

NOTIZEN

Ein Reaktionszyklus mit Amidoalkylierungs- und Transamidoalkylierungs-Schritten

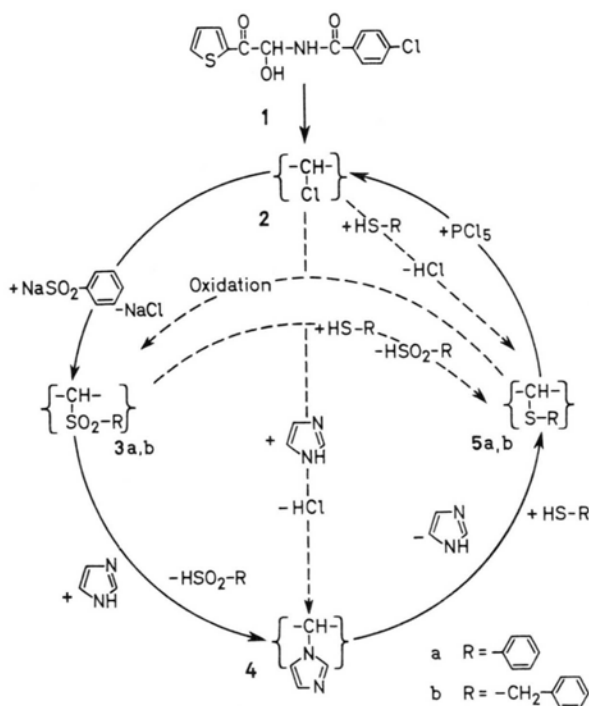
A Reaction Cycle Involving Steps of Amidoalkylation and Transamidoalkylation

DIETER MATTHIES

Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität Hamburg

(Z. Naturforsch. 28c, 100–102 [1973];
eingegangen am 19. September/31. Oktober 1972)Alkylating transport forms, alkylating glycine derivatives,
alkylating agents, amidoalkylating agents

Unsere Arbeiten über Amidoalkylierungen mit α -substituierten *N*-Acylglycin-Derivaten^{1–4} haben insbesondere zum Ziel, therapeutisch verwendbare Alkylierungsmittel zu finden.



Von der Grundstruktur der Glycin-Derivate ist im Zyklus nur das reaktive α -C-Atom mit den jeweiligen Substituenten wiedergegeben.

Sonderdruckanforderungen an Dr. D. MATTHIES, Institut für Pharmazeut. Chemie d. Univ. Hamburg, D-2000 Hamburg 13, Laufgraben 28.

Wir haben das aus dem Thienylglyoxal-p-chlorbenzamid-Addukt **1** erhältliche 2-[α -Chlor-N-(p-chlorobenzoyl)-glycyl]-thiophen(**2**)³ unter anderem auch mit dem Natriumsalz der Benzolsulfinsäure umgesetzt. Der Benzolsulfonylrest des 2-[α -Benzolsulfonyl-N-(p-chlorobenzoyl)-glycyl]-thiophen(**3a**) erwies sich für Amidoalkylierungen von SH- und NH-aciden Reaktionspartnern als geeignete *leaving group*.

In Gegenwart von Triäthylamin als Säurefänger reagierte **3a** bei Raumtemperatur beispielsweise mit Benzylmercaptan zur Mercaptoverbindung **5b**. Von besonderem Interesse war die analoge Reaktion mit Imidazol zum 2-[α -Imidazolyl-N-(p-chlorobenzoyl)-glycyl]-thiophen(**4**), über dessen Darstellung aus **2** und selektive Transfereigenschaften gegenüber einigen nucleophilen Substanzen wir kürzlich berichteten⁴. Die Fähigkeit von **4** zur Übertragung des Amidoalkylrestes führte in der anschließenden Umsetzung mit Thiophenol zur Bildung des Sulfids **5a**, welches von den gebräuchlichen stark nucleophilen Partnern Morpholin bzw. Pyrrolidin nicht angegriffen wurde. Es gelang aber durch Einwirkung der äquivalenten Menge Phosphor(V)-chlorid daraus die Chlorverbindung **2** zurückzugewinnen und so den Kreis der Reaktionen zu schließen. Ein verkürzter Zyklus ergab sich aus der Möglichkeit, **5a** mit Wasserstoffperoxid in Essigsäure unter schonenden Bedingungen zum Sulfon **3a** zu oxidieren. Analog ließ sich **5b** in das gleichermaßen reaktive Sulfon **3b** überführen.

