

246. W. Graßmann, H. Hörmann und H. Endres: Eine Verbesserung der Bestimmung von Aminosäuren am Carboxylende von Peptiden durch Reduktion der Carboxylgruppe

[Aus der Forschungsstelle für Eiweiß und Leder der Max-Planck-Gesellschaft, Regensburg]

(Eingegangen am 8. Oktober 1953)

Die endständigen Carboxylgruppen von Peptiden werden verestert und mit Lithiumborhydrid reduziert. Die nach Hydrolyse erhaltenen Aminosäuren und Aminoalkohole werden in die entsprechenden Dinitrophenyl-Verbindungen übergeführt. Die Dinitrophenyl-aminoalkohole können dann als Neutralkörper von den Dinitrophenyl-aminosäuren praktisch quantitativ abgetrennt und papierchromatographisch identifiziert werden.

Trotz der großen Bedeutung, die die Bestimmung carboxylendständiger Aminosäuren zur Strukturaufklärung von Peptiden und Proteinen besitzt, gibt es zur Zeit noch sehr wenige Methoden, dieses Problem befriedigend zu lösen. Erste Arbeiten stammen von F. Bettzieche und R. Menger¹⁾, welche die endständige Carboxylgruppe durch Umsetzung mit Grignard-Verbindungen charakterisierten, und von M. Bergmann und L. Zervas²⁾, die mit Hilfe des Curtiusschen Abbaues der Azide die endständige Aminosäure als Aldehyd abspalteten. Eine Abwandlung dieses Verfahrens, nämlich der Lossensche Abbau der entsprechenden Hydroxamsäuren, wurde neuerdings von Th. Wieland³⁾ vorgeschlagen. Ebenfalls als Aldehyd läßt sich nach R. A. Boissonnas⁴⁾ die Carboxylendgruppe durch anodische Oxydation abtrennen. Alle diese Methoden haben jedoch noch keine weitere Verbreitung gefunden. Dasselbe gilt auch von einem Vorschlag von S. Akabori und Mitarbb.⁵⁾, die Eiweißkörper durch Hydrazin aufzuspalten, wobei nur die Aminosäuren mit freier Carboxylgruppe als solche erhalten bleiben, während die anderen Hydrazide bilden. Dagegen wurde die Abspaltung der Endgruppe als Thiohydantoin nach P. Schlack und W. Kumpf⁶⁾ bereits mehrfach aufgegriffen und erfolgreich angewendet⁷⁾. Sie erlaubt allerdings nicht die Bestimmung endständiger Iminosäuren. Von dieser Einschränkung abgesehen eignet sich die Methode nach unseren Erfahrungen recht gut für die qualitative Endgruppenbestimmung, kaum aber für quantitative Aussagen⁸⁾. Die Bedingungen zur Bildung des Thiohydantoinringes konnten neuer-

¹⁾ Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **161**, 37 [1926].

²⁾ J. biol. Chemistry **113**, 341 [1936].

³⁾ Angew. Chem. **65**, 40 [1953]; Th. Wieland u. H. Fritz, Chem. Ber. **86**, 1186 [1953].

⁴⁾ Nature [London] **171**, 304 [1953].

⁵⁾ S. Akabori, K. Ohno u. K. Narita, Bull. chim. Soc. Japan **25**, 214 [1952].

⁶⁾ Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **154**, 125 [1926].

⁷⁾ Vergl. S. G. Waley u. J. Watson, J. chem. Soc. [London] **1951**, 2394; J. Tibbs, Nature [London] **168**, 910 [1951]; W. Graßmann u. H. Hörmann, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **292**, 24 [1953]; R. A. Turner u. G. Schmerzler, Biochim. biophysica Acta **11**, 586 [1953].

⁸⁾ Vergl. dazu V. H. Baptist u. H. B. Bull, J. Amer. chem. Soc. **75**, 1727 [1953].

dings durch Anwendung von Diphenylphosphor-isothiocyanatidat wesentlich gemildert werden⁹⁾, während der Versuch, mit Hilfe von Carbodiimiden den Hydantoinringschluß zu erreichen, wenig glatt verlief¹⁰⁾.

