

61. Ernst Waldschmidt-Leitz und Karl Gauss: Verfahren zur Bestimmung der carboxyl-endständigen Aminosäuren in Peptiden

[Aus dem Privatlaboratorium München, Kraepelinstraße 2]
(Eingegangen am 3. Januar 1952)

Es wird ein Verfahren beschrieben, welches auf der Abspaltung der carboxyl-endständigen Aminosäuren aus den mit dem Dinitrophenylrest substituierten Peptiden mittels Carboxy-peptidase und der papierchromatographischen Identifizierung der abgespaltenen Aminosäuren beruht.

Zur Ermittlung der die endständigen Aminogruppen tragenden Aminosäuren in Proteinen und auch in Peptiden hat F. Sanger¹⁾ vor einigen Jahren ein einfaches und elegantes Verfahren beschrieben: es besteht in der Einführung des Dinitrophenylrestes mittels 2,4-Dinitro-fluor-benzols und in der Isolierung und Kennzeichnung der den Dinitrophenylrest enthaltenden Aminosäuren nach der Hydrolyse des substituierten Proteins bzw. Peptids. Das Verfahren, das nur geringe Substanzmengen erfordert, hat inzwischen in zahlreichen Fällen wertvolle Dienste geleistet, so zur Bestimmung der Aminosäuren mit freien Aminogruppen im Insulin¹⁾, in Hämoglobin und Myoglobin²⁾, in Fibrinogen und Fibrin³⁾. Über ein gleichwertiges Verfahren zur Bestimmung der carboxyl-endständigen Aminosäuren verfügen wir noch nicht; denn die bisher in der Literatur dafür angegebenen Wege⁴⁾ sind umständlich und erfordern verhältnismäßig große Substanzmengen.

Für die Bestimmung der carboxyl-endständigen Aminosäuren in Peptiden läßt sich mit Erfolg die spezifische Wirkungsweise der Carboxy-peptidase, z. B. aus Pankreas, heranziehen. Es ist bekannt, daß dieses Enzym nur die freien Carboxygruppen tragenden Aminosäuren in Peptiden oder Peptid-Derivaten abzuspalten vermag, da es für seinen Angriff die Gegenwart einer freien Carboxygruppe in Nachbarschaft zu der zu spaltenden Peptidbindung benötigt. Während freie Peptide durch das Enzym nur beim Vorhandensein einer sauren Aminosäure am Carboxylende gespalten werden, werden acylierte Peptide, z. B. benzoylierte, soviel man bisher beobachtet hat, unabhängig von der Natur des carboxyl-endständigen Bausteins angegriffen⁵⁾. Man kann also, wie wir uns überzeugt haben, die carboxyl-endständige Aminosäure eines Peptids nach dessen Acylierung mittels der Einwirkung von Carboxy-peptidase ermitteln.

Einfacher noch und zweckmäßiger erscheint der Weg über die Dinitrophenyl-Derivate der Peptide, die nach Sanger zugleich zur Kennzeichnung

¹⁾ Biochem. Journ. **39**, 507 [1945].

²⁾ F. Sanger, Biochem. Journ. **39**, 507 [1945]; R. R. Porter u. F. Sanger, Biochem. Journ. **42**, 287 [1947/48].

³⁾ K. Bailey, F. R. Bettelheim, L. Lorand u. W. R. Middlebrook, Nature **167**, 233 [1950/51].

⁴⁾ Siehe dazu P. Schlack u. W. Kumpf, Ztschr. physiol. Chem. **154**, 125 [1926]; F. Bettzieche u. R. Menger, ebenda **161**, 37, 178 [1926]; E. Abderhalden u. H. Brockmann, Biochem. Ztschr. **225**, 386 [1930]; M. Bergmann u. L. Zervas, Journ. biol. Chem. **113**, 341 [1936]; N. Lichtenstein, Journ. Amer. chem. Soc. **60**, 560 [1938].