Ein Vergleich der Amidoalkylierungsreagenzien und deren Umsetzungen anhand des Reaktionsschemas zeigt, daß **2** als Ausgangsstufe für alle anderen Verbindungen des Zyklus dienen kann, **3** in **4** und **5** überführbar ist und **4** zu **5** reagiert. Die daraus herzuleitende Reaktivitätsabstufung kann allerdings nur eingeschränkt gelten, da die Umsetzungen nicht unter genau gleichen Bedingungen verlaufen. Eine teilweise Bestätigung ergibt sich aus der unterschiedlichen Beständigkeit der Reagenzien: Im Gegensatz zum leicht zersetzlichen Chlorderivat bleiben die Sulfon- und Imidazol-Derivate unter Normalbedingungen stabil. Sie stellen daher chemische Transportformen des amidoalkylierenden Prinzips dar, womit sie zugleich Bedeutung als potentielle Wirkstoffe im Sinne der vorerwähnten Zielvorstellung gewinnen.

Die Strukturen der neuen Verbindungen wurden durch Elementaranalysen und IR-Spektren gesichert.

Beschreibung der Versuche

Geräte: Linströmapparat zur Bestimmung der Schmelzpunkte; Coleman-autoanalyzer zur Stickstoffbest.; Schöniger-Best. von Schwefel und Chlor; IR-Spektren wurden mit dem Spektrometer 257 (Perkin-Elmer) aufgenommen.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

2-[α -Benzosulfonyl-N-(*p*-chlorbenzoyl)-glycyl]-thiophen (3a**)**

Unter Rühren wurde zur Suspension von 1,64 g (10 mMol) Na-Benzolsulfonat in je 7 ml trockenem Tetrahydrofuran und Dimethylformamid die Lösung von 3,14 g (10 mMol) Chlorverbindung **2**³ in 25 ml trockenem Tetrahydrofuran innerhalb 20 min zuge- tropft und darauf das Gemisch kurz zum Sieden er- hitzt. Die, nach Zugabe von 30 ml Petroläther (40–60 °C) abgesaugte Fällung, ergab durch Umkristalli- sieren aus Dioxan/Äther, unter Abfiltrieren des Na- triumchlorids, 3,12 g (74 %) Sulfon **3a**; Schmp. 192–195 °C.

$C_{19}H_{14}ClNO_4S_2$ (419,9) Ber. Cl 8,44 N 3,34 S 15,27, Gef. Cl 8,39 N 3,22 S 15,19.
IR(KBr): 3345 cm^{-1} (NH), 1670 cm^{-1} (CO), 1653 cm^{-1} (CONH), 1329 cm^{-1} (SO_2 asym.), 1143 cm^{-1} (SO_2 sym.).

2-[α -Benzylmercapto-N-(*p*-chlorbenzoyl)-glycyl]-thiophen (5b**)**

Zur Suspension von 0,62 g (1,5 mMol) **3a** in 6 ml trockenem Tetrahydrofuran wurde die Lösung äqui- valenter Mengen Benzylmercaptan und Triäthylamin in 6 ml trockenem Tetrahydrofuran gegeben. Nach 12 stdg. Stehenlassen bei Raumtemperatur mit gelegent- lichem Umschwenken, wobei eine homogene Lösung entstand, erfolgte Aufarbeitung: Abdunsten des Lö- sungsmittels im Vakuum, Aufnehmen des Rückstandes mit 15 ml Essigester, Extrahieren mit 1,5 mMol 0,1 N Natronlauge, nach Trocknen über Natriumsulfat Ab- destillieren des Essigesters im Vakuum. Der verblei- bende Rückstand kristallisierte nach Anreiben. Die Ausbeute des durch Vergleich mit authentischem Ma- terial nach l. c.⁴ identifizierten Produktes betrug 0,45 g (75 %).

