

CHROM. 4840

TRENNUNG VON PEPTIDEN UND AMINOSÄUREN IM URIN*

A. NIEDERWIESER UND H. CH. CURTIUS

*Medizinisch-Chemische Abteilung der Universitäts-Kinderklinik CH-8032** , Zürich (Schweiz)*

(Eingegangen am 25. Mai 1970)

SUMMARY

Separation of peptides and amino acids in urine

A relatively simple method is described which allows the detection of differences in the peptide pattern in human urine. Urine is concentrated five times, shaken with $\text{CuCO}_3 \cdot \text{Cu(OH)}_2$, centrifugated, and the copper complexes are separated on a TEAE-cellulose column at pH 8.0 into a fraction A (amino acids, amines and neutral substances) and, by elution with 0.2 M acetic acid, into a fraction P (peptides and organic acids). After extraction of the copper by 8-hydroxy-quinoline in chloroform, fraction P is dinitrophenylated and the ether-soluble and acid-soluble DNP-peptides are separated by two-dimensional thin-layer chromatography on Silica Gel G. As little as about 0.5 nmole peptide may be detected.

EINLEITUNG

Während die Analytik der Aminosäuren in biologischen Flüssigkeiten bereits seit vielen Jahren gut ausgebaut und heute sogar vollautomatisiert ist, bleibt der Nachweis von Peptiden im Urin immer noch einigen spezialisierten Forschungsgruppen überlassen. Ein Screening-Verfahren zur Analyse der Peptide im Urin könnte aber unseres Erachtens für die Diagnose von Stoffwechselstörungen eine ähnliche Bedeutung erlangen, wie sie die Aminosäuren-Analyse¹ für die Diagnose von zahlreichen hereditären und erworbenen Krankheiten bereits besitzt. Der etwa 10–1000-fache Überschuss an Aminosäuren im Urin und deren physikalisch-chemische Ähnlichkeit mit den Peptiden haben bisher ein einfaches Screening-Verfahren zum Nachweis der Peptide verhindert und komplizierte Trennverfahren^{2–5} erfordert. Weder die elegante Gelfiltration^{6–8} noch die Säulenchromatographie an Ionenaustauschern^{4, 5, 9, 10}, Aktivkohle², mit Kupferhydroxid präpariertem Sephadex¹¹ oder Chelex 100 (Lit. 12) sind für sich allein in der Lage, Urinpeptide generell von den in grossem Überschuss vorhandenen Aminosäuren zu trennen. Hingegen öffnet die Trennung als Kupferchelate bei pH 8 auf DEAE- oder TEAE-Cellulose nach dem Verfahren von TOMMEL *et al.*¹³ einen prinzipiell neuen, vielversprechenden Weg. Wir haben dieses Verfahren

* Diese Arbeit wurde unterstützt vom Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung, Projekt Nr. 53 19.3. Teile dieser Arbeit wurden vorgetragen am VII. Internationalen Kongress für Klinische Chemie in Genf, 8.–13. Sept. 1969. Abstract Siehe Lit. 18.

** Direktor Prof. Dr. A. PRADER.

mit einigen Modifikationen übernommen und erreichen durch Kombination mit Dinitrophenylierung und zweidimensionaler Dünnschicht-Chromatographie einen nahezu generellen Nachweis von Peptiden bei erträglichem Arbeitsaufwand. Dem Nachweis unter unseren Bedingungen entgehen dabei lediglich Peptide, die keine freie Aminogruppe tragen, z.B. Acetylpeptide ohne Lysin oder Histidin. Neutrale oder basische Dipeptide verbleiben theoretisch in der Aminosäurenfraktion. Unser Verfahren ist in Fig. 1 zusammengefasst und wird im folgenden im Detail beschrieben.

