

Fig. 3 zeigt die Sorptionsisothermen derselben Substanzen; beide Kurven wurden mit der konventionellen Schalenmethode bei 40 Torr (Angleichung im Exsikkator) und mit der oben beschriebenen Mikromethode aufgenommen.

Die Isothermen der Schalenmethode (Makromethode) stimmen sehr gut überein mit jenen der Mikromethode: die Abweichungen sind nicht signifikant. Damit ist die neue Methode als anwendbar erwiesen. Sie bietet ähnliche Vorteile und Nachteile wie die Messung mit dem Isoteniskop und Kathetometer: man kann nur eine einzige Probe aufs Mal messen; dafür aber ist ohne weiteres die Gleichgewichtseinstellung ersichtlich. Weiter führt die Verwendung kleiner Substanzmengen zu geringen Schichtdicken im Wägeschälchen und somit zu einem kleinen Zeitbedarf zur Gleichgewichtseinstellung, weshalb man ohne Druckreduktion auskommt. In jenen Fällen aber, bei denen überhaupt nur geringe Substanzmengen vorhanden sind, ist diese Mikromethode die einzige Möglichkeit, um die Sorptionseigenschaften der Proben zerstörungsfrei zu messen. Eine Alternative (allerdings unter Zerstörung des Materials) besteht in der Mikrotitration des Wassers nach KARL FISCHER nach der Konditionierung der Probe.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Es wird eine Apparatur zur automatischen Bestimmung der Kinetik der Sorption und Desorption beschrieben, die sich auf die CAHN-Elektrowaage stützt. Mit der gleichen Waage ist auch die Mikrobestimmung von Sorptionsisothermen möglich.

Physikalisch-chemisches Institut der Universität Basel  
KNORR-Forschungs-Institut Zürich

## 167. Quantitative Bestimmung von Nitroarginin in synthetischen Polypeptiden

von J. R. Gamper<sup>1)</sup>

(18. V. 62)

*Einleitung.* Die Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin (in viel kleinerem Masse auch Phenylalanin) besitzen ein beträchtliches Absorptionsvermögen für UV. in der Gegend von 250–320  $m\mu$ , einem Bereiche, in welchem die anderen Aminosäuren durchlässig sind. Diese Eigenschaft bildete schon die Grundlage mehrerer Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Tyrosin und Tryptophan in Proteinen<sup>2)</sup>.

$\omega$ -Nitroarginin<sup>3)</sup>, das in der Natur nicht gefunden wurde, dem aber in der präparativen Peptidchemie grösste Bedeutung zukommt<sup>4)</sup>, besitzt ebenfalls ein sehr grosses

1) Vorliegende Arbeit bildet einen Teil meiner Promotionsarbeit und wurde auf Anregung von Herrn Prof. Dr. R. SCHWYZER ausgeführt.

2) T. W. GOODWIN & R. A. MORTON, *Biochem. J.* 40, 628 (1946); G. H. BEAVAN & E. R. HOLIDAY, *Advances in Protein Chemistry* 7, 319 (1952); W. L. BENCZE & KARL SCHMID, *Analyt. Chemistry* 29, 1193 (1957).

3) A. KOSSEL & E. L. KENNAWAY, *Z. physiol. Chem.* 72, 486 (1911).

4) Vgl. die Übersicht von H. GIBIAN & E. SCHRÖDER, *Liebigs Ann. Chem.* 642, 145 (1961).

Absorptionsvermögen in diesem Wellenlängenbereich<sup>5)</sup>. Doch fehlte bisher eine schnelle und zuverlässige Methode zu seiner quantitativen Bestimmung neben den anderen Chromophoren. Eine solche Methode wäre sehr wertvoll, um die Hydrierung der NO<sub>2</sub>-Gruppe in Nitroargininpeptiden und die Reinheit der Endprodukte zu kontrollieren (die Hydrierung soll möglichst quantitativ sein, aber nicht zu weit fort-schreiten, ansonst allfällig vorhandene Aminosäuren Tryptophan und Tyrosin ange-griffen werden<sup>6)</sup>).

