

qui appartiennent respectivement aux formes cétonique (**1**) et énolique (**2**), ainsi que le signal **x** du groupe méthylène de **1**, tandis que celui du proton méthinique de **2** est caché par le signal de l'eau. Cette interprétation est en accord avec le fait qu'un mélange réactionnel sans sulfate de cérium donne un spectre $^1\text{H-RMN}$. identique.

Afin d'obtenir une information sur le processus oscillatoire, nous avons répété le spectre $^1\text{H-RMN}$. dans la région d'absorption des groupes méthyle toutes les 25 secondes. Cela a été réalisé par décalage périodique de «l'offset» d'observation. Quatre spectres représentatifs de cette série sont représentés sur la Fig. 3 (spectres B à E). Le spectre B, obtenu 380 secondes après le début de la réaction montre l'apparition d'un nouveau signal méthyle **c**. Au fur et à mesure que les signaux **a** et **b** de l'acétylacétone disparaissent, le signal **c** passe par un maximum (spectre C). Par comparaison avec un échantillon connu, nous avons pu attribuer le signal **c** aux groupes méthyle de la bromo-3-acétylacétone non énolisée. Ce corps pourtant n'est manifestement qu'un intermédiaire éphémère de la réaction totale. Les spectres B à E montrent qu'un corps correspondant au signal **d**, apparaît également comme intermédiaire. Seuls les signaux **f** et **e** appartiennent aux produits finals (spectre E de la Fig. 3) et persistent pendant plusieurs heures.

L'identification des intermédiaires et des produits finals est en cours d'étude.

Nous remercions *C. Biselx*, du Département de Chimie physique, qui a procédé aux mesures calorimétriques ainsi que *J. J. Schaer*, du même Département, de ses nombreux conseils techniques.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] *B. P. Belousov*, Ref. Radiats, Med. 1958, Medgiz (Moscou), 145, (1959).
- [2] *A. M. Zhabotinsky*, Dokl. Akad. Nauk. SSSR, 157, 392 (1964).
- [3] *R. J. Field, E. Koros & R. M. Noyes*, J. Amer. chem. Soc. 94, 8649 (1972).
- [4] *P. G. Bowers, K. E. Caldwell & D. F. Prendergast*, J. phys. Chemistry 76, 2185 (1972).
- [5] *Z. Varadi & M. T. Beck*, Chem. Commun. 1973, 30.

30. *Edman-Abbau als analytische Methode in der 'Solid phase'-Peptidsynthese*

Vorläufige Mitteilung¹⁾

von **Peter Fankhauser, Peter Fries, Peter Stahala** und **Max Brenner**

Institut für Organische Chemie, Universität Basel

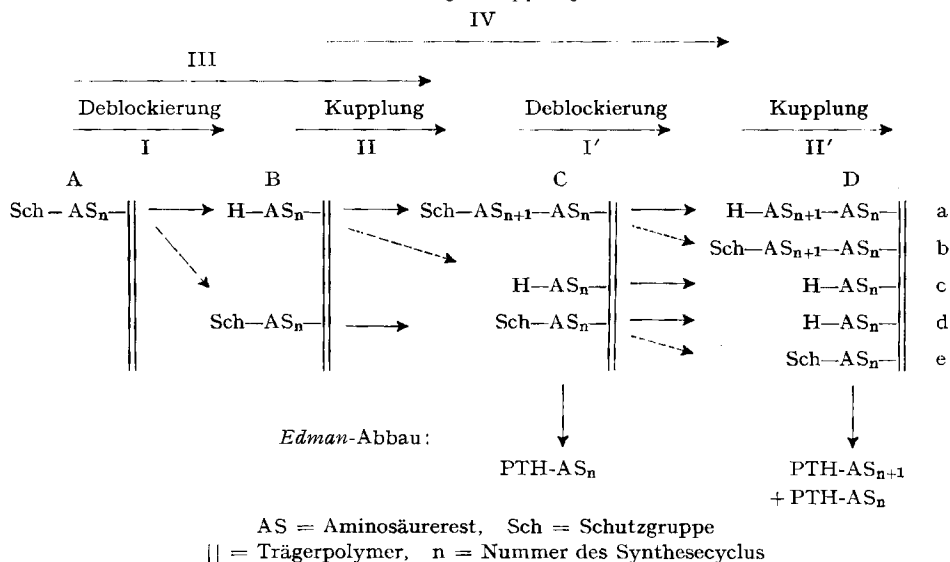
(31. XII. 1973)

