131. Die Adsorption einiger Di- und Tri-peptide an synthetischen organischen Ionenaustauschern

von **M. Brenner** und **C. H. Burckhardt**[1]).

(26. IV. 51.)

Die synthetischen organischen Ionenaustauscher sind hochmolekulare Kondensations- oder Polymerisationsharze, welche über ein dreidimensionales Kohlenstoffgerüst verteilt zahlreiche saure oder basische Gruppen aufweisen. Sie lassen sich deshalb als wasserunlösliche polyvalente Säuren oder Basen auffassen, deren Eigenschaften unter anderem durch die Zahl und Stärke der ionisierenden Gruppen sowie durch die Quellbarkeit und den permutoiden Charakter des gesamten Gebildes gegeben sind.

Suspendiert man ein — beispielsweise durch Polykondensation aus Formaldehyd und Phenolsulfosäure bereitetes[2]) — saures Harz in Wasser, so bleibt die Suspension neutral, weil die Harzsäure aus elektrostatischen Gründen keine Wasserstoffionen in Lösung senden kann. Wenn dieser Suspension aber eine geringe Menge eines wasserlöslichen Salzes wie NaCl oder Na_2SO_4 zugesetzt wird, so tritt sofort stark saure Reaktion auf. Sie ist die Folge eines unter Wahrung der Elektroneutralität eintretenden, stöchiometrischen Austausches zwischen den Kationen in der Lösung und den Protonen der Sulfonsäure-Gruppen im Harz. Versetzt man statt mit Kochsalz mit etwas Natronlauge, so unterscheidet sich der eintretende Vorgang nur dadurch vom erstgenannten, dass die durch Austausch in Lösung gegangenen Protonen sich mit den Hydroxylionen der Lauge zu Wasser verbinden. Der Ionenaustausch macht sich hier also nicht durch das Auftreten von Säure, sondern durch das Verschwinden von Lauge bemerkbar. Die Verhältnisse gestalten sich am übersichtlichsten, wenn man den Endzustand in jedem Fall als das Ergebnis einer Verteilung aller im System vorhandenen Kationen zwischen der Lösung und dem Harz betrachtet. — Bei Phenolharzen dissoziieren in alkalischer Lösung ausser den Sulfonsäure-Gruppen auch phenolische Hydroxyl-Gruppen[3]). Die dadurch bedingte Komplikation im reaktiven Verhalten fällt weg, wenn man an Stelle „polyfunktioneller" Kondensationsharze die neueren „monofunktionellen" Polymerisationsharze verwendet. Solche Produkte werden z. B. durch Sulfonierung von vernetzten Polystyrolen hergestellt[3])[4]).

K. Freudenberg, H. Walch & H. Molter[5]) sowie *R. J. Block*[6]) haben wohl als erste erkannt, dass synthetische organische Ionenaustauscher unter geeigneten Bedingungen Aminosäuren aus ihren wässerigen Lösungen adsorbieren können. In der Folge ist diese Eigenschaft in zahlreichen Laboratorien genauer überprüft worden. Heute stellen die sauren und basischen Austauscher geschätzte Hilfsmittel dar, die es je nach der Wahl der Versuchsanordnung gestatten,

1. Aminosäuregemische analytisch oder präparativ in drei Gruppen (saure, neutrale, basische Aminosäuren) aufzutrennen[7]);

---

[1]) Vgl. Dissertation *Christoph Heinrich Burckhardt*, Basel 1950.

[2]) *T. R. E. Kressman & J. A. Kitchener*, Soc. **1949**, 1193.

[3]) *N. E. Topp & K. W. Pepper*, Soc. **1949**, 3299.

[4]) *D. K. Hale & D. Reichenberg*, Discussions Faraday Soc. **7**, 79 (1949).

[5]) Naturwiss. **30**, 87 (1942).

[6]) Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. **51**, 252 (1942).

[7]) *R. K. Cannan*, Ann. N. Y. Acad. Sci. **47**, 135 (1946); *A. Tiselius, B. Drake & L. Hagdahl*, Exper. **3**, 21 (1947); *J. C. Winters & R. Kunin*, Ind. Eng. Chem. **41**, 460 (1949).

2. innerhalb dieser Gruppen präparativ mehr oder weniger scharfe Trennungen zu verwirklichen[1]), und

3. im Mikromaßstab vollständige Analysen von Eiweisshydrolysaten durchzuführen[2]).

Das Verhalten einer bestimmten Aminosäure gegenüber einem gegebenen Austauscher lässt sich qualitativ leicht verstehen, wenn man davon ausgeht, dass sie von einem sauren Harz nur als Kation, von einem basischen Harz nur als Anion adsorbiert werden kann, und dass die Aminosäure-Ionen wie anorganische Ionen und gegebenenfalls in Konkurrenz mit den letzteren einer Verteilung zwischen Harz und Lösung unterliegen. Massgebend für den Eintritt und das Ausmass der Adsorption ist also die Stärke der Harz-Säure bzw. -Base, der saure, neutrale oder basische Charakter der Aminosäure, das pH und ein eventueller Salzgehalt der Lösung. In zweiter Linie sind auch der Vernetzungsgrad des Austauschers, Gestalt und Grösse der zu adsorbierenden Molekel, nichtionische Wechselbeziehungen zwischen Harz und Aminosäure und die Temperatur zu berücksichtigen[3]).

Der Verwendung im Laboratorium stehen heute vier käufliche, unter sich prinzipiell verschiedene organische Austauschertypen zur Verfügung. Man unterscheidet:

a) Stark saure Austauscher. Der saure Charakter beruht auf der Gegenwart von Sulfonsäure-Gruppen. Zur Bezeichnung solcher Produkte wird in dieser Arbeit das Symbol Harz-SO_3H verwendet. Beispiele: Wofatit K, KS und P[4]), Amberlite IR-100[5]) und IR-120[6]), Dowex-50[7]) u.a.m.[8]).

b) Schwach saure Austauscher. Der saure Charakter beruht auf der Gegenwart von Carboxyl-Gruppen. Symbol: Harz-COOH. Beispiele: Wofatit C[4]) und Amberlite IRC-50[9]) u.a.m.[8]).

c) Stark basische Austauscher. Der basische Charakter beruht auf der Gegenwart von sehr stark basischen Gruppierungen. Symbol: Harz-NR_3OH (die Symbolisierung als quarternäre Ammoniumbase will nicht besagen, dass unbedingt quaternisierte Produkte vorliegen müssen). Beispiele: Amberlite IRA-400[10]), Dowex-2.

d) Schwach basische Austauscher. Der basische Charakter beruht auf der Gegenwart schwacher bis mittelstarker Amino-Gruppen. Symbol: Harz-NR_2 bzw. Harz-NR_2HOH. Beispiele: Wofatit M[4]), Amberlite IR-4B[11]) u.a.m.[8]).

Je nach der Herstellungsart sind die Fabrikate monofunktionell (Polymerisationsprodukte) oder polyfunktionell (Kondensationsprodukte).

In bezug auf die Reaktionsweise der Aminosäuren mit diesen 4 Harztypen lassen sich nun grundsätzlich einige einfache Regeln ableiten. Sie ergeben sich daraus, dass der

[1]) *R. Consdon, A. H. Gordon & A. J. P. Martin*, Biochem. J. **42**, 443 (1948); *S. M. Partridge*, Chem. and Ind. **1950**, 383; *S. M. Partridge, R. C. Brimley & K. W. Pepper*, Biochem. J. **46**, 334 (1950); *C. W. Davies, R. B. Hughes & S. M. Partridge*, Soc. **1950**, 2285; *R. J. Block* in *F. C. Nachod*, Ion Exchange, New York 1949.

[2]) *W. H. Stein & S. Moore*, Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol. **14**, 188-89 (1950).

[3]) *C. W. Davies*, Biochem. J. **45**, 38 (1949); *C. W. Davies, R. B. Hughes & S. M. Partridge* loc. cit.