*Problemstellung.* Um Nitroarginin neben Tyrosin und Tryptophan bestimmen zu können, müssen im einfachsten Falle zwei Messpunkte gefunden werden, zwischen welchen sich das Absorptionsvermögen des Nitroarginins sehr stark verändert, währenddem die molare Extinktion der anderen vorhandenen Chromophore zwischen diesen Messpunkten möglichst gleich bleibt.

In der vorliegenden Arbeit ist das Problem dadurch gelöst worden, dass die beiden Messpunkte in zwei verschiedenen, spezifisch geeigneten Lösungsmittelsystemen ge-wählt wurden.

*UV.-Absorptionsspektren von Nitroarginin (I), Tryptophan (II) und Tyrosin III:*

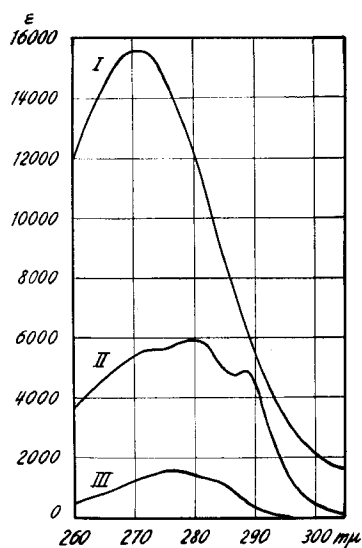


Fig. 1

*In Dimethylformamid/0,2N HCl (1:1; v/v)*

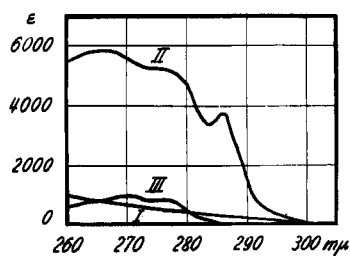


Fig. 2

*In wasserfreier Trifluoressigsäure*

*Wahl des Lösungsmittels.* Damit synthetische, mit Schutzgruppen versehene Peptide überhaupt untersucht werden können, müssen zunächst geeignete Lösungs-mittel gefunden werden. VANDENBELT<sup>7)</sup> hat vorgeschlagen, Gemische von Dimethyl-formamid (DMF) und wässriger Salzsäure zu gebrauchen. Für diese Arbeit erwies

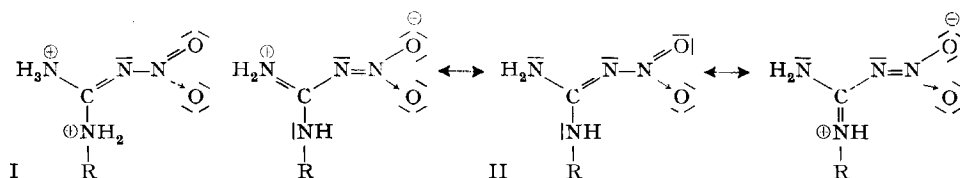
<sup>5)</sup> B. RINIKER & R. SCHWYZER, *Helv.* 44, 674 (1961).

<sup>6)</sup> Unveröffentlichte Beobachtungen von H. KAPPELER, B. RINIKER, W. RITTEL, P. SIEBER & R. SCHWYZER.

<sup>7)</sup> J. M. VANDENBELT, vorgetragen vor der Pharmaceutical Manufacturers Association, Sea Island, Georgia, am 16. November 1960.

sich ein Gemisch von gleichen Volumina DMF und 0,2N HCl als sehr günstig, da sozusagen alle «geschützten» Peptide in einer der beiden Komponenten löslich sind und nach Zugabe der zweiten Komponente gut gelöst bleiben. Trifluoressigsäure (TFA) ist ebenfalls ein vorzügliches Lösungsmittel für «geschützte» und freie Peptide und besitzt (wie hier gefunden wurde) den Vorteil, dass es dem Nitroarginin im Bereiche über 260  $m\mu$  fast vollständige Durchlässigkeit verleiht (Fig. 2), währenddem Nitroarginin im DMF-HCl-H<sub>2</sub>O-Gemisch stark absorbiert (Fig. 1).