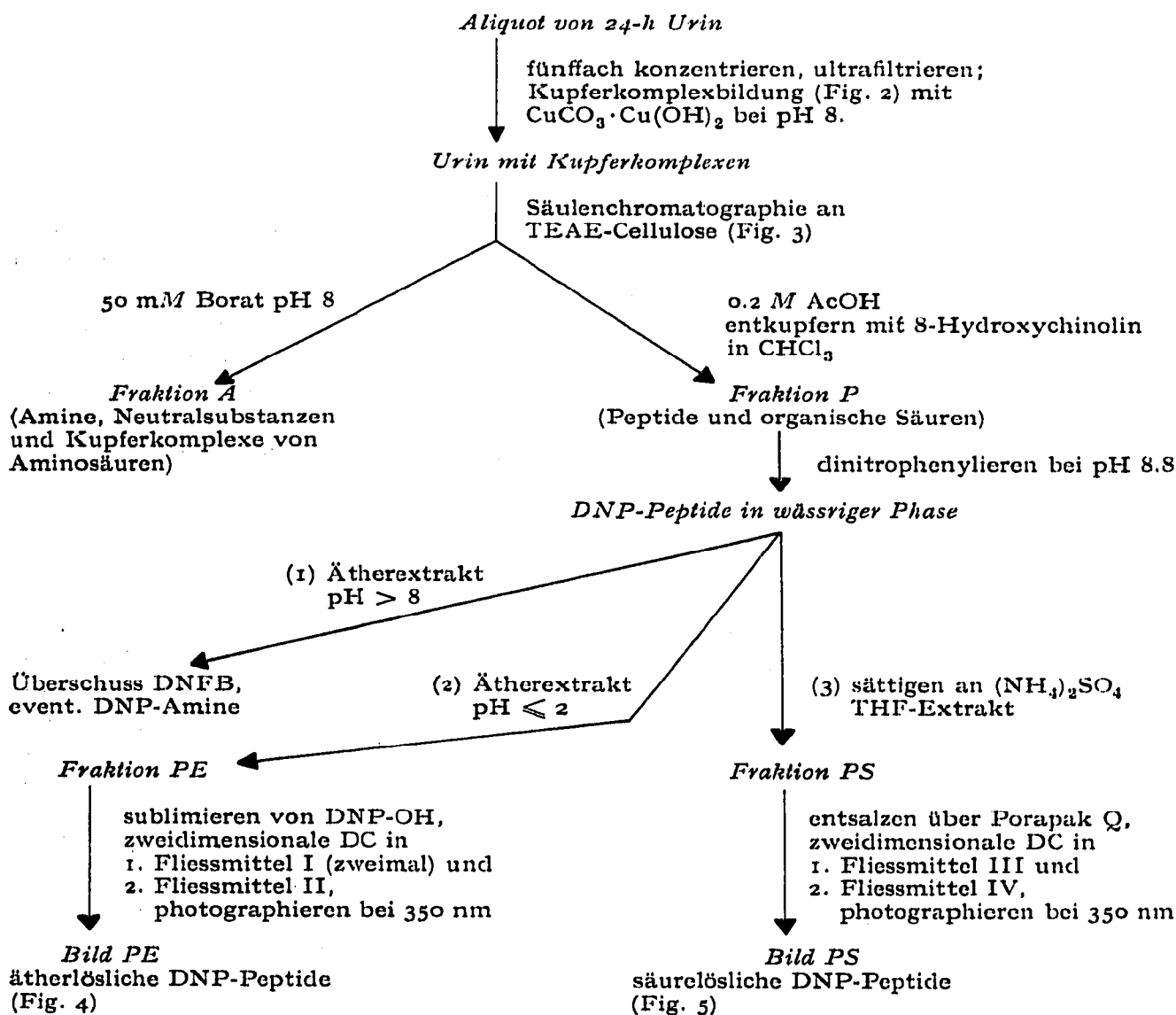


Fig. 1. Verfahren zum Nachweis von Peptiden im Urin als 2,4-Dinitrophenylderivate. DC = Dünnschicht-Chromatographie; DNFB = 2,4-Dinitrofluorbenzol; DNP-OH = Dinitrophenol; THF = Tetrahydrofuran.

Über erste Ergebnisse, die mit diesem Verfahren unter physiologischen und einigen pathologischen Verhältnissen erzielt wurden, werden wir in Kürze an anderer Stelle berichten.

EXPERIMENTELLES

Lösungen

0.05 M Boratpuffer pH 8.0. Borsäure, 30.9 g, in 41 ml 1 N NaOH lösen, portionsweise in etwa 6 l dest. Wasser einrühren, auf 10 l auffüllen, pH mit Glaselektrode prüfen und notfalls mit NaOH oder Eisessig korrigieren. CO₂-freies H₂O verwenden.

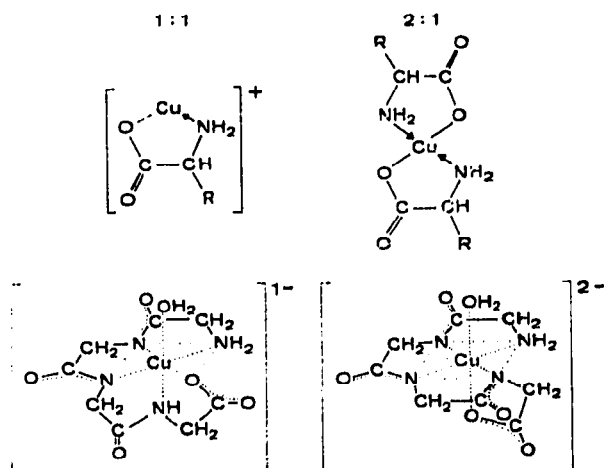


Fig. 2. Kupferkomplexe von Aminosäuren (oben) und Peptiden (unten). Bei pH 8 liegen neutrale Aminosäuren als positiv geladene 1:1 Komplexe oder als elektroneutrale 2:1 Komplexe vor. Peptide geben durch Ionisation von Amid-Protonen elektronegative Komplexe, dargestellt am Beispiel des Tetraglycins bei pH 8 (links) und bei pH > 8 (rechts), nach KIM UND MARTELL¹⁴.

0.05 M Natriumacetat pH 5.0. 20.4 g Natriumacetat · 3H₂O in 3 l dest. Wasser lösen und pH mit etwa 4 ml Eisessig einstellen.

Carbonatpuffer pH 8.8. 8.4 g NaHCO₃ in 100 ml dest. Wasser lösen und mit 40 % NaOH und Glaselektrode pH auf 8.8 einstellen.

10 % g/v Dinitrofluorbenzol in abs. Äthanol. Im Kühlschrank aufbewahren.

Peroxidfreies Tetrahydrofuran (THF). 1 l THF (Fluka) mit 100 ml einer frisch zubereiteten Lösung von 5 % Fe(II)SO₄ in 0.5 N H₂SO₄ und mit 500 mg Hydrochinon versetzen, 30 min schütteln, und dann im Rotationsverdampfer bei etwa 100 Torr und 45° bis auf einen Rückstand von etwa 100 ml destillieren. Das Destillat mit 50 g Ammoniumsulfat schütteln, durch einen Wattebausch filtrieren, mit 50 g Natriumsulfat sicc. versetzen und sofort am Rotationsverdampfer bis fast zur Trockne destillieren. Destillat in brauner Flasche unter Stickstoff aufbewahren und bei Gebrauch durch Einleiten von Stickstoff auspressen. Vor Gebrauch auf Peroxide prüfen: 1 ml THF mischen mit 1 ml 4 % KJ-Lösung in Wasser; die Mischung muss farblos bleiben.

Fließmittel

Die folgenden Fließmittel wurden verwendet: (I) Toluol–2-Chloräthanol–Pyridin–25 % Ammoniak (50:35:15:7). Ammoniak genau abmessen; es darf sich keine Emulsion bilden! (II) Chloroform–Benzylalkohol–Eisessig (70:30:3). (III) *n*-Propanol–25 % Ammoniak (75:25). (IV) *n*-Butanol–Eisessig–Wasser (80:20:20).

Aufarbeitung der Probe

Probe. Es wird 24-h Urin verwendet. Während der Sammlung durch 5–10 ml

Toluol stabilisieren und im Kühlschrank aufbewahren. Danach Volumen messen, die Konzentrationen von Chlorid und Kreatinin bestimmen und bis zur Aufarbeitung tiefrieren.

Konzentrierung und Ultrafiltration. Im Rotationsverdampfer bei 45° 100 ml 24-h Urin unter Zusatz von etwa 10 ml *n*-Butanol auf etwa 10 ml einengen. Das Konzentrat mittels einer Pipette quantitativ in ein 20-ml Messkölbchen überführen und nach mehrmaligem Spülen mit H_2O dest. auffüllen (5-fache Konzentrierung des Urins). Nach guter Durchmischung das ausgefallene Salz 5 min bei 4000 r.p.m. abzentrifugieren. Die klare Lösung vorsichtig abhebern und bei 4° in ein 20 ml-Schliffrohr, das in die Zentrifuge passt, ultrafiltrieren. Wir verwenden zum Ultrafiltrieren ein Amicon Modell 52 mit einer Diaflo XM-50 Membran (80 % Retention von Pepsin, Molgew. 35 000) bei 2 atm N_2 . (Die Ultrafiltration kann unter Umständen weggelassen werden, vgl. DISKUSSION.)