Vor einiger Zeit haben C. Fromageot und Mitarbb.¹¹⁾ vorgeschlagen, die endständigen Carboxylgruppen mit Lithiumaluminiumhydrid zu Carbinolgruppen zu reduzieren. Sodann sollte der Eiweißkörper sauer hydrolysiert und die gebildeten Aminoalkohole papierchromatographisch identifiziert werden. Allerdings reduziert Lithiumaluminiumhydrid unter den angegebenen Bedingungen auch die Peptidbindungen teilweise unter Bildung von sekundären Aminogruppen¹²⁾, die dann nicht mehr aufhydrolysiert werden können. Um diesen Nachteil auszuschalten, haben A. C. Chibnall und M. W. Rees¹³⁾ Lithiumborhydrid auf verestertes Insulin einwirken lassen. Dieses Reduktionsmittel wirkt milder, so daß eine Veränderung der Peptidbindungen nicht zu befürchten ist, während die Estergruppierungen vollständig reduziert werden¹⁴⁾.

Die Autoren beider Arbeiten stehen aber dann vor der Schwierigkeit, die nach saurer Hydrolyse der reduzierten Proteine oder Peptide entstandenen Aminoalkohole von den meist in wesentlich größeren Mengen gebildeten Aminosäuren abzutrennen und zu identifizieren. Sehr viele der in Frage kommenden Aminoalkohole (Colamin, Serinol, Threoninol, Asparagin-diol, Glutamin-diol und Oxyprolinol) besitzen nämlich eine derart hohe Löslichkeit in Wasser, daß es nur sehr schwer möglich ist, sie aus dem wäßrigen Hydrolysat zu isolieren, vor allem, wenn sie nur in geringen Mengen vorhanden sind. Bei der Reduktion mit Lithiumborhydrid bilden sich außerdem schwer spaltbare Borsäurekomplexe, deren Bildung allerdings vermieden werden kann, wenn man mit Aluminiumhydrid arbeitet, das nach einer kurzen Mitteilung von J. Bailey¹⁵⁾ ähnliche Reduktionseigenschaften wie Lithiumborhydrid besitzen soll. Dazu kommt noch, daß die papierchromatographische Identifizierung der Aminoalkohole namentlich neben Aminosäuren wegen ihrer unbefriedigenden Anfärbbarkeit auf Schwierigkeiten stößt. Die Ninhydrinreaktion besitzt nämlich nur $\frac{1}{10}$ bis $\frac{1}{20}$ der Empfindlichkeit, die sie bei Aminosäuren zeigt¹¹⁾.

Man kann diese Schwierigkeiten in der Form überwinden, daß man die mit Lithiumborhydrid reduzierten Eiweißkörper bzw. Peptide sauer hydrolysiert und anschließend in hydrogencarbonatalkalischer Lösung mit einer alkoholischen Lösung von Dinitrofluorbenzol (DNFB) nach F. Sanger¹⁶⁾ zur

⁹⁾ G. W. Kenner, H. G. Khorana u. R. J. Stedman, J. chem. Soc. [London] 1953, 673.

¹⁰⁾ H. G. Khorana, J. chem. Soc. [London] 1952, 2081.

¹¹⁾ C. Fromageot, M. Jutisz, D. Meyer u. L. Penasse, Biochim. biophysica Acta 6, 283 [1950].

¹²⁾ A. Uffer u. E. Schlittler, Helv. chim. Acta 31, 1397 [1948]; P. Karrer u. B. J. R. Nicolaus, Helv. chim. Acta 35, 1581 [1952]; R. L. Slykes, Nature [London] 171, 654 [1953]; A. L. Morrison, R. F. Long u. M. Königstein, J. chem. Soc. [London] 1951, 952. ¹³⁾ Biochem. J. 48, xlvii [1951].

¹⁴⁾ R. F. Nystrom, S. W. Chaikin u. W. G. Brown, J. Amer. chem. Soc. 71, 3245 [1949]. ¹⁵⁾ Biochem. J. 52, iv [1952]. ¹⁶⁾ Biochem. J. 39, 507 [1945].