[4]) *R. Griessbach*, Über die Herstellung und Anwendung neuerer Austauschadsorbentien, insbesondere auf Harzbasis. Z. Ver. Deutscher Chemiker, Beiheft **31**, Berlin 1939.

[5]) Amberlite Ion Exchange Resins: Laboratory Manual, The Resinous Products and Chemical Company, Philadelphia, Pa.

[6]) *R. Kunin*, Anal. Chem. **21**, 88 (1949), Figur 1.

[7]) *W. C. Bauman, J. R. Skidmore & H. R. Osmun*, Ind. Eng. Chem. **40**, 1350 (1948); *W. C. Bauman & J. Eichhorn*, Am. Soc. **69**, 2830 (1947).

[8]) *R. Kunin*, Anal. Chem. **21**, 89 (1949), Tabelle 1; ferner Appendix zu *F. C. Nachod*, Ion Exchange, New York 1949.

[9]) *R. Kunin & R. E. Barry*, Ind. Eng. Chem. **41**, 1269 (1949); *J. C. Winters & R. Kunin*, ibid. 460; *F. X. McGarvey & J. Thompson*, ibid. **43**, 741 (1951).

[10]) *R. Kunin & F. X. McGarvey*, Ind. Eng. Chem. **41**, 1265 (1949); *J. C. Winters & R. Kunin*, loc. cit.

[11]) *F. J. Myers*, Ind. Eng. Chem. **35**, 858 (1943); *R. Kunin & R. J. Myers*, Am. Soc. **69**, 2874 (1947).

Adsorptionsvorgang im wesentlichen[1]) einer Salzbildung gleichzusetzen ist, und dass der Adsorptionskomplex sich gegenüber Wasser, Säuren und Alkalien qualitativ ähnlich wie ein entsprechendes lösliches Salz verhält.

Reaktionsweise der sauren Aminosäuren.

$\left.\begin{matrix}HOOC\\HOOC\\H_2N\end{matrix}\right\}$ R_{AS} sei das Symbol einer Monoamino-dicarbonsäure. Die bei den verschiedenen Austauschertypen vorauszusehenden Adsorptionskomplexe sind dann schematisch wie folgt zu formulieren:

$$\left.\begin{matrix}HOOC\\HOOC\\Harz\text{-}SO_3\cdot H_3N\end{matrix}\right\} R_{AS} = A \qquad \left.\begin{matrix}Harz\text{-}NR_3\cdot OOC\\{}^{-}OOC\\{}^{+}H_3N\end{matrix}\right\} R_{AS} \text{ und } \left.\begin{matrix}{}^{-}OOC\\Harz\text{-}NR_3\cdot OOC\\{}^{+}H_3N\end{matrix}\right\} R_{AS} = C$$

$$\left[\begin{matrix}Harz\text{-}NR_3\cdot OOC\\Harz\text{-}NR_3\cdot OOC\\H_2N\end{matrix}\right\} R_{AS} = c \qquad \left.\begin{matrix}Harz\text{-}NR_2\cdot HOOC\\{}^{-}OOC\\{}^{+}H_3N\end{matrix}\right\} R_{AS} \text{ und } \left.\begin{matrix}{}^{-}OOC\\Harz\text{-}NR_2\cdot HOOC\\{}^{+}H_3N\end{matrix}\right\} R_{AS} = D$$

Harz-COOH adsorbiert nicht.

Tabelle 1 zeigt die Bedingungen, unter denen die Bildung derartiger Komplexe und damit Adsorption der Aminosäuren zu erwarten ist.

Tabelle 1.

Reaktion zwischen einer Monoamino-dicarbonsäure als Kation (Hydrochlorid), isoelektrisches Zwitterion oder Anion (Mononatriumsalz) und überschüssigem Austauscher in wässeriger Suspension. Es bedeuten: A, C, c, D = Adsorption unter Bildung der entsprechenden Komplexe; (A), (C) usw. = nur geringfügige Umsetzung; — = keine Adsorption.

Austauscher	Reaktionsprodukte beim Vorliegen der Monoamino-dicarbonsäure als		
	Kation	isoelektr. Zwitterion	Anion
$Harz\text{-}SO_3H$	A + HCl[2])	A[3])	A + $Harz\text{-}SO_3Na$[4])
$Harz\text{-}SO_3Na$	A + NaCl[2])	—	—
Harz-COOH	—	—	—[6])
Harz-COONa	—[6])	—[6])	—
$Harz\text{-}NR_3OH$	C + (c) + $Harz\text{-}NR_3Cl$[5])	C + c	C + c + NaOH[2])
$Harz\text{-}NR_3Cl$	—	(C + HCl)	C + NaCl[2])
$Harz\text{-}NR_2$	D + $Harz\text{-}NR_2$, HCl[5])	D	(D + NaOH)
$Harz\text{-}NR_2$, HCl	—	(D + HCl)	D + NaCl[2])

[1]) Über den Beitrag der „molekularen" Adsorption vgl. Seite 1074.

[2]) Freigesetzte Säuren, Basen oder Salze wirken rückläufig auf den jeweiligen Vorgang und verringern dadurch das Ausmass der Adsorption.

[3]) Zur Wasserbeständigkeit (Hydrolyse) solcher Komplexe vgl. die Bemerkung auf Seite 1074.

[4]) Die primäre Reaktion ist die Aufnahme von Natrium-Ion durch den Austauscher unter gleichzeitiger Rückbildung des Aminosäure-Zwitterions. Erst dieses lässt sich unter Umwandlung zum Kation vom sauren Harz adsorbieren. Daraus ersieht man die Bedeutung des Harzüberschusses.

[5]) Vor der Adsorption erfolgt die Umwandlung des Kations in die freie Säure, vgl. [3]).

[6]) Auch hier sind gewisse Umsetzungen zu erwarten, die indessen nicht zur Adsorption von Aminosäure führen, z. B.:

$$Harz\text{-}COOH + \left.\begin{matrix}{}^{-}OOC\\NaOOC\\{}^{+}H_3N\end{matrix}\right\} R_{AS} \rightleftarrows Harz\text{-}COONa + \left.\begin{matrix}{}^{-}OOC\\HOOC\\{}^{+}H_3N\end{matrix}\right\} R_{AS}$$

Reaktionsweise der neutralen Aminosäuren.

$\left.\begin{matrix}HOOC\\H_2N\end{matrix}\right\}$ R_{AS} sei das Symbol einer Monoamino-monocarbonsäure. Die bei den verschiedenen Austauschertypen vorauszusehenden Adsorptionskomplexe sind schematisch wie folgt zu formulieren:

$$\left.\begin{matrix}HOOC\\Harz\text{-}SO_3\cdot H_3N\end{matrix}\right\} R_{AS} = A' \qquad \left.\begin{matrix}Harz\text{-}NR_3\cdot OOC\\H_2N\end{matrix}\right\} R_{AS} = C'$$

Harz-COOH und Harz-NR_2 adsorbieren nicht oder nur schwach[1]).

Tabelle 2 zeigt die Bedingungen, unter denen die Bildung solcher Komplexe und damit Adsorption zu erwarten ist.

Tabelle 2.

Reaktion zwischen einer Monoamino-monocarbonsäure als Kation (Hydrochlorid), Zwitterion oder Anion (Natriumsalz) und überschüssigem Austauscher in wässeriger Suspension. Es bedeuten: A', C' = Adsorption unter Bildung entsprechender Komplexe; — = keine Adsorption.