Kupferkomplex-Bildung. Das Ultrafiltrat mit einigen Tropfen 40 % NaOH vorsichtig auf pH 8.0 bringen (Glaselektrode). Etwa 0.4 g Kupfer(II)hydroxid-Carbonat ($CuCO_3 \cdot Cu(OH)_2$) zugeben, verschliessen und 20 min bei 40° schütteln. Anschliessend den Überschuss abzentrifugieren (5 min, 4000 r.p.m.), und 10 ml des klaren, blaugrünen Überstandes auf TEAE-Cellulose chromatographieren (siehe unten).

Vorbereitung der TEAE-Cellulose. 250 g TEAE-Cellulose (Serva) in einem 5-l Becherglas in H_2O dest. aufschlänmen, 5-mal im randvollen Glas nach guter Durchmischung sedimentieren lassen und die feine Suspension jeweils nach 30 min absaugen. Den Rückstand in einer Glasfritte unter Umrühren und Absaugen nacheinander mit den folgenden Lösungen waschen (pH jeweils im Auslauf kontrollieren): 0.5 N NaOH, 0.1 N HCl, 0.5 N NaOH, 0.05 M Boratpuffer pH 8.0. Die TEAE-Cellulose daraufhin in einem Rundkolben in 0.05 M Boratpuffer pH 8.0 suspendieren, am Wasserstrahlvakuum entlüften und unter Rühren in ein 2.5×45 cm Chromatographierrohr mit Adapter (z.B. Pharmacia) einfüllen. Die Füllhöhe soll nach 16 h ständigen Äquilibrierens mit Boratpuffer (ca. 150 ml/h) etwa 30 cm betragen.

Säulenchromatographie an TEAE-Cellulose. 10 ml der klaren Kupferkomplex-Lösung durch einen Kapillaradapter mittels Pumpe in das 2.5×30 cm hohe TEAE-Cellulose-Bett einsaugen. Ohne Einschluss einer Luftblase anschliessend mit 0.05 M

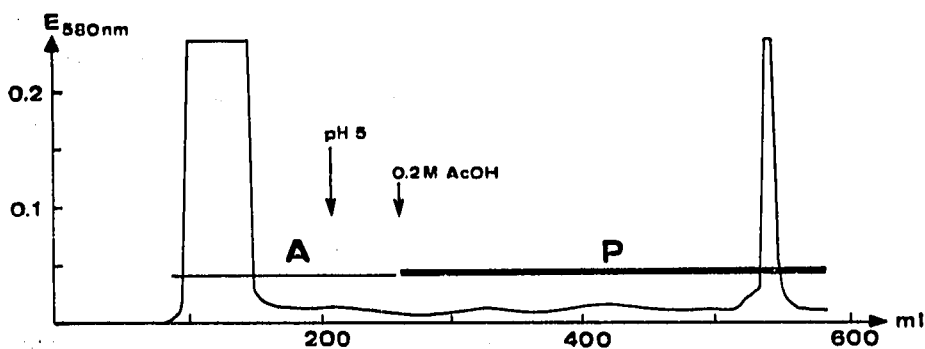


Fig. 3. Fraktionierung von Aminosäuren (A) und Peptiden (P) im Urin als Kupferkomplexe auf einer 2.5×30 cm Säule von TEAE-Cellulose, äquilibriert mit 50 mM Boratpuffer pH 8.0. Aminosäuren, Amine und Neutralsubstanzen gelangen in Fraktion A. Peptide und organische Säuren werden mit 0.2 M Essigsäure eluiert (Fraktion P.) Um die eventuell auf der Säule gebundene oder im Boratpuffer vorhandene Kohlensäure nicht plötzlich freizusetzen, wird vor der Essigsäure 30 min lang mit 50 mM Natriumacetat pH 5.0 eluiert. Durchflussgeschwindigkeit ca. 120 ml/h.

Boratpuffer pH 8.0 eluieren. Nach 105 min bei 120 ml/h auf 0.05 M Natriumacetat pH 5.0, nach weiteren 30 min bei gleichbleibender Pumpgeschwindigkeit auf 0.2 M Essigsäure umschalten. Das Eluat bei 580 nm im Durchlauf kolorimetrieren (wir verwenden dazu ein Beckman DB Spektralphotometer mit Schreiber) und in 5-min Fraktionen (ca. 10 ml) auffangen. Die Fraktionen gemäss Fig. 3 zu den Fraktionen A (Aminosäuren, Basen und Neutralsubstanzen) und P (Peptide und Säuren) vereinigen. Ihr Volumen soll etwa $A \approx 170$ ml und $P \approx 370$ ml betragen. Die Säule nach der Chromatographie 120 min mit 0.1 N HCl, 120 min mit 0.5 N NaOH waschen und über Nacht mit 0.05 M Boratpuffer pH 8.0 äquilibrieren.

Entkupfern und Dinitrophenylieren. Fraktion P auf etwa 30 ml einengen, mit NaOH auf pH 7.0 einstellen und 2-mal mit je 30 ml 0.6 % g/v 8-Hydroxychinolin in Chloroform und 2-mal mit je 30 ml Chloroform extrahieren. Die wässrige Phase am Rotationsverdampfer einengen, auf ein Volumen von 3–4 ml bringen, mit wenigen Tropfen 40 % NaOH vorsichtig auf pH 8.8 (Glaselektrode) einstellen, mit 1 ml Carbonatpuffer pH 8.8 und 1 ml 10 % Dinitrofluorbenzol-Lösung in abs. Äthanol versetzen und 90 min bei 40° im Dunkeln schütteln. Anschliessend das pH kontrollieren (muss grösser als 8 sein), die Probe quantitativ in einen 100-ml Scheidetrichter überführen (spülen mit jeweils zwei 10-ml Portionen H₂O dest. und Äther), 5-mal mit je ca. 30 ml Äther extrahieren und den Extrakt verwerfen. Die wässrige Phase mit 6 N HCl auf pH 2 einstellen und nochmals 5-mal mit jeweils 30 ml Äther extrahieren. Die vereinigten Extrakte mit Na₂SO₄ sicc. trocknen und (nach Spülen des Salzes mit frischem Äther) einengen, mit wenig Aceton quantitativ in ein Sublimations-Gefäss überführen und eindampfen (ätherlösliche Derivate; Fraktion PE). Die wässrige Phase mit festem Ammoniumsulfat sättigen und 2-mal mit 10 ml peroxidfreiem (Kontrolle!) Tetrahydrofuran extrahieren. Den Extrakt mit Na₂SO₄ sicc. trocknen, einengen, unter Zusatz von wenigen Tropfen Wasser quantitativ in ein 10-ml Schliffröhrchen überführen und im Stickstoffstrom bei 50° vorsichtig eindampfen (säurelösliche Derivate; Fraktion PS). Siehe ANMERKUNG BEI DER KORREKTUR

Sublimation (Fraktion PE). Dinitrophenol, das sich als Nebenprodukt bei der Dinitrophenylierung bildet, durch mehrmalige Sublimation bei ≤ 0.05 Torr und 50° entfernen. Um die Oberfläche zu erneuern, jeweils nach 15 min unterbrechen, den Rückstand in wenig Aceton und Äther lösen und beim Eindampfen auf eine möglichst grosse Fläche verteilen. Zur Kontrolle das Sublimat vom Kühlfinger mit Aceton in ca. 100 ml Wasser spülen und zum späteren Vergleich aufbewahren. Die Sublimation solange wiederholen (4–6-mal), bis die neue Spülflüssigkeit nur noch schwach gefärbt ist. Daraufhin den Rückstand vom Sublimiergefäss mit etwas Aceton quantitativ in ein 10-ml Schliffröhrchen überspülen und am Vakuum trocknen.

