

# Aminosäure- $\beta$ -naphthylamide zur Aktivitätsbestimmung proteolytischer Fermente

Von

Hans Nesvadba

Aus dem Organisch-chemischen Institut der Universität Wien und dem Peptidlaboratorium der Firma Sanabo, Wien XII

(Eingegangen am 16. Dezember 1961)

Es wird die Darstellung der  $\beta$ -Naphthylamide von Valin, Isoleucin, Prolin, Hydroxyprolin, Histidin, Tyrosin, Tryptophan, Phenylalanin, Lysin, Arginin und Ornithin sowie von Asparaginsäure und Glutaminsäure beschrieben und die Möglichkeit, diese Verbindungen als spezifische Substrate zur Bestimmung der Aktivität proteolytischer Fermente einzusetzen, diskutiert.

Bei der Charakterisierung, quantitativen Bestimmung und Spezifitätsuntersuchung vieler proteolytischer Fermente hat die Verwendung von niedermolekularen Peptiden und Aminosäurederivaten als Substrate wertvolle Dienste geleistet<sup>1-4</sup>, wenngleich bekannt ist, daß die an einfachen Modellsubstanzen ermittelte Substratspezifität nur in beschränktem Maße das Verhalten eines Enzyms höhermolekularen Substraten gegenüber wiedergibt<sup>5</sup>. Auf Grund ihrer „chromogenen“ Eigenschaft stellen die  $\beta$ -Naphthylamide von freien oder acylierten Aminosäuren ausgezeichnete Enzymsubstrate dar; ihre Verwendung geht auf Gomori<sup>6</sup> zurück, der Glycin- und Alanin- $\beta$ -naphthylamid zur histochemischen Darstellung von Aminopeptidasen heranzog, während Seligman und Mitarb.<sup>7</sup>

<sup>1</sup> M. Bergmann, Naturwiss. **20**, 420 (1932); Science [USA] **79**, 439 (1934).

<sup>2</sup> M. Bergmann, J. S. Fruton und H. Pollok, J. Biol. Chem. **127**, 643 (1939).

<sup>3</sup> K. Hofmann und M. Bergmann, J. Biol. Chem. **130**, 81 (1939); **138**, 243 (1941).

<sup>4</sup> M. Bergmann und J. S. Fruton, Adv. Enzymol. **1**, 63 (1941); **2**, 49 (1942).

<sup>5</sup> H. Zuber, Chimia [Zürich] **14**, 405 (1960).

<sup>6</sup> G. Gomori, Proc. Soc. Exper. Biol. Med. **87**, 559 (1954).

<sup>7</sup> M. N. Green, K. C. Tsou, R. Bressler und A. M. Seligman, Arch. Biochem. Biophysics **57**, 458 (1955).

später für einen äußerst empfindlichen Nachweis der Leucinamino-peptidase das L-Leucin- $\beta$ -naphthylamid einföhrten.

Bei Verwendung dieser chromogenen Substrate wird das durch enzymatische Hydrolyse abgespaltene Naphthylamin entweder durch eine modifizierte *Bratton-Marshall-Methode*<sup>8</sup> bestimmt, d. h. zunächst in saurer Lösung diazotiert und sodann mit N-(1-Naphthyl)-äthylendiamin gekuppelt, oder aber direkt mit tetrazotiertem Di-o-Anisidin<sup>9\*</sup> umgesetzt; die so gebildeten Farbstoffe werden kolorimetrisch ausgemessen. Auf diese Weise lassen sich noch wenige  $\mu\text{g}$   $\beta$ -Naphthylamin quantitativ erfassen.

Mit *H. Tuppy* wurde vor einigen Jahren eine Bestimmung der Oxytocinase mittels Cystin-di- $\beta$ -naphthylamid als Substrat ausgearbeitet, welche uns einen enzymchemisch geföhrten Schwangerschaftsnachweis erlaubte<sup>10, 11</sup>. Das im Serum schwangerer Frauen vorkommende Ferment<sup>12-15</sup> inaktiviert das Hypophysenhinterlappenhormon Oxytocin durch Spaltung der Peptidbindung, an der der amino-endständige Halbcystinrest des Cyclopeptides beteiligt ist, und besitzt somit die Wirkungsweise einer Amino-peptidase. Im Verlaufe dieser Arbeiten war es notwendig, eine Prüfung des Enzyms mit einer Reihe von Naphthylamidsubstraten\*\* vorzunehmen. Dabei zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen der Spaltspezifität der Oxytocinase und einer anderen Amino-peptidase, welche die Oxytocinase begleitet.

Die vielseitige Anwendbarkeit dieser chromogenen Substrate — in der Zwischenzeit berichteten *Wünsch* und Mitarb. über eine quantitative Bestimmung des Trypsins<sup>16</sup> mittels N <sup>$\alpha$</sup> -Benzoyl-arginin- $\beta$ -naphthylamid — erforderte die Darstellung weiterer noch nicht beschriebener Aminosäure- $\beta$ -naphthylamide und die Prüfung auf ihre Verwendungsmöglichkeit, worüber in dieser Arbeit berichtet werden soll.

Die in Tab. 1 zusammengefaßten geschützten Naphthylamide wurden nach der in der Peptidchemie üblichen DCCI-Methode<sup>17</sup> (Dicyclohexylcarbodiimid) hergestellt. Die Abspaltung der Schutzgruppe zu den freien Aminosäure- $\beta$ -naphthylamiden (Tab. 2) erfolgte entweder mit 25proz.

\* Bayer Echtblausalz B (Merck).