Reaktion bringt. Dabei werden die gebildeten Aminoalkohole und Aminosäuren vollständig in die entsprechenden *N*-Dinitrophenyl-Verbindungen (DNP-Aminoalkohole bzw. -Aminosäuren) verwandelt. Erstere verlieren damit ihre große Wasserlöslichkeit, während letztere infolge ihrer noch vorhandenen Carboxylgruppe im wäßrig-alkalischen Reaktionsmedium gelöst bleiben. Überschüssiges DNFB, das später bei der papierchromatographischen Identifizierung stören würde, kann nach der Umsetzung mit Hilfe von nachträglich zugesetzten Aminosäuren entfernt werden. Sodann werden die DNP-Aminoalkohole aus hydrogencarbonathaltiger Lösung mit Äther ausgeschüttelt und papierchromatographisch bestimmt. Sie sind auf Grund ihrer gelben Eigenfarbe am Papier leicht auffindbar.

Die oben angeführten Reaktionen verlaufen nach unseren Erfahrungen, die wir bisher allerdings nur an einigen synthetischen Dipeptiden sammeln konnten, in Ausbeuten von etwa 90%; Nebenprodukte, die auf eine teilweise Reduktion der Peptidbindungen hinweisen könnten, wurden niemals beobachtet. Das Verfahren eignet sich also in gewissen Grenzen auch zur quantitativen Bestimmung der endständigen Aminosäuren.

Um die Reduktion mit Lithiumborhydrid quantitativ ausführen zu können, ist es erforderlich, die freien Carboxylgruppen vorher zu verestern. Als besonders mildes Verfahren, das die übliche Behandlung mit alkoholischer Salzsäure¹⁷⁾ umgeht, hat sich die Einwirkung von Methanol-Essigsäureanhydrid¹⁸⁾ gut bewährt. Dabei werden gleichzeitig die freien Carboxylgruppen verestert und die Aminogruppen acetyliert, was bei unserer Reaktionsfolge nicht stört. Die Verwendung von Diazomethan, wie sie A. C. Chibnall und M. W. Rees¹³⁾ empfehlen, wirkt nur in untergeordnetem Maße veresternd, in der Hauptsache entstehen *N*-methylierte und andere, noch wenig untersuchte Verbindungen¹⁹⁾.

Die bisher nicht beschriebenen DNP-Aminoalkohole, die bei der Identifizierung der Endgruppen als Vergleichssubstanzen benötigt wurden, haben wir aus den Estern der Aminosäuren durch Reduktion mit Lithiumaluminiumhydrid nach der Methode von P. Karrer²⁰⁾ und anschließende Umsetzung mit DNFB hergestellt.

¹⁷⁾ K. Felix u. H. Rauch, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **200**, 27 [1931]; K. Felix u. H. Reindl, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **205**, 11 [1932]; H. Fraenkel-Conrat u. H. S. Olcott, J. biol. Chemistry **161**, 259 [1945].

¹⁸⁾ J. N. Ashley u. C. R. Harrington, Biochem. J. **23**, 1178 [1929]; vergl. auch S. Blackburn u. H. Philipps, Biochem. J. **38**, 171 [1944].

¹⁹⁾ K. Landsteiner, Biochem. Z. **58**, 362 [1914]; J. Herzig u. K. Landsteiner, Biochem. Z. **61**, 458 [1914]; E. Abderhalden u. H. Sickel, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **159**, 163 [1926]; J. Herzig u. H. Lieb, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **117**, 1 [1921]; R. Kuhn u. H. W. Ruelius, Chem. Ber. **85**, 38 [1952]; I. J. O'Donnell u. J. M. Swan, Nature [London] **171**, 571 [1953].

²⁰⁾ P. Karrer, P. Portmann u. M. Suter, Helv. chim. Acta **31**, 1617 [1948], **32**, 1156 [1949].

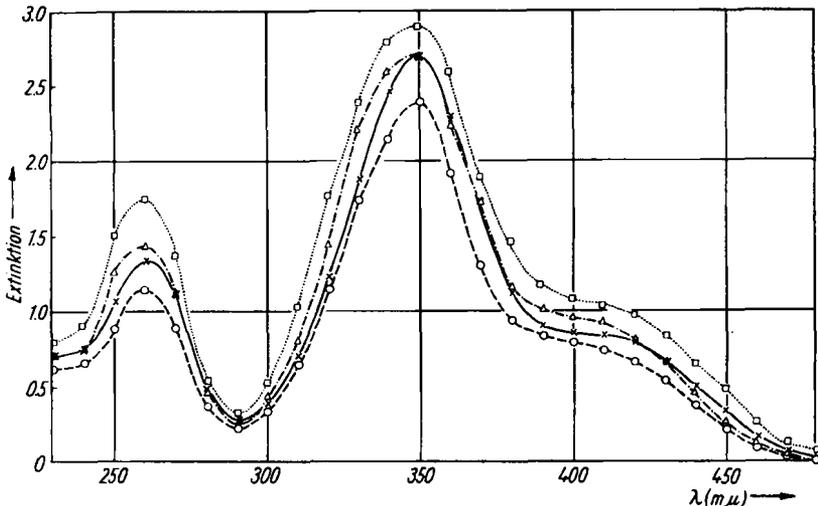
Ihre Schmelzpunkte zeigt Tafel 1. DNP-*l*-Leucinol und DNP-*l*-Prolinol konnten vorläufig nur als Öl erhalten werden; sie erwiesen sich papierchromatographisch als einheitlich.