Entsalzen der Fraktion PS über Porapak Q. Den folgenden Vorgang ohne Unterbrechung durchführen, um einer teilweisen, irreversiblen Adsorption vorzubeugen! 1 g Porapak Q[®], 150–200 mesh (ein poröses, mit Divinylbenzol quervernetztes Polystyrol der Firma Waters Associates, Inc., Framingham, Mass., U.S.A.) in 96 % Äthanol quellen lassen und in eine 1 × 10 cm Chromatographiersäule mit Glasfritte einfüllen. Mit 96 % Äthanol, dann mit mindestens 20 ml entlüfteter 5 %-iger Essigsäure waschen. Die Fraktion PS in 2 ml und danach nochmals in 1 ml 5 %-iger Essigsäure aufnehmen und soweit möglich (es bleibt ein Rückstand) auf die Porapak Q Säule auftragen. Mit 12 ml entlüfteter 5 %-iger Essigsäure spülen und das Eluat (ca. 15 ml) verwerfen. Den im Schliffrohr verbliebenen Rückstand der PS-Fraktion in

3 ml Äthanol-Wasser (2:1) lösen und quantitativ auf die Säule überführen, mit 10 ml Äthanol-Wasser (2:1) und weiter mit 10 ml 96 % Äthanol langsam (!) eluieren. Eine 20-ml Fraktion auffangen, die praktisch alle gelben Farbstoffe enthält. Diese Fraktion einengen, quantitativ in ein 10-ml Schliffröhrchen überführen und im Stickstoffstrom bei 50° eindampfen. Die Säule zur Reinigung mit viel Äthanol nachwaschen.

Zweidimensionale Dünnschicht-Chromatographie

Allgemeines. Dünnschichten 20 × 20 cm aus Kieselgel G (Merck), selbstgestrichen, mindestens 16 h an der Luft getrocknet (rel. Luftfeuchtigkeit 50 %). Wie in Fig. 4 ersichtlich, auf der Dünnschichtplatte zwei 35 mm breite Randstreifen zur Aufnahme des Standards abtrennen und die Startpunkte jeweils 20 mm vom Plattenrand entfernt durch Einstich markieren. Alle Ränder 1–2 mm breit von Schicht befreien.

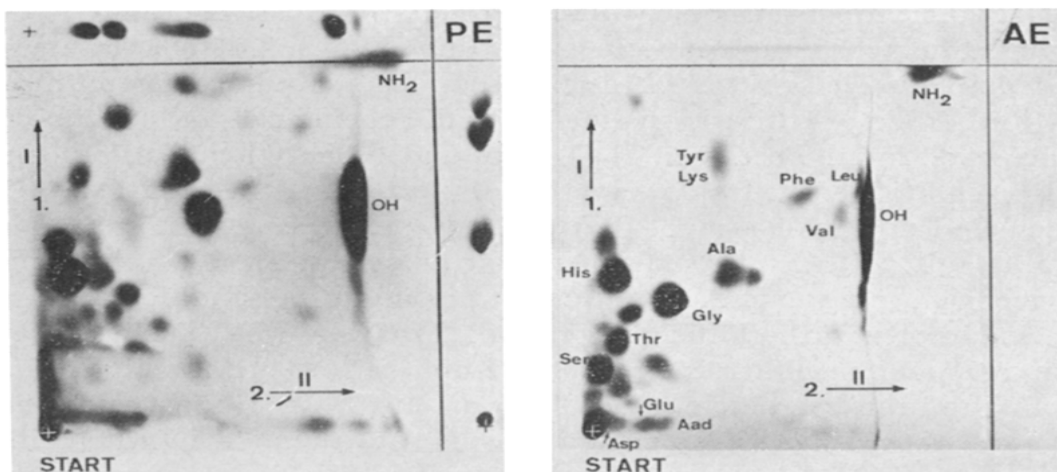


Fig. 4. Zweidimensionale Dünnschicht-Chromatogramme der ätherlöslichen DNP-Derivate der Peptidfraktion (PE, links) und der Aminosäurenfraktion (AE, rechts) eines Normalurins auf Kieselgel G. Die aufgetragenen Mengen entsprechen bei der Fraktion PE 2.5⁰/₁₀₀ und bei der Fraktion AE 0.1⁰/₁₀₀ des 24-h Urins. Die Fraktion A wurde analog zu P aufgearbeitet, doch unterblieb die Sublimation des Dinitrophenols. Fliessmittel I (zweimal in derselben Richtung) und II (einmal) nach WALZ *et al.*¹⁶, siehe Text. Bei His, Lys und Tyr handelt es sich um die di-DNP-Derivate. Die am Rand aufgetragene Testmischung enthielt DNP-Alanin, DNP-Glycin, DNP-Glutaminsäure und di-DNP-Tyrosin. UV-Photographie. Aad = α -Amino adipinsäure; NH₂ = 2,4-Dinitroanilin; OH = 2,4-Dinitrophenol.

Chromatographierkammern. Plattenkassetten der Firma Camag, Muttenz, Schweiz wurden verwendet. Die Schienen in den Kassetten unten 3 cm hoch abschleifen, um Störungen durch kapillares Hochklettern des Fliessmittels zu vermeiden. Die Ränder der zur Aufnahme des Fliessmittels dienenden Schalen beidseits etwas nach aussen biegen, um ein klemmfreies Einstellen und Herausheben der Kassetten zu gewährleisten. Zur Chromatographie die Schale mit 80 ml Fliessmittel füllen und sofort die aus Gründen der Reproduzierbarkeit immer vollständig mit sieben Dünnschichtplatten gefüllte Kasette (alle Dünnschichten zur selben Seite gewandt) hineinstellen und verschliessen. Sobald das Fliessmittel auf einer der Platten die Grenze des Randstreifens (siehe oben) erreicht hat, die Chromatographie unterbrechen und das Fliessmittel verwerfen.