\*\* Es wurden die Synthesen der  $\beta$ -Naphthylamide von Leucin, Methionin, Cystein und Cystin beschrieben.

<sup>8</sup> *A. C. Bratton* und *E. K. Marshall*, *J. Biol. Chem.* **128**, 537 (1939).

<sup>9</sup> *H. A. Ravin*, *P. H. Bernstein* und *A. M. Seligman*, *J. Biol. Chem.* **208**, 1 (1954).

<sup>10</sup> *H. Tuppy* und *H. Nesvadba*, *Mh. Chem.* **88**, 977 (1957).

<sup>11</sup> *W. Müller-Hartburg*, *H. Nesvadba* und *H. Tuppy*, *Arch. Gynäkol.* **191**, 442 (1959).

<sup>12</sup> *K. Fekete*, *Endocrinol.* **7**, 1 (1930); **10**, 16 (1932).

<sup>13</sup> *E. Werle* und *G. Effkeman*, *Arch. Gynäkol.* **171**, 186 (1941).

<sup>14</sup> *E. Werle*, *A. Hevelke* und *K. Buthmann*, *Biochem. Z.* **309**, 270 (1941)

<sup>15</sup> *E. Werle*, *K. Semm* und *R. Enzenbach*, *Arch. Gynäkol.* **177**, 211 (1950).

<sup>16</sup> *A. Riedel*, *E. Wünsch* und *A. Haril*, *Z. physiol. Chem.* **316**, 61 (1959).

<sup>17</sup> *J. C. Sheehan* und *G. P. Hess*, *J. Amer. Chem. Soc.* **77**, 1067 (1955).

HBr in Eisessig<sup>18</sup> oder durch katalytische Hydrierung mit Pd-Katalysatoren<sup>19</sup>. Prolin- und Isoleucin- $\beta$ -naphthylamid wurden, da sie bei der Aufarbeitung nur als Öle anfielen, in Form ihrer Hydrobromide charak-

Tabelle 1. Geschützte L-Aminosäure- $\beta$ -naphthylamide\*

Verbindung** (Vorschrift Nr.; Ausb. in %)	Schmp.	Formel (Mol.-Gew.)	Analysenwerte		
			C	H	N
Cbo-L-Val-NA (1; 65)	213—13,5°	C <sub>23</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (376,44)	Ber. 73,38 Gef. 73,35	6,43 6,57	7,44 7,41
Cbo-L-Ileu-NA (3; 42)	202—4°	C <sub>24</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (390,47)	Ber. 73,82 Gef. 73,97	6,71 6,43	7,17 7,16
Cbo-L-Ser-NA (5; 64)	185—86°	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> (364,39)	Ber. 69,22 Gef. 68,92	5,53 5,73	7,69 7,72
Cbo-L-Pro-NA (7; 61)	131—33°	C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (374,42)	Ber. 73,78 Gef. 73,80	5,92 5,98	7,48 7,32
Cbo-L-Hypro-NA (9; 84)	172—73°	C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> (390,42)	Ber. 70,75 Gef. 70,90	5,68 5,75	7,18 7,33
Cbo-L-His-NA (11; 51)	174°	C <sub>24</sub> H <sub>22</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> (414,45)	Ber. 69,55 Gef. 69,76	5,35 5,50	13,52 13,40
N $\alpha$ -Cbo-O-Benzyl-L-Tyr-NA (13; 74)	174—76°	C <sub>34</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> (530,60)	Ber. 76,96 Gef. 76,63	5,70 5,72	5,28 5,33
Cbo-L-Try-NA (15; 64)	181—83°	C <sub>29</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> (463,53)	Ber. 75,14 Gef. 75,34	5,44 5,64	9,06 9,33
Cbo-L-Phe-NA (17; 49)	173—74°	C <sub>27</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (424,48)	Ber. 76,39 Gef. 75,97	5,70 5,69	6,60 6,65
Cbo-L-Asp- $\beta$ -Benzylester- $\alpha$ -NA (19; 76)	171—72°	C <sub>29</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (482,52)	Ber. 72,16 Gef. 72,38	5,43 5,57	5,81 6,06
Cbo-L-Asp- $\alpha$ -Benzylester- $\beta$ -NA (21; 52)	180—81°	C <sub>29</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (482,52)	Ber. 72,16 Gef. 72,31	5,42 5,45	5,81 6,02
Cbo-L-Glu- $\gamma$ -Benzylester- $\alpha$ -NA (23; 46)	181—83°	C <sub>30</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (495,54)	Ber. 72,71 Gef. 72,56	5,69 5,77	5,60 5,77
Cbo-L-Glu- $\alpha$ -Benzylester- $\gamma$ -NA (25; 43)	150—51°	C <sub>30</sub> H <sub>28</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (495,54)	Ber. 72,71 Gef. 72,68	5,69 5,57	5,60 5,57
Di-Cbo-L-Lys-NA (27; 77,5)	151,5—53,5°	C <sub>32</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> (539,71)	Ber. 71,15 Gef. 71,19	6,16 6,17	7,80 7,87
Di-Cbo-L-Orn-NA (29, 64)	176—78°	C <sub>31</sub> H <sub>31</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> (525,5)	Ber. 70,83 Gef. 70,68	5,95 6,05	8,06 8,01
Tri-Cbo-L-Arg-NA (31; 42)	192—94°	C <sub>40</sub> H <sub>39</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub> (701,76)	Ber. 68,40 Gef. 68,32	5,60 5,73	10,03 9,84

\* Der besseren Übersicht wegen wird in den Tabellen und im experimentellen Teil  $\beta$ -Naphthylamid durch die Abkürzung -NA ersetzt.