2-[α -Imidazolyl-N-(*p*-chlorbenzoyl)-glycyl]-thiophen (4**)**

Die Suspension von 0,58 g (1,4 mMol) **3a** in 5 ml Methanol wurde mit der Lösung von 0,10 g (1,4 mMol) Imidazol und 0,14 g (1,4 mMol) Triäthylamin in 3 ml Tetrahydrofuran versetzt und analog vorstehender Vorschrift behandelt. Die Aufarbeitung ergab 0,32 g kristallinen Rückstand, der durch Vergleich mit au- thentischem Material³ als **4** identifiziert werden konn- te. Ausbeute: 62 %.

2-[α -Phenylmercapto-N-(*p*-chlorbenzoyl)-glycyl]-thiophen (5a**)**

Die Lösung von 1,04 g (3 mMol) **4** und 0,33 g (3 mMol) Thiophenol im Gemisch von 10 ml Methanol und 5 ml Tetrahydrofuran wurde 2,5 d verschlossen bei Raumtemperatur belassen, dann im Vakuum ein- geengt, der Rückstand in ca. 20 ml Essigester aufge- nommen und mit der äquivalenten Menge 5-proz. Chlorwasserstoffsäure extrahiert. Die neutralgewasche- ne organische Phase hinterließ nach Trocknen über Natriumsulfat und Abdunsten des Lösungsmittels im

Vakuum ein kristallines Rohprodukt, das durch Um- kristallisieren aus Benzol/Petroläther 0,75 g (64 %) reines Material vom Schmp. 110–112 °C ergab.

$C_{19}H_{14}ClNO_4S_2$ (387,9) Ber. Cl 9,14 N 3,61 S 16,53, Gef. Cl 9,20 N 3,49 S 16,75.
IR(KBr): 3285 cm^{-1} (NH), 1670 cm^{-1} Schulter(CO), 1650 cm^{-1} (CONH).

2-[α -Chlor-N-(*p*-chlorbenzoyl)-glycyl]-thiophen (2**) aus **5****

Das Gemisch von 1,36 g (3,5 mMol) **5a** und 0,73 g (3,5 mMol) Phosphor-(V)-chlorid in 12 ml Tetrachlor- methan wurde 2 Stdn. am Rückfluß zum Sieden er- hitzt, dabei hatte sich nach ca. 30 min eine klare, bräunliche Lösung gebildet. Beim Abkühlen im Eisbad erfolgte Kristallabscheidung. Das Produkt wurde un- ter Ausschluß von Luftfeuchtigkeit abgesaugt und mit Äther/Petroläther (5 ml + 5 ml) nachgewaschen. Aus- beute 1,03 g (91 %); Schmp. 159–161 °C. Identisch mit Substanz in l. c.³.

Die analoge Darstellung aus **5b** ergab 70 % Aus- beute.

2-[α -Benzosulfonyl-N-(*p*-chlorbenzoyl)-glycyl]-thiophen (3a**) aus **5a** und entsprechende Benzyl- sulfonylverbindung **3b** aus **5b****

Die Suspension von 2,91 g (7,5 mMol) **5a** im Ge- misch von 15 ml Eisessig und 3,5 ml Acetanhydrid wurde unter Rühren bei Eiskühlung tropfenweise so mit 2,0 g 30-proz. Wasserstoffperoxid versetzt, daß die Reaktionstemperatur unter 10 °C blieb. Anschlie- ßend ließ man ohne Kühlung 1,5 Stdn.iterrühren, wobei nach 40 min die Höchsttemperatur von 32 °C erreicht war. Temperaturen über 40 °C sind zu ver- meiden! Während der ganzen Reaktionsdauer blieb das Zweiphasensystem bestehen. Jedoch war nach eini- ger Zeit eine deutliche Veränderung der feinen Kri- stalle des Ausgangsmaterials zu den Blättchen des Re- aktionsproduktes bemerkbar. Nach Absaugen und mehrmaligem Nachwaschen mit Äther wurden 2,97 g (95 %) des analysenreinen Sulfons **3a** erhalten (vgl. oben).