Austauscher	Reaktionsprodukte beim Vorliegen der Monoamino-monocarbonsäure als		
	Kation	Zwitterion	Anion
Harz-SO_3H	A' + HCl[2])	A'[3])	A' + Harz-SO_3Na[4])
Harz-SO_3Na	A' + NaCl[2])	—	—
Harz-COOH	—	—[7])	—[6])
Harz-COONa	—[6])[7])	—	—
Harz-NR_3OH	C' + Harz-NR_3Cl[5])	C'	C' + NaOH[2])
Harz-NR_3Cl	—	—	C' + NaCl[2])
Harz-NR_2	—[6])	—	—
Harz-NR_2, HCl	—	—[6])	—[6])

Reaktionsweise der basischen Aminosäuren.

$\left.\begin{matrix}HOOC\\H_2N\\X_2N\end{matrix}\right\}$ R_{AS} sei das Symbol einer Diamino-monocarbonsäure. Die bei den verschiedenen Austauschertypen vorauszusehenden Adsorptionskomplexe sind schematisch wie folgt zu formulieren:

$$\left.\begin{matrix}{}^{-}OOC\\{}^{+}H_3N\\Harz\text{-}SO_3\cdot HX_2N\end{matrix}\right\} R_{AS} \text{ und } \left.\begin{matrix}{}^{-}OOC\\Harz\text{-}SO_3\cdot H_3N\\{}^{+}HX_2N\end{matrix}\right\} R_{AS} = A'' \qquad \left[\begin{matrix}HOOC\\Harz\text{-}SO_3\cdot H_3N\\Harz\text{-}SO_3\cdot HX_2N\end{matrix}\right\} R_{AS} = a''$$

$$\left.\begin{matrix}{}^{-}OOC\\{}^{+}H_3N\\Harz\text{-}COO\cdot HX_2N\end{matrix}\right\} R_{AS} \text{ und } \left.\begin{matrix}{}^{-}OOC\\Harz\text{-}COO\cdot H_3N\\{}^{+}HX_2N\end{matrix}\right\} R_{AS} = B'' \qquad \left.\begin{matrix}Harz\text{-}NR_3\cdot OOC\\H_2N\\X_2N\end{matrix}\right\} R_{AS} = C''^{*})$$

Harz-NR_2 adsorbiert nicht.

*) gilt nicht für Arginin.

[1]) Eine scheinbare Ausnahme bildet die Adsorption von Tryptophan an Wofatit M (*F. Turba, M. Richter & F. Kuchar*, Naturwiss. **31**, 508 (1943)). Sie beruht wahrscheinlich nicht auf Salzbildung, sondern auf molekularer Adsorption.

[2])[3])[4])[5])[6]) vgl. die entsprechenden Fussnoten zu Tabelle 1.

[7]) Bei Amberlite IRC-50 und einem selbst hergestellten Carboxylharz haben wir immerhin eine schwache Adsorption beobachtet (Diss. *R. Frey*, erscheint demnächst).

Tabelle 3 zeigt die Bedingungen, unter denen die Bildung derartiger Komplexe und damit Adsorption der Aminosäure zu erwarten ist.

Tabelle 3.

Reaktion zwischen einer Diamino-monocarbonsäure als Kation (Monohydrochlorid, isoelektrisches Zwitterion oder Anion (Natriumsalz) und überschüssigem Austauscher in wässeriger Suspension. Es bedeuten: A″, a″, B″, C″ = Adsorption unter Bildung der entsprechenden Komplexe; (A″), (a″) usw. = nur geringfügige Umsetzung; — = keine Adsorption.

Austauscher	Reaktionsprodukte beim Vorliegen einer basischen Aminosäure als		
	Kation	isoelektr. Zwitterion	Anion
Harz-SO_3H	A″ + a″ + HCl[2])[1])	A″ + a″[3])	A″ + (a″) + Harz-SO_3Na[4])
Harz-SO_3Na	A″ + NaCl[2])	(A″ + NaOH)	—
Harz-COOH	(B″ + HCl)	B″[7])	B″ + Harz-COONa[4])
Harz-COONa	B″ + NaCl[2])	(B″ + NaOH)	—
Harz-NR_3OH	C″ + Harz-NR_3Cl[5])	C″	C″ + NaOH[2])
Harz-NR_3Cl	—	—[6])	C″ + NaCl[2])
Harz-NR_2	—[6])	—	—
Harz-NR_2, HCl	—	—[6])	—[6])

Soweit dies der Literatur und zahlreichen eigenen Versuchen entnommen werden kann, stimmen die obigen Regeln (Tabellen 1—3) mit der Erfahrung überein. Ergänzend sei beigefügt, dass die Kapazität eines Austauschers (maximal austauschbarer Wasserstoff bei sauren, im Maximum aufnehmbare Säure bei basischen Harzen) bei der Adsorption von Aminosäuren aus sterischen Gründen gewöhnlich nicht voll ausnützbar ist[8]). Dies gilt auch dann, wenn durch Massenwirkung bedingte rückläufige Reaktionen (Tabelle 1—3, Fussnote 2) durch Filtration über Austauschersäulen vermieden werden. Für die Säulenadsorption gelten im übrigen dieselben Regeln wie für die Adsorption im geschlossenen System. Abgesehen von der Möglichkeit einer besseren Harzausnützung bietet sie aber bessere und vielfältigere Trennungsmöglichkeiten. Insbesondere kommen bei langsamem Durchfluss der Lösung, geringer Beladung und feinster Körnung des Austauschers die Verhältnisse einem wahren Adsorptionsgleichgewicht, wie wir es in ruhenden Systemen finden, sehr nahe, so dass beim Vorliegen von Gemischen die Ausbildung wohlbegrenzter Zonen beobachtet werden kann[9]).

Die das Gleichgewicht bestimmende Affinität zwischen einem gegebenen Austauscher und einem bestimmten Adsorbenden ist zunächst eine Funktion der relativen Säure- und Basenstärke. Ein saurer Austauscher z. B. hält eine Aminosäure um so fester zurück, je

[1]) In saurer Lösung (Dihydrochloride der Aminosäuren) wird a″ auf Kosten von A″ grösser.

[2])[3])[4])[5])[6]) Vgl. entsprechende Fussnoten zu Tabelle 1.

[7]) Bildet sich nur langsam und deshalb oft unvollständig. Vgl. dazu die langsame Einstellung des Gleichgewichtes zwischen Harz-COOH und KOH: *R. Myers & R. E. Barry* loc. cit., Tabelle 2.

[8]) Entscheidend ist der Durchmesser des zu adsorbierenden Ions und der Vernetzungsgrad des Austauschers. Effekt des Ionendurchmessers: *R. Kunin*, loc. cit., Figur 13. Bedeutung des Vernetzungsgrades: *W. Lautsch*, Angew. Ch. **57**, 149 (1944); *R. Kunin & R. J. Myers*, Discussions Faraday Soc. **7**, 114 (1949); *S. M. Partridge*, ibid. 304; *S. M. Partridge, R. C. Brimley & K. W. Pepper*, loc. cit.; *K. W. Pepper*, Chem. and Ind. **1950**, 252; *D. Reichenberg, K. W. Pepper & D. J. McCauley*, Soc. **1951**, 493.

[9]) *W. H. Stein & S. Moore*, loc. cit.

basischer sie ist. Dementsprechend stellt man etwa in der Reihe der Komplexe A, A', A'' eine zunehmende Wasserbeständigkeit fest; die Analogie zur Hydrolyse der Salze schwacher Säuren oder Basen ist augenfällig[1]). Eine Zunahme der Affinität ergibt sich auch bei steigendem Molekulargewicht des Adsorbenden. Diese Erscheinung hat mit der Salzbildung nichts zu tun. Sie wird „molekularer" oder „physikalischer" Adsorption zugeschrieben[2]) und kann auch unabhängig von einer gleichzeitigen Salzbildung auftreten. So beobachteten *D. T. Englis & H. A. Fiess*[3]) bei Versuchen mit der Na- oder Ca-Form sulfonierter Kohlen die Aufnahme beträchtlicher Mengen von Norleucin und Tryptophan. Bei den einheitlicher gebauten synthetischen Austauschern ist der Effekt jedoch geringer; er scheint insbesondere bei den monofunktionellen Produkten ein Minimum zu erreichen[4]). *Cleaver & Cassidy* haben diese Art Adsorption an einigen weiteren Beispielen überprüft und auf eine bemerkenswerte Parallele zur relativen Verteilung verschiedener Aminosäuren zwischen organischen Lösungsmitteln und Wasser aufmerksam gemacht[4]). Die Autoren kommen zum Schluss, dass die Neigung der Harze zu nicht-ionischer Adsorption mit zunehmender Polarität kleiner wird. Als Maßstab für die Polarität benützen sie den reziproken Wert des Äquivalentgewichtes.