⁵⁾ Siehe dazu E. Waldschmidt-Leitz, Chemie der Eiweißkörper, Stuttgart 1950, S. 67.

des amino-endständigen Bausteins dienen. Überraschenderweise sind nämlich auch die Dinitrophenyl-Derivate, wenigstens von Tripeptiden und wohl auch von höheren Peptiden, durch Carboxy-peptidase spaltbar. Wir belegen dies im Versuchsteil an der Spaltung der Derivate von fünf verschiedenen Tripeptiden, mit verschiedenen carboxyl-endständigen Bausteinen, nämlich Glykoll, Leucin, Phenylalanin, Tyrosin und Asparaginsäure. Bemerkenswerterweise beschränkt sich in den untersuchten Beispielen, welche Derivate des Leucyl-glycins betreffen, die Einwirkung der Carboxy-peptidase auf die Abspaltung der carboxyl-endständigen Aminosäure; sie bleibt auf der Stufe des Di-peptids stehen. Dies läßt sich nicht nur aus der Zunahme an freiem Amino-stickstoff bei der Spaltung ableiten, welche in keinem Falle den für die Hydrolyse einer Peptidbindung berechneten Wert übersteigt, es ergibt sich auch eindeutig aus der papierchromatographischen Analyse der Spaltprodukte auch nach längeren Einwirkungszeiten des Enzyms. Für eine sichere Kennzeichnung der carboxyl-endständigen Aminosäure ist schon eine kurze Anspaltung des Dinitrophenyl-Derivats und die papierchromatographische Analyse des abgespaltenen Bausteins ausreichend.

Beim Vorliegen höherer Peptide, etwa von Tetrápeptiden, wird man die Reihenfolge der Aminosäuren am Carboxylende aus dem Intensitätsvergleich der mit Ninhydrin färbaren Flecke in dem Chromatogramm ableiten können; dies gilt auch für Fälle, bei welchen, etwa durch das Vorliegen besonderer Bausteine bedingt, die Spaltung durch Carboxy-peptidase nicht bei der Di-peptidstufe haltmachen sollte. Es bleibt ferner die Frage, ob die Methode für die Ermittlung nicht nur neutraler oder saurer wie der bisher geprüften, sondern auch für die Kennzeichnung basischer Aminosäurebausteine, z. B. von Arginin, oder auch von Prolin und Oxyprolin am Carboxylende anwendbar ist oder ob man in solchen Fällen ein anderes Enzym, beispielsweise Protaminase⁶⁾, zu Hilfe nehmen muß, sowie auch die Frage, inwieweit das Verfahren einer solchen enzymatischen Analyse grundsätzlich auch für die Kennzeichnung carboxyl-endständiger Aminosäuren in Proteinen dienlich sein kann. Denn auch dinitrophenylsubstituierte Proteine werden, wie wir an Dinitrophenyl-clupein festgestellt haben, verhältnismäßig leicht enzymatisch gespalten. Wir sind mit der Prüfung dieser Fragen beschäftigt*).

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir ergebenst für die zur Verfügung gestellten Mittel.

Beschreibung der Versuche

Darstellung der Dinitrophenyl-peptide

1.) *N*-[2.4-Dinitro-phenyl]-*d,l*-leucyl-glycyl-glycin: Zu 400 mg *d,l*-Leucyl-diglycin⁷⁾, mit 800 mg Natriumhydrogencarbonat in 5 ccm Wasser gelöst, wurde

⁶⁾ Siehe dazu E. Waldschmidt-Leitz, A. Schöffner, Fr. Ziegler u. J. Weil, *Ztschr. physiol. Chem.* **197**, 219 [1931].

* Anmerkung bei der Korrektur (25. 2. 1952): Versuche der Spaltung von Dinitrophenyl-clupein mit krist. Carboxy-peptidase haben inzwischen ergeben, daß hier zufolge der chromatographischen Analyse Arginin, Alanin und Valin in dieser Reihenfolge vom Carboxyl-Ende des Proteins abgespalten werden.

⁷⁾ Dargestellt nach E. Fischer, *B.* **36**, 2990 [1903].

eine Lösung von 800 mg 2.4-Dinitro-fluorbenzol in 20 ccm Alkohol zugefügt, wobei nach kurzer Zeit die Ausscheidung des Reaktionsproduktes begann. Nach 12stdg. Stehenlassen im Eisschrank wurde i. Vak. bei 30° zur Trockne eingengt, darauf von Natriumfluorid und dem Natriumhydrogencarbonat durch Extraktion des Reaktionsproduktes mit warmem absol. Alkohol und nach dem Wiedereindampfen der Alkohol-Lösung durch Behandeln mit Äther von überschüss. Dinitro-fluorbenzol getrennt. Das Dinitrophenylpeptid wurde aus der Lösung in wenig warmem Alkohol durch tropfenweisen Zusatz von Wasser bis zur Trübung umgefällt; Ausb. 400 mg (74% d.Th.). Die Verbindung zersetzt sich zwischen 145 und 150°.

Die papierchromatographische Reinheitsprüfung (absteigende Methode) ergab keine Verunreinigung durch Peptid. R_F -Wert bei Verwendung von Phenol-Wasser (75 : 25) = 0.83, bei Verwendung von Butanol-Ameisensäure-Wasser (75 : 15 : 10) = 0.88.