Diese Erscheinung könnte die Folge einer doppelten Protonierung der Nitroguanidgruppe in der wasserfreien Säure (I) sein, wodurch der mesomere Zustand (II) weitgehend aufgehoben würde:



*Bestimmung des Nitroarginin-Gehaltes in Aminosäuregemischen.* Da die molaren Extinktionen von absorbierenden Aminosäureresten von der molekularen Umgebung (z. B. beim Einbau in verschiedene Polypeptidsequenzen) abhängen, wurde die Methode zuerst anhand von Nitroarginin enthaltenden Aminosäuregemischen gearbeitet. Es ist dies ein Fall, der in der analytischen Praxis kaum vorkommt, da z. B. bei der Säurehydrolyse von Nitroargininpeptiden der Nitroargininrest zu Ornithin und Arginin abgebaut wird<sup>5)</sup>. Seine Anwendung ist jedoch denkbar bei der Analyse von Hydrolysaten von Nitroargininpeptiden, die durch enzymatische Methoden gewonnen wurden (z. B. mittels Carboxypeptidase oder Aminopeptidase).

Die Parameter, die zur Bestimmung des Nitroarginin-Gehaltes bei Aminosäuregemischen dienen, können jedoch, ohne grosse Fehler zu verursachen, auch auf die Bestimmung dieser Aminosäure in einfacheren Peptiden angewandt werden (siehe unten).

Zur Lösung des Problems wurde anhand der Spektren von Fig. 1 und 2 in den beiden Lösungsmitteln je eine Wellenlänge gesucht, wo:

- die  $\epsilon$ -Werte von Nitroarginin voneinander sehr stark verschieden sind;
- die  $\Delta\epsilon^8$  der anderen vorhandenen Chromophore möglichst klein sind;
- jeweils ein Absorptionsmaximum auftritt, die richtige Wellenlänge also am sichersten definiert ist, und die Ablesefehler möglichst klein sind.

Diese Wellenlängen sind<sup>9)</sup>:

A. 271,6  $m\mu$  in DMF/0,2N HCl (Max. durch Arg[NO<sub>2</sub>] verursacht);

B. 267,6  $m\mu$  in TFA (Max. durch -CH<sub>2</sub>- verursacht).

Wie für die Punkte A und B die drei Bedingungen erfüllt werden, ist aus Fig. 3 und Tab. 1 ersichtlich.

<sup>8)</sup> Differenz zwischen den  $\epsilon$ -Werten einer Substanz, gemessen an zwei verschiedenen Messpunkten.

<sup>9)</sup> Es handelt sich hierbei um Mittelwerte. Die einzelnen Maxima variieren zwischen: A. 270,4–272,3  $m\mu$ ; B. 267,1–267,9  $m\mu$ .

Zur Frage, wie solche Messpunkte gefunden werden können, soll an dieser Stelle nur erwähnt werden, dass z. B. die Superposition der aufgezeichneten UV.-Spektren der drei Aminosäuren in jedem der zwei Lösungsmittel auf jene Wellenlängen hinweist, wo die erwähnten drei Bedingungen am besten erfüllt werden. Es ist selbstverständlich, dass viele Lösungsmittelsysteme geprüft werden müssen, bis man zwei Messpunkte findet, an denen die besagten Bedingungen einigermassen gut erfüllt werden.

Tabelle 1. Molare Extinktion der Aminosäuren an den Messpunkten A und B

Aminosäure	A: DMF/0,2N HCl $\lambda = 271,6$	B: TFA $\lambda = 267,6$	$\Delta \epsilon_0$ $\epsilon_{(A)} - \epsilon_{(B)}$
Nitroarginin . . .	15 595	775	+ 14 820
Tryptophan . . .	5 540	5800	- 260
Tyrosin . . . . .	1 285	895	+ 390

Tabelle 2. Molare Extinktionskoeffizienten synthetischer Peptide an den beiden definierten Messpunkten A und B