\*\* Abkürzungen nach E. Brand und J. T. Edsall, Ann. Rev. Biochem. 16, 223 (1947).

terisiert. Die beiden isomeren Glutaminsäure- und Asparaginsäure- $\beta$ -naphthylamide wurden durch Hydrierung der entsprechenden Carbo-benzoxy-aminosäurebenzylester hergestellt. Schwierigkeiten ergaben sich

<sup>18</sup> D. Ben-Ishai und A. Berger, J. Org. Chem. 17, 1564 (1952).

<sup>19</sup> R. Shriner und R. Adams, J. Amer. Chem. Soc. 46, 1683 (1924).

Tabelle 2. Freie L-Aminosäure- $\beta$ -naphthylamide

Verbindung (Vorschrift Nr.; Ausb. in %)	Schmp.	Formel (Mol.-Gew.)	Analysenwerte			
			C	H	N	Br
L-Val-Na (2; 74)	122—23°	C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O (242,31)	Ber. 74,35 Gef. 74,52	7,49 7,56	11,56 11,50	
L-Leu-Na · HBr (4; 85)	212—213°	C <sub>16</sub> H <sub>21</sub> N <sub>2</sub> OBr (337,26)	Ber. 67,80 Gef. 68,01	6,12 6,21	12,17 12,28	23,70 23,79
L-Ser-Na (6; 83)	151,5—52,5°	C <sub>13</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (230,26)	Ber. 67,80 Gef. 68,01	6,12 6,21	12,17 12,28	
L-Pro-Na · HBr (8; 86)	238—40°	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O · HBr (321,22)	Ber. 70,29 Gef. 70,64	6,29 6,28	8,77 10,93	24,88 24,91
L-Hydro-Na (10; 85)	178,5—80°	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (256,29)	Ber. 68,55 Gef. 68,39	5,75 5,83	11,07 19,99	
L-His-Na (12; 79)	178—80°	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> N <sub>4</sub> O (280,32)	Ber. 74,48 Gef. 74,15	5,92 6,09	19,88 9,14	
L-Tyr-Na (14; 48)	194—96°	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (306,35)	Ber. 76,57 Gef. 76,42	5,81 5,88	8,97 12,75	
L-Trp-Na (16; 64)	145—46°	C <sub>21</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O (329,39)	Ber. 78,59 Gef. 78,50	6,25 6,24	9,65 9,61	
L-Phe-Na (18; 61)	128—29°	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O (290,35)	Ber. 65,12 Gef. 65,37	5,41 5,57	10,85 11,08	
L-Asp- $\alpha$ -Na (20; 76)	234—35°	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (258,27)	Ber. 65,12 Gef. 65,30	5,41 5,50	10,85 10,98	
L-Asp- $\beta$ -Na (22; 77)	252—54°	C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (258,27)	Ber. 66,03 Gef. 66,17	6,03 5,92	10,29 10,19	
L-Glu- $\alpha$ -Na (24; 66)	184—86°	C <sub>15</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (272,29)	Ber. 66,03 Gef. 66,18	6,03 6,09	10,29 10,15	
L-Glu- $\gamma$ -Na (26; 55)	207°	C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (272,29)	Ber. 64,74 Gef. 65,03	6,71 6,68	13,32 13,24	
L-Lys-Na · CO <sub>2</sub> L (28; 83)	104—5°	C <sub>16</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O · CO <sub>2</sub> (315,36)	Ber. 60,17 Gef. 60,62	6,62 6,55	13,15 13,20	
-Orn-Na · CO <sub>2</sub> · H <sub>2</sub> O (30; 94)	115—17°	C <sub>15</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O · CO <sub>2</sub> · H <sub>2</sub> O (319,36)	Ber. 57,93 Gef. 58,02	6,28 6,01	19,85 19,51	
L-Arg-Na · CO <sub>2</sub> · $\frac{1}{2}$ H <sub>2</sub> O (32; 67)	156—58°	C <sub>16</sub> H <sub>21</sub> N <sub>5</sub> O · CO <sub>2</sub> · $\frac{1}{2}$ H <sub>2</sub> O (352,39)	Ber. 57,93 Gef. 58,02	6,28 6,01	19,85 19,51	

anfänglich nur bei der Synthese der Naphthylamide der basischen Aminosäuren Lysin, Arginin und Ornithin.

Wie *Wünsch* und Mitarb. berichteten<sup>16</sup>, stellten sie bei der Synthese des N<sup>α</sup>-Benzoyl-arginin-β-naphthylamids aus optisch aktivem N<sup>α</sup>-Benzoyl-L-arginin nach der DCCI-Methode vollständige Racemisierung fest und nahmen die Bildung eines Oxazolons als Zwischenprodukt an, welches bei Gegenwart von β-Naphthylamin nucleophil zum Säureamid aufgespalten wird, wobei Verlust der optischen Aktivität auftritt.

Wir stellten nach der gleichen Methode N<sup>α</sup>-Tosyl-, N<sup>α</sup>-p-Nitro-carbobenzoxy-, N<sup>α</sup>-Carbobenzoxy-ω-nitro- bzw. Tri-Carbobenzoxy-L-arginin-β-naphthylamid her, welche alle in optisch aktiver Form erhalten wurden. Die Abspaltung der Schutzgruppen nach den üblichen Methoden führte jedoch nur von Tri-carbobenzoxy-L-arginin-β-naphthylamid ausgehend zu einem kristallisierenden und papierchromatographisch einheitlichem Produkt. Es fiel im Verlauf der katalytischen Hydrierung als optisch aktives L-Arginin-β-naphthylamid-carbonat aus. Lysin- und Ornithin-β-naphthylamid, welche zunächst nur ölig erhalten werden konnten, kristallisierten in Methanollösung in Gegenwart von CO<sub>2</sub> gleichfalls als stabile Carbonate.