Analog erfolgte die Darstellung des Sulfons **3b** aus **5b**; Ausbeute: 2,2 g (68 %); Schmp. 147–148 °C; Um- krist. aus Dioxan/Äther.

$C_{20}H_{17}ClNO_4S_2$ (434,9) Ber. Cl 8,15 N 3,22 S 14,74, Gef. Cl 8,37 N 3,08 S 14,87.
IR(KBr): 3305 cm^{-1} (NH), 1663 cm^{-1} Schulter(CO), 1645 cm^{-1} (CONH), 1329 cm^{-1} (SO_2 asym.), ein auf- fälliger Peak bei 1036 cm^{-1} ist der symmetrischen SO_2 - Streckschwingung zuzuordnen.

Darstellung von **4 direkt aus **2** l. c.³**

Darstellung von **5a, b direkt aus **2****

Die Lösung von 2,20 g (7 mMol) **2** in 20 ml trocke- nem Tetrahydrofuran wurde innerhalb 15 min unter Rühren und Feuchtigkeitsausschluß zu einer Lösung von 0,77 g (7 mMol) Thiophenol und 0,71 g (7 mMol) Triäthylamin in 10 ml trockenem Tetrahydrofuran zu-

gerührt, dann filtriert und das Filtrat im Vakuum eingengt. Der Rückstand kristallisierte auf Anreiben und ergab nach Umkristallisieren aus Benzol/Petroläther 2,04 g (74 %) **5a**, Schmp. 110–112 °C (vgl. oben).

¹ D. MATTHIES, Arch. Pharmaz. 301, 867 [1968].

² D. MATTHIES, Pharmazie 25, 522 [1970].

³ D. MATTHIES, Synthesis 1972, 380.

5b wurde analog aus **2** erhalten; Ausbeute: 2,61 g (92 %); Schmp. 121–122 °C (vgl. l. c. ⁴ und oben).

Frau R. WOLFF sei an dieser Stelle für zuverlässige experimentelle Mitarbeit besonders gedankt.

⁴ D. MATTHIES, und R. WOLFF, Pharmac. Acta Helvetica, im Druck.

Zur Bioakustik des Waldmistkäfers, *Geotrupes stercorosus* Scriba

Sound production by *Geotrupes stercorosus* Scriba

A. NIKOLAY

Zoologisches Institut, Poppelsdorfer Schloß
Universität Bonn

(Z. Naturforsch. 28c, 102–103 [1973];
eingegangen am 27. November 1972)

Coleoptera, stridulation mechanisms, sound analysis

Sowohl die ♂♂ als auch die ♀♀ des Waldmistkäfers stridulieren mit zwei Instrumenten, die LANDOIS¹ und VERHOEFF² teilweise beschrieben haben. Bisher waren weder der Feinbau der Instrumente noch die Lautformen und deren biologische Bedeutung bekannt.

Die Morphologie des äußeren Lautapparates untersuchte ich mit Hilfe von Kolloidumabzügen und Stereoscanaufnahmen. Beim Coxo-metasternalen Instrument fungiert der nach cranial gebogene Hinterrand des III. abdominalen Sterniten, der über eine Strecke von ca. 0,7 mm verstärkt ist, als Plectrum (Stärke: ca. 15 µm gegenüber ca. 8 µm an den Seiten). Die Pars stridens an den Hintercoxen, die bei ♂♂ eine Fläche von je 2,1 × 0,4 mm aufweist (\bar{x} von $n = 10$), ist aus 80–100 Rippen aufgebaut. Die Abstände der Rippen nehmen von distal nach proximal erst zu, dann stark ab, bei ♂♂ beträgt der maximale Abstand 23,9 µm (\bar{x} von $n = 10$). Die Rippen tragen Zähnhchen, die distal 1–12 µm, proximal nur 1–3 µm lang sind. Das Abdomino-elytrale Instrument besteht aus einem paarigen Haarfeld von einer Fläche von je 1,8 × 0,5 mm, das sich an den lateralen Rändern des III. abdominalen Sterniten befindet, der auch Träger des Plectrums des Coxo-metasternalen Instrumentes ist, und der Unterseite der Elytren. Letztere sind mit Chitinschuppen besetzt, die im Bereich des Instrumentes besonders dicht und regelmäßig stehen (ca. 10 000 pro mm²). Die Instrumente können einzeln oder zusammen angestrichen werden; das Zusammenspiel ist aufgrund der morphologischen Koppelung nur im gleichen Rhythmus möglich.