Peptid	$\epsilon$ (DMF/HCl) $\lambda = 271,6^{10}$	$\epsilon$ (TFA) $\lambda = 267,6^{10}$
Z · Arg(NO <sub>2</sub> )-Phe · OCH <sub>3</sub> <sup>11</sup> . . . . .	15 485	837
Z · Arg(NO <sub>2</sub> )-Phe-Ser · OCH <sub>3</sub> <sup>12</sup> . . . . .	15 472	750
Z · Pro-Phe-Arg(NO <sub>2</sub> ) · OCH <sub>3</sub> <sup>12</sup> . . . . .	15 602	769
Z · Asp(NH <sub>2</sub> )-Arg(NO <sub>2</sub> ) · OH <sup>13</sup> . . . . .	15 428	762
H · Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe · OH <sup>14</sup> . . . . .	1 297	960
Z · Asp(NH <sub>2</sub> )-Arg(NO <sub>2</sub> )-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe · OCH <sub>3</sub> <sup>15</sup> . . . . .	16 914	1 891
Z · Phe-Arg(NO <sub>2</sub> )-Try-Gly · OCH <sub>3</sub> <sup>16,17</sup> . . . . .	20 342	5 589
H · Phe-Arg(NO <sub>2</sub> )-Try-Gly · OCH <sub>3</sub> <sup>16</sup> . . . . .	20 380	5 614
H · Glu(OBu <sup>t</sup> )-His-Phe-Arg-Try-Gly · OCH <sub>3</sub> <sup>18</sup> . . . . .	5 371	5 120
H · Val-Lys(BOC)-Val-Tyr-Pro · OBu <sup>t</sup> <sup>18</sup> . . . . .	1 252	824
Z · Arg(NO <sub>2</sub> )-Arg(NO <sub>2</sub> )-Pro · OCH <sub>3</sub> <sup>19</sup> . . . . .	30 547	1 759

Z: Benzylloxycarbonyl; Bu<sup>t</sup>: *t*-Butyl; BOC: *t*-Butyloxycarbonyl.

<sup>10</sup>) Die  $\epsilon$ -Werte wurden jeweils bei der Wellenlänge des Absorptionsmaximums (Nitroarginin-peptide in DMF/HCl bei 270,4–272,3 m $\mu$ ) oder des von Benzyl herrührenden Nebenmaximums (TFA, 267,1–267,9 m $\mu$ ) gemessen. Wo keine Maxima festgestellt werden konnten, wurde die Extinktion bei 271,6 bzw. 267 6 m $\mu$  gemessen. Es sind dies die Wellenlängen, an denen die Extinktionsmaxima am häufigsten auftreten.

<sup>11</sup>) K. HOFMANN, A. RHEINER & W. D. PECKHAM, J. Amer. chem. Soc. 75, 6083 (1953).

<sup>12</sup>) B. RINIKER, unveröffentlicht.

<sup>13</sup>) W. RITTEL, B. ISELIN, H. KAPPELER, B. RINIKER & R. SCHWYZER, Helv. 40 614 (1957).

<sup>14</sup>) B. RINIKER & R. SCHWYZER, Helv. 44, 658 (1961).

<sup>15</sup>) R. SCHWYZER, B. ISELIN, H. KAPPELER, B. RINIKER, W. RITTEL & H. ZUBER, Helv. 41, 1287 (1958).

<sup>16</sup>) H. KAPPELER & R. SCHWYZER, Helv. 44, 1136 (1961).

<sup>17</sup>) H. KAPPELER, Helv. 44, 476 (1961).

<sup>18</sup>) R. SCHWYZER & H. KAPPELER, Helv. 44, 1991 (1961).

<sup>19</sup>) H. KAPPELER, unveröffentlicht.

Im Interesse einer übersichtlicheren Darstellung wurden auf Fig. 3 nicht die gesamten Spektren in den beiden gewählten Lösungsmittelsystemen superponiert, sondern es wurde die Festlegung des Messpunktes B vorausgesetzt, und die Werte der molaren Extinktion der drei Aminosäuren in B wurden als Gerade auf die Extinktionskurven der Aminosäuren in DMF/HCl superponiert.

**Bestimmung des Nitroarginingehaltes in Peptiden.** In Dimethylformamid/0,2N HCl (1:1; v/v) tritt bei allen Peptiden mit Nitroarginin ein Hauptmaximum bei 270,4–272,3  $m\mu$  auf. In Tabelle 2 werden alle Peptide aufgeführt, welche im Verlaufe dieser Untersuchung in diesem Lösungsmittel ausgemessen wurden.