2.) *N*-[2.4-Dinitro-phenyl]-*d,l*-leucyl-glycyl-*l*-leucin: Zu 400 mg *d,l*-Leucyl-glycyl-*l*-leucin⁸⁾, mit 800 mg Natriumhydrogencarbonat in 20 ccm Wasser gelöst, gab man 850 mg Dinitro-fluorbenzol in 20 ccm Alkohol und beließ die Mischung 12 Stdn. im Eisschrank. Die Reinigung und Umfällung des Reaktionsproduktes erfolgte, wie oben beschrieben. Ausb. 400 mg (64% d.Th.); zersetzt sich zwischen 136 und 145°.

Die papierchromatographische Analyse ließ keine Verunreinigung durch Peptid erkennen; R_F -Wert in Phenol-Wasser = 0.88, in Butanol-Ameisensäure-Wasser = 0.91.

3.) *N*-[2.4-Dinitro-phenyl]-*d,l*-leucyl-glycyl-*d,l*-phenylalanin: Zur Lösung von 3.35 g *d,l*-Leucyl-glycyl-*d,l*-phenylalanin⁹⁾ und 5.35 g Natriumhydrogencarbonat in 135 ccm Wasser gab man 3.7 g Dinitro-fluorbenzol in 80 ccm Alkohol, beließ die Mischung 2 Tage im Eisschrank und versetzte dann mit Wasser bis zur Lösung des Reaktionsproduktes. Die durch Einengen i. Vak. vom Alkohol befreite Lösung wurde dann mit Äther bei alkal., darauf bei saurer Reaktion ausgeschüttelt und wieder i. Vak. bei 30° zur Trockne eingedampft; aus dem Rückstand nahm man das Reaktionsprodukt in absol. Alkohol auf und wusch es nach dem Eindampfen zur Trockne nochmals mit Äther aus. Ausb. 4.7 g (94% d.Th.); zersetzt sich bei 125°.

Die papierchromatographische Reinheitsprüfung ergab keine Verunreinigung; R_F -Wert in Butanol-Ameisensäure-Wasser = 0.92.

4.) *N*-[2.4-Dinitro-phenyl]-*d,l*-leucyl-glycyl-*l*-tyrosin: Auf 700 mg *d,l*-Leucyl-glycyl-*l*-tyrosin¹⁰⁾, mit 1.1 g Natriumhydrogencarbonat in 60 ccm Wasser gelöst, ließ man 750 mg Dinitro-fluorbenzol in 30 ccm Alkohol mehrere Tage bei Zimmertemperatur einwirken und verdünnte dann mit Wasser bis zur Lösung des Reaktionsproduktes; weitere Aufarbeitung wie unter 3) angegeben. Ausb. 1.0 g (100% d.Th.); zersetzt sich bei 200°.

Die papierchromatographische Analyse ergab keine Verunreinigung; R_F -Wert in Phenol-Wasser = 0.83, in Butanol-Ameisensäure-Wasser = 0.90.

5.) *N*-[2.4-Dinitro-phenyl]-*d,l*-leucyl-glycyl-*l*-asparaginsäure: 600 mg *d,l*-Leucyl-glycyl-*l*-asparaginsäure¹¹⁾ und 1.2 g Natriumhydrogencarbonat in 60 ccm Wasser vermischte man mit 560 mg Dinitro-fluorbenzol in 65 ccm Alkohol und beließ mehrere Tage bei Zimmertemperatur. Die Aufarbeitung des Reaktionsproduktes erfolgte, wie unter 3) und 4) beschrieben. Ausb. 920 mg (62% d.Th.); zersetzt sich bei 146°.

Die papierchromatographische Analyse ergab keine Verunreinigung; R_F -Wert in Butanol-Ameisensäure-Wasser = 0.88.

Enzymatische Spaltung der Dinitrophenyl-peptide

Angewandte Enzym-Lösungen: a) Glycerin-Rohauszug, aus mit Aceton und Äther getrocknetem Pankreas mit 10 Tln. Glycerin bereitet; b) aus dem Rohauszug durch Adsorption mit Tonerde Cy dargestellte Lösung von Carboxy-peptidase, frei von Dipep-

⁸⁾ Dargest. nach E. Fischer u. J. Steingroever, A. 365, 167, 169 u. 174 [1909].

⁹⁾ Dargest. nach E. Fischer, s. Fußn. 7).

¹⁰⁾ Dargest. nach E. Fischer, B. 37, 2494 [1904].