Wir haben speziell diese basischen Naphthylamidsubstrate in letzter Zeit auf ihre Verwendbarkeit untersucht und mit ihnen bei der Bestimmung einiger an der Blutgerinnung maßgeblich beteiligter Fermente, wie Thrombin, Plasmin und Thrombokinase, brauchbare Ergebnisse erhalten. Thrombin und Plasmin spalten bekanntlich eine Reihe niedermolekularer Substrate, wie z. B. N<sup>α</sup>-Tosyl-L-arginin-methylester<sup>20-22</sup> bzw. Lysinester<sup>23-25</sup>. Es sei aus einer Arbeit, welche an anderer Stelle publiziert werden wird, vorweggenommen, daß wir die proteolytische Aktivität des Thrombins mit L-Arginin-β-naphthylamid bestimmten<sup>26, 27</sup>. Da *Seegers*<sup>28</sup> in letzter Zeit Thrombinpräparate herstellen konnte, die zwar Esterase-wirkung, aber keine gerinnungsauslösende Wirkung haben, schien es zweifelhaft, ob die esterolytische und die proteolytische Aktivität des Thrombins einander gleichgesetzt werden dürfen. Die Tatsache, daß Plasmin zum Unterschied von Thrombin N<sup>α</sup>-Tosyl-L-arginin-β-naphthylamid nicht spaltete, scheint für die Bestimmung beider Fermente in einem

<sup>20</sup> *S. Sherry* und *W. Troll*, *J. Biol. Chem.* **208**, 95 (1954).

<sup>21</sup> *E. Ronwin*, *Canad. J. Biochem. Physiol.* **35**, 743 (1957).

<sup>22</sup> *H. A. Scheraga*, *S. Ehrenpreis* und *E. Sullivan*, *Nature* [London] **182**, 461 (1958).

<sup>23</sup> *S. Ehrenpreis* und *H. A. Scheraga*, *J. Biol. Chem.* **227**, 1043 (1957).

<sup>24</sup> *M. Lassen*, *Biochem. J.* **69**, 361 (1958).

<sup>25</sup> *E. Ronwin*, *Canad. J. Biochem. Physiol.* **34**, 1169 (1956).

<sup>26</sup> *B. Köbele*, *Dissert.* Tübingen 1962.

<sup>27</sup> *E. Deutsch*, *B. Köbele* und *H. Nesvadba*, *Thromb. Diath. Haem.*, in Vorbereitung.

<sup>28</sup> *W. H. Seegers* und *R. H. Landaburu*, *Amer. J. Physiol.* **191**, 167 (1957).

System von Bedeutung zu sein. In Übereinstimmung mit einer kürzlich von *Milstone*<sup>29</sup> veröffentlichten Arbeit fanden auch wir, daß die Thrombokinase, deren Fermentnatur angezweifelt wird, synthetische Substrate — in unserem Falle Arginin- und Lysin- $\beta$ -naphthylamid — spaltete.

Eine Untersuchung der in die Blutgerinnung eingreifenden proteolytisch aktiven Schlangengifte war naheliegend. *Michl* und *Kiss*<sup>30</sup> konnten mittels Zonelektrophorese in Stärkegel eine für jede Giftart charakteristische Auftrennung in eine oder mehrere Zonen proteolytischer Aktivität feststellen. Der Aktivitätsnachweis ließ sich nicht nur durch Gelatineabbau, sondern — wie wir fanden — auch durch Inkubation des Stärkegelstreifens mit Naphthylamidsubstraten in Gegenwart eines geeigneten Diazoniumsalzes durchführen, wobei eine spezifische, dem Fermenttypus entsprechende Anfärbung zu erreichen war.

So ergaben Versuche\* an Gift von *Bothrops atrox* nach Inkubation mit Leucin- $\beta$ -naphthylamid bzw. Arginin- $\beta$ -naphthylamid zwei Aktivitätszonen. Wir gingen hierbei nach einer vor kurzem von *Tuppy* und *Wintersberger*<sup>31</sup> ausgearbeiteten Methode vor, mit der die Oxytocinase und Leucinaminopeptidase des Schwangerenserums durch Stärkegelelektrophorese voneinander getrennt wurden. Durch Inkubation der Gelstreifen mit Leucin- $\beta$ -naphthylamid bzw. Cystin-di- $\beta$ -naphthylamid und Fast Garnet GBC gelang es — mit einer von *Burston* und *Folk*<sup>32</sup> sowie *Nachlass*, *Crawford* und *Seligman*<sup>33</sup> eingeführten Methodik — die beiden Fermente voneinander getrennt nachzuweisen.

Nach den bisherigen Erfahrungen ist mit Sicherheit zu erwarten, daß Aminosäure- $\beta$ -naphthylamide bei biochemischen Arbeiten, welche sich mit proteolytischen Fermenten befassen, mannigfaltige Anwendung finden werden. Um nur einige Möglichkeiten zu erwähnen, sei auf die Bearbeitung der bakteriellen Enzyme, auf die Kathepsine, die Hefe-endopeptidasen, auf die in Carcinomen vorkommenden Proteasen, ferner auf Spezifitätsuntersuchungen in der Chymotrypsinreihe, auf die bereits erwähnten Blutgerinnungsfaktoren sowie auf die proteolytische Fermente aus tierischen Giften hingewiesen.