Summary. The systematic analysis of solid phase peptide synthesis by *Edman* degradation becomes possible by the development of a technique (high pressure liquid chromatography) for the determination of phenylthiohydantoins in trace amounts. By its qualitative beside the quantitative results the degradation method offers the possibility to follow formation and propagation of failure sequences over more than one synthetic cycle. Scope and limitations of the method are discussed.

¹⁾ Eine ausführliche Mitteilung mit Angaben über die experimentelle Technik des Abbaus und umfassenderen Beispielen wird später in Helv. erscheinen.

Trotz einer Vielzahl vorgeschlagener Methoden [1] ist die analytische Verfolgung des Verlaufs von 'Solid phase'-Peptidsynthesen (SPPS) nach wie vor unbefriedigend [2]. Die meisten Nachweisverfahren ermöglichen keine direkte Aussage über die Vollständigkeit eines ganzen Synthesecyclus (III bzw. IV im *Schema 1*). Diese wird vielmehr aus separaten Umsatzanalysen der Teilprozesse I und II ermittelt. Verbleibende Aminogruppenzahl nach der Kupplung (Restbeladung; Harz C) bzw. totale Aminogruppenzahl vor der Kupplung (Totalbeladung; Harze B bzw. D) sind die zu bestimmenden Grössen. Sollen geringe Abweichungen vom idealen Syntheseverlauf (< 2–5%) erfasst werden, so verlangen Bestimmungen der Totalbeladung eine sehr hohe Genauigkeit, die praktisch nur von Titrationsverfahren erreicht wird. Die dazu üblichen Säure-Basen-Reaktionen sind aber unspezifisch und daher besonders anfällig auf Störungen durch Fremdbasen und Ionenaustauschergruppen auf den Syntheseharzen. Titrationsverfahren sind daher *a priori* immer verdächtig, zu hohe Analysenwerte zu liefern. Obwohl die Gefahr zu hoher Analysenwerte ebenfalls bei den übrigen unspezifischen Bestimmungsverfahren (*Schiff*'sche Basen-Bildung, Tracer-Umsetzungen, analytische Kupplungen mit Fremdaminosäuren etc.) besteht (unspezifische Adsorptionen, Reaktionen mit harzfixierten Nebenprodukten), sind diese durch die Natur der zugehörigen Reaktionen (Gleichgewichte, langsame Reaktionen) zumeist eher verdächtig, zu geringe Analysenwerte zu liefern. Allen diesen Verfahren gemeinsam ist es, nur quantitative Aussagen über eine bestimmte chemische Gruppierung zu liefern, nicht aber qualitativ sicher nur eine Aminosäure oder gar nur die interessierende Aminosäure zu erfassen.

Schema 1. Verlauf einer SPPS unter Berücksichtigung unvollständiger Deblockierung und unvollständiger Kupplung



End-Aminosäure-Bestimmungen liefern dagegen, vom Prinzip her, exakte und in ihrer qualitativen Aussage zweifelsfrei interpretierbare Ergebnisse. Obwohl sich der