Tafel 1.

	Schmp.		Schmp.
DNP-Colamin (DNP-Glycinol)	92°	DNP- <i>d,l</i> -Valinol	77°
DNP- <i>d,l</i> -Alaninol	97°	DNP- <i>d,l</i> -Phenylalaninol	94°

Die DNP-Aminoalkohole mit zwei Oxygruppen, wie DNP-Serinol, DNP-Threoninol, DNP-Asparagin-diol, DNP-Glutamin-diol und DNP-Oxyprolinol sind in dieser Zusammenstellung noch nicht enthalten, da bei ihrer Darstellung Sekundärreaktionen beobachtet wurden. Die Aufklärung derselben sowie die Frage, ob beim Abbau von Peptiden mit den entsprechenden Aminosäuren am Carboxylende die gleichen Reaktionsprodukte erhalten werden, ist derzeit noch in Arbeit. Ähnliches gilt für Arginin und Histidin, da die Guanidinogruppe²¹⁾ und vermutlich auch der Imidazolkern gegenüber Reduktionsmitteln instabil sind und das Verhalten dieser Aminosäuren bei der angegebenen Reaktionsfolge erst genauer geprüft werden muß.

Von sämtlichen dargestellten Verbindungen wurden die Absorptionsspektren aufgenommen. Sie zeigen ein starkes Maximum bei 350 m μ und ein kleineres bei 260 m μ (Abbild.). Die Maxima sind gegenüber denjenigen der DNP-Aminosäuren, die bei 330 m μ bzw. 250 m μ liegen, etwas in den kurzwelligeren Bereich verschoben.



Abbild. Absorptionsspektren von □ DNP-Colamin, ○ DNP-Alaninol, × DNP-Valinol und △ DNP-Phenylalaninol in Essigester ($1/6250$ Mol)

Die papierchromatographische Trennung der DNP-Aminoalkohole stieß anfangs auf Schwierigkeiten, da diese in den für die Trennung der DNP-Aminosäuren gebräuchlichen Lösungsmitteln im allgemeinen mit der Lösungsmittelfront wanderten.

Einzig das von Biserte und Osteux²²⁾ für die Trennung einiger DNP-Aminosäuren angegebene Lösungsmittelgemisch Dekalin-Eisessig schien erfolgversprechend. Die DNP-Aminoalkohole zeigten aber dabei sehr geringe Wanderungsgeschwindigkeiten, so daß

²¹⁾ A. Rhein u. M. Jutisz, *Biochim. biophysica Acta* **9**, 645 [1952].

²²⁾ G. Biserte u. R. Osteux, *Bull. Soc. chim. biol.* **33**, 50 [1951].

ziemlich lange Trennzeiten notwendig waren. Dieser Übelstand wurde behoben, indem man dem Lösungsmittelgemisch Isoamylalkohol oder Nitrobenzol zusetzte. Als brauchbar haben sich die Gemische Dekalin-Eisessig-Isoamylalkohol (15:10:2), Dekalin-Eisessig-Nitrobenzol (9:6:1) und Dekalin-10-proz.-Essigsäure-Isoamylalkohol (15:10:4) erwiesen. Sämtliche drei Lösungsmittelgemische lieferten abgegrenzte und gut voneinander getrennte Flecken. Ihre R_F -Werte, die für die ersten beiden Gemische auf DNP-Leucinol, für das dritte auf die Lösungsmittelfront bezogen sind, sind in Tafel 2 angeführt.