In Trifluoressigsäure tritt im allgemeinen nur ein kleines Nebenmaximum bei 267,1–267,9  $m\mu$  auf, welches auf die Benzyl-Gruppierung (in Benzyloxycarbonyl und in Phenylalanin) zurückzuführen ist. In Tabelle 2 werden die ausgemessenen Peptide aufgeführt.

Zur Bestimmung des Nitroarginin-Gehaltes werden die  $\epsilon$ -Werte des zu untersuchenden Peptides an den beiden definierten Messpunkten A und B ermittelt. Die Differenz  $\Delta\epsilon_{(\text{exp})}$  wird durch das früher festgestellte  $\Delta\epsilon_0[\text{Arg}(\text{NO}_2)] = 14820$  (Tab. 1) dividiert. Es wird dann  $\Delta\epsilon_{(\text{exp})}/\Delta\epsilon_0 = \text{Anzahl der Reste Nitroarginin pro Molekel}$  (bei vorausgesetzter Einheitlichkeit des Peptides).

Will man aber das Nitroarginin<sup>20)</sup> in Gewichtsprozenten der zu untersuchenden Substanz bestimmen, so muss man den Ausdruck  $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ <sup>21)</sup> einführen. Dann gilt für Nitroarginin:

$$\begin{aligned} \text{in DMF/0,2 N HCl, } \lambda &= 271,6 \text{ m}\mu, E_{1\text{cm}}^{1\%} = 711,45; \\ \text{in TFA, } \lambda &= 267,6 \text{ m}\mu, E_{1\text{cm}}^{1\%} = 35,35; \\ &\text{und } \Delta E_{0,1\text{cm}}^{1\%} = 676,1. \end{aligned}$$

Somit muss man die Messungen an den vorgeschriebenen Messpunkten durchführen,  $\Delta E_{1\text{cm}}^{1\%}(\text{exp})$  bestimmen, diese Zahl durch  $\Delta E_{0,1\text{cm}}^{1\%} = 676,1$  dividieren und mit 100% multiplizieren.

Da es sich bei diesen Auswertungen nicht um relative, sondern um absolute Bestimmungen handelt, muss die Substanz vor der Einwaage auf das sorgfältigste getrocknet werden. Die Methode eignet sich denn auch zur Bestimmung von gebundenem Wasser und gebundener Säure in Peptid-Hydraten bzw. -Salzen.

Die nach der beschriebenen Methode experimentell ermittelten Nitroarginin-Gehalte von synthetischen Peptiden sind in Tabelle 3 zusammengestellt.

**Korrekturen.** Aus Tab. 1 und Fig. 3 ist ersichtlich, dass infolge der vorhandenen Differenzen  $\epsilon_A - \epsilon_B$  von Tryptophan und Tyrosin eine kleine Abweichung von dem richtigen Nitroargininwert auftreten kann, wenn diese Chromophore im Peptid vorhanden sind. Aus den angegebenen  $\Delta\epsilon$ -Werten kann man die nötigen Korrekturen für die experimentell bestimmten Nitroarginingehalte errechnen. Diese Korrekturen betragen:

$$\begin{aligned} &-0,0262 \text{ pro Tyrosin-Rest,} \\ &+0,0175 \text{ pro Tryptophan-Rest.} \end{aligned}$$

<sup>20)</sup> Nicht als -Arg(NO<sub>2</sub>)-Rest ausgedrückt, sondern als freie Säure (Mol.-Gew.: 219,20).

<sup>21)</sup> A. E. GILLAM & E. S. STERN, in «Electronic Absorption Spectroscopy», S. 10, Edward Arnold, London 1955.

Wird der Nitroarginingehalt jedoch in Prozenten ausgedrückt, so sind diese Korrekturen relativ zum vorher experimentell bestimmten Prozentwert für Nitroarginin zu berücksichtigen. Somit gilt:

$$\% \text{ Arg(NO}_2\text{) korr.} = \% \text{ Arg(NO}_2\text{)gef.} \times (1 + \text{Korrektur}).$$

