

# Synthese eines chromogenen Substrates - Modul Organische Biochemie

Versuchsprotokoll zum

OBC - Praktikum im SS 2005

Leitung: Prof. E. Bayer

Präparat: Chromogenes Substrat

Thorsten Barth, Stefan Mogk

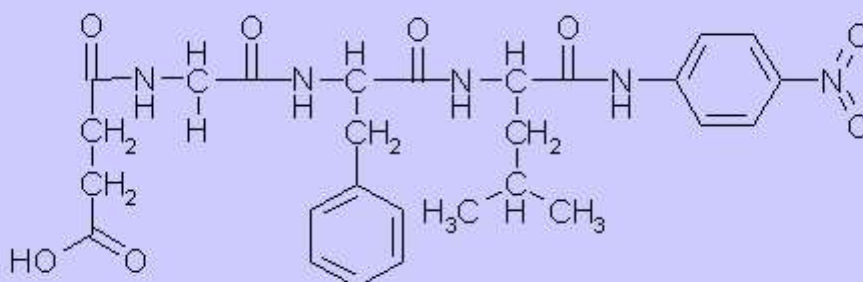
Platz 27

## 1. Allgemeines

→ Um die kinetischen Parameter einer von Proteasen katalysierten Reaktion zu bestimmen, wird eine Substanz benötigt, deren UV-Absorptionsspektrum sich während der enzymatischen Hydrolyse verschiebt. Für diesen Zweck war ein sog. Chromogenes Substrat zu synthetisieren, dessen Spaltung der Leucin- p-Nitroanilid- Peptidbindung photometrisch z.B. bei 405 nm verfolgt werden kann. Für den Verdau wurde Papain eingesetzt. In diesem Protokoll soll die Darstellung des chromogenen Substrates besprochen werden.

→ Dargestellt wurde Succinyl- Glycyl- Phenylalanyl- Leucyl- p- Nitro- Anilid. Die Herstellung erfolgte durch eine lineare Peptidsynthese in flüssiger Phase mittels Boc (tert- Butyloxycarbonyl- ) Strategie. Seitenkettenschutzgruppen wurden für die verwendeten Aminosäuren nicht benötigt.

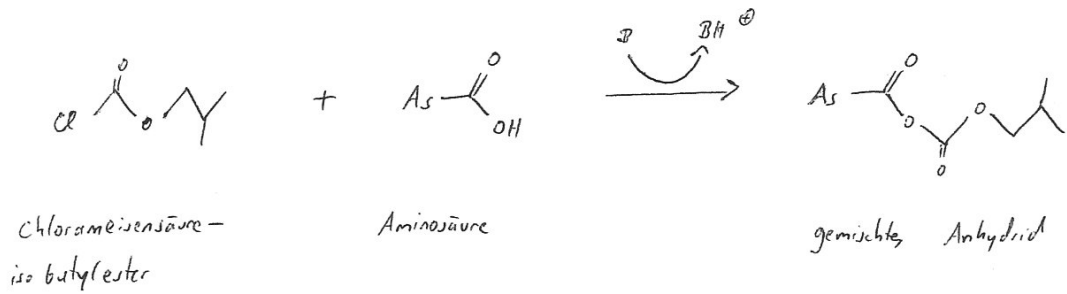
→ Im folgenden werden die zugrundeliegenden Reaktionen sowie der Ablauf der Synthese teils schematisch dargestellt, teils tabellarisch bezüglich aller eingesetzten Substanzmengen und Ausbeuten aufgelistet. Auffälligkeiten während des Versuchs werden ebenso diskutiert wie die durchgeführten Kontrollschritte.



