

SCHNELLE, QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON KUPPLUNGS-AUSBEUTEN
BEI PEPTIDSYNTHESEN AN LÖSLICHEN POLYMEREN TRÄGERN MIT
HILFE DER DURCHFLUSSANALYSE

Hanspaul Hagenmaier und Manfred Mutter

Chemisches Institut der Universität Tübingen, D-74 Tübingen

(Received in Germany 2 November 1973; received in UK for publication 22 January 1974)

Der Erfolg einer stufenweisen Peptidsynthese an polymeren Trägern (1,2) ohne Reinigung von Zwischenstufen hängt wesentlich davon ab, wie weit sich die Ausbeuten bei den einzelnen Kupplungsreaktionen der 100% Grenze nähern. Der Ausarbeitung analytischer Verfahren zur Bestimmung der Kupplungsausbeuten bei Peptidsynthesen kommt deshalb besondere Bedeutung zu. In den letzten Jahren sind mehrere Umsatztests, vor allem für die Peptidsynthese an festen Trägern, beschrieben worden, die z.T. eine hohe Empfindlichkeit besitzen, deren Durchführung aber meist mit einigem Zeitaufwand verbunden ist und deren Genauigkeit in dem besonders interessierenden Bereich 98-100% Umsatz oft zu wünschen übrig läßt (3). Für die Peptidsynthese an löslichen Trägern (2) wurde ein System entwickelt, das auf der Basis der Durchflußanalyse unter Verwendung von Ninhydrin (4) oder Fluorescamin (5) die schnelle, quantitative Umsatzkontrolle erlaubt. Das Analysenprinzip ist für beide Detektionsverfahren dasselbe. Ein kontinuierlich fließender Lösungsmittelstrom, in den ein Probeninjektionsventil zwischengeschaltet ist, wird mit dem ebenfalls kontinuierlich fließenden Reagenzienstrom gemischt und in die Durchflußküvette eines registrierenden Photometers bzw. Fluorometers geleitet. Es wird so eine konstante Basislinie erhalten, gegen die das Auftreten auch relativ geringer Absorptions- bzw. Fluoreszenzänderungen nach Injektion einer Probenlösung mit freien Aminogruppen in den Lösungsmittelstrom mit großer Genauigkeit gemessen werden kann. Da es bei Verwendung des löslichen Trägers Polyäthylenglykol (2)

mit seinen homogenen Reaktionsorten (6) möglich sein sollte, einen 100%igen Umsatz der Aminogruppen auf jeder Synthesestufe mit großer Annäherung zu erzwingen, interessiert hier bei einer Umsatzkontrolle lediglich, inwieweit dieses Ziel erreicht ist. Es wird deshalb zur Erhöhung der Genauigkeit und zur Vereinfachung der Auswertung der Analysen ein Teil Peptidpolymer vor der Kupplung mit 100-1000 Teilen Peptidpolymer nach beendeter Kupplungsreaktion verglichen. Bei einem Verhältnis 1:100 würde z.B. Gleichheit der Peakflächen einem Umsatz von 99% entsprechen. Da beide Detektionsverfahren im unteren Nanomolbereich arbeiten, liegt die benötigte Probenmenge für eine Analyse bei maximal 1-2 μ Mol Peptidpolymer.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Die Synthese des Modellpeptids Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro⁺, für das auf jeder Reaktionsstufe die Möglichkeit besteht, die Produktzusammensetzung durch Ionenaustausch-Chromatographie exakt zu bestimmen (8) wurde an Polyäthylenglykol 6000 als Träger unter Verwendung symmetrischer Anhydride durchgeführt und die Kupplungsansbeuten mit Hilfe der beiden beschriebenen Detektionsverfahren verfolgt. Beim Ninhydrin-System konnte bereits auf der ersten Kupplungsstufe auf Grund der unterschiedlichen Ninhydrinfärbung für Prolin und Alanin festgestellt werden, daß unter den Bedingungen der Ninhydrinreaktion bei der automatischen Aminosäureanalyse Abspaltung der Boc-Gruppe auftritt, die ca. 1-2% beträgt. Bei einer Badtemperatur von 80°C für die Reaktionscoil konnte die Abspaltung auf etwa 0,1% gesenkt werden, aber es war unter den bisher angewandten Bedingungen nicht möglich, sie völlig zu unterdrücken. Hierdurch wurde die Detektion nicht umgesetzter Aminogruppen etwas limitiert. Nach diesem Bestimmungsverfahren betrug der Umsatz bei der Synthese des Modellheptapeptids auf jeder Kupplungsstufe mindestens 99,6%. Die aus den Peakflächen bestimmten Werte ohne Berücksichtigung von Boc-Abspaltung sind in Tabelle 1 angegeben. Unter Variation der Bedingungen sollte es möglich sein, die Boc-Abspaltung völlig zu unterdrücken. Dann wäre die Bestimmung von 0,1% nicht umgesetzten Aminogruppen noch mit großer Genauigkeit möglich. Die Analysen wurden jeweils

⁺ Ala-Ile-Gly-Val-Gly-Ala-Pro ist das C-terminale Pentapeptid von Calcitonin M (7).