¹¹⁾ Dargest. nach E. Fischer u. A. Fiedler, A. 375, 182, 185, 187 u. 189 [1910].

tidase- sowie Aminopolypeptidase-Wirkung¹²⁾, aber noch Trypsin enthaltend. Enzym-Lösungen zu den Spaltungsansätzen jeweils mit peptidasefreier Enterokinase aktiviert.

1.) Spaltbarkeit durch Glycerin-Rohauszug; Ansatz: 209.2 mg Dinitrophenyl-*d,l*-leucyl-diglycin + 1.0 ccm Glycerinauszug (enth. 0.0184 C.-Pol.-E.¹³⁾ neben 0.0030 Pol.-E.¹⁴⁾ und 0.0016 Er.-E.¹⁵⁾), 30 Min. mit 0.35 ccm Enterokinase aktiviert, + 1.5 ccm Alkohol, Gesamtv. 25.0 ccm, p_H 8.5 (mittels NaOH eingestellt), bzw. 151.7 mg Dinitrophenyl-*d,l*-leucyl-glycyl-*l*-leucin + 1.0 ccm Glycerinauszug, wie oben aktiviert, Gesamtv. 25.0 ccm, p_H 8.3, bzw. 70.0 mg Dinitrophenyl-*d,l*-leucyl-glycyl-*d,l*-phenylalanin + 0.5 ccm aktivierter Glycerinauszug, Gesamtv. 25.0 ccm, p_H 8.6, bzw. 70.0 mg Dinitrophenyl-*d,l*-leucyl-glycyl-*l*-tyrosin + 0.5 ccm aktivierter Glycerinauszug, Gesamtv. 25.0 ccm, p_H 8.0, bzw. 60.0 mg Dinitrophenyl-*d,l*-leucyl-glycyl-*l*-asparaginsäure + 0.5 ccm aktivierter Glycerinauszug, Gesamtv. 25.0 ccm, p_H 7.4; Temp. 30°. Zur Analyse entnommen 5.0 ccm des Ansatzes; NH_2 -Zuwachs bestimmt nach van Slyke; gemessene Spaltung bez. auf die Hydrolyse einer Peptidbindung.

Tafel. Spaltung von Dinitrophenyl-peptiden

Substrat:	a		b		c		d		e	
	Leucyl-glycyl-glycin	Leucyl-glycyl-leucin	Leucyl-glycyl-phenylalanin	Leucyl-glycyl-tyrosin	Leucyl-glycyl-asparaginsäure	Zeit Min.	Spalt. %	Zeit Min.	Spalt. %	Zeit Std.
	120	11.2	120	24.2	2	8.5	3	41.8	4	25.0
	210	25.9	300	45.0	5	10.6	41	46.2	15	39.1
	300	30.8	—	—	15	14.9	—	—	39	99.0

Papierchromatographische Analyse. a) Mit Phenol-Wasser unabhängig von der Spaltungsdauer beobachtet: Gelber Fleck von $R_F = 0.83$ (für angew. Dinitrophenyl-peptid = 0.83); daneben nur ein ninhydrinfärbbarer Fleck von $R_F = 0.40$ (für Glykoll beob. $R_F = 0.42$).

b) Mit Phenol-Wasser unabhängig von der Spaltungsdauer beobachtet: Gelber Fleck von $R_F = 0.88$ (für angew. Dinitrophenyl-peptid = 0.88); daneben nur ein ninhydrinfärbbarer Fleck von $R_F = 0.84$ (für Leucin gemessen $R_F = 0.83$).

c) Mit Butanol-Ameisensäure-Wasser unabhängig von der Spaltungsdauer beobachtet: Gelber Fleck von $R_F = 0.91$ (für angew. Dinitrophenyl-peptid = 0.92); daneben nur ein ninhydrinfärbbarer Fleck von $R_F = 0.53$ (für Phenylalanin gemessen $R_F = 0.53$).

d) Mit Phenol-Wasser nach 41 stdg. Spaltung beobachtet: Gelber Fleck von $R_F = 0.83$ (für angew. Dinitrophenyl-peptid = 0.83); daneben nur ein ninhydrinfärbbarer Fleck von $R_F = 0.59$ (für Tyrosin gemessen $R_F = 0.58$).

e) Mit Butanol-Ameisensäure-Wasser unabhängig von der Spaltungsdauer beobachtet: Gelber Fleck von $R_F = 0.87$ (für angew. Dinitrophenyl-peptid = 0.88); daneben nur ein ninhydrinfärbbarer Fleck von $R_F = 0.12$ (für Asparaginsäure gemessen $R_F = 0.12$).