Sonderdruckanforderungen an Frl. A. NIKOLAY, Zoologisches Institut d. Universität, D-5300 Bonn, Poppelsdorfer Schloß.

Die Waldmistkäfer erzeugen verschiedene Lauttypen, die sich in ihrer Silbenzahl und in der Impulsfrequenz pro Silbe unterscheiden. Im Gegensatz zu den spontanen Lauten, die sie hauptsächlich während des Sexualverhaltens und fast ausschließlich durch das Coxo-metasternale Instrument hervorbringen, ist der Protestlaut jederzeit durch künstliche Stimulation (z. B. Kneifen) auslösbar; hierbei werden in der Regel beide Instrumente eingesetzt. Durch Ausschalten eines Instrumentes bestimmte ich den Anteil des anderen am Aufbau dieses Lauttyps. Die Doppelsilbe aller Laute entsteht beim Anwinkeln des Abdomens nach cranial und dorsal (Silbe A) und folgender Rückbewegung (Silbe B) (Abb.). Beim Coxo-metasternalen Instrument ist der Amplitudenverlauf unregelmäßig, zeigt aber die Tendenz bei der Hinbewegung (A) zu- und bei der Rückbewegung (B) abzunehmen (Abb.). Ein Impuls entspricht dem Anstreichen einer Rippe der Pars stridens; diese Zuordnung wurde durch Ausschalten einzelner Rippen nachgewiesen. Da eine Silbe aus maximal 50 Impulsen aufgebaut ist, wird folglich nur 1/4 der Rippen (25 je Pars stridens) pro Silbe angestrichen. Es zeigte sich, daß der Bereich zwischen der 30. und 60. Rippe (von proximal nach distal) bevorzugt wird und daß die Tiere die äußersten distalen und proximalen Rippen nicht benutzen. Die Impulsfrequenz liegt zwischen 300 und 1600 Hz. Sie wird

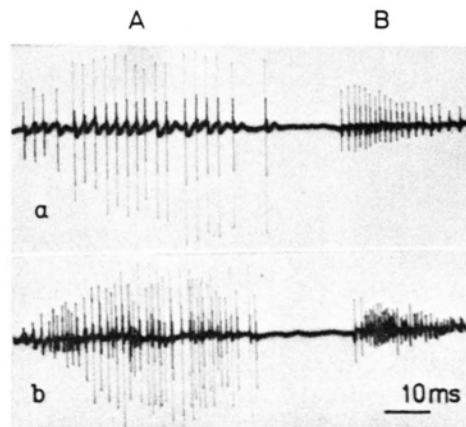


Abb. 1. Doppelsilbe des Coxo-metasternalen Instrumentes: a) Mit nur einseitig intakter Pars stridens, b) mit vollständigem Instrument. A Silbe A, B Silbe B.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition “no derivative works”). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

durch die Anstreichgeschwindigkeit, die im Mittel 7 mm/s beträgt, das Stridulieren mit einer oder beiden Pars stridens sowie durch die Wahl feingerippter proximaler bzw. grobgerippter distaler Teile der Pars stridens verändert. Der Lautanteil des Abdomino-elytralen Instrumentes hat einen regelmäßigeren Amplitudenverlauf. Er nimmt in Silbe A und B erst zu, dann

ab. Die Impulsfrequenz liegt zwischen 5 und 8 kHz. Das Spektrum des Protestlautes, der von beiden Instrumenten erzeugt wird, liegt im Bereich von 100 Hz bis 20 kHz. Letzteres ist die obere Grenze der bisher von mir gemachten Lautaufnahmen. AUTRUM³ stellte für *Geotrupes sp.* einen Ultraschallanteil bis 40 kHz fest.

¹ H. LANDOIS, Thierstimmen, Herder'sche Verlagshandlung, Freiburg i. Br., 1874.