Ätherlösliche DNP-Derivate (PE-Fraktion). Den Rückstand der PE-Fraktion in Aceton lösen, und zwar in 200/*v* μ l, wobei *v* das 24-h Urin-Volumen in Liter bedeutet

(z.B. bei einer Ausscheidung von 0.5 l lösen in 400 μ l Aceton). Das Gefäß unter gelegentlichem Schütteln 30 min gut verschlossen stehen lassen und dann mit Hilfe einer Microcap Kapillare (Drummond Scientific Comp., Broomall, Pa., U.S.A.) 10 μ l auf die Dünnschicht portionsweise auftragen. An beiden Randstreifen der Platte je 1 μ l einer Standard-Mischung von DNP-Glycin, DNP-Alanin, DNP-Glutaminsäure und di-DNP-Tyrosin (je 2 mg/ml Aceton) applizieren. Gut trocknen lassen und anschliessend in der 1. Dimension zweimal mit Fliessmittel I chromatographieren¹⁵ (Zwischentrocknung 10 min im Luftzug*), danach 30 min im Luftzug trocknen und in der 2. Dimension einmal in Fliessmittel II chromatographieren (Fig. 4).

Säurelösliche DNP-Derivate (PS-Fraktion). Den Rückstand der Fraktion PS in peroxidfreiem Tetrahydrofuran-Wasser (2:1) oder in Aceton-Wasser (2:1) lösen, und zwar in 200/v μ l (siehe oben), und 10 μ l auftragen. Die an den Rändern aufzutragende Standardmischung enthält DNP-Arginin, DNP-Citrullin, DNP-Cysteinensäure, di-DNP-Histidin und DNP-Taurin (je 2 mg/ml in Aceton-Wasser, 2:1). In der 1. Dimension einmal in Fliessmittel III chromatographieren, 30 min im Luftzug* trocknen lassen und dann in der 2. Dimension einmal in Fliessmittel IV chromatographieren (Fig. 5).

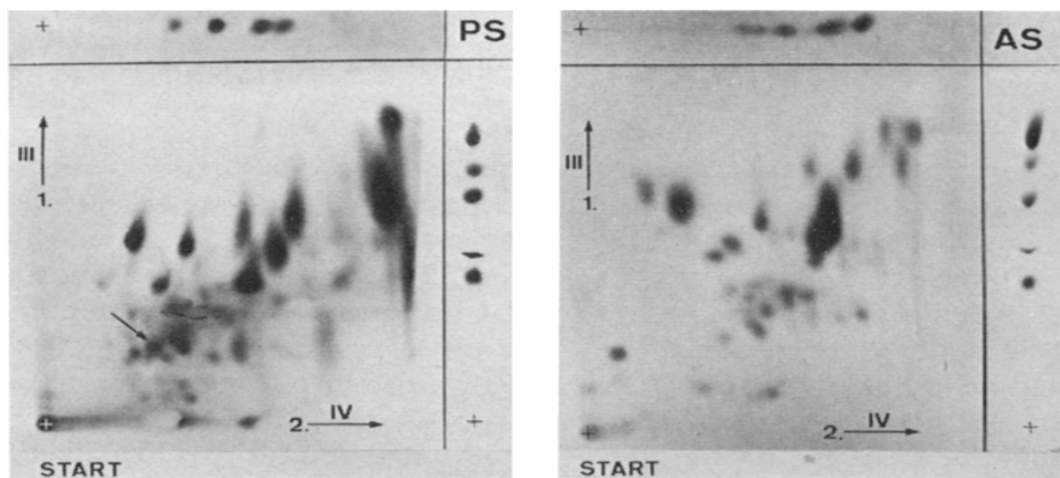


Fig. 5. Zweidimensionale Dünnschicht-Chromatogramme der säurelöslichen DNP-Derivate der Peptidfraktion (PS, links) und der Aminosäurenfraktion (AS, rechts) eines Normalurins auf Kiesgel G. Die aufgetragenen Mengen entsprechen 2.5⁰/₁₀₀ (Fraktion PS) und 0.1⁰/₁₀₀ (Fraktion AS) des 24-h Urins. Die Fraktion A wurde analog zu P aufgearbeitet. Fliessmittel III und IV, siehe Text. Die am Rand aufgetragene Testmischung enthielt DNP-Arginin, DNP-Citrullin, DNP-Cysteinensäure, di-DNP-Histidin und DNP-Taurin. UV-Photographie. Der Pfeil deutet auf die Stelle, an der von dem PS-Chromatogramm eines anderen Urins ein Fleck eluiert wurde; dieser Fleck ergab nach Weiterreinigung und Hydrolyse das in Fig. 8 gezeigte Aminosäuren-Chromatogramm.

Photographie im UV-Licht. Das im Luftzug* getrocknete Chromatogramm (Zeit standardisieren!) von zwei UV-Lampen (Camag Universal TL 900) bei 350 nm beidseitig im Winkel von 45° beleuchten. Der Abstand Lampe-Plattenmitte soll ca. 20 cm betragen. Im verdunkelten Raum 45 sec bei Blende 8 auf Agfa-Gevaert Copex Ortho 35 mm Film belichten (Abstand 65 cm) Die entwickelten Filme im Diaskop oder mittels eines Projektors betrachten. Falls erforderlich, Vergrößerungen anfertigen

* Platten unmittelbar hinter die Scheibe eines gut lüftenden Abzugs legen und die Scheibe bis auf einen etwa 3 cm hohen Spalt schliessen.

auf Agfa Brovira Papier BH1 (hart, extraweiss glänzend) oder auf Agfa-Gevaert Copyline P1m. Das letztere Material basiert auf Celluloseacetat, ist durchscheinend, matt und besonders gut geeignet zum Vergleich durch Übereinanderlegen der Bilder und zum Beschriften.

DISKUSSION

Die Methode von TOMMEL *et al.*¹³ beruht auf der Eigenschaft vieler Peptide, bei pH 8 unter Abspaltung eines Protons vom Amid-Stickstoff negativ geladene Kupferkomplexe zu bilden, während die meisten Aminosäuren unter diesen Bedingungen positiv geladene oder elektroneutrale Komplexe bilden (vgl. Fig. 2) und daher z.B. durch Chromatographie an schwach basischem Ionenaustauscher, wie DEAE- oder TEAE-Cellulose, abgetrennt werden können. Saure Aminosäuren sollten ebenfalls negativ geladene Komplexe bilden und sich daher wie Peptide verhalten. Dies wurde von TOMMEL *et al.*¹³ auch beobachtet. Um diese Schwierigkeit zu umgehen, haben die genannten Autoren vorgeschlagen, der zu trennenden Mischung Arginin als basische Aminosäure im Überschuss zuzugeben, um elektroneutrale Mischkomplexe zu erhalten. Wir können die Ergebnisse von TOMMEL *et al.* unter unseren Bedingungen nicht bestätigen und fanden keinen Einfluss von Arginin auf die Verteilung der sauren Aminosäuren. Da bei der Kupferkomplexbildung mit einem Überschuss an Kupfer gearbeitet wird, sollten 1:1 Kupfer-Aminosäure-Komplexe bevorzugt und Mischkomplexe unterdrückt werden.