Die methodischen Vorteile, welche die Verwendung von Ionenaustauschern auf dem Gebiet der Aminosäuren bietet, legten den Versuch nahe, die Gültigkeit der dort massgebenden Regeln auch an einigen Peptiden zu erproben[5]). Es standen uns hierzu ein schwach basisches (Amberlite IR-4B) und zwei stark saure Harze (Amberlite IR-100 und Harz IS) zur Verfügung. Harz IS ist ein Austauscher, den wir zur Zeit, da uns die Amberlite-Produkte noch unzugänglich waren, selbst hergestellt hatten. Wie beim Amberlite IR-100 handelt es sich um ein sulfoniertes Phenolharz, wobei die Sulfonsäure-Gruppen jedoch nicht in α-Stellung zum Kern ($-CH_2-SO_3H$), sondern in γ-Stellung an einer Seitenkette sitzen. Seine Herstellung aus Crotonaldehyd, Hydrogensulfit, Phenol und Formaldehyd wird im experimentellen Teil beschrieben.

Geprüft wurde die Adsorption einiger Dipeptide von saurem, neutralem und basischem Charakter, ferner die Adsorption von zwei neutralen Tripeptiden. Bei der Auswahl dieser Substanzen wurde darauf geachtet, dass sich ausser der Acidität der Peptide und der Zahl der darin enthaltenen Aminosäurereste auch das Molekulargewicht von Fall zu Fall beträchtlich änderte. Auf diese Weise mussten die Einflüsse der Peptid-Kettenlänge einerseits und des Molgewichtes anderseits am ehesten getrennt zum Ausdruck kommen. Die Untersuchung auf Adsorption und Haftfestigkeit wurde ohne Rücksicht auf die Einstellung von Gleichgewichten durchgeführt, indem wässerige Lösungen der Peptide (0,2 mMol in 20 cm³ Wasser),

[1]) Vgl. die Hydrolyse von Amberlite IR-4B, HCl: *H. P. Kortschak & J. H. Payne*, Am. Soc. **70**, 3139 (1948); *R. Kunin & R. J. Myers*, loc. cit.

[2]) *R. J. Block*, loc. cit.; *C. W. Davies*, loc. cit.

[3]) Ind. Eng. Chem. **36**, 604 (1944).

[4]) *C. S. Cleaver & H. G. Cassidy*, Am. Soc. **72**, 1147 (1950).

[5]) Kurz vor dem Abschluss unserer Versuche sind von anderer Seite zwei Arbeiten erschienen, in denen von der Adsorption saurer Peptide an basischen Austauschern bereits praktischer Gebrauch gemacht wird: *R. Consdon, A. H. Gordon & A. J. P. Martin*, Biochem. J. **44**, 548 (1949); *R. Consdon & A. H. Gordon*, ibid. **46**, 8 (1950).

gefolgt von 100 cm³ Wasser, mit einer mittleren Geschwindigkeit von 50 cm³ pro Stunde durch Säulen filtriert wurden, welche jeweilen 1 g (lufttrocken gewogen) vorbehandeltes Harz von der bei den Amberliten handelsüblichen Korngrösse enthielten. Der Peptidgehalt der aus der Säule austretenden Flüssigkeit liess sich mit Hilfe von Stickstoffanalysen laufend verfolgen. Enthielten die ersten 120 cm³ Filtrat bereits wesentliche Mengen Peptid, so wurde die Elution mit Wasser fortgesetzt. War dies nicht der Fall, so wurde mit 1-n. HCl (saure Harze) bzw. 1-n. NaOH (basische Harze) gewaschen (50 cm³/Std.), bis sich der grösste Teil des eingesetzten Peptids im Filtrat befand. In der Tabelle 4 ist das Verhalten der einzelnen Peptide gegenüber den verwendeten Harzen zusammengestellt.

Der Tabelle 4 lässt sich als Resultat unserer Versuche folgendes entnehmen:

Die Peptid-Adsorption an den von uns verwendeten Austauschern entspricht qualitativ der Adsorption von entsprechend geladenen Aminosäuren. Trotz der begrenzten Zahl der in unsere Untersuchung einbezogenen Austauschertypen besteht kein Grund zur Annahme, dass sich bei anderen Typen oder unter anderen Reaktionsbedingungen ein prinzipieller Unterschied zwischen dem Verhalten von Peptiden und Aminosäuren ergeben würde. Als Hauptergebnis ist somit festzuhalten, dass die Aussagen der Tabellen 1, 2 und 3 auch auf Oligopeptide übertragbar sind. Im übrigen zeichnen sich einige für die Praxis der Peptid-Adsorption bedeutsame konstitutive Einflüsse ab.

So sieht man an den Beispielen Diglycin/Triglycin und Leucylglycin/Leucyl-glycyl-glycin, dass die Verlängerung der Peptidkette eine geringe Verstärkung der Adsorption bewirkt. Im gleichen Sinne wirkt eine Beschwerung der Molekel durch Vergrösserung der Seitenkette: die Adsorption nimmt in der Reihe Glycyl-glycin/Leucylglycin/Leucyl-leucin deutlich zu. Ferner scheint bei gleichem Molgewicht die adsorptionsverstärkende Wirkung einer Seitenkette jene einer zusätzlichen Peptid-Bindung zu übertreffen: Leucyl-glycin wird stärker als Triglycin und Leucyl-leucin stärker als Leucyl-glycyl-glycin zurückgehalten. Schreibt man diesen Seitenketten-Effekt dem Auftreten molekularer Adsorption zu, so ergibt sich auch eine Erklärung für die starke Verzögerung beim Durchfluss von Leucyl-leucin durch das basische Harz Amberlite IR-4B. Die beim Glycyl-tyrosin generell zu beobachtende elutionsverzögernde Wirkung des Tyrosins zeigt sich, sofern überhaupt Adsorption eintritt, auch bei den sauren und basischen Tyrosinpeptiden. Sie ist wahrscheinlich dem Phenylkern zuzuschreiben und findet ihr Analogon im Verhalten des freien Tyrosins und der übrigen aromatischen Aminosäuren[1]).

[1]) Tyrosin und Amberlite IR-100: *R. K. Cannan*, Ann. N. Y. Acad. Sci. **47**, 156 (1946). Aromatische Aminosäuren: *S. M. Partridge*, Biochem. J. **44**, 521 (1949); *C. W. Davies*, loc. cit.; *G. Schramm & J. Primosigh*, Z. physiol. Ch. **282**, 271 (1947).

Tabelle 4.

Adsorptions- und Elutionsverhältnisse der untersuchten Peptide an Amberlite IR-100 (H-Form), Harz IS (H-Form), Amberlite IR-4B und Amberlite IR-4B, HCl. Beladung pro Gramm Harz überall 0,2 mMol Peptid, gelöst in 20 cm³ Wasser. Die Adsorptionskolonnen zeigen die nach Waschen mit 100 cm³ Wasser auf den Säulen verbleibenden Peptidmengen in % der Beladung. Die Elutionskolonnen geben die Filtrat-Volumina (Wasser bzw. 1-n. HCl oder 1-n.NaOH) bei 50- (V 50) und 90-proz. (V 90) Elution der auf die Säule gebrachten Peptidmenge an.