Tabelle 1) Kupplungsausbeuten bei der Synthese des Heptapeptids

Aminosäuresequenz	Pro	Ala	Gly	Val	Gly	Ile	Ala
Kupplungsstufe	1	2	3	4	5	6	
Ausbeuten in % nach							
a) Ninhydrinmethode	99,7	99,8	99,8	99,6	99,6	99,8	
b) Fluorescaminmethode	nicht bestimmt	99,95	99,95	99,75	99,7	99,85	

nach Entfernung nicht trägergebundener niedermolekularer Stoffe durchgeführt, da bei Verwendung von DCCI zur Aktivierung der Aminosäuren häufig eine unspezifische Ninhydrinfärbung auftritt. Der Vorteil der Ninhydrinmethode ist, daß der in jedem Peptidlaboratorium vorhandene automatische Aminosäureanalyser hierzu verwendet werden kann.

Die Bestimmung der Kupplungsausbeuten bei der Synthese des Modellpeptids mit Hilfe von Fluorescamin ergab die in Tabelle 1 angegebenen Werte. Mit Fluorescamin lassen sich die Bestimmungen auch direkt aus der Reaktionslösung durchführen. Dieses Verfahren bietet sich also durchaus zur zeitlichen Verfolgung der Kupplungsreaktion an. Ein weiterer Vorteil der Fluorescamin-Methode ist die geringe Abhängigkeit der Fluoreszenzausbeute von der N-terminalen Aminosäure. Für die getesteten Peptide war die relative Fluoreszenzausbeute jeweils etwa gleich hoch. Vor allem bei länger-kettigen Peptiden könnte sich dies als ein Vorteil der Fluorescamin-Methode erweisen.

Bei der chromatographischen Analyse des Rohprodukts, das nach alkalischer Hydrolyse des Heptapeptidpolymers erhalten wurde, konnte nur das gewünschte Heptapeptid nachgewiesen werden, was auf die Verlässlichkeit des Bestimmungsverfahrens schließen läßt. Die Aminosäureanalyse ergab für das Heptapeptid folgende Zusammensetzung: Pro 1,00; Gly 1,98; Ala 1,96; Val 1,00; Ile 1,00. Das beschriebene Verfahren nutzt die hohe Empfindlichkeit und Spezifität der beiden Detektionsmethoden auf Grund der guten Reproduzierbarkeit der Ergebnisse voll aus. Bei manueller Durchführung der Ninhydrin- oder Fluorescaminreaktion in diskreten Proben geht durch die auftretende große Fehler-

breite ein beträchtlicher Teil der Empfindlichkeit verloren.

DURCHFÜHRUNG DER ANALYSEN

a) Mit Ninhydrin

Ein Aminosäureanalysator (Beckman Modell Unichrom) wurde für die Umsatzbestimmung dadurch modifiziert, daß in den Pufferstrom zwischen Säulenauslauf und Ninhydrinmischblock ein Injektionsventil geschaltet wurde und eine Reaktionscoil (10 m) in einem Äthanolbad erhitzt wurde. Die Analysenproben (z.B. 3 mg Peptidpolymer vor der Kupplung gelöst in 1ml H₂O und 30 mg Peptidpolymer nach der Kupplung gelöst in 0,1ml H₂O bzw. DMF) wurden in den fließenden Pufferstrom injiziert. Das Probenvolumen lag zwischen 5 und 50 µl. Die Fließgeschwindigkeit von Ninhydrinlösung und Pufferlösung betrug jeweils 40 ml/h, die Entwicklungszeit der Ninhydrinfarbe 10 Minuten. Die Farbintensität wurde bei einer Schichtdicke von 1cm im Bereich von 0 - 0,1 O.D. registriert.

b) Mit Fluorescamin

Mit Hilfe einer Zweikolben Labordosierpumpe (Labotron LDP-11) wurde eine Wasser-Aceton Mischung (1:1), nach dem Durchfließen eines Probeninjektionsventils, mit derselben Menge einer Fluorescaminlösung (40mg Fluorescamin in 100ml Aceton) in einem Mischblock zusammengeführt und durch die Durchflußküvette eines Fluorometers (Aminco Fluoro-Colorimeter, Primärfilter 365 nm, Sekundärfilter 415 nm, angeschlossen an Philips Recorder PM 8220) mit einer Gesamtdurchflußgeschwindigkeit von 20 ml/h gepumpt. Proben wurden direkt aus der Reaktionslösung entnommen und nach entsprechender Verdünnung mit Methylenchlorid analysiert. Außerdem wurden die für den Ninhydrintest hergestellten Proben verwendet. Das Probenvolumen betrug 1-5 µl, die Reaktionszeit mit Fluorescamin ca. 30 Sekunden.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Unterstützung der Arbeit.

- 1) R.B. Merrifield, *Advanc. Enzymol.* 32, 221 (1969)
- 2) M. Mutter, H. Hagenmaier und E. Bayer, *Angew. Chemie* 83, 883 (1971)
- 3) H. Frank, Dissertation Universität Tübingen 1973
- 4) D.H. Spackman, W.H. Stein und S. Moore, *Anal.Chem.* 30, 1190 (1958)
- 5) M. Weigele, S.L. DeBernado, J.P. Teng, W. Leimgruber, *J. Am. Chem. Soc.* 94, 5927 (1972)
- 6) H. Frank und H. Hagenmaier, *Tetrahedron*, zur Publikation eingereicht
- 7) R. Neher, B. Riniker, W. Rittel und H. Zuber, *Helv. Chim. Acta* 51, 1900 (1968)
- 8) H. Hagenmaier und H. Frank, *J. Chrom. Sci.* 10, 663 (1972)