

der entstandenen Säure stieg stark mit dem Sauerstoffdruck an. Das beste Ergebnis erzielten wir mit nur 11 Atmosphären Sauerstoff. Der Wasserwert der Apparatur war bei etwa 19° und 30 at O₂: 2560.6 ± 1.0 cal pro Grad; bei geringerem Druck wurde der Wert entsprechend vermindert.

g Substanz	at O ₂	Wasser ccm	Millimole Säure		cal/g C(NO ₂) ₄
1.0088	21	10	Wand + Dampfraum 8.64	sentina 5.82	539.2
0.8843	18	0.5	" " —	" 7.34	547.4
0.7224	11	0.5	" " —	" 1.17	541.4

Ein unsicherer Versuch gab 533.7 cal/g. Der oben an dritter Stelle aufgeführte Wert ist der sicherste, da die Korrektur für Salpetersäure am kleinsten ist. Als Mittel ergibt sich: + 542.7 ± 2.5 cal/g bei konstantem Vol. und etwa 18°, pro Mol bei konstantem Druck also + 102.9 kcal. Da die Bildungswärme von CO₂ 94.0 kcal beträgt, ist die molare Bildungswärme — 8.9 (± 0.5) kcal; für CH₄ ist der Wert + 17.65, für flüssiges Mononitromethan + 27.1 kcal, für die höher nitrierten Derivate liegen leider keine Zahlen vor. Berger hatte für C(NO₂)₄ eine positive Bildungswärme angegeben.

Zusammenfassung: Es wird eine Methodik entwickelt, um unverbrennliche Substanzen in der calorimetrischen Bombe durch Hitze zu zersetzen. Die Verbrennungswärme von Tetranitromethan wird auf diese Weise zu 102.9 kcal pro Mol bei konstantem Druck bestimmt. Die molare Bildungswärme beträgt — 8.9 kcal.

99. Theodor Wieland: Abtrennung der basischen Aminosäuren durch Adsorption an Wofatit C.

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut f. Medizin. Forschung Heidelberg, Institut f. Chemie.]
(Eingegangen am 17. Juli 1944.)

Die analytischen Methoden zur Abtrennung der basischen Aminosäuren aus einem Proteinhydrolysat gehören zu den am besten durchgearbeiteten. Man macht Gebrauch entweder von der geringen Löslichkeit der Phosphorwolframate in Wasser, die allerdings auch dem Cystinsalz zukommt, oder von der Wanderung als Kationen im elektrischen Feld bei p_H 5.5, d. h. im isoelektrischen Gebiet der neutralen Aminosäuren. Beide Verfahren sind in zahlreichen Fällen zur Bausteinanalyse herangezogen worden. Dabei nimmt man bei der Phosphorwolframsäure-Fällung in Kauf, daß die Niederschläge mitunter andere als die gewünschten Aminosäuren einschließen und daß die Löslichkeit der Komplexsalze doch nicht zu vernachlässigen ist, was Korrekturen nötig macht. Die elektrophoretische Abscheidung erfordert einen beträchtlichen apparativen Aufwand.

Wir haben deshalb, wie schon kurz erwähnt¹⁾, die synthetischen Austauscher der „Wofatit“-Klasse auf ihre Eignung zur spezifischen Adsorption der Hexonbasen untersucht. Während die stark sauren, SO₃H-Gruppen-haltigen Wofatite K und KS alle Aminosäuren als Kationen

¹⁾ Chemie 56, 213 [1943].

binden²⁾, ist in dem COOH-haltigen Wofatit C die saure Natur so abgeschwächt, daß nur die basischen Aminosäuren, und zwar mit großer Spezifität, festgehalten werden. Die neutralen und sauren laufen leicht durch eine Säule aus diesem Material hindurch. Die Kapazität des Kunststoffs C für die Hexonbasen ist recht groß: Von 1 g werden mindestens 100 mg Histidin festgehalten, so daß auch für die präparative Gewinnung der Hexonbasen dieses Adsorptionsmittel mit Vorteil zu verwenden ist. Die Elution gelingt sehr leicht mit verdünnten Mineralsäuren, wonach kurz mit Wasser entsäuert werden kann, wenn dieselbe Säule zu einer neuen Adsorption Verwendung finden soll. Wir haben die Abtrennung der basischen Aminosäuren an künstlichen Gemischen studiert und unsere Erfahrungen schließlich mit Erfolg auf die Hydrolysate einiger Proteine angewandt.

Die Hexonbasen zeigen große Unterschiede im isoelektrischen Punkt, der für Histidin bei etwa $p_H = 7.5$, für Arginin und Lysin bedeutend alkalischer liegt. Auf Grund dieser Tatsache war es zu erklären, daß aus neutraler Lösung Histidin, weil ungeladen, an basisches Al_2O_3 , das mit seinen Na-Ionen als Permutit reagiert, nicht adsorbiert wird, während die beiden anderen, als Kationen vorliegend, gegen die Na-Ionen des Adsorptionsmittels ausgetauscht werden³⁾. Die Kapazität des basischen Al_2O_3 für Arginin und Lysin war jedoch nicht sehr groß⁴⁾. Es wurde deshalb versucht, das Permutitprinzip, also den Austausch eines gelösten Kations gegen ein Metall-Ion des Adsorbens, auch hier zur Anwendung zu bringen in der Hoffnung, auf diese Weise Histidin von den beiden anderen Basen abtrennen zu können. Diese Erwartung bestätigte sich, aber nur, wenn man die Wofatit-C-Säule durch Behandeln mit verdünnter Kalilauge und nachträgliches Neutralwaschen mit Wasser in einen Kaliumpermutit verwandelte. Ein solcher hält von den Hexonbasen aus neutraler Lösung nur Arginin und Lysin fest, während mit Wasser Histidin quantitativ ins Filtrat getrieben wird. Von den untersuchten werden nur K-Ionen in neutraler Lösung ausgetauscht, andere mit kleineren Ionenradien, wie Na^+ oder gar Li^+ , haften so fest am Kunstharz, daß nur wenige oder gar keine durch die Ionen der basischen Aminosäuren verdrängt werden. Allerdings ist auch die Menge der K-Ionen, die unter diesen Bedingungen verdrängt wird, nicht sehr groß, so daß die Capazität der K-permutoiden Wofatit-C-Säule für Arginin und Lysin kleiner ist als die des sauren Wofatit C. Immerhin werden noch 5 mg Arginin von 2 g mit KOH neutralisiertem Wofatit C festgehalten, womit die Aufnahmefähigkeit des basischen Al_2O_3 rund um das 10-fache übertroffen ist. Vielleicht führt die Vorbehandlung mit Rb^+ und Cs^+ zu Adsorptionsmitteln von erhöhter Capazität.