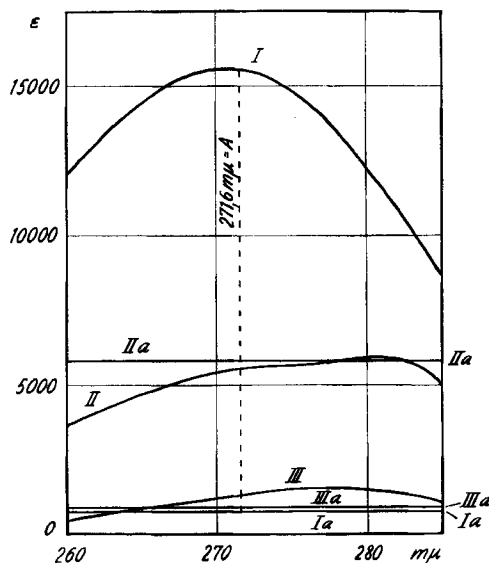


Fig. 3. Ermittlung des Messpunktes A in Dimethylformamid/0,2N HCl bei festgelegtem Messpunkt B (267,6 mμ) in Trifluoressigsäure

Absorptionskurven in DMF/0,2N HCl von: I Arg(NO<sub>2</sub>); II Try; III Tyr.  
 $\epsilon_{267,6 \text{ m}\mu}$  in Trifluoressigsäure von: Ia Arg(NO<sub>2</sub>); IIa Try; IIIa Tyr.

Wie aus Tabelle 3 hervorgeht, werden die Werte in diesen Beispielen durch die Korrektur meistens nicht verbessert; wahrscheinlich liegen die Verhältnisse in den Peptiden anders als in Aminosäuregemischen, und die Übertragung der Korrekturparameter von diesen Systemen auf jene ist nicht ohne weiteres erlaubt. Dies gilt, streng genommen, auch für den Parameter  $\Delta\epsilon_0[\text{Arg(NO}_2)] = 14820$ , der anhand von Aminosäuregemischen erhalten wurde. Die dadurch verursachten Fehler sind relativ klein, können sich aber in speziellen Fällen summieren, vgl. Z · Arg(NO<sub>2</sub>)-Arg(NO<sub>2</sub>)-Pro · OCH<sub>3</sub>, Tab. 3.

*Relativer Einfluss der Messfehler bei A und B auf die Genauigkeit der Bestimmung.* Bei ähnlich grossen  $\epsilon$ -Werten hat ein allfällig auftretender Messfehler am Messpunkt B (in Trifluoressigsäure) auf die Genauigkeit der Nitroargininbestimmung einen viel geringeren Einfluss als ein möglicher, gleich grosser Fehler in DMF/0,2N HCl (Messpunkt A). Da die  $\epsilon$ -Werte gleicher Nitroargininpeptide bei B im allgemeinen  $3^{22)}$ – $20^{23)}$  mal kleiner sind als bei A, so sind die Lösungen in TFA entsprechend konzentrierter zu wählen als in DMF/HCl; beim Ausrechnen der molaren Extinktion ( $\epsilon = E/c$ )

<sup>22)</sup> Beim Auftreten von Nitroarginin und Tryptophan im Verhältnis von 1:1.

<sup>23)</sup> In Abwesenheit von Tryptophan und Tyrosin.

wird daher der absolute Fehler von  $\epsilon_{(\text{molar})}$  bei B um einen Faktor von ca. 3–20 mal kleiner als der Fehler bei A. Da aber nachher die Differenz  $\epsilon_{(A)} - \epsilon_{(B)}$  gebildet werden muss, kommt es bei der Genauigkeit der Bestimmung nicht auf die relativen, sondern auf die absoluten Fehler von  $\epsilon_{(\text{molar})}$  an.