Edman-Abbau als analytische Methode deshalb aufdrängt, wurde er bisher kaum verwendet. Die Schwierigkeit der quantitativen Spurenbestimmung eines Thiohydantoins besonders im Gemisch mit anderen Thiohydantoinen dürfte dafür die vorwiegende Ursache sein. Ein einziges Literaturverfahren unter Einsatz einer massenspektrometrischen Verdünnungsanalyse [3] hat sich deshalb kaum durchgesetzt. Ein weiteres Verfahren [4] setzt den *Edman-Abbau* nur zur unspezifischen Tracer-Aminogruppenbestimmung ein. Durch Anwendung der Hochdruckflüssigchromatographie (HPLC.) haben wir eine genügend niedrige Erfassungsgrenze und auch eine genügende Trennung der Phenylthiohydantoine aller Protein-Aminosäuren (PTH-AS) erreicht, um qualitativ sichere und quantitativ brauchbare Aussagen unter Einsatz minimaler Harzmengen zu erhalten²⁾.

Die HPLC.-Trennung erfolgt für die lipophilen und die polaren PTH-AS getrennt. Weil das System für die polaren je nach dem vorliegenden Gemisch leichte Modifikationen verlangt und weil wir unsere Abbauersuche bisher auf unpolare beschränkt haben, verzichten wir hier auf weitere Angaben zur Auftrennung der polaren PTH-AS³⁾.

Die Auftrennung der unpolaren PTH-AS gelingt in folgendem System:

Säulen: 50×0,2 cm (Stahl), Träger: Merckosorb Si 60 (5 μm), Elutionsmittel: Dichloräthan mit 0,8% 2-Propanol, Temperatur: 20°, Druck: 250 Atm, Durchfluss: 0,5 ml/Min., Detektion: UV.-Absorption bei 254 nm (Durchflussküvette: 10 μl).

Folgende Retentionsvolumina (in ml) wurden beobachtet: PTH-Pro 2,1, -Leu 2,35, -Ile 2,65, -Val 3,05, -Phe 3,4, -Met 4,3, -Irp 5,0, -Ala 5,5, -Gly 8,4.

Bodenhöhen von 0,1 bis 0,3 mm sind erreichbar, die Auflösungen sind jeweils besser als 0,9 (Definitionen s. [5]). Durch Variation von Durchfluss und Temperatur (zwischen -10° und 35°) lassen sich auch kritische PTH-AS-Paare vollständig trennen, so dass in jedem Falle der Nachweis von 0,5% einer PTH-AS in der Nachbar-PTH-AS