2.) Spaltung mit gereinigter Carboxy-peptidase. Spaltungsansätze: a) 41.1 mg Dinitrophenyl-*d,l*-leucyl-diglycin, bzw. b) 46.7 mg Dinitrophenyl-*d,l*-leucyl-glycyl-*l*-leucin, bzw. c) 50.1 mg Dinitrophenyl-*d,l*-leucyl-glycyl-*d,l*-phenylalanin, bzw. d) 35.6 mg Dinitrophenyl-*d,l*-leucyl-glycyl-*l*-tyrosin, bzw. e) 46.9 mg Dinitrophenyl-*d,l*-leucyl-glycyl-*l*-asparaginsäure + 1.2 ccm gerein. Carboxy-peptidase-Lösung, mittels 0.2 ccm Enterokinase-Lösung 30 Min. aktiviert (enth. 0.0028 C.-Pol.-E.), + 0.1 ccm Alkohol, Gesamtv. 5.0 ccm; p_H 7.5, Temp. 30°; Proben von etwa 0.03 ccm zur papierchromatographischen Analyse nach 30 und 60 Min. entnommen¹⁶⁾.

¹²⁾ Nach E. Waldschmidt-Leitz u. A. Purr, B. 62, 2217 [1929].

¹³⁾ Carboxy-Polypeptidase-Einheiten.

¹⁴⁾ Polypeptidase-Einheiten.

¹⁵⁾ Erepsin (oder Dipeptidase)-Einheiten.

¹⁶⁾ Der Zuwachs an NH_2 -Stickstoff, in 1.0 ccm der Ansätze bestimmt, lag innerhalb der Fehlergrenzen der Bestimmung.

Papierchromatographische Analyse: a) Mit Butanol-Ameisensäure-Wasser gelber Fleck von $R_F = 0.88$ (für Dinitrophenyl-leucyl-diglycin gemessen 0.88); daneben ninhydrinfärbbarer Fleck von $R_F = 0.13$ (für Glykokoll gemessen 0.13).

b) Mit Butanol-Ameisensäure-Wasser gelber Fleck von $R_F = 0.92$ (für Dinitrophenyl-leucyl-glycyl-leucin gemessen 0.91); daneben ninhydrinfärbbarer Fleck von $R_F = 0.62$ (für Leucin gemessen 0.62).

c) Mit Butanol-Ameisensäure-Wasser gelber Fleck von $R_F = 0.91$ (für Dinitrophenyl-leucyl-glycyl-phenylalanin gemessen 0.92); daneben ninhydrinfärbbarer Fleck von $R_F = 0.54$ (für Phenylalanin gemessen 0.53).

d) Mit Phenol-Wasser gelber Fleck von $R_F = 0.83$ (für Dinitrophenyl-leucyl-glycyl-tyrosin gemessen 0.83); daneben ninhydrinfärbbarer Fleck von $R_F = 0.59$ (für Tyrosin gemessen 0.58).

e) Mit Butanol-Ameisensäure-Wasser gelber Fleck von $R_F = 0.89$ (für Dinitrophenyl-leucyl-glycyl-asparaginsäure gemessen 0.88); daneben ninhydrinfärbbarer Fleck von $R_F = 0.12$ (für Asparaginsäure gemessen 0.12).

Berichtigungen

Jahrg. 84 [1951], Heft 7, S. 583: In dieser Mitteilung sind die ersten Sätze beim Druck irrtümlich als Inhaltsübersicht der Arbeit vorangestellt worden, obwohl sie nur den Inhalt der vorangegangenen II. Mitteilung umfassen. Die Inhaltsübersicht der III. Mitteilung muß folgendermaßen lauten:

Die in der II. Mitteilung beschriebenen 2.5-Diaroyl-hydrochinone reagieren mit je 2 Moll. Phenylhydrazin, Hydrazin und Anilin unter Austritt von 2 Moll. Wasser. Trotz Unlöslichkeit der Derivate in Alkalien wird normale Reaktion mit den 2 Ketogruppen angenommen, da auch der Diäthyläther des Dibenzoylhydrochinons mit Phenylhydrazin so reagiert. Erhitzen mit Pyridinium-hydrochlorid auf 200–220° führt das Di-phenylhydrazon und das Tolyhomologe in Tetraaryl-pyrazo-benzopyrazol über.

Jahrg. 85 [1952], Heft 1, S. 25, Zeile 4 v. o. lies „ $C_{27}H_{41}O_5N_2J$ “ statt „ $C_{27}H_{36}O_5N_2J$ “.