Tabelle 3. Experimentelle Kontrolle der beschriebenen Methode

Peptide	% Nitroarginin <sup>20)</sup>			Reste -Arg(NO <sub>2</sub> )- pro Molekel		
	ber.	gef.	korr. f. Tyr, Tyr.	ber.	gef.	korr. f. Tyr, Tyr.
Z · Arg(NO <sub>2</sub> )-Phe · OCH <sub>3</sub> . . . . .	42,60	42,10		1,00	0,99	
Z · Arg(NO <sub>2</sub> )-Phe-Ser · OCH <sub>3</sub> . . . . .	36,44	36,20		1,00	0,99	
Z · Pro-Phe-Arg(NO <sub>2</sub> ) · OCH <sub>3</sub> . . . . .	35,84	35,87		1,00	1,00	
Z · Asp(NH <sub>2</sub> )-Arg(NO <sub>2</sub> ) · OH . . . . .	46,89	46,40		1,00	0,99	
H · Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe · OH . . . . .	—	0,66	-0,10 <sup>24)</sup>	—	0,02	0,00
Z · Asp(NH <sub>2</sub> )-Arg(NO <sub>2</sub> )-Val-Tyr-Val-His- Pro-Phe · OCH <sub>3</sub> . . . . .	17,90	18,15	17,68	1,00	1,01	0,99
Z · Phe-Arg(NO <sub>2</sub> )-Try-Gly · OCH <sub>3</sub> . . . . .	28,93	28,80	29,31	1,00	1,00	1,01
H · Phe-Arg(NO <sub>2</sub> )-Try-Gly · OCH <sub>3</sub> . . . . .	35,15	35,02	35,64	1,00	1,00	1,01
H · Glu(OBu <sup>t</sup> )-His-Phe-Arg-Try-Gly · OCH <sub>3</sub>	—	0,41	0,84	—	0,02	0,03
H · Val-Lys(BOC)-Val-Tyr-Pro · OBu <sup>t</sup> . . . . .	—	0,83	0,08	—	0,03	0,00
Z · Arg(NO <sub>2</sub> )-Arg(NO <sub>2</sub> )-Pro · OCH <sub>3</sub> . . . . .	65,86	63,97		2,00	1,94	

### Experimentelle Einzelheiten

**Apparate.** Alle halbquantitativen Vorversuche zur Ermittlung der günstigsten Messpunkte (Lösungsmittel, Wellenlänge) wurden auf einem CARY Recording Spectrophotometer durchgeführt. Die quantitativen Messungen wurden alle auf einem BECKMAN Quartz Spectrophotometer (Model DU) durchgeführt. Die Eichung der Wellenlängenskala des registrierenden CARY-Instrumentes zeigte in den verwendeten Messbereichen eine Abweichung von höchstens 0,1 m $\mu$ . Der BECKMAN Spektrophotometer wurde mit einer Lösung von Samariumoxid in HCl ( $\lambda_{max} = 401,6 \text{ m}\mu$ ) geeicht. Gefunden wurde:  $\lambda_{max} = 401,0 \text{ m}\mu$ . Zur Prüfung der Genauigkeit der gemessenen  $\epsilon$ -Werte wurden Lösungen von Kaliumchromat in 0,05N KOH verwendet. Hier wurde bei 273 m $\mu$  eine ebenfalls gute Übereinstimmung mit der Literatur gefunden: Lit.  $\epsilon = 3688$ <sup>25)</sup>; gef.  $\epsilon = 3718$ .

**Peptide.** Die verwendeten Peptide wurden alle in dankenswerter Weise von Herrn Prof. Dr. R. SCHWYZER und seinen Mitarbeitern (CIBA AG., Basel) zur Verfügung gestellt.

**Lösungsmittel.** — *Trifluoressigsäure* (FLUKA) wurde in einer trockenen Apparatur destilliert. Die mittlere Fraktion war genügend rein für spektralanalytische Zwecke. — *Dimethylformamid*: Für die Vorversuche wurde handelsübliches Dimethylformamid nochmals im Vakuum destilliert. Für die quantitativen Messungen wurde DMF der Firmen MERCK («für UV.-Spektroskopie») und EASTMAN («Spectro Grade») verwendet. — *0,2N HCl*: 0,1 Mol Salzsäure («Titrisol», MERCK) wurde in einen Masskolben von 500 ml Inhalt gegeben und mit mehrfach (2–3mal) aus Quarz destilliertem Wasser verdünnt. — *0,05N KOH*: 0,1 Mol Kaliumhydroxid («Titrisol», MERCK) wurde in einem Masskolben (1000 ml) mit dreifach aus Quarz destilliertem Wasser verdünnt. Diese Lösung wurde bei Gebrauch (Kaliumchromat-Lösungen) jeweils 1:1 mit Wasser verdünnt.