Wir haben quantitative Bestimmungen von Aminosäuren durchgeführt, die in einer Testlösung verkupfert, chromatographiert und entkupfert wurden. Ausser den Aminosäuren enthielt die Testlösung 5 % NaCl und 20 % Harnstoff, um den Bedingungen eines Urinkonzentrats besser zu entsprechen. Wie Tabelle I zeigt, gelangen nur relativ geringe Anteile von Asparaginsäure und Glutaminsäure in die "Peptidfraktion" P, aber ein hoher Anteil von Tyrosin, sowie Spuren von Serin, Glycin und Histidin. Offenbar wird der Kupferkomplex von Tyrosin durch teilweise Ionisation seiner phenolischen Hydroxylgruppe (pK -Wert = 10.07, Lit. 16) an TEAE-Cellulose gebunden. Phenylalanin, das diese Hydroxylgruppe bei sonst gleicher Struktur nicht besitzt, gelangt vollständig in die "Aminosäurenfraktion" A.

Bemerkenswert ist ferner, dass, entgegen der Theorie, der Kupferkomplex der basischen Aminosäure Lysin teilweise an den Ionenaustauscher gebunden wird und erst mit 0.1 N HCl eluiert werden kann.

Die Gesamtausbeute der meisten Aminosäuren liegt bei etwa 86 %. Es wird vermutet, dass die grössten Verluste bei der Entkupferung auftreten. Die sauren und basischen Aminosäuren Asparaginsäure, Glutaminsäure, Lysin und Arginin werden nur zu etwa 76 % wiedergefunden, und die schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin und Cystin nur zu 73 bzw. 26 %. Methioninsulfon und Cysteinsäure wurden nicht beobachtet. Eine Oxidation der schwefelhaltigen Aminosäuren durch Cu(II) und eine irreversible Bindung des dadurch entstandenen Methioninsulfons und der Cysteinsäure an den Ionenaustauscher kann aber nicht ganz ausgeschlossen werden, obwohl ein qualitativer Versuch zeigte, dass Cysteinsäure mit 0.1 N HCl von TEAE-Cellulose zumindest teilweise eluierbar ist. Frühere Versuche, die an einer anderen Charge von TEAE-Cellulose und ohne Zusatz von NaCl und Harnstoff zur Testlösung durchgeführt wurden, zeigten hohe Verluste von Asparaginsäure, Glutaminsäure und Serin,

TABELLE I

PROZENTUALE WIEDERGEWINNUNG VON AMINOSÄUREN NACH KUPFERKOMPLEXBILDUNG, CHROMATOGRAPHIE AN TEAE-CELLULOSE UND ENTKUPFERUNG

Eingesetzt wurden 10 ml einer wässrigen Lösung mit je 25 μ Mol Aminosäure, 5% NaCl und 20% Harnstoff. Angegeben ist das Mittel zweier Bestimmungen.

Aminosäure	Fraktion A	Fraktion P	0.1 N HCl Wasch- flüssigkeit	Gesamt- ausbeute
Asp	70.5	0.7	4.2	75.4
Thr	91.0			91.0
Ser	89.7	Spur		89.7
Pro	81.5			81.5
Glu	73.5	5.0		78.5
Gly	90.0	Spur		90.0
Ala	89.0			89.0
Val	85.2			85.2
(Cys) ₂	26.4			26.4
Met	73.1			73.1
Ile	88.4			88.4
Leu	86.0			86.0
Tyr	55.9	30.2		86.1
Phe	84.4			84.4
Lys	70.0		3.1	73.1
His	81.2	Spur		81.2
Arg	79.3			79.3

sowie einen relativen Anteil von etwa 40 % Tyrosin, 4 % Lysin (!) und 5 % Arginin (!) in der "Peptidfraktion" P.

Der Einfluss der Salzkonzentration auf die Trennung von Aminosäuren und Peptiden wurde am Beispiel einer Mischung von Arginin, Glycin und Leucylglycylglycin untersucht. Fig. 6 zeigt eine deutliche Verschlechterung der Trennung bei NaCl-Konzentrationen über 6 %. Die störende Komponente ist dabei das Chlorid-Ion. Der zu verwendende Elutionspuffer darf daher kein Chlorid enthalten. Aus demselben Grund darf Urin im allgemeinen nur 5-fach konzentriert werden. Eine 10-fache Kon-

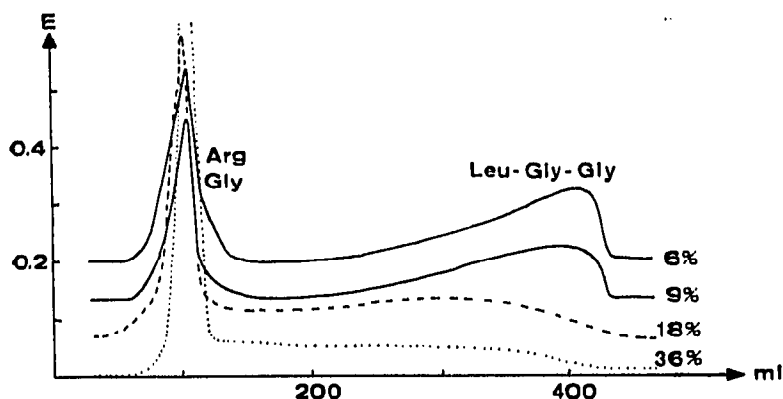


Fig. 6. Trennung von Arginin + Glycin und Leucylglycylglycin auf TEAE-Cellulose bei pH 8.0 in Abhängigkeit von der Chlorid-Konzentration. Aufgetragen wurden 12.5 mg Arginin, 25 mg Glycin und 50 mg Leucylglycylglycin in 1 ml 50 mM Natriumborat 6, 9, 18 bzw. 36%ig an NaCl, pH auf 8.0 eingestellt.

zentrierung ist nur bei einer Chloridkonzentration unter 110 mequiv./l zulässig.