Tafel 2. R_F -Werte einiger DNP-Aminoalkohole

DNP-Aminoalkohol	Lösungsmittelgemisch		
	I	II	III
DNP-Leucinol	1.00	1.00	0.86
DNP-Valinol	0.68	0.64	0.77
DNP-Phenylalaninol	0.51	0.54	0.82
DNP-Prolinol	0.31	0.37	0.65
DNP-Alaninol	0.25	0.34	0.53
DNP-Colamin (DNP-Glycinol) ...	0.12		

Lösungsmittel: I. Dekalin:Eisessig:Isoamylalkohol 15:10:2, II. Dekalin:Eisessig:Nitrobenzol 9:6:1, III. Dekalin:10-proz.-Essigsäure:Isoamylalkohol 15:10:4.

Um die Brauchbarkeit der Methode zu prüfen, haben wir die Dipeptide Glycyl-glycin und Glycyl-*d,l*-phenylalanin²³⁾ der angegebenen Reaktionsfolge unterworfen. In beiden Fällen konnten die am Carboxylende stehenden Aminosäuren als DNP-Aminoalkohole in nahezu quantitativer Ausbeute rein gewonnen werden. Sie wurden durch Mischschmelzpunkt mit der entsprechenden Vergleichssubstanz und papierchromatographisch identifiziert. Die zweite Aminosäure ließ sich papierchromatographisch als DNP-Aminosäure zusammen mit der nachträglich zugesetzten nachweisen; sie war frei von der ursprünglich carboxylendständigen und anderen Verunreinigungen. Diese Ergebnisse zeigen, daß Lithiumborhydrid Peptidbindungen nicht angreift.

Herrn Prof. G. Wittig, Tübingen, sowie Herrn Dr. P. Pickhard, Hanau, möchten wir an dieser Stelle für die Überlassung von Lithiumborhydrid bzw. Lithiumaluminiumhydrid vielmals danken.

Beschreibung der Versuche

Darstellung der DNP-Aminoalkohole

DNP-Colamin: 0.5 g Colamin wurden in einem Kolben mit 1 g Natriumhydrogencarbonat, 10 ccm Wasser und einer Lösung von 0.8 g Dinitrofluorbenzol (DNFB) in 20 ccm Alkohol 3 Stdn. geschüttelt. Hierauf wurden zur Entfernung von überschüssigem DNFB 0.2 g Glykokoll zugegeben. Nach weiterem 2stdg. Schütteln wurde i. Vak. bei 40° vom Alkohol befreit und mit Wasser versetzt. Das Reaktionsprodukt wurde ausgeäthert und der Ätherauszug i. Vak. zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde aus Alkohol umkristallisiert und über Diphosphorpentoxyd i. Vak. getrocknet. Ausb. 1.62 g (86.4% d. Th.); feine, rotgelbe Nadeln vom Schmp. 92°.

$C_9H_9O_3N_3$ (227.2) Ber. C 42.42 H 3.99 N 18.51 Gef. C 42.65 H 4.23 N 18.32

²³⁾ Für die Darstellung von Peptiden möchten wir Herrn Dipl. chem. E. Wunsch an dieser Stelle unseren verbindlichsten Dank aussprechen.

Nach demselben Verfahren und mit den gleichen Ausgangsmengen wurden hergestellt:

DNP-*d,l*-Valinol: Der Rückstand wurde aus verd. Alkohol umkristallisiert. Ausb. 1.16 g (88% d.Th.); feine, hellgelbe Nadeln vom Schmp. 77°.

$C_{11}H_{15}O_5N_3$ (269.2) Ber. C 48.77 H 5.69 N 15.69 Gef. C 49.01 H 5.71 N 15.53

DNP-*d,l*-Alaninol: Der Rückstand wurde aus verd. Alkohol umkristallisiert. Ausb. 1.52 g (94.8% d.Th.); gelbe Nadeln vom Schmp. 97°.

$C_9H_{11}O_5N_3$ (241.2) Ber. C 44.81 H 4.59 N 17.43 Gef. C 44.79 H 4.83 N 17.19

DNP-*d,l*-Phenylalaninol: Der Rückstand wurde aus verd. Alkohol umkristallisiert. Ausb. 0.97 g (92.9% d.Th.); gelbe Nadeln vom Schmp. 94°.