**Einwaagen.** Die zum Teil sehr hygroskopischen Peptide und Aminosäuren wurden unmittelbar vor jeder Einwaage mindestens 4 Stunden über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> neu getrocknet (0,005–0,001 Torr,

<sup>24)</sup> Negativer Wert; ergibt sich aus der Korrektur.

<sup>25)</sup> J. M. VANDENBELT, J. FORSYTH & A. GARRETT, Ind. Engng. Chemistry (Analyt. Ed.) 17, 235 (1945).

100° C). Für jede Messung wurden zwischen 1 mg und 9 mg der Aminosäure bzw. des Peptides auf einer BUNGE-Mikrowaage eingewogen.

*Lösungen.* Die Konzentration der Lösungen wurde immer so gewählt, dass die Extinktion in den optimalen Bereich von 0,4–1,8<sup>26</sup>) zu liegen kam. – Zur Herstellung der Gemische von DMF und 0,2N HCl (1:1) wurden aus Vollpipetten nacheinander gleiche Mengen beider Lösungsmittel zur Substanz gegeben. Als Gesamtvolumen wurde immer der doppelte Pipetteninhalt angenommen. – Das reine (Vergleichs-)Lösungsmittelgemisch und die Lösungen wurden immer gleichzeitig hergestellt. In keinem Falle waren die Lösungen im Zeitpunkt der Messung älter als 2 Std. Aminosäuren wurden erst in HCl gelöst und dann mit DMF verdünnt. Peptidderivate wurden in umgekehrter Reihenfolge gelöst. Alle beschriebenen Substanzen lösten sich ausgezeichnet auf diese Art.

Der CIBA AG. in Basel verdanke ich Beihilfe bei der Beschaffung von Materialien und die Möglichkeit, am CARY-Instrument orientierende Messungen ausführen zu lassen (Dr. H. HÜRZELER).

#### SUMMARY

A spectrochemical method for the assay of  $\omega$ -nitroarginine in synthetic peptides is described. It is based on the strong difference in absorption of the nitroarginyl residue in the two solvents dimethylformamide (DMF)/0,2N HCl (1:1;  $v/v$ ) and anhydrous trifluoroacetic acid (TFA). The difference is greatest for nitroarginine and smallest for tryptophan and tyrosine, and most easily measured between the points 271.6  $m\mu$  (DMF/0,2N HCl) and 267.6  $m\mu$  (TFA).

Organisch-Chemisches Institut  
der Universität Zürich

---

### 168. Rhodo- und Erythro-Salze des Chroms(III) Ionengewichte, Acidität und Basizität, Lichtabsorption und die Kinetik der Umwandlung von G. Schwarzenbach und B. Magyar

(19. V. 62)

Chrom(III)-Komplexe stellt man häufig durch Zugabe des betreffenden Liganden zu einer Lösung von Chrom(II)-Salz und nachherige Oxydation her. Die Komplexbildung des Ions  $\text{Cr}^{2+}$  findet dabei momentan statt und die Oxydation verwandelt dann den labilen Cr II- in den inerten Cr III-Komplex, bei dem der Ersatz eines Liganden durch einen andern nur noch unter Aufwendung einer gewissen Aktivierungsenergie möglich ist. So kann man auch das gelbe Kation  $[\text{Cr}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$  erzeugen, indem man die mit  $\text{NH}_3$  und  $\text{NH}_4\text{Cl}$  versetzte Lösung von Chrom(II)-chlorid stehen lässt, wobei sich das Metall unter Wasserstoffentwicklung oxydiert. Andere Komplexe entstehen aber, wenn mit Luft oxydiert wird, nämlich die 1882 von JÖRGENSEN<sup>1)</sup> beschriebenen, leuchtend roten Rhodo- und Erythro-Salze.

Zur Herstellung des normalen Rhodochlorides:  $\{[\text{Cr}_2(\text{OH})(\text{NH}_3)_5]\text{Cl}_5, \text{H}_2\text{O}\}$  fügt man eine mit metallischem Zink reduzierte, saure Lösung von  $\{\text{CrCl}_3, 6\text{H}_2\text{O}\}$  zu konzentriertem Ammoniak, das vorher mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$  gesättigt worden ist, und leitet Luft

<sup>1)</sup> S. M. JÖRGENSEN, J. prakt. Chem. [2] 25, 321, 398 (1882).