Peptid	Amberlite IR-100			Harz IS			Amberlite IR-4B					Amberlite IR-4B,HCl		
		Elution mit HCl			Elution mit HCl			Elution mit					Elution mit Wasser	
								Wasser		NaOH				
	Adsorption %	V 50 cm³	V 90 cm³	Adsorption %	V 50 cm³	V 90 cm³	Adsorption %	V 50[1] cm³	V 90 cm³	V 50 cm³	V 90 cm³	Adsorption %	V 50[1] cm³	V 90 cm³
Glycyl-glycin	99	10	30	98	10	20	2	<20	20			3	< 20	20
DL-Leucyl-glycin	98	10	60	99	10	50	5	20	30			3	20	30
L-Leucyl-L-leucin	99	50	400	100	30	150	9	20	100			8	20	30
Diglycyl-glycin	99	10	50	99	10	25	4	20	40			1	20	30
L-Leucyl-glycyl-glycin	99	20	200	99	20	100	3	20	30			3	< 20	20
Glycyl-L-tyrosin	99	30	350	99	20	150	14	20	270			12	20	270
L-Leucyl-L-tyrosin	96	90	> 350	97	30	150	5	20	40			0	< 20	20
L-Glutamyl-glycin	97	10	50	94	10	25	95			10	20	18	30	300
L-Glutamyl-L-tyrosin	97	40	500	97	20	150	94			10	100	39	70	300[2]
L-Lysyl-glycinsulfat	99	20	300	100	20	100	1	< 20	20			2	20	30
L-Lysyl-L-tyrosinacetat	100	150	> 600	100	50	500	4	20	30			5	20	30

[1]) Es ist zu beachten, dass das theoretische Minimum von $V\,50_{Wasser}$ bei Beladung mit 20 cm³ wässeriger Lösung 10 cm³ beträgt (nach Abzug des in der Säule vorhandenen Wassers).

[2]) Die Elution erreichte hier nur 70% der Beladung.

Schliesslich zeigen unsere Ergebnisse, dass das Harz IS dem Amberlite IR-100 insofern überlegen ist, als die Elution bedeutend geringere Volumina an Salzsäure erfordert. Da bei beiden Harzen Korngrösse und Kapazität vergleichbar sind und in beiden Fällen Phenol-Formaldehyd-Kondensationsprodukte vorliegen, ist es vielleicht berechtigt, den beobachteten Unterschied der Stellung der Sulfogruppe zuzuschreiben. Amberlite IR-100 wird in der Literatur als Abkömmling der Phenol-methylen-sulfonsäure bezeichnet[1]). Die Sulfogruppe befindet sich also in α-Stellung zum Kern. In unserem Harz IS steht sie in γ-Stellung und es ist möglich, dass die dadurch bedingte Entfernung zwischen salzartig adsorbierter Aminosäure und aromatischem Gerüst des Austauschers eine Verminderung der molekularen Adsorption zur Folge hat.

Die verwendeten Peptide wurden teils gekauft[2]) (DL-Leucyl-glycin, Diglycyl-glycin, Glycyl-L-tyrosin, L-Leucyl-L-tyrosin, L-Leucyl-glycyl-glycin), teils nach bekannten Vorschriften hergestellt (Glycyl-glycin[3]), L-Leucyl-L-leucin[4]), L-Glutamyl-glycin[5]), L-Glutamyl-L-tyrosin[6]), L-Lysyl-glycin-sulfat[7]) und teils zum ersten Male synthetisiert (L-Lysyl-L-tyrosin-acetat). Letztere Synthese erfolgte nach der Carbobenzoxy-azid-Methode; sie wird im experimentellen Teil beschrieben. Ferner geben wir dort einige Ergänzungen und Verbesserungen zu den zitierten Darstellungsmethoden des L-Leucyl-L-leucins und des L-Lysyl-glycin-sulfats.

Der eine von uns (*M. B.*) dankt der *Rockefeller Foundation* in New York für die gewährte Unterstützung.

Experimenteller Teil.

A. Adsorptionsversuche.

Die Versuche wurden in Chromatographierröhren von 7 mm innerer Weite durchgeführt. Für jeden Versuch verwendete man 1 g lufttrockenes Harz, das nach mehrmaligem abwechslungsweisem Beladen (NaCl für saures, HCl für basisches Harz) und Regenerieren (HCl für saures, NaOH für basisches Harz) mit Wasser sorgfältig in eine Röhre gespült und wie folgt vorbereitet wurde: Die sauren Säulen (Amberlite IR-100[1]), Harz IS und Amberlite IR-4B, HCl[8]) wurden so lange mit 1-n. HCl gewaschen, bis im Eluat mittels Flammenfärbung praktisch kein Natrium mehr nachgewiesen werden konnte. Meist genügten dazu 100 cm³ Säure. Dann wurde mit dest. Wasser neutral gewaschen und mit Silbernitrat in salpetersaurer Lösung auf Chlorionen geprüft. Die Eluate waren im allgemeinen nach Waschen mit 150 cm³ Wasser chlorfrei[9]). Entsprechend wurde Amberlite

[1]) *R. Kunin*, loc. cit.

[2]) *F. Hoffmann-La Roche & Co. A. G.*, Basel.

[3]) *E. Fischer*, B. **34**, 2870 (1901).

[4]) *M. A. Nyman & R. M. Herbst*, J. Org. Chem. **15**, 108 (1950).

[5]) *W. Grassmann & F. Schneider*, Bioch. Z. **273**, 460 (1934).

[6]) *M. Bergmann, L. Zervas, L. Salzmann & H. Schleich*, Z. physiol. Ch. **224**, 21 (1934).

[7]) *M. Bergmann, L. Zervas, H. Rinke & H. Schleich*, Z. physiol. Ch. **224**, 31 (1934).

[8]) Analytical grade.

[9]) Amberlite IR-4B, HCl wurde in allen Fällen nur mit 150 cm³ Wasser gewaschen; vgl. Fussnote [1]) auf Seite 1075.

IR-4B zuerst mit 1-n. Natronlauge gewaschen und nachher mit dest. Wasser behandelt, bis das Waschwasser keine Natriumionen mehr enthielt. Dazu benötigte man in der Regel 100 cm³ Lauge und 200 cm³ Wasser. Es wurde speziell darauf geachtet, dass die Säule nie trocken lief. Die auf solche Weise bereiteten Adsorptionssäulen besassen folgende Kapazitäten (in Klammern):

Harz IS (ca. 2[1]); Amberlite IR-100 (ca. 1,5)[1][2]; Amberlite IR-4B (ca. 3)[2][3].

Zur Adsorption löste man die Peptide in dest. Wasser (0,2 mMol Peptid in 20 cm³) und liess diese Lösungen mit einer Geschwindigkeit von 50 cm³ pro Stunde durch die Säulen laufen. Der Peptid-Lösung folgten unmittelbar 100 cm³ Wasser, in einzelnen Fällen noch weitere Mengen Wasser (vgl. Tabelle 4 und die untenstehende Bemerkung über Hydrolyse der Adsorptions-Komplexe) und hierauf das jeweilen gewählte Elutionsmittel (Wasser, Salzsäure, Natronlauge) in den angegebenen Mengen (Tab. 4). Es wurde darauf geachtet, dass die Säule in keinem Moment trocken lief. Das Filtrat wurde je nach dem Gehalt an Substanz in Portionen von 10, 20 oder 50 cm³ aufgefangen und nach der Semimikro-*Kjeldahl*-Methode von *Frey*[4]) auf Stickstoff analysiert. Da die in Kontrollversuchen aus den Harzen eluierte Stickstoffmenge sehr gering war, wurden die in den Hauptversuchen gefundenen Werte ohne Korrektur auf anwesendes Peptid umgerechnet.