Mit Hilfe dieser Substrate lassen sich Anreicherung und Reinigung von Fermentpräparationen durch quantitative Messungen verfolgen und Aussagen über Konzentrations- und pH-Abhängigkeit der Wirkung sowie über Aktivierung und Hemmung proteolytischer Enzyme machen. Auf

<sup>29</sup> *J. H. Milstone*, Proc. Soc. Exper. Biol. Med. **103**, 361 (1960).

<sup>30</sup> *H. Michl* und *G. Kiss*, Mh. Chem. **90**, 604 (1959).

<sup>31</sup> *E. Wintersberger* und *H. Tuppy*, Mh. Chem. **91**, 406 (1960).

<sup>32</sup> *M. S. Burstone* und *E. J. Folk*, J. Histochem. Cytochem. **4**, 217 (1956).

<sup>33</sup> *M. M. Nachlas*, *D. T. Crawford* und *A. M. Seligman*, J. Histochem. Cytochem. **5**, 264 (1957).

\* In Zusammenarbeit mit *E. Wintersberger* und *G. Kiss*.

die histochemisch bedeutsame Anwendung der  $\beta$ -Naphthylamide zur direkten und spezifischen Anfärbung von Enzymen in Gewebeschnitten und auf ihre Verwendung bei der Trennung von Enzymgemischen mittels Papier- oder Stärkegelelektrophorese ist bereits hingewiesen worden.

Große Bedeutung kommt auch der Aufnahme eines „Aktivitätsspektrums“ eines proteolytischen Fermentes zu: Die unter Standardbedingungen ermittelte Spezifität eines Enzyms gegenüber einer vollständigen Reihe einheitlich gebauter Substrate, wie sie in Form der Aminosäure- $\beta$ -naphthylamide vorliegen, kann zur Charakterisierung eines reinen Enzyms dienen, Hinweise bezüglich seiner Einordnung in eine bestimmte Fermentgruppe geben und die Suche nach weiteren Enzymsubstraten erleichtern.

### Experimenteller Teil\*

Die Schmelzpunkte werden auf einem *Kofler*-Block bestimmt und sind korrigiert. Die beschriebenen Ansätze wurden bei 0° unter Magnetührung, die einzelnen Zusätze in der angegebenen Reihenfolge durchgeführt. Nach Stehen über Nacht im Eiskasten wurde von ausgefallenem Dicyclohexylharnstoff abgesaugt und das Filtrat im Vak. schonend eingedampft. Unter „üblicher Aufarbeitung“ ist zu verstehen: Aufnehmen in Essigester, Ausschütteln mit 1 n HCl, H<sub>2</sub>O, 4proz. NaHCO<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O, Trocknen mit MgSO<sub>4</sub> und Eindampfen im Vak. Zur Spaltung mit 25proz. HBr/Eisessig wurde 1 Stde. bei Zimmertemp. stehen gelassen, dann im Vak. eingedampft und mit Äther gefällt. Falls nicht anders angegeben, wurde zur Analyse 4 Stdn. bei 80° und 0,1 Torr über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> getrocknet.

Cbo-L-valin-NA (1): 1,13 g Cbo-L-valin<sup>34</sup>, 0,64 g NA und 0,92g DCCI in 9 ml absol. THF. Der Eindampfrückstand wurde mit Wasser, anschließend mit 1 n HCl digeriert, wobei Kristallisation eintrat. Nach dem Absaugen wurde 2mal mit sied. Methanol digeriert. Ausb.: 1,1 g Nadeln (65% d. Th.).

L-Valin-NA (2): 1,1 g Cbo-L-valin-NA wurde mit 9 ml HBr/Eisessig gespalten. Das unter Äther kristallisierende Hydrobromid wurde in Wasser gelöst und das Säureamid durch Zusatz von verd. Ammoniak ausgefällt. Mit Wasser gewaschen, 0,52 g (74%).  $[\alpha]_D^{23} = +35,0^\circ$  ( $c = 1$ , CH<sub>3</sub>OH).

Cbo-L-isoleucin-NA (3): 1,96 g Cbo-L-isoleucin<sup>35</sup>, 1,06 g NA und 1,57 g DCCI in einer Mischung von 8 ml absol. THF und 2 ml DMFA. Der Eindampfrückstand kristallisierte auf Zusatz von Äther. Aus THF 1,2 g (42%) Kristalle; zur Analyse 4 Stdn. bei 100° über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> getrocknet.

L-Isoleucin-NA-hydrobromid (4): Spaltung von 1,02 g obiger Cbo-Verbindung mit 8 ml HBr/Eisessig ergaben 0,75 g (85%) Hydrobromid, welches in Form feiner Nadeln kristallisierte. Zur Analyse wurde 10 Stdn. bei 115° über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> getrocknet;  $[\alpha]_D^{23} = +70,0^\circ$  ( $c = 1$ , H<sub>2</sub>O).

<sup>34</sup> J. R. Vaughan, Jr. und J. A. Eichler, J. Amer. Chem. Soc. **75**, 5556 (1953).

<sup>35</sup> W. Rittel, B. Iselin, H. Kapeller, B. Riniker und R. Schwyzer, Helv. Chim. Acta **40**, 614 (1957).

\* Verwendete Abkürzungen: NA =  $\beta$ -Naphthylamid resp.  $\beta$ -Naphthylamin, Cbo = Carbobenzoxy, DCCI = Dicyclohexyl-carbodiimid; THF = Tetrahydrofuran, DMFA = Dimethylformamid.