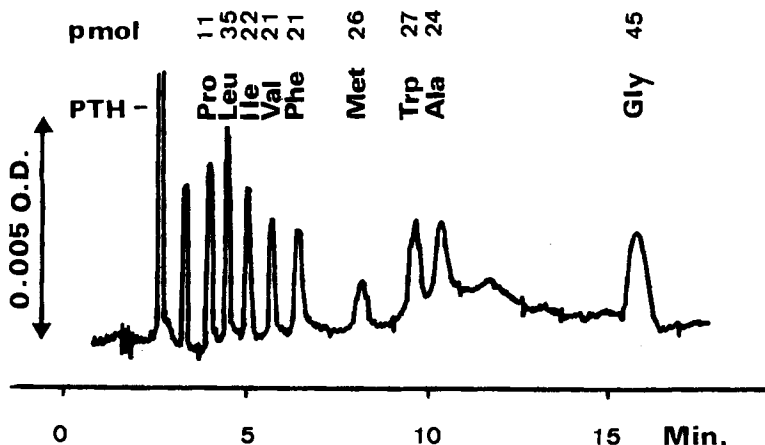


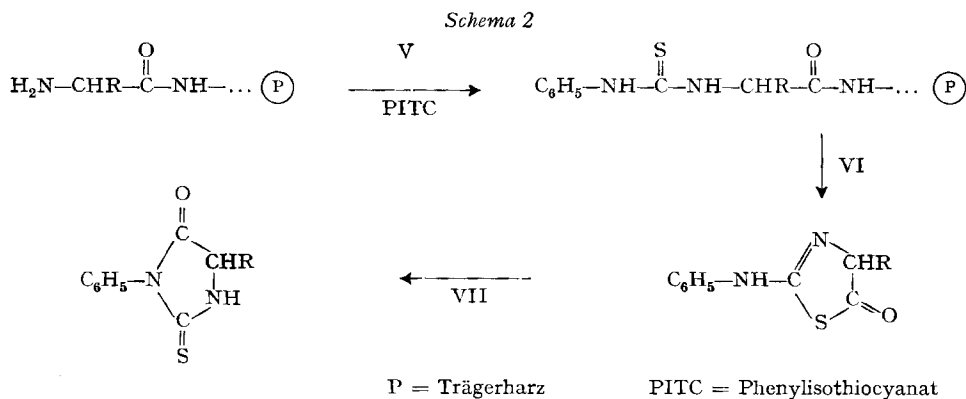
Fig. 1. HPLC-Chromatogramm der unpolaren PTH-AS in pmol-Mengen. Chromatographie-System s. Text.

²⁾ Diese HPLC.-Technik kann man selbstverständlich auch in der Sequenzaufklärung und zur schnellen Aminosäureanalyse einsetzen. Entsprechende Arbeiten sind im Gange.
³⁾ Eine ausführliche Mitteilung über HPLC. von PTH-AS ist in Vorbereitung.

möglich ist. Die absolute Nachweisgrenze liegt unter 50 pmol pro PTH-AS; Fig. 1 zeigt das Chromatogramm von je 10 bis 50 pmol der unpolaren PTH-AS im angegebenen System (Messbereich 0,04 O.D.⁴⁾). Relativbestimmungen lassen sich bei Anteilen einer PTH-AS im PTH-AS-Gemisch von mehr als 10% mit einer Genauigkeit von ca. $\pm 5\%$ durchführen. Für Absolutbestimmungen liess sich die Genauigkeit bisher nicht unter 20–30% verbessern.

Zur Durchführung der *Edman*-Abbau-Prozesse werden Harzproben von 2–20 mg in kleine, verschliessbare Röhrchen mit Frittenboden (7 × 60 mm, P2-Fritte) eingewogen, in Dioxan vorgequollen und nach *Schema 2* abgebaut. Reaktion V erfolgt in 0,5 ml Pyridin/Dioxan (1:20) mit 250 μ l Phenylisothiocyanat (PITC) durch einstündiges Schütteln bei 50° (gelegentlich länger, s.u.). Anschliessend wird 10mal mit Dioxan und 5mal mit Methylenchlorid gewaschen (je 0,7 ml). Zur Abspaltung der Thiazolinone (Reaktion VI) wird 30 Min. bei 50° mit 0,7 ml chlorwasserstoffgesättigtem Eisessig geschüttelt, filtriert und 2mal mit HCl/Eisessig nachgespült (je 0,3 ml). Nach Zugabe von 1,4 ml Wasser zu den vereinigten HCl/Eisessig-Lösungen erfolgt Umlagerung (Reaktion VII) zu den Thiohydantoinen beim Stehen über Nacht bei 25°. Nach Eindampfen i.V. löst man unter Erwärmen in 50 μ l bis 1 ml Dichloräthan. 5 μ l dieser Lösung werden in den HPL.-Chromatographen eingespritzt.

Reaktion VII verläuft unter den angegebenen Bedingungen [6] vollständig und sauber. In 20proz. wässriger Trifluoressigsäure, wie gelegentlich für diesen Reaktionsschritt vorgeschlagen [7], ist die Umlagerung dagegen unvollständig und es treten im HPL.-Chromatogramm störende Nebenprodukte auf. Ein sauberer Ablauf von Reaktion VI lässt sich ausser in der beschriebenen Weise auch mittels unverdünnter



Trifluoressigsäure oder 50 proz. (v/v) Trifluoressigsäure in Methylenchlorid bei gleichen Reaktionsbedingungen erreichen. Wiederholung dieses Reaktionsschrittes bringt unabhängig vom verwendeten Reagens stets weniger als 0,1% zusätzliches Thiohydantoin (nach Umlagerung). Reaktion V scheint in den meisten Fällen nach 30 Min. vollständig. Eine Verschleppung des N-terminalen Valins über sukzessiv ausgeführte Abbaureaktionen bei Valylpeptiden (Tab. 1), zeigt aber, dass in speziellen Fällen längere Umsetzungen notwendig sein können. Umsatzdauern über 5 Stunden sollten dagegen vermieden werden, da mit zunehmender Reaktionsdauer infolge unbekannter Nebenreaktionen die Thiohydantoin-Ausbeuten abnehmen.