L-Leucyl-L-tyrosin wird, wie Tabelle 4 zeigt, durch saure Harze unvollständiger als die übrigen neutralen Peptide adsorbiert. Waschen mit total 200 cm³ Wasser zeigte aber, dass dies nicht einer Hydrolyse des Adsorptionskomplexes zuzuschreiben ist. Wahrscheinlich war die Durchflussgeschwindigkeit in diesem Fall nicht klein genug, um ein vollständiges Zurückhalten dieser schon relativ grossen Molekel zu gewährleisten. Dagegen beobachtete man bei den Adsorptionskomplexen der sauren Peptide an Amberlite IR-100, Harz IS und Amberlite IR-4B eine deutliche Hydrolyse, indem durch drei aufeinanderfolgende Portionen von je 100 cm³ Waschwasser stets gleichbleibende Mengen Peptid von der Säule abgelöst wurden.

B. Peptidsynthesen.

Alle Schmelzpunkte sind auf dem *Kofler*-Block bestimmt und korrigiert worden; Fehlergrenze ± 2°. Zum Chromatographieren diente Aluminiumoxyd „Ciba", das durch Erhitzen auf 200° während 15 Minuten aktiviert und hierauf in das mit Benzol beschickte Chromatographierrohr eingefüllt wurde.

1. L-Lysyl-L-tyrosin.

Dicarbobenzoxy-L-lysyl-L-tyrosin-äthylester: 2,00 g Dicarbobenzoxy-L-lysin-hydrazid[5]) wurden in 40 cm³ Wasser, 8 cm³ Eisessig und 5 cm³ 5-n. Salzsäure gelöst, auf 0° abgekühlt und unter starkem Rühren mit 0,46 g Natriumnitrit in 5 cm³ Wasser versetzt. Es schied sich sofort eine schmierige Masse aus, welche in 50 cm³ eiskaltem Äther aufgenommen wurde. Beim Waschen mit Eiswasser bis zum Verschwinden der sauren Reaktion (Kongopapier) schied sich (wie schon *Prelog & Wieland* bemerkt haben)[6]) eine geringe Menge von Dicarbobenzoxy-L-lysin-amid aus. Die ätherische Lösung wurde rasch mit Natriumsulfat getrocknet und zu einer Lösung von 2,00 g L-Tyrosin-äthylester in 50 cm³ Essigester zugegeben. Nach 24stündigem Stehen, erst bei 0°, dann bei Zimmertemperatur, wurde die Äther-Essigester-Lösung mit 2-n. Salzsäure, gesättigter

[1]) Eine 2-proz. NaCl-Lösung wird durch die Säule filtriert (50 cm³ pro Std.), bis das Eluat wieder neutral abläuft. Die durch Austausch gebildete Säure befindet sich quantitativ im Eluat und wird titrimetrisch bestimmt. Angabe des Resultates in mval/g Harz (= Kapazität).

[2]) Vgl. dazu *R. Kunin*, loc. cit., Tabelle 1.

[3]) 0,1-n. Salzsäure wird durch die Säule filtriert (50 cm³ pro Std.) bis das Filtrat eben lakmussauer abläuft. Die ungefähre Durchbruchskapazität errechnet sich aus dem Volumen des säurefreien Filtrates. Angabe in mval/g Harz.

[4]) *G. Frey*, Helv. **31**, 709 (1948).

[5]) *M. Bergmann, L. Zervas & J. P. Greenstein*, B. **65**, 1692 (1932).

[6]) *V. Prelog & P. Wieland*, Helv. **29**, 1131 (1946).

Sodalösung und Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet, auf ca. 10 cm³ eingeengt und mit Petroläther versetzt. Das amorph ausfallende Produkt wog 2,05 g und schmolz bei 117—123°. Die Hauptmenge wurde ohne Reinigung auf Dicarbobenzoxy-lysyl-tyrosin weiterverarbeitet und nur eine Probe durch Chromatographie gereinigt. 680 mg Rohprodukt, gelöst in 10 cm³ Essigester, lieferten nach Adsorption an 20 g Aluminiumoxyd und Elution mit Äther: Chloroform: Essigester: Methanol = 90:3:3:3 bzw. Äther:Methanol = 9:1 insgesamt 560 mg Substanz, die nach Kristallisation aus Essigester/Petroläther konstant bei 140—142° schmolz. Zur Analyse wurde 8 Stunden am Hochvakuum bei 100° getrocknet.

$C_{33}H_{39}O_8N_3$ Ber. C 65,44 H 6,49 N 6,94%
Gef. „ 65,74 „ 6,53 „ 7,12%

$[\alpha]_D^{20} = -6{,}2^0 \pm 0{,}4^0$ (c = 5 in abs. Methanol, l = 1 dm)

Dicarbobenzoxy-L-lysyl-L-tyrosin: 2,05 g Dicarbobenzoxy-L-lysyl-L-tyrosin-äthylester (Rohprodukt) wurden in 100 cm³ Aceton und 8,5 cm³ n. Kalilauge während drei Stunden auf der Schüttelmaschine geschüttelt. Das gelb gewordene Reaktionsgemisch säuerte man mit 5-n. Salzsäure an (Kongopapier), dampfte zur Trockene ein und nahm die zurückbleibende ölige Schmiere in Essigester auf. Die Essigester-Lösung wurde zuerst mit 2-n. Salzsäure gewaschen und dann abwechselnd mit 10-proz. Sodalösung und Wasser erschöpfend extrahiert. Beim Ansäuern der wässerigen Auszüge fiel ein Öl aus, welches in Essigester aufgenommen wurde. Nach dem Trocknen mit Natriumsulfat versetzte man diese Lösung mit Petroläther bis zur Trübung, worauf bald ein dichter Kristallbrei entstand: 0,78 g; Smp. 140—141°. Aus der Mutterlauge liessen sich beim weiteren Versetzen mit Petroläther noch 0,62 g Substanz vom Smp. 136—139° gewinnen. Reinigung durch Umkristallisieren aus Essigester/Petroläther, Smp. 141—142°. Zur Analyse wurde 10 Stunden am Hochvakuum bei 100° getrocknet.

$C_{31}H_{35}O_8N_3$ Ber. C 64,46 H 6,11 N 7,28%
Gef. „ 64,20 „ 5,88 „ 7,26%

$[\alpha]_D^{17} = +6{,}0^0 \pm 0{,}4^0$ (c = 5 in abs. Methanol, l = 1 dm)

Chromatographisch gereinigter Ester lieferte bei der Verseifung dasselbe Produkt in einer Ausbeute von 97%. Zur Überprüfung der Verseifungsmethode wurden ferner 100 mg reines Dicarbobenzoxy-L-lysyl-L-tyrosin mit Diazomethan in den Methylester verwandelt (Smp. 128—130°; ber. C 64,96, H 6,30, N 7,10%, gef. C 64,70, H 6,38, N 6,87%) und derselbe wiederum mit KOH in Aceton verseift. Die in guter Ausbeute resultierende Säure war nach Schmelzpunkt und Mischprobe mit dem Ausgangsmaterial identisch.

L-Lysyl-L-tyrosin-acetat: 1,15 g Dicarbobenzoxy-L-lysyl-L-tyrosin wurden in 50 cm³ absolutem Methanol und 5 cm³ Eisessig gelöst und nach Zugabe von 200 mg Palladium während 6 Stunden im Wasserstoffstrom bei Zimmertemperatur hydriert. Dann wurde die Lösung filtriert, 100 mg frischer Katalysator zugegeben und nochmals während 14 Stunden hydriert. Die filtrierte Lösung wurde unter vermindertem Druck bei 40° zur Trockene verdampft, wobei mehrmals absoluter Alkohol zugegeben wurde. Es blieb ein zähflüssiger, leicht gelblicher Sirup zurück, der durch Lösen in wenig Eisessig und tropfenweisen Zusatz von absolutem Alkohol zur Kristallisation gebracht werden konnte. Ausbeute: 0,72 g (91% der Theorie). Reinigung durch Umkristallisieren aus Eisessig/Alkohol; Smp. 179—181°. Zur Analyse wurde 8 Stunden am Hochvakuum bei 90° getrocknet.