Cbo-L-serin-NA (5): 1,5 g Cbo-L-serin<sup>36</sup>, 0,9 g NA und 1,29 g DCCI in 28 ml absol. THF. Nach üblicher Aufarbeitung 1,46 g (64%) aus Methanol. Schmp. 185—186° (unter vorheriger Umwandlung bei 167—168°).

L-Serin-NA (6): 0,05 g PdO<sub>2</sub> wurde in 20 ml Methanol vorhydriert, dann 0,44 g obiger Cbo-Verbindung in 30 ml Methanol zugesetzt. Nach beendeter Wasserstoffaufnahme wurde im Vak. eingedampft, der Rückstand in verd. HCl gelöst, mit Tierkohle behandelt, filtriert und dann das Naphthylamid mit verd. NH<sub>3</sub> ausgefällt, 0,23 g (83%) Blättchen, nach Umkristallisation aus Wasser.  $[\alpha]_D^{23} = -2,0^\circ$  ( $c = 1$ , CH<sub>3</sub>OH). Zur Analyse 10 Stdn. bei 115° über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> getrocknet.

Cbo-L-prolin-NA (7): 4,0 g Cbo-L-prolin<sup>37</sup>, 2,58 g NA und 3,64 g DCCI in 12 ml DMFA. Der Eindampfrückstand wurde in Essigester aufgenommen und wie üblich aufgearbeitet. Auf Zusatz von Äther erfolgte Kristallisation. Ausb. 3,7 g (61%). Ungetrocknet zur Analyse.

L-Prolin-NA-hydrobromid (8): 3,2 g Cbo-Produkt wurde mit 20 ml HBr/Eisessig gespalten. Das mit Äther ausgefällte Hydrobromid wurde aus Methanol-Äther umkristallisiert. Blättchen, Ausb. 2,34 g (86%).  $[\alpha]_D^{21} = -23,0^\circ$  ( $c = 1$ , CH<sub>3</sub>OH).

Cbo-L-hydroxyprolin-NA (9): 1,5 g Cbo-L-hydroxyprolin<sup>37</sup>, 1,64 g NA und 2,36 g DCCI in 12 ml absol. THF. Nach dem Eindampfen im Vak. erfolgte bereits Kristallisation. Aus Methanol-Äther umkristallisiert: 1,86 g Nadeln (84%).

L-Hydroxyprolin-NA (10): 0,43 g obiger Cbo-Verbindung wurde mit 0,05 g vorhydriertem PdO<sub>2</sub> in insgesamt 30 ml Methanol hydriert. Nach Filtration wurde im Vak. eingedampft, in verd. HCl gelöst und mit NH<sub>3</sub> ausgefällt. Aus Methanol umkristallisiert 0,25 g (85%).  $[\alpha]_D^{24} = -34,0^\circ$  ( $c = 1$ , CH<sub>3</sub>OH).

Mono-carbobenzoxy-L-histidin-NA (11): 2 g Di-carbobenzoxy-L-histidin<sup>38</sup>, 0,65 g NA und 1,0 g DCCI in 7 ml absol. THF. Nach üblicher Aufarbeitung (bei der die Abspaltung einer Cbo-Gruppe erfolgte) wurde der Essigester-Eindampfrückstand mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> versetzt, wobei Kristallisation erfolgte. 1,0 g (51%) Nadeln aus Methanol.

L-Histidin-NA (12): Spaltung von 0,6 g obiger Cbo-Verbindung mit 6 ml HBr/Eisessig ergab auf Zusatz von Äther ein kristallines Hydrobromid. Nach Aufnahme in Wasser, Behandlung mit Tierkohle in Siedehitze, Filtration und Fällung mit verd. NH<sub>3</sub> 0,32 g (79%) Nadeln.  $[\alpha]_D^{22} = +38,0^\circ$  ( $c = 1$ , CH<sub>3</sub>OH).

Na-Cbo-O-benzyl-L-tyrosin-NA (13): 3 g N-Cbo-O-benzyl-L-tyrosin<sup>39</sup> 1,06 g NA und 1,53 g DCCI in 25 ml DMFA. Der Eindampfrückstand kristallisierte auf Zusatz von Äther. Abgesaugt und mit Äthanol in Siedehitze digeriert 2,92 g (74%).

L-Tyrosin-NA (14): 1,0 g obiger Cbo-Verbindung wurde mit 10 ml HBr/Eisessig gespalten und das Naphthylamid aus der wässrigen Lösung

<sup>36</sup> St. Guttman und R. A. Boissonas, *Helv. Chim. Acta* **41**, 1856 (1958).

<sup>37</sup> W. Grassmann und E. Wunsch, *Chem. Ber.* **91**, 462 (1958).

<sup>38</sup> A. Patchornik, A. Berger und E. Katchalski, *J. Amer. Chem. Soc.* **79**, 6461 (1957).

<sup>39</sup> E. Wunsch, G. Fries und A. Zwick, *Chem. Ber.* **91**, 542 (1958).



des Hydrobromides durch Zusatz von verd.  $\text{NH}_3$  ausgefällt; 0,28 g (48%).  $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -152,0^\circ$  ( $c = 1$ , Eisessig).

Cbo-L-tryptophan-NA (15): 2,17 g Cbo-L-tryptophan<sup>40</sup>, 0,92 g NA und 1,32 g DCCI in 8 ml DMFA. In üblicher Weise aufgearbeitet; Kristallisation des Eindampfrückstandes auf Zusatz von Äther. Ausb. 1,9 g (64%).