⁴⁾ O. D. = optische Dichte.

Tabelle 1. *Verschleppte Anteile der N-terminalen PTH-AS (kursiv bei sukzessiven Abbau-Schritten (in % der gesamten nachweisbaren Menge N-terminaler PTH-AS). P = Copolymer Styrol/DVB 2%*

Peptidylharz	Umsatzdauer Reaktion V (50°)	1. Abbau	2. Abbau	3. Abbau
<i>Gly-Val-Phe-Gly-O-CH₂-P</i>	30 Min.	100	0,1	–
<i>(Val-Phe-Gly)₅-O-CH₂-P</i>	30 Min.	66	26	8
<i>Val-Phe-Gly-O-CH₂-P</i>	2 h	97	3	–

 Tabelle 2. *Nachgewiesene PTH-AS-Anteile (in %) beim Abbau verschiedener Peptidylharze; zugehörige Esko-Bestimmung [9] und Dorman-Titration [10] (in %)*

Nr.	Peptidylharz	PTH- -Gly	-Val	-Phe	-Ala	-Leu	<i>Esko</i> ^{b)} vor Deblockie- rung zu 4–8	<i>Dorman</i> ^{b)}
1	BOC-Gly-Ala-Phe-Leu-O-CH ₂ -P	0	–	2,5	4,2	1,0		
2	H-Gly-Ala-Phe-Leu-O-CH ₂ -P	100 ^{a)}	–	2,8	4,9	1,0		
3	BOC-Gly-Val-Phe-Gly-O-CH ₂ -P	0	0,3	0,25	–	–	0,18	7,2
4	H-Gly-Val-Phe-Gly-O-CH ₂ -P	100 ^{a)}	2,7	< 0,5	–	–		
5	H-Val-Phe-Gly-O-CH ₂ -P	< 0,5	100 ^{a)}	9,5	–	–	2,1	7,4
6	H-(Val-Phe-Gly) ₂ -O-CH ₂ -P	< 0,5	100 ^{a)}	7,8	–	–	4,3	10,5
7	H-(Val-Phe-Gly) ₃ -O-CH ₂ -P	< 0,5	100 ^{a)}	7,7	–	–	10,5	12,5
8	H-(Val-Phe-Gly) ₄ -O-CH ₂ -P	< 0,5	100 ^{a)}	10,1	–	–	15,5	12,5

^{a)} Bezugsgrösse für PTH-AS (Probenanalytik, vgl. [2]).

^{b)} Bezugsgrösse (= 100) ist die jeweilig ermittelte Totalbelastung nach der Deblockierung zu 4–8 (Probenanalytik bei *Esko*, Batchanalytik bei *Dorman*, vgl. [2]),
P = Copolymer Styrol/DVB 2% BOC = *t*-Butyloxycarbonyl