$C_{17}H_{27}O_6N_3$ Ber. C 55,27 H 7,37 N 11,38%
Gef. „ 55,07 „ 7,36 „ 11,38%

$[\alpha]_D^{15} = +17{,}0 \pm 0{,}4^0$ (c = 5 in Wasser, l = 1 dm)

2. L-Leucyl-L-leucin.

Carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucin-methylester[1]): 5,60 g Carbobenzoxy-L-leucin-hydrazid[2]) wurden in 50 cm³ Wasser, 5 cm³ Eisessig und 3 cm³ konzentrierter

[1]) *M. A. Nyman & R. M. Herbst*, loc. cit.

[2]) *M. Bergmann, L. Zervas, J. S. Fruton, F. Schneider & H. Schleich*, J. Biol. Chem. **109**, 341 (1935).

Salzsäure gelöst und auf -5^0 abgekühlt. Unter starkem Rühren wurde eine Lösung von 1,5 g Natriumnitrit in wenig Wasser zugegeben, wobei die Temperatur dauernd unter 0^0 gehalten wurde. Es schied sich eine gelbliche, schmierige Masse aus, die man in 100 cm³ kaltem Äther aufnahm. Die mit Eiswasser bis zum Verschwinden der kongosauren Reaktion gewaschene und flüchtig über Natriumsulfat getrocknete Lösung des Azids wurde sodann mit einer Lösung von L-Leucin-methylester in Chloroform (bereitet aus 5,4 g L-Leucinmethylester-hydrochlorid) versetzt und unter zeitweiligem Umschütteln während 2 Tagen bei Zimmertemperatur stehengelassen. Dann wusch man die Reaktionslösung mit Hydrogencarbonat, Wasser, verdünnter Salzsäure und Wasser, trocknete über Natriumsulfat und dampfte zur Trockene ein. Das ausgeschiedene Öl wurde in 30 cm³ Essigester aufgenommen, die Lösung mit Petroläther bis zur schwachen Trübung versetzt und zur Kristallisation in den Kühlschrank gestellt. Es resultierten insgesamt 4,75 g gelbliche Nadeln, die bei 80—85° schmolzen. Die Hauptmenge wurde ohne weitere Reinigung zum Carbobenzoxy-dipeptid verseift und nur eine Probe durch Chromatographie gereinigt. 750 mg Rohprodukt, gelöst in 10 cm³ Äther, lieferten nach Adsorption an 20 g Aluminiumoxyd und Elution mit Äther 440 mg des gesuchten Esters, der nach Kristallisation aus Essigester/Petroläther bei 95—96° schmolz. *Nyman & Herbst* fanden einen Smp. von 97—98°, bezweifeln aber die Reinheit ihres Produktes. Zur Analyse wurde 8 Stunden am Hochvakuum bei 65° getrocknet.

$C_{21}H_{32}O_5N_2$ Ber. C 64,26 H 8,22 N 7,12%
Gef. „ 64,47 „ 8,31 „ 6,95%

$[\alpha]_D^{23} = -39{,}6^0 \pm 0{,}4^0$ (c = 5 in abs. Methanol, l = 1 dm)

Ein Nebenprodukt vom Smp. 119—121°, welches aus der Säule durch Äther: Chloroform:Essigester:Methanol = 90:3:3:3 und insbesondere durch Methanol eluierbar war, ist nicht weiter untersucht worden.

Carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucin: 2,00 g Carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucin-methylester (Rohprodukt) wurden in 70 cm³ Aceton gelöst, mit 8 cm³ 1-n. Kalilauge versetzt und während 3 Stunden auf der Schüttelmaschine geschüttelt. Dann säuerte man mit 5-n. Salzsäure an (Kongo), engte am Vakuum ein bis zum Auftreten einer schmierigen Trübung und nahm in Essigester auf. Die Lösung wurde gewaschen: mit 2-n. Salzsäure, mit Hydrogencarbonat, 3mal mit Wasser, mit Soda und 2mal mit Wasser. Die wässerigen Fraktionen wurden angesäuert, wobei sofort ein Öl ausfiel. Es wurde in Essigester aufgenommen und durch Zusatz von Petroläther zur Kristallisation gebracht. Smp. 114—116°; Ausbeute 1,18 g. Zur Analyse wurde während 8 Stunden am Hochvakuum bei 75° getrocknet.

$C_{20}H_{30}O_5N_2$ Ber. C 63,47 H 7,99 N 7,40%
Gef. „ 63,19 „ 7,96 „ 7,45%

$[\alpha]_D^{23} = -30{,}8^0 \pm 0{,}6^0$ (c = 5 in abs. Methanol, l = 1 dm)

Chromatographisch gereinigter Ester lieferte bei der Verseifung dieselbe Säure in einer Ausbeute von 90% der Theorie. Zur Überprüfung der Verseifungsmethode wurden ferner 50 mg reines Carbobenzoxy-dipeptid mit Diazomethan verestert: Kristalle vom Smp. 94—95°. Die Mischprobe mit chromatographisch gereinigtem Ester vom Smp. 95—96° schmolz ohne Depression.

Das Carbobenzoxy-dipeptid lieferte bei der Hydrierung mit Wasserstoff in Gegenwart von Palladium in fast quantitativer Ausbeute das bekannte L-Leucyl-L-leucin.

3. L-Lysyl-glycin-sulfat.

Dicarbobenzoxy-L-lysyl-glycin-äthylester: Dieser von *Bergmann* und Mitarbeitern[1]) über das Dicarbobenzoxychlorid bereitete Ester lässt sich besser nach der Azid-Methode gewinnen. 4,28 g Dicarbobenzoxy-L-lysin-hydrazid[2]) wurden in 85 cm³ Wasser, 17 cm³ Eisessig und 10 cm³ Salzsäure gelöst, die Lösung auf -5^0 abgekühlt und unter starkem Rühren mit einer Lösung von 1 g Natriumnitrit in 10 cm³ Wasser versetzt.

[1]) Loc. cit.

[2]) *M. Bergmann, L. Zervas & J. P. Greenstein*, loc. cit.

Die sich sofort ausscheidende, fädige Masse wurde in 100 cm³ kaltem Äther aufgenommen und die ätherische Lösung mit Eiswasser gewaschen, bis das Waschwasser nicht mehr kongosauer reagierte. Zu der flüchtig über Natriumsulfat getrockneten Lösung gab man 3,30 g frisch destillierten Glycin-äthylester in 5 cm³ Äther und liess unter zeitweiligem Umschwenken 24 Stunden stehen. Die ausgeschiedene Kristallmasse wurde abgesaugt und zur Trennung von ebenfalls vorhandenem Dicarbobenzoxy-L-lysin-amid[1]) in kaltem Essigester gelöst. Auf Zusatz von Petroläther resultierten 4,71 g Kristalle vom Smp. 86—88°. Die Hauptmenge wurde ohne weitere Reinigung auf Dicarbobenzoxy-L-lysyl-glycin verarbeitet und nur eine Probe durch Chromatographie gereinigt. 500 mg Rohprodukt, gelöst in 5 cm³ Chloroform, lieferten nach Adsorption an 15 g Aluminiumoxyd und Elution mit Äther:Chloroform:Essigester:Methanol = 90:3:3:3 insgesamt 410 mg Substanz, die nach Kristallisation aus Eisessig/Petroläther in Übereinstimmung mit der Angabe von *Bergmann* bei 90° schmolz.

$$[\alpha]_D^{16} = -13{,}4^0 \pm 0{,}4^0 \text{ (c = 5 in abs. Methanol, } l = 1 \text{ dm)}$$