L-Tryptophan-NA (16): Hydrierung von 0,9 g Cbo-Verbindung in 30 ml Methanol mit 0,05 g vorhydriertem  $\text{PdO}_2$ . Im Vak. eingedampft, dann in Wasser aufgenommen und durch  $\text{NH}_3$  gefällt; 0,48 g (64%).  $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +76,0^\circ$  ( $c = 1$ ,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ).

Cbo-L-phenylalanin-NA (17): 2,0 g Cbo-L-phenylalanin<sup>41</sup>, 0,96 g NA und 1,38 g DCCI in 7 ml absol. THF. Der unter Äther kristallisierende Eindampfrückstand wurde mehrmals mit Methanol ausgekocht. Ausb. 1,4 g (49%).

L-Phenylalanin-NA (18): 1,12 g obiger Verbindung wurde mit 8 ml  $\text{HBr}$ /Eisessig gespalten. Das in Wasser gelöste Hydrobromid gab auf Zusatz von verd.  $\text{NH}_3$  0,47 g (61%) eines in Nadeln kristallisierenden Naphthylamides.  $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +86,0^\circ$  ( $c = 1$ ,  $\text{CH}_3\text{OH}$ ).

Cbo-L-asparaginsäure- $\beta$ -benzylester- $\alpha$ -NA (19): 1,0 g Cbo-L-asparaginsäure- $\beta$ -benzylester<sup>42</sup>, 0,4 g NA und 0,6 g DCCI in 10 ml absol. THF. Der ausgefallene Harnstoff wurde abgesaugt und die Lösung im Vak. eingedampft, wobei sofort Kristallisation eintrat. Aus THF-Äther 1,0 g (76%).

L-Asparaginsäure- $\alpha$ -NA (20): 0,8 g obiger Benzylester wurde in einem Gemisch von 30 ml Eisessig und 10 ml Methanol suspendiert und mit 0,1 g vorhydriertem  $\text{PdO}_2$  über Nacht hydriert. Nach einigen Stdn. ging die Substanz vollständig in Lösung. Sie wurde vom Katalysator filtriert, mit Methanol nachgewaschen und im Vak. eingedampft. Der Rückstand wurde 2mal mit Wasser abgedampft, dann mit THF digeriert und abgesaugt. 0,33 g (76%).  $[\alpha]_{\text{D}}^{28} = +42,3^\circ$  ( $c = 1$ , 95proz. Essigsäure).

Cbo-L-asparaginsäure- $\alpha$ -benzylester- $\beta$ -NA (21): Ansatz und Aufarbeitung wie oben beschrieben, jedoch mit Cbo-L-asparaginsäure- $\alpha$ -benzylester<sup>43</sup>. Ausb. 0,71 g (52%).

L-Asparaginsäure- $\beta$ -NA (22): Hydrierung wie unter (20) beschrieben. Aus 0,6 g obiger Verbindung wurden 0,25 g Naphthylamid (77%) erhalten.  $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +1,4^\circ$  ( $c = 0,5$ , 95proz. Essigsäure).

Cbo-L-glutaminsäure- $\gamma$ -benzylester- $\alpha$ -NA (23): 1,62 g Cbo-L-glutaminsäure- $\gamma$ -benzylester<sup>44</sup>, 0,62 g NA und 0,89 g DCCI in 14 ml absol. THF. Nach Stehen über Nacht wird vom ausgefallenen Harnstoff abgesaugt und im Vak. eingedampft. Der Rückstand kristallisiert auf Zusatz von Äther. 1,0 g (46%) aus THF/Äther in Form von Nadeln.

<sup>40</sup> E. L. Smith, J. Biol. Chem. **175**, 39 (1948).

<sup>41</sup> M. Bergmann, L. Zervas, H. Rinke und H. Schleich, Z. physiolog. Chem. **224**, 33 (1934).

<sup>42</sup> P. M. Briant, R. H. Moore, P. J. Pimlott und G. T. Young, J. Chem. Soc. [London] 3868 (1959).

<sup>43</sup> R. F. Fischer und R. R. Whetstone, J. Amer. Chem. Soc. **77**, 750 (1955).

<sup>44</sup> W. E. Hamby, S. G. Waley und J. Watson, J. Chem. Soc. [London] 3239 (1950).

L-Glutaminsäure- $\alpha$ -NA (24): 0,8 g obiger Ester wurde in einem Gemisch von 18 ml Eisessig und 7 ml Methanol suspendiert und mit 0,1 g vorhydriertem PdO<sub>2</sub> über Nacht hydriert. Nach Eindampfen im Vak. wurde der Rückstand zur Entfernung der Essigsäure 2mal mit Wasser, dann mit Äthanol abgedampft, wobei schließlich Kristallisation eintrat. 0,29 g (66%) mit Schmp. 184—186° (nach vorheriger Umwandlung bei 165—166°).  $[\alpha]_D^{23} = + 65,7^\circ$  ( $c = 1$ , 95proz. Essigsäure).

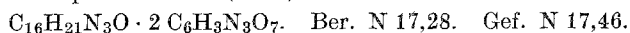
Cbo-L-glutaminsäure- $\alpha$ -benzylester- $\gamma$ -NA (25): 5,8 g Cbo-L-glutaminsäure- $\alpha$ -benzylester<sup>45</sup>, 2,22 g NA und 3,19 g DCCI in 42 ml absol. THF. Aufarbeitung wie bei (23) ( $\gamma$ -Benzylester); 3,35 g (43%) aus THF/Äther bzw. Benzol.