² K. W. VERHOEFF, Sitzber. Ges. Naturforsch. Freunde, Berlin [1902].

³ H. AUTRUM, Z. vergleich. Physiol. 23, 332 [1936].

Gross Chemical Composition of Strain Flury HEP Rabies Virus

H. D. SCHLUMBERGER*, L. G. SCHNEIDER**,
H.-P. KULAS*, and H. DIRINGER*

* Max-Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen and

** Bundesforschungsanstalt für Viruskkrankheiten der Tiere, Tübingen

(Z. Naturforsch. 28c, 103–104 [1973];
received August 16/November 3, 1972)

Rabies virus protein, RNA, lipid, carbohydrate

The Flury HEP strain of *rabies virus*, grown in BHK 21/C 13-cells was purified by adsorption and elution from aluminium phosphate gel followed by a cycle of high and low speed centrifugation as previously described¹. The specific infectivity (LD_{50}/mg dry mass) of the purified virus was 1000 to 4000 times higher than of the infectious tissue culture fluid. The crude virus preparation reacted in the complement fixation assay with 8 units of anti-BHK 21 rabbit serum up to dilutions of 1 : 4000 to 1 : 8000. On the other hand the purified and 200 to 300 fold concentrated virus preparations reacted in the same test up to dilutions of 1 : 4 to 1 : 8 indicating that the purified virus contained $2 \cdot 10^5 - 3 \cdot 10^5$ less host antigens than the crude virus preparation. Thus the antigenic impurities possibly present in the purified virus preparations seem to be negligible and the same most likely applies for non-immunogenic impurities. Although the virus was grown in a medium containing bovine serum albumin (BSA) anti BSA sera did not react in a complement fixation with purified virus.

Preparations of purified virus contained per mg dry mass in average $10^{10} LD_{50}$ determined by intracerebral inoculation of suckling mice, 10^4 complement fixing units (CFU) and 5×10^4 hemagglutinating units (HAU). The results are in good agreement with the specific activities of the same virus purified by other methods².

The main chemical constituents of the virus were determined for four different batches. Purified virus was dialyzed exhaustively against distilled water at

4 °C, lyophilized, and dried at 20 °C over P_2O_5 under reduced pressure for 48 hours. The water uptake of the dried material during the weighing procedure was recorded and the weight was corrected accordingly.

Lipids were extracted with chloroform/methanol/water (40/20/3) at 20 °C for 3 min, using 6 ml of the solvent per 40 mg of dry mass. The residue was again extracted with half the volume of a mixture, containing 20 parts of chloroform, 40 parts of methanol and 3 parts of water.

In average 25 % (24,6–28 %) of the dry mass was solubilized by this treatment. The weight of the insoluble residue represented in average 74,3 % (72–76 %) of the original dry mass.

The protein content of the virus, as determined by quantitative analysis of the amino acid composition of the insoluble residue, ranged from 63,4 to 70,0 %

Table I. Lipid, protein, carbohydrate and RNA content of strain Flury HEP rabies virus.

constituent	% of dry weight
Lipids:	
(Chloroform/methanol soluble fraction)	25.8 ± 1.5 *
phosphorus	0.41 ± 0.01
chloroform/methanol insoluble fraction	74.3 ± 1.9
phosphorus	0.38 ± 0.06
Protein:	67.0 ± 3.6
Protein-bound carbohydrates:	
hexoses	0.7
fucose	0.1
sialic acids	0.8
galactosamine	0.3
glucosamine	1.0
	2.9
RNA	3.9 ± 0.6
total mass of the insoluble residue:	73.8 ± 3.6
total mass of the virus:	99.6 ± 2.5

* Mean ± standard deviation.

Requests for reprints should be send to H. DIRINGER, MPI für Virusforschung, D-7400 Tübingen, Spemannstr. 35.



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitalized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

(average 67.0 %) (Table I). To correct for amino acid decay during hydrolysis, samples of 0.6 to 0.8 mg of insoluble residue were hydrolyzed in 6 N HCl at 110 °C in sealed tubes under a nitrogen atmosphere for 24, 48, 72, 96 and 120 hours, respectively. After hydrolysis the samples were dried and analyzed in a Beckman amino acid analyzer. The results of the individual amino acid determinations were corrected by graphic extrapolation. The mass of protein was calculated from the corrected data (Table I).