Abbau-Reaktionen an vorhandenen ungeschützten Peptidketten lassen sich auf jeder Stufe der Synthese durchführen. Bedingt durch die höhere Genauigkeit chromatographischer Relativbestimmungen liefert der Abbau im Zustand D (*Schema 1*) zuverlässigere Werte für den Anteil an N-terminaler Fehlaminosäure, der Abbau im Zustand C dagegen einen weitaus empfindlicheren qualitativen Nachweis, da Störungen durch den grossen Anteil der richtigen Aminosäure wegfallen. Der Abbau auf den Stufen C und D ergibt bei unvollständiger Kupplung und vollständiger Deblockierung innerhalb der Fehlergrenzen übereinstimmende Resultate, wie es an den absichtlich fehlerhaften (Kupplung auf jeder Stufe nur zu ca. 80%) Tetrapeptidylharzen 1 und 2 (s. Tab. 2) ersichtlich ist. Die Aminosäuren aller drei vorhergehenden Synthesecyclen sind nachweisbar. Eine solche Verfolgung der Fehlerfortpflanzung über mehr als einen Synthesecyclus ist nicht nur nach absichtlich fehlerhafter Kupplung möglich, wie das Auftreten von PTH-Phenylalanin beim Abbau des BOC-Glycylharzes 3 (s. Tab. 2) zeigt. Die hohe Reaktivität des PITC und/oder die stärkere Auflockerung der Gelmatrix infolge der höheren Temperatur scheint auch Aminogruppen dem Abbau zugänglich zu machen, die sich selbst unter energischen Synthesebedingungen im

Kupplungsschritt unreaktiv verhalten haben! Bildung von Rumpfpeptiden und Auslassungspeptiden infolge Unzugänglichkeit eines Teils der Aminogruppen ('closing off', vgl. [2]) kann dank dieser erhöhten Reaktivität verfolgt werden. Ob sich alle 'closing off'-Phänomene erfassen lassen, ist allerdings fraglich, da eine genügende Reaktivität aller Aminogruppen niemals *a priori* vorausgesetzt werden kann. Die nachgewiesenen Fehl-PTH-AS zeigen daher nur minimale, im Gegensatz zu den unspezifischen Analytikdaten aber stets gesicherte minimale Fehlerraten an. So sind Restgruppenbestimmungen nach *Esko* [9] am Peptidylharz **3** und an den geschützten Vorstufen **5** und **6** eindeutig zu niedrig, von **7** und **8** möglicherweise zu hoch (z.B. durch unspezifische Adsorptionen). Teilweise auffällige Diskrepanzen zwischen Titrationswerten nach *Dorman* [10] und *Edman*-Abbau sind noch völlig ungeklärt. Während die *Dorman*-Werte der Beispiele **5** bis **8** offenbar (trotz grosser Differenz zur *Esko*-Bestimmung in Beispiel **5**) etwa den reellen Restbelastungen entsprechen dürften, ist der *Dorman*-Wert in Beispiel **3** um eine Grössenordnung zu gross. 'Closing off' im geschützten Harz **3** wäre eine Erklärung, die zudem durch die grössere Menge an PTH-Valin beim Abbau des deblockierten Harzes **4** nahegelegt werden könnte. Die im gleichen Abbau nicht erhöhte Menge an PTH-Phenylalanin weist aber viel eher auf unvollständige Deblockierung im letzten Syntheseschritt hin.

Bei unvollständiger Deblockierung I ist ja gemäss *Schema 1* nach erneuter Deblockierung I' auf Stufe D ein gegenüber Stufe C erhöhter Gehalt an AS_n zu erwarten, da zum vorher vorhandenen Anteil c ein weiterer Anteil d hinzukommt. Im Prinzip ist damit eine empfindliche indirekte Überprüfung der Deblockierung I von AS_n möglich, in der Praxis allerdings nur dann, wenn die Fehlerrate der Deblockierung nicht wesentlich kleiner ist als die der Kupplung (NB. der Chromatographiefehler bei Differenzbestimmung $(c + d) - c$ (s. *Schema 1*) ist ca. 30%!) und wenn *Dorman*-Titration und *Edman*-Abbau auf Stufe C in den Fehlergrenzen übereinstimmen (Wegfall von Interpretationsschwierigkeiten). Systematische Endgruppenbestimmung ist damit potentiell eine der wenigen Möglichkeiten zur Verfolgung von Reaktion I, die von der oft beobachteten Abnahme der titrierbaren Totalbelastung im Laufe der Synthese (z.B. infolge Esterspaltung im Deblockierungsschritt) nicht beeinträchtigt wird. Gerade wegen dieser Abnahme und der dadurch beschränkten Anwendbarkeit energischeren Deblockierungsmethoden scheint uns Reaktion I zu unrecht als problemlos zu gelten. Besonders bei glatt verlaufenden Kupplungen, wo ein empfindlicher Nachweis mit der beschriebenen Methode möglich ist, könnte ein grosser Teil der Sequenzfehler auf unvollständige Deblockierung zurückführbar sein.