Die "Peptidfraktion" P eines Normalurins ergab bei Ionenaustauschchromatographie nach Stein und Moore das in Fig. 7 gezeigte Bild, das auf die Anwesenheit zahlreicher saurer und neutraler Peptide schliessen lässt. Nach Hydrolyse der Peptidfraktion konnten alle Aminosäuren nachgewiesen werden, wobei Glycin und Glutaminsäure überwogen. Ein solches Totalhydrolysat sagt aber wenig aus, da Glycin bei salzsaurer Hydrolyse auch aus Nichtpeptiden freigesetzt wird, so z.B. aus der in der Fraktion P anwesenden Hippursäure. Hippursäure ist hingegen weder mit Ninhydrin (Fig. 7) noch mit Dinitrofluorbenzol (Fig. 4) nachweisbar.

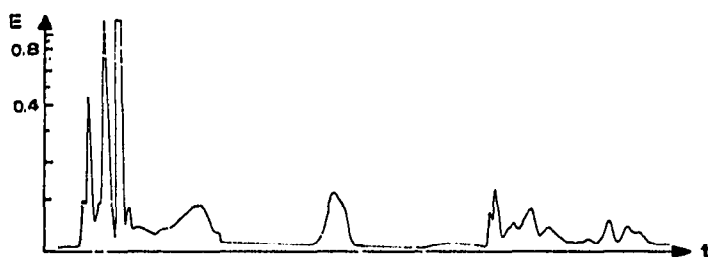


Fig. 7. Trennung der entkupferten Peptidfraktion P eines Normalurins durch Ionenaustauschchromatographie nach Stein und Moore. Saure und neutrale Verbindungen. Die breiten Peaks deuten auf unvollständige Trennung von Substanzgruppen mit sehr ähnlichen pK -Werten. Die zum Nachweis verwendete Ninhydrin-Reaktion (ohne vorherige Hydrolyse) ist bei grösseren Peptiden nur noch wenig empfindlich.

Bei den untersuchten Urinproben enthielt die 0.1 N HCl-Fraktion nur sehr wenig dinitrophenylierbares Material. Vereinigt man diese Fraktion mit der Fraktion P, so tritt häufig bei der Dünnschicht-Chromatographie der ätherlöslichen DNP-Derivative eine so schwere Störung auf (sehr langgezogene Flecken, Retention am Startpunkt), dass diese Chromatogramme nicht mehr auswertbar sind. Wir haben daher auf die Untersuchung der HCl-Fraktion verzichtet.

Die Ultrafiltration dient dazu, Zelldebris und grosse Proteine mit Sicherheit zu entfernen und auf diese Weise eine theoretisch mögliche Veränderung der Peptidzusammensetzung durch enzymatische Hydrolyse von Zellbestandteilen und Proteinen auszuschliessen. Da aber der Urin bis zur Aufarbeitung in gefrorenem Zustand gelagert wird und dann bis zur Verkupferung mit anschliessender Zentrifugation nur kurze Zeit verstreicht, dürfte eine nachträgliche Veränderung der Peptidzusammensetzung sehr unwahrscheinlich sein. Eventuell vorhandene Proteine stören in unserem Verfahren nicht, da diese denaturiert werden und bei der Chromatographie als DNP-Derivate auf Kieselgel am Startpunkt verbleiben. Im Hinblick auf eine Vereinfachung des Verfahrens kann daher auf die Ultrafiltration in der Regel verzichtet werden. Paralleluntersuchungen von Normalurin mit und ohne Ultrafiltration zeigten keinen Unterschied im Peptidmuster.

Die Extraktion der säurelöslichen DNP-Derivate mit Tetrahydrofuran aus der mit Ammoniumsulfat gesättigten Lösung (diese Arbeit) erfolgt leichter und schneller als dies bisher¹⁵ möglich war. Die säurelöslichen DNP-Derivate lassen sich aus wässriger Lösung auf das Polystyrolharz Porapak Q adsorbieren und somit auf einfache Weise von anorganischem Material befreien¹⁷. Die zweidimensionale Dünnschicht-Chromatographie der säurelöslichen DNP-Peptide in den Fließmitteln III und IV

ergibt von mehreren untersuchten Fließmittelkombinationen die beste Trennung.

Bei der Photographie unter unseren Bedingungen werden nur Substanzen erfasst, die bei etwa 370–380 nm absorbieren. Die verwendete UV-Lampe emittiert maximal bei 350 nm, das verwendete Photoobjektiv (Asahi Pentax Takumar 1:1.8; $f = 55$ mm) ist aber, wie Kontrollmessungen ergaben, unterhalb von 370 nm lichtundurchlässig ($OD_{390\text{ nm}} = 0.78$; $OD_{370\text{ nm}} > 2$). Mit dieser Anordnung werden die intensiv gelben Dinitrophenylderivate von Peptiden und Aminosäuren mit grosser Empfindlichkeit erfasst (Absorptionsmaximum 366 nm). Die Nachweisgrenze dürfte bei dem beschriebenen Verfahren bei etwa 0.5 nMol Peptid liegen; dies entspricht einer Ausscheidung von etwa 200 nMol Peptid/24 h. Mono-O-DNP-Tyrosin, das ein Absorptionsmaximum von 310 nm aufweist — der Fuss des Absorptionspeaks endet bei etwa 390 nm — ist bereits nur noch sehr schwach sichtbar. Die Photographie der Chromatogramme im UV steigert daher die Selektivität unseres Verfahrens erheblich. Andere aromatische Verbindungen, die sich — wie z.B. die aromatischen Säuren — in der "Peptidfraktion" befinden, aber nicht dinitrophenyliert sind, werden nicht registriert. Andererseits werden dinitrophenylierbare Amine und Phenole, soweit sich diese überhaupt in der Fraktion P befinden, durch Extraktion mit Äther im alkalischen Milieu und durch die dünnschicht-chromatographischen Bedingungen weitgehend entfernt. Bei der Fülle der im Urin vorhandenen Substanzen ist es aber wahrscheinlich, dass trotzdem einige der auf den Chromatogrammen sichtbaren Substanzen keine Peptide oder Aminosäuren darstellen. Stichprobenartig untersuchte Flecken liessen nach weiterer dünnschicht-chromatographischer Reinigung, salzsaurer Hy-