Dicarbobenzoxy-L-lysyl-glycin: 4,00 g Dicarbobenzoxy-L-lysyl-glycin-äthylester wurden in 100 cm³ Aceton gelöst und mit 8,2 cm³ n. Kalilauge während 4 Stunden bei Zimmertemperatur geschüttelt. Dann säuerte man die Lösung mit 5-n. Salzsäure an, dampfte unter vermindertem Druck ein und nahm die verbleibende Schmiere in Essigester auf. Die Lösung wurde gewaschen: mit 10-proz. Sodalösung, 2mal mit Wasser, mit 10-proz. Sodalösung und 2mal mit Wasser. Die wässerigen Extrakte wurden mit 5-n. Salzsäure kongosauer gemacht und das ausfallende Öl in Essigester aufgenommen. Versetzen mit Petroläther bis zur Trübung ergab 2,34 g weisse Kristalle vom Smp. 145—151°. Nach Umkristallisieren aus Essigester/Petroläther lag der Schmelzpunkt in Übereinstimmung mit der Angabe von *Bergmann* bei 158—159°.

$$[\alpha]_D^{16} = -11{,}4^0 \pm 0{,}6^0 \text{ (c = 5 in abs. Methanol, } l = 1 \text{ dm)}$$

Die Hydrierung dieser Substanz erfolgte nach den Angaben der Literatur.

C. Herstellung des Harzes IS.

25,6 kg (98 Mol) technische Natriumhydrogensulfit-Lösung (SO_2-Gehalt 24,5%) wurden bei 28—33° unter Rühren innert 4 Stunden mit 4,03 kg (46,6 Mol) 81-proz. technischem Crotonaldehyd versetzt. Man rührte anschliessend 3 Stunden bei 30°, erwärmte hierauf innert 90 Minuten auf 95—100°, hielt 15 Minuten auf dieser Temperatur und liess über Nacht erkalten. Die Lösung, welche nunmehr butyraldehyd-3-sulfosaures Natrium in Form seiner Hydrogensulfit-Verbindung enthielt[2]), wurde auf 40° erwärmt, mit 4,38 kg (46,6 Mol) geschmolzenem Phenol und dann innert 80 Minuten unter gutem Rühren mit 4,9 Liter konzentrierter Schwefelsäure versetzt. Die Temperatur stieg dabei auf 52° und wurde während 2,5 Stunden auf dieser Höhe gehalten; anschliessend liess man unter ständigem Rühren erkalten und hierauf während 24—48 Stunden stehen. Das Reaktionsgemisch trennte sich hierbei in zwei Schichten, deren untere, wässerige (11,3 Liter) abgezogen und verworfen wurde. Die obere, ölige Schicht, ein Kondensationsprodukt von Phenol und Butyraldehyd-sulfosäure, wurde während 4 Stunden mit 4,1 Liter 32-proz. Salzsäure verrührt und anschliessend über Nacht durch einen Filter aus Nitrozellulose gesaugt. Es resultierten 20,3 kg öliges, homogenes Filtrat, das mit 2,6 Liter Wasser verdünnt, auf 40° erwärmt und hierauf unter kräftigem Rühren innert 45 Sekunden mit 1,9 kg (23,3 Mol) 37,2-proz. wässerigem Formaldehyd versetzt wurde. Während der folgenden 9 Minuten erwärmte sich das Reaktionsgut ohne äussere Wärmezufuhr auf 57°, die Viscosität nahm stetig zu und schliesslich wurde die Masse so zähe, dass der Rührer abgestellt werden musste. 15 Minuten später erreichte die Temperatur 66° und stieg nun nicht mehr höher. Das Reaktionsgefäss wurde jetzt in ein Wasserbad von 67° gestellt und dieses innert 4 Stunden zum Sieden erhitzt. Man hielt 4 Stunden im Kochen, wobei die Temperatur der verharzten Reaktionsmasse 6 Stunden nach Beginn des Aufheizens

[1]) *V. Prelog & P. Wieland*, loc. cit.

[2]) *O. Nottbohm*, A. **412**, 75 (1916).

ein Maximum von 82° erreichte. Das Harz wurde heiss aus dem Reaktionsgefäss herausgenommen und der oberste Anteil (ca. 8%) verworfen, da er sich als „Deckel" vom Rest der Masse abheben und wegen der an der Oberfläche unvermeidlichen Wärmeverluste eine von der Hauptmenge abweichende Qualität erwarten liess. Die gelartig erstarrte Hauptmasse konnte ohne Schwierigkeit zu ungefähr cm^3-grossen Stücken gebrochen werden. Diese wurden zur Entfernung löslicher Bestandteile gründlich gewässert (ca. 80 Stunden). Dabei musste die Zufuhr von Frischwasser, besonders anfänglich, sehr sorgfältig dosiert werden, um ein Auseinanderfallen der noch weichen Harzstücke nach Möglichkeit zu vermeiden. Es scheint, dass hier osmotische Effekte eine grosse Rolle spielen. Das gewässerte Harz wurde durch 15stündiges Stehenlassen in 10 Liter 6-proz. Salzsäure mit HCl durchtränkt, von äusserlich anhaftender Säure durch Waschen mit Wasser befreit, in flacher Schicht ausgebreitet und 44 Stunden in einem Luftstrom von 25—30° getrocknet. Anschliessend erfolgte eine Härtung durch 17stündiges Erhitzen auf 115°. Nach dem Erkalten überschichtete man mit Wasser, liess 48 Stunden quellen und zerkleinerte in einer Mühle bis das gesamte Produkt ein Sieb mit ungefähr 20 Maschen pro cm^2 passierte. Das saure Harz (Harz-SO_3H) wurde nun mit Sole in seine Na-Form (Harz-SO_3Na) übergeführt, mit Wasser gewaschen und im Luftstrom bei Zimmertemperatur getrocknet. Die Ausbeute betrug rund 9 kg gebrauchsfertiges Harz von vorzüglicher Härte und Beständigkeit. Für die in dieser Arbeit beschriebenen Adsorptionsversuche wurde eine Korngrösse mit dem Durchmesser 0,25—1,5 mm ausgesiebt. Die Kapazität betrug je nach dem Wassergehalt des Harzes 2—3 mval/g[1]).

Zusammenfassung.

Es wird die Adsorption von Glycyl-glycin, L-Leucyl-glycin, L-Leucyl-L-leucin, Diglycyl-glycin, L-Leucyl-glycyl-glycin, Glycyl-L-tyrosin, L-Leucyl-L-tyrosin, L-Glutamyl-glycin, L-Glutamyl-L-tyrosin, L-Lysyl-glycin und L-Lysyl-L-tyrosin an zwei sauren und einem basischen Ionenaustauscher untersucht und festgestellt, dass sie nicht nur von der Ladung eines gegebenen Peptids, sondern auch von der Anzahl der darin enthaltenen Aminosäurereste und der Art ihrer Seitenketten abhängig ist. Das Verhalten der Peptide entspricht also prinzipiell der bereits bekannten und in der Einleitung schematisch dargestellten und diskutierten Reaktionsweise der Aminosäuren.

Mit Hilfe der Carbobenzoxy-Methode ist das noch unbekannte L-Lysyl-L-tyrosin hergestellt und als Acetat isoliert und charakterisiert worden; ferner konnten die Literaturangaben über die Darstellung des L-Leucyl-L-leucins und des L-Lysyl-glycins in einigen Punkten ergänzt und verbessert werden.

Schliesslich wird die Herstellung eines Kationen-Austauschers auf Phenol-Formaldehyd-Basis beschrieben, der die Sulfonsäuregruppe in γ-Stellung zum aromatischen Kern an einer aliphatischen Seitenkette trägt und sich in bezug auf die Desorption der Peptide vorteilhaft vom Amberlite IR-100 unterscheidet.

Organisch-chemische Anstalt der Universität Basel.

[1]) Definition und Bestimmung der Kapazität: vgl. Seite 1079, Fussnote [1]).