Mit gewissen Einschränkungen erlaubt also die *Edman*-Abbaumethodik die Erfassung sämtlicher Teilprozesse einer Festphasensynthese. Durch ihre qualitative und quantitative Aussage ermöglicht sie ein Studium der Fehlerentstehung und -fortpflanzung. Auch Peptidspaltung (z.B. als Folge von *Backbone*-Acylierung [8]) müsste erfassbar sein. Zusätzliche Möglichkeiten bietet der sukzessive wiederholte Abbau. Unvollständiger Verlauf früherer Abbau-Schritte lässt sich dabei (Auftreten von PTH-AS N-ständiger Reste $AS_{i>n}$ beim Abbau der n-ten Aminosäure) leicht von einfachen Synthesefehlern wie Auslassung und Rumpfbildung (Auftreten von PTH-AS C-ständiger Reste $AS_{i<n}$) differenzieren. Da sich einfache Sequenzfehler bei wiederholtem Abbau kumuliert auswirken, müssen auch relativ geringe statistische Fehler erfassbar werden. Durch alle diese Vorteile dürfte die *Edman*-Methodik in der beschriebenen

Ausführungsform die analytischen Möglichkeiten zur Kontrolle der SPPS wesentlich erweitern.

Die vorliegende Arbeit wurde vom *Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung* (Projekt Nr. 2.7920.72) unterstützt.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] J. Hirt, E. W. B. de Leer & H. C. Beyerman, in P. G. Katsoyannis 'The Chemistry of Polypeptides', S. 363, Plenum Press, New York, 1973.
- [2] P. Fankhauser & M. Brenner, in P. G. Katsoyannis 'The Chemistry of Polypeptides', S. 389, Plenum Press, New York, 1973.
- [3] F. Weygand & R. Obermeier, *Z. Naturforsch.* 23b, 1390 (1968).
- [4] W. Geising & S. Hörnle, in H. Nesvadba (ed.) 'Peptides 1971', S. 146, North-Holland Publishing Comp., Amsterdam, 1973.
- [5] R. Kaiser, 'Chromatographie in der Gasphase I', S. 30 und 51 (Abb. 9), Hochschultaschenbücher Nr. 22/22 a, Bibliograph. Inst., Mannheim, 1965.
- [6] J. Sjöquist, *Arkiv Kemi* 11, 129, 151 (1957).
- [7] R. A. Laursen, *Eur. J. Biochemistry* 20, 89 (1971).
- [8] P. Fankhauser, B. Schilling & M. Brenner, in H. Hanson (ed.) 'Peptides 1972', S. 162, North-Holland Publishing Comp., Amsterdam, 1973.
- [9] K. Esko & S. Karlsson, *Acta chem. Scand.* 24, 1415 (1970).
- [10] L. C. Dorman, *Tetrahedron Letters* 1969, 2319.

Some New Developments in Transition Metal Chemistry

by the Chemical Society, Dalton Division

12 February 1974

Further informations: The Chemical Society, Dr. John F. Gibson, Burlington House, London W1V 0BN.

25th Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy

by Society for Analytical Chemists of Pittsburgh, Spectroscopy Society of Pittsburgh

Cleveland, Ohio, 4–8 March 1974

Further informations: Dr. E. S. Hodge, Society for Analytical Chemists of Pittsburgh, Mellon Institute, 4400 Fifth Ave., Pittsburgh, Pa. 15213.