$C_{16}H_{15}N_3O_4$ (317.3) Ber. C 56.83 H 4.79 N 13.25 Gef. C 57.07 H 5.06 N 13.39

DNP-*l*-Leucinol: Als Rückstand hinterblieb ein rotgelbes Öl.

DNP-*l*-Prolinol: Als Rückstand hinterblieb ein rotgelbes Öl.

Abbau von Dipeptiden

Glycyl-glycin: 2 g Glycyl-glycin wurden mit 50 ccm Methanol und 10 ccm Essigsäureanhydrid versetzt und 20 Stdn. stehengelassen. Das Lösungsmittel wurde auf dem Wasserbad verdampft, der Rückstand wieder in Methanol aufgenommen und nochmals verdampft. Diese Operation wurde mehrmals wiederholt. Der Rückstand wurde über Kaliumhydroxyd scharf getrocknet, in wenig Methanol aufgenommen und mit Äther ausgefällt. Bei längerem Stehenlassen bildeten sich weiße Stäbchen des Acetyl-glycyl-glycinesters; Ausb. 2.72 g (96.7% d.Th.) vom Schmp. 123°.

$C_7H_{12}O_4N_2$ (188.1) Ber. C 44.68 H 6.43 N 14.89 Gef. C 44.72 H 6.35 N 14.72

1 g *N*-Acetyl-glycyl-glycin-methylester wurde in 50 ccm absol. Tetrahydrofuran aufgeschlämmt und unter starkem Rühren und äußerer Kühlung mit 4 g feingepulvertem Lithiumborhydrid versetzt. Nach 30stdg. Erhitzen bei Feuchtigkeitsabschluß und unter Rückfluß (Badtemperatur 75–80° C) versetzte man nach dem Erkalten mit 125 ccm Alkohol und etwas Wasser, filtrierte den Niederschlag ab und kochte ihn dreimal mit je 50 ccm Alkohol aus. Nach dem Verjagen des Lösungsmittels hinterblieb ein Öl, welches mit 2 *n* Salzsäure aufgenommen und 8 Stdn. unter Rückfluß gekocht wurde. Dann wurde i. Vak. eingeeengt und der entstandene Alkohol als DNP-Verbindung, wie oben beschrieben, isoliert. An Stelle von Glycin wurden zur Entfernung von überschüssigem DNFB nachträglich 0.3 g Alanin zugegeben. Ausbeute an rohem DNP-Colamin: 1.05 g (87% d.Th.). Die papierchromatographische Untersuchung in den 3 Lösungsmitteln zeigte keine Verunreinigung an, der *R_F*-Wert stimmte mit DNP-Colamin, das zum Vergleich nebenher lief, überein. Nach Umkristallisation aus Alkohol schmolzen die rotgelben Kristalle bei 92°; der Mischschmelzpunkt mit DNP-Colamin war nicht erniedrigt.

Die wäßrige Mutterlauge zeigte bei chromatographischer Untersuchung DNP-Glycin und DNP-Alanin (Alanin wurde zur Beseitigung von überschüssigem DNFB zugegeben); Verunreinigungen traten keine auf.

Glycyl-*d,l*-phenylalanin: 2 g Glycyl-*d,l*-phenylalanin wurden, wie bei Glycyl-glycin beschrieben, verestert und acetyliert. Im Gegensatz zu Glycyl-glycin trat schon nach wenigen Stunden völlige Lösung ein. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels lieferte der Rückstand, aus Alkohol-Petroläther bei Gegenwart geringer Mengen Äther umkristallisiert, feine, weiße Nadeln des acetylierten Esters vom Schmp. 173°; Ausb. 2.24 g (89% d.Th.).

$C_{14}H_{20}O_4N_2$ (280.3) Ber. C 59.13 H 6.11 N 10.61 Gef. C 59.28 H 6.11 N 10.87

Die Reduktion des Esters und die Isolierung des entstandenen Alkohols als DNP-Verbindung wurde, wie bei Glycyl-glycin beschrieben, durchgeführt.

Ausbeute an rohem DNP-*d,l*-Phenylalaninol 1.095 g (91.3% d.Th.). Es erwies sich papierchromatographisch einheitlich. Nach Umkristallisation aus wäßrigem Alkohol schmolzen die Kristalle bei 94°; der Mischschmelzpunkt mit DNP-*d,l*-Phenylalaninol war nicht erniedrigt.