg Samen von *Lepidium sativum* werden möglichst fein gemahlen, wobei die Temperatur des Mahlgutes 30°C nicht überschreiten sollte.

Der gemahlene Samen wird durch mehrfaches Digerieren mit je 1 Liter Petroläther entfettet. Das entfettete Material wird bei Zimmertemperatur an der Luft getrocknet und anschliessend mit der Extraktionslösung (3 g Trichloressigsäure auf 100 ml 70 %iges Äthanol) zu einem dünnflüssigen Brei verrieben. Dieser wird 7 bis 10 mal mit je 0.8 Liter Extraktionsmittel gut durchgeschüttelt.

Jeweils nach Absetzen der festen Bestandteile giesst man die überstehende klare Flüssigkeit (Extrakt) ab. Anschliessend wird einmal mit 1 Liter 70 %igem Äthanol extrahiert. Die vereinigten Extrakte werden mit Hilfe von Hyflo Super-Cel filtriert.

Man bereitet eine Säule mit 400 ml Dowex IR 120 Harz (H^+ -Form) und wäscht diese mit 600 ml 70 %igem Äthanol¹ um die Schleimbildung zu verhindern.

* Erste Mitteilung: Virtanen und Ettala,¹ zweite Mitteilung: Virtanen und Ettala.²

Auf die so vorbereitete Säule werden die vereinigten Extrakte gegeben. Man wäscht mit 600 ml 50 %igem Äthanol und dann mit Wasser bis das Eluat neutral ist. Anschliessend wird mit 2 N NH_4OH eluiert und das ammoniakalische Eluat am Rotationsverdampfer (20 Torr, max. 40°C Badtemperatur) zur Trockene gebracht. Man erhält als Rückstand 16 bis 30 g * Aminosäuren, die man in 0,5 N Essigsäure löst und auf eine Säule mit 180 ml Dowex 1-X8 Harz (Acetat-Form) gibt. Die Säule wird mit 0,5 N Essigsäure gewaschen, bis im Eluat längere Zeit keine Aminosäuren mehr nachweisbar sind (mindestens jedoch mit 0,7 Liter 0,5 N Essigsäure). Dann wird mit 0,5 N HCl eluiert und das Eluat in Fraktionen zu 50 ml aufgefangen. Die erste Fraktion, in der Cl^- -Ionen nachweisbar sind, enthält die gesuchte Dihydroxyglutaminsäure. Ob in den folgenden Fraktionen noch I vorhanden ist, muss mittels Chromatogramm festgestellt werden.

Alle Fraktionen, die I enthalten, werden vereinigt und auf eine kleine Säule mit 25 ml Dowex IR 120 Harz (H^+ -Form) gegeben. Die Säule wird mit Wasser neutral gewaschen und I mit 2 N NH_4OH eluiert. Nach Eindampfen des Eluates am Rotationsverdampfer (20 Torr, max 40°C Badtemperatur) erhält man 30 bis 60 mg * eines bräunlichen Öles, das alle Reaktionen von I zeigt und frei von anderen Aminosäuren ist (papierchromatographisch geprüft). Das Öl wurde mit Aceton und Äther behandelt, wobei die Aminosäure als weisses Pulver abgeschieden wurde.

Bemerkungen. Um bei der Isolierung von I reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, muss man auf die Instabilität der Substanz Rücksicht nehmen.

1) Wird eine salzsaure Lösung von I auf ein Chromatogramm aufgegeben und wie üblich mit dem heissen Föhn getrocknet, dann zersetzt sich I teilweise zu einer ninhydrin-positiven Substanz mit dem R_F -Wert = 0.

2) Im Papierchromatogramm (Laufmittel $\text{BuOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{HAc}$) treten auch bei Aufgabe von reinem I mehrere schneller laufende Flecken auf. Durch 2-dimen-

sionale Chromatographie (beide Richtungen $\text{BuOH}/\text{H}_2\text{O}/\text{HAc}$ als Laufmittel) konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei um Artefakte handelt.

3) Während der Versuche zur Isolierung von I ergaben sich Hinweise darauf, dass I *lichtempfindlich* ist. Sowohl auf Dowex IR 120 als auch auf Dowex 1-X8 färben sich die Zonen, die I enthalten, bei direkter Sonnenbestrahlung blau. Die Färbung tritt innerhalb weniger Minuten ein. Dieser Vorgang wurde nicht weiter untersucht, scheint jedoch irreversibel und auf Lösungen beschränkt zu sein.

Ergebnis. Samen von *Lepidium sativum* wurden mit äthanolischer Trichloressigsäure extrahiert, die Aminosäuren mit Dowex IR 120 abgetrennt und Dihydroxyglutaminsäure durch fraktioniertes Eluieren der Aminosäuren von Dowex 1 gewonnen.

Die mit diesem Material durchgeführten Versuche brachten die gleichen Ergebnisse wie von Virtanen und Ettala ² angegeben.

1) Im absteigenden Chromatogramm auf Whatmann 4 Papier (Laufmittel: Butanol/ $\text{H}_2\text{O}/\text{HAc}$, 12:5:3) wandert I geringfügig langsamer als Cysteinsäure.

2) Bei der Reduktion von I mit rotem Phosphor und 66 % HJ entsteht vorwiegend Glutaminsäure und Serin.

3) Wird I für 4 Stunden mit 5 %iger Essigsäure im Bombenrohr auf 125°C erhitzt, so entsteht Dihydroxypyrrolidoncarbonsäure. (Durch Behandeln des Papierchromatogramms mit Chlorgas und Sprühen mit 1 % KJ/Stärkelösung ³ nachgewiesen.)

Wir danken Herrn Professor Dr. A. I. Virtanen für die Überlassung des Themas und sein reges Interesse am Fortschritt dieser Arbeit. Einer von uns (A.L.M.) ist der *Stiftung für Chemische Forschung* (Helsinki, Finnland) für die Gewährung eines Forschungstipendiums zu Dank verpflichtet.

1. Virtanen, A. I. und Ettala, T. *Suomen Kemistilehti B* 29 (1956) 107.
2. Virtanen, A. I. und Ettala, T. *Acta Chem. Scand.* 11 (1957) 182.
3. Ellfolk, N. und Synge, R. L. M. *Biochem. J.* 59 (1955) 523.

Eingegangen am 22. September, 1965.

* Die Ausbeute hängt unter anderem sehr stark davon ab, wie fein das Ausgangsmaterial gemahlen wurde.