Beschreibung der Versuche.

Für die mikroanalytischen Trennungen muß das technische Austauscherpräparat⁵⁾ wesentlich zerkleinert und vorgereinigt werden. Nach Mahlen des bei 100° getrockneten Materials in der Kugelmühle wird ein

²⁾ K. Freudenberg, H. Walch und H. Molter, Naturwiss. 30, 87 [1942].

³⁾ Ztschr. physiol. Chem. 273, 24 [1942].

⁴⁾ Naturwiss. 30, 374 [1942].

⁵⁾ Alle Wofatite sind bei der I. G. Farbenindustrie A. G., Wolfen, erhältlich, der wir für die Überlassung zahlreicher Proben danken.

Pulver von der Partikelgröße von 0.1—0.2 mm Durchmesser ausgesiebt. Dieses wird nun durch fortgesetztes Waschen mit 2-n. KOH, dann mit 2-n. HCl bis zur Farblosigkeit der Waschflüssigkeit und endlich mit Wasser bis zur neutralen Reaktion gereinigt. Um aus diesem sauren Wofatit C den neutralen herauszustellen, versetzt man im Überschuß mit 2-n. KOH, gießt nach einiger Zeit ab und wäscht dann mit Wasser neutral. 2 ccm dieses Pulvers, als Bodensatz in Wasser gemessen, wiegen etwa 1 g.

Versuche mit saurem Wofatit C.

Modellgemische: Eine neutrale wäbr. Lösung von 0.50 mg Glutaminsäure-N und 1.30 mg Arginin-N wird an 0.5 g saurem Wofatit C adsorbiert, mit 40 ccm Wasser gewaschen (F) und mit 40 ccm 1-n. HCl eluiert (E). F = 0.56 mg N, E = 1.26 mg N. — 0.58 mg Valin-N und 0.94 mg Histidin-N ebenso adsorbiert und eluiert: F = 0.52 mg N, E = 0.92 mg N. — 0.60 mg Valin-N, 0.50 mg Glutaminsäure-N, 0.94 mg Histidin-N, 1.30 mg Arginin-N und 0.64 mg Lysin-N ebenso adsorbiert und eluiert: F = 1.07 mg N (ber. 1.10 mg), E = 2.82 mg N (ber. 2.88 mg).

Analyse einiger Proteinhydrolysate: Je 2.0 g der trocknen Proteine wurden mit 10 ccm 25-proz. Schwefelsäure 20 Stdn. zum gelinden Sieden erhitzt. Nach Verdünnen mit Wasser wurde mit Barytwasser eben phenolphthalein-alkalisch gemacht und im Vak. bei 40° 1 Stde. eingedampft, um das Ammoniak zu entfernen. Dann wurde mit Schwefelsäure genau neutralisiert, vom BaSO₄ abzentrifugiert und dieses 5-mal mit je 20 ccm Wasser ausgekocht. Die Zentrifugate wurden vereinigt und auf 200.0 ccm gebracht. Zur Abtrennung der Hexonbasen läßt man durch eine Säule von 8 g saurem Wofatit C laufen und wäscht mit 500 ccm Wasser nach. Dann wird mit 500 ccm 1-n. HCl eluiert, das Eluat im Vak. zur Trockne verdampft und in einem geeigneten Wasservolumen aufgenommen. Gefunden wurden folgende N-Werte der Hexonbasen in Prozenten des Gesamt-N:

Casein (Hammarsten)	18.0, ber. 18.8 ⁶⁾
Gelatine	23.2, ber. 22.3 ⁷⁾
Zein	9.4, ber. 5.0 ^{7) 8)}

Versuche mit neutralem Wofatit C.

2.0 g des neutralen Materials wurden für die folgenden Trennungsversuche verwendet: 0.79 mg Alanin-N und 0.63 mg Arginin-N aus neutraler Lösung adsorbiert, mit 50 ccm Wasser gewaschen (F) und mit 60 ccm 1-n. HCl eluiert (E). F = 0.81 mg N, E = 0.58 mg N. — 0.79 mg Alanin-N und 0.95 mg Histidin-N: F = 1.62 mg N, E = 0.05 mg N. — 0.95 mg Histidin-N und 0.63 mg Arginin-N: F = 0.91 mg N, E = 0.58 mg N.

Den Frl. L. Wirth, H. Fremerey und E. Klinger danke ich sehr für die eifrige Mithilfe.

⁶⁾ G. R. Tristram, Biochem. Journ. 33, 1271 [1939].

⁷⁾ C. L. A. Schmidt, Chemistry of Aminoacids and Proteins, Springfield Illinois, S. 217.

⁸⁾ Vergl. auch die von uns an anderer Stelle (s. Fußn. 4) erhaltenen höheren Werte.