L-Glutaminsäure- $\gamma$ -NA (26): 0,8 g obiger Substanz wurde in einem Gemisch von 25 ml Eisessig und 7 ml Methanol mit 0,07 g vorhydriertem PdO<sub>2</sub> hydriert. Der Eindampfrückstand wurde mehrfach mit Wasser abgedampft, dann mit THF digeriert. 0,24 g (55%).  $[\alpha]_D^{25} = + 0,5^\circ$  ( $c = 1$ , 95proz. Essigsäure).

Dicarbobenzoxy-L-lysin-NA (27): 3,74 g Dicarbobenzoxy-L-lysin<sup>46</sup> 1,3 g NA und 1,87 g DCCI in 9 ml DMFA. Der Eindampfrückstand kristallisierte auf Zusatz von Äther. Aus absol. Äthanol 3,76 g (77%). 6 Stdn. bei 115° über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> getrocknet.

L-Lysin-NA-carbonat (28): 1,25 g Dicarbobenzoxy-L-lysin-NA wurde in 50 ml Methanol mit 0,07 g vorhydriertem PdO<sub>2</sub> hydriert. Die Suspension ging nach einigen Stdn. in Lösung. Nach beendeter Hydrierung wurde ausgefallenes Naphthylamid-carbonat durch Erwärmen in Lösung gebracht, der Katalysator abfiltriert, das Filtrat mit Tierkohle behandelt und im Vak. schonend eingedampft. In CO<sub>2</sub>-Atmosphäre fielen 0,61 g (83%) Carbonat aus, welches zur Analyse bei Zimmertemp. über Silikagel getrocknet wurde.  $[\alpha]_D^{19} = + 89,0^\circ$  ( $c = 1$ , 1 n HCl).

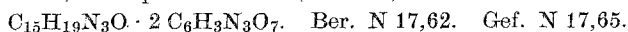
L-Lysin-NA-dipikrat: Fällung aus wäßriger Lösung; Blättchen (aus Äthanol), Schmp. 238—239° (Zers.).



Dicarbobenzoxy-L-ornithin-NA (29): 3,9 g Dicarbobenzoxy-L-ornithin<sup>47</sup>, 1,12 g NA und 2 g DCCI in 10 ml DMFA. Der Eindampfrückstand wurde mit 1 n HCl, dann mit 4proz. NaHCO<sub>3</sub>-Lösung digeriert. 2mal aus Äthanol umkristallisiert 2,3 g (64%). 16 Stdn. bei 100° über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> getrocknet.

L-Ornithin-NA-carbonat-monohydrat (30): 2,1 g Dicarbobenzoxy-L-ornithin-NA wurden in 80 ml Methanol suspendiert und mit 0,11 g vorhydriertem PdO<sub>2</sub> hydriert. Wie bereits bei dem entsprechenden Lysin-Derivat beschrieben, kristallisierte das L-Ornithin-NA-carbonat in CO<sub>2</sub>-Atmosphäre als verhältnismäßig schwer lösliches Monohydrat aus (H<sub>2</sub>O ber. 5,65%, gef. 5,9%). Ausb. 1,2 g (94%).  $[\alpha]_D^{21} = + 82,8^\circ$  ( $c = 1$ , 1 n HCl).

L-Ornithin-NA-dipikrat: Aus wäßriger Lösung gefällt. Aus Äthanol-Aceton Nadeln, Schmp. 226—228° (u. Zers.).



<sup>45</sup> H. Sachs und E. Brand, J. Amer. Chem. Soc. **75**, 4610 (1953).

<sup>46</sup> M. Bergmann, L. Zervas und W. F. Ross, J. Biol. Chem. **111**, 245 (1935).

<sup>47</sup> R. L. M. Synge, Biochem. J. **42**, 99 (1948).

Tricarbobenzoxy-L-arginin-NA (31): 1,73 g Tricarbobenzoxy-L-arginin<sup>48</sup> wurde in 10 ml absol. THF mit 0,62 g NA und 0,43 g DCCI gekuppelt. Harnstoff und Naphthylamid wurden durch Zusatz von Äther gemeinsam ausgefällt. Nach dem Digerieren mit sied. Methanol konnte 0,89 g (42%) Substanz erhalten werden, die nochmals aus THF-Äther umkristallisiert wurde.

L-Arginin-NA-carbonat-hemihydrat (32): 0,6 g obiger Substanz wurden in 50 ml Methanol mit 0,05 g PdO<sub>2</sub> hydriert und gingen im Verlauf von 48 Std. in Lösung. Nach Filtration wurde im Vak. schonend eingedampft, wenig Äther zugesetzt und mit CO<sub>2</sub> begast. Die ausgefallene amorphe Substanz wurde aus Methanol umkristallisiert. Ausb. 0,21 g (67%). Ungetrocknet zur Analyse.  $[\alpha]_D^{21} = + 61,4^\circ$  ( $c = 1$ , 95proz. Essigsäure).

Für die Durchsicht des Manuskriptes und für die Förderung meiner Arbeit danke ich dem Vorstand des Biochemischen Institutes der Universität Wien, Herrn Prof. Dr. *H. Tuppy*.

Die Mikroanalysen wurden in dankenswerter Weise von Herrn *H. Bieler* im Mikrolaboratorium des Organisch-Chemischen Institutes der Universität Wien ausgeführt.

---

<sup>48</sup> *L. Zervas, M. Winitz und J. P. Greenstein, J. Org. Chem. 22, 1515 (1957).*