The ribonucleic acid (RNA) content of the virus was calculated from the phosphorus content of the insoluble residue determined by the method of BARTLETT³ (Table II). Possible phosphorylation of viral proteins was not considered in these calculations, and thus the data obtained (in average 3.9 % RNA (3.2 to 4.6 %) per mg dry mass), represent maximal values.

Table II. Amino acid composition of strain Flury HEP rabies virus.

Amino acid *	% of dry weight
Lys	5.0 ± 0.6
His	2.1 ± 0.2
Arg	4.3 ± 0.6
Asp	6.8 ± 0.7
Thr	3.9 ± 0.2
Ser	3.5 ± 0.15
Glu	8.8 ± 0.5
Pro	2.8 ± 0.2
Gly	2.5 ± 0.05
Ala	2.8 ± 0.3
Cys	1.4 ± 0.2
Val	4.1 ± 0.15
Met	1.8 ± 0.3
Ile	4.1 ± 0.4
Leu	6.5 ± 0.3
Tyr	2.9 ± 0.1
Phe	3.6 ± 0.1
	67 ± 3.6

* Tryptophan was not determined.

Carbohydrate analysis was carried out only with two virus batches. Neutral sugars present in the chloroform/methanol-insoluble residue were hydrolyzed and isolated according to WALBORG *et al.*⁴. Hexoses were

determined by the orcinol-sulfuric acid reaction of WINZLER⁵ employing a standard of galactose:mannose = 1:1. The data are corrected for the presence of ribose and fucose interfering with the determination of hexoses. Ribose was determined by the orcinol method⁶. Fucose was assayed by the cystein-sulfuric acid reagent according to DISCHE⁷. Sialic acids were determined by the method of WARREN⁸, after hydrolysis with 0.1 N sulfuric acid for 1 hour at 80 °C. Standards of *N*-acetyl-neuraminic acid were treated similarly.

Hexosamines were analyzed directly in a Beckman amino acid analyzer after hydrolysis for 2,4 and 6 hours, respectively at 110 °C in 5 ml of 2 N HCl of each 5 mg of insoluble residue in sealed tubes under a nitrogen atmosphere. The molar ratio of galactosamine and glucosamine was found to be 1:3. The total carbohydrate content of the chloroform/methanol-insoluble residue was estimated to be 2.9 % (Table II). The balance of protein, carbohydrate and RNA in in good agreement with the weight determinations of the insoluble residue. The sum of the viral constituents adds up to about 100 % of the original viral mass.

The authors like to express their gratitude to Professor Dr. F. A. ANDERER and to Professor Dr. M. MUSSGAY for valuable discussions and the support of this work. We are indebted to Dr. M. A. KOCH and Dr. F. SOKOL for revising the manuscript. The skillful assistance of Miss D. TROMM and Mr. M. GENČIĆ is gratefully acknowledged.

¹ L. G. SCHNEIDER, M. HORZINEK, and H. D. MATHEKA, Arch. ges. Virusforsch. 34, 351 [1971].

² F. SOKOL, E. KUWERT, T. J. WIKTOR, K. HUMMELER, and H. KOPROWSKI J. Virol. 2, 836 [1968].

³ G. R. BARTLETT J. biol. Chemistry, 234, 466 [1959].

⁴ E. F. jr. WALBORG and D. N. WARD, Biochim. biophysica Acta 78, 304 [1963].

⁵ C. FRANCOIS, R. D. MARSHALL, and A. NEUBERGER, Biochem. J. 83, 335 [1962].

⁶ A. J. SHATKIN, in K. HABEL, and N. P. SALZMANN, Fundamental Techniques in Virology, p. 231, Academic Press, New York and London 1969.

⁷ Z. DISCHE and L. B. SHETTLES J. biol. Chemistry 175, 595 [1948].

⁸ L. WARREN J. biol. Chemistry 234, 1971 [1959].