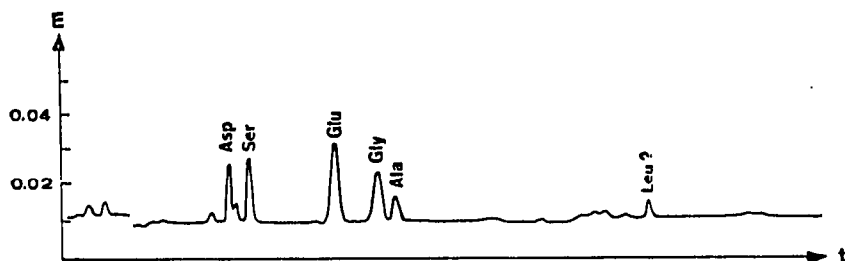


Fig. 8. Hydrolysat eines DNP-Peptids der PS-Fraktion. Das Peptid wurde nach zweidimensionaler Dünnschicht-Chromatographie (vgl. Fig. 5, Pfeil) mit Aceton-Wasser (2:1) eluiert, mehrmals, unter anderem mit Chloroform-Methanol-Eisessig-Wasser (60:40:1:10), auf Kieselgel H chromatographiert und mit 6 N HCl während 15 h unter N_2 hydrolysiert. Das Gesamtgewicht der nach dem Chromatogramm berechneten Aminosäuren betrug etwa 6 μ g.

droyse und zweidimensionaler Dünnschicht-Chromatographie mehrere Aminosäureflecken erkennen, u.a. Glycin, Glutaminsäure, Serin, Threonin, Alanin, Valin und Leucin. Man darf daher annehmen, dass es sich bei den dargestellten Flecken zumindest weitgehend um Dinitrophenylpeptide handelt. Sprühtests ergaben, dass zahlreiche gelbe Flecken, vor allem in der säurelöslichen Fraktion, Zucker enthalten und daher möglicherweise Glykopeptide darstellen. Die Untersuchung solch kleiner Mengen (μ g bis ng-Bereich) stellt aber erhebliche Anforderungen. Fig. 8 zeigt als Beispiel das Hydrolysat eines Substanzfleckens (ca. 6 μ g), der nach mehrmaliger dünnschicht-chromatographischer Reinigung hydrolysiert und nach Stein und Moore analysiert wurde. In der Regel reicht aber die Empfindlichkeit unserer Aminosäuren-Analysatoren nicht aus. Wir hoffen, in näherer Zukunft über ein besser geeignetes Analyseverfahren zu verfügen (Gaschromatographie). Die Dinitrophenylderivate besitzen die

Vorteile, dass sie unmittelbar sichtbar sind, leicht weitergereinigt werden können und nach Hydrolyse auch die endständige Aminosäure erkennen lassen.

ANMERKUNG BEI DER KORREKTUR

Vereinfachung: Die Extraktion der säurelöslichen DNP-Derivate (Fraktion PS, siehe Fig. 1) erfolgt nach der Dinitrophenylierung und den Extraktionen mit Äther aus der verbleibenden wässrigen Phase mittels Porapak Q (Lit. 17). Dabei entfallen Sättigung mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und Extraktion mit dem wenig beständigen THF.

Man entfernt den in der wässrigen Phase gelösten Äther im Vakuum (5 min Rotieren bei ca. 20°) und lässt die Lösung zum Entsalzen (siehe dort) direkt durch eine Porapak-Q Säule laufen. Man spült mit ca. 12 ml entlüfteter 5 %iger Essigsäure und verwirft das Eluat. Wie unter *Entsalzen der Fraktion PS über Porapak Q* beschrieben, werden die DNP-Peptide langsam mit Äthanol-Wasser und Äthanol eluiert.

DANK

Herrn Dr. G. SCHOENENBERGER, Basel, danken wir für wertvolle Diskussionen und Frau L. GUIARD, Frau L. GUSTAFSON, Frä. H. KARPf und Herrn H.-R. BOSSHARDT für technische Hilfe.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird eine relativ einfache Methode zum Nachweis von Unterschieden im Peptidmuster im Urin beschrieben. Urin wird fünffach konzentriert, zur Komplexbildung mit $\text{CuCO}_3 \cdot \text{Cu}(\text{OH})_2$ geschüttelt, zentrifugiert und der Überstand bei pH 8.0 auf TEAE-Cellulose in eine Fraktion A (Aminosäuren, Amine und Neutralsubstanzen) und, durch Elution mit 0.2 M Essigsäure, in eine Fraktion P (Peptide und organische Säuren) getrennt. Nach Entkupfern durch Extraktion mit 8-Hydroxychinolin in Chloroform wird Fraktion P dinitrophenyliert. Äther- und säurelösliche DNP-Peptide werden durch zweidimensionale Dünnschicht-Chromatographie auf Kieselgel G getrennt. Die Nachweisgrenze liegt bei etwa 0.5 nMol Peptid.

LITERATUR

- 1 A. NIEDERWIESER UND H. CH. CURTIUS, *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.*, 7 (1969) 404.
- 2 H. HANSON UND S. FITTKAU, *Z. Physiol. Chem.*, 313 (1958) 152.
- 3 S. ANSORGE UND H. HANSON, *Z. Physiol. Chem.*, 348 (1967) 334.
- 4 D. L. BUCHANAN, E. E. HALEY UND R. T. MARKIW, *Biochemistry*, 1 (1962) 612.
- 5 F. E. DORER, E. E. HALEY UND D. L. BUCHANAN, *Biochemistry*, 5 (1966) 3236.
- 6 J. PORATH, *Biochim. Biophys. Acta*, 39 (1960) 193.
- 7 H. BENNICH, *Biochim. Biophys. Acta*, 51 (1961) 265.
- 8 P. R. CARNEGIE, *Nature*, 206 (1965) 1128.
- 9 P. R. CARNEGIE, *Biochem. J.*, 78 (1961) 687.
- 10 P. R. CARNEGIE, *Nature*, 192 (1961) 658.
- 11 S. FAZAKERLEY UND D. R. BEST, *Anal. Biochem.*, 12 (1965) 290.
- 12 N. R. M. BUIST UND D. O'BRIEN, *J. Chromatog.*, 29 (1967) 398.
- 13 D. K. J. TOMMEL, J. F. G. VLIEGENHART, T. J. PENDERS UND J. F. ARENS, *Biochem. J.*, 107 (1968) 335, *ibid.*, 99 (1966) 48P.
- 14 M. K. KIM UND A. E. MARTELL, *J. Am. Chem. Soc.*, 88 (1966) 914.
- 15 D. WALZ, A. R. FAHMY, G. PATAKI, A. NIEDERWIESER UND M. BRENNER, *Experientia*, 19 (1963) 213.
- 16 J. T. EDSALL, in E. J. COHN UND J. T. EDSALL (Herausgeber), *Proteins, Amino Acids, and Peptides as Ions and Dipolar Ions*, Reinhold, New York, 1943, S. 75.
- 17 A. NIEDERWIESER, *J. Chromatog.*, zur Publikation übergeben.
- 18 A. NIEDERWIESER, *Enzymol. Biol. Clin.*, 10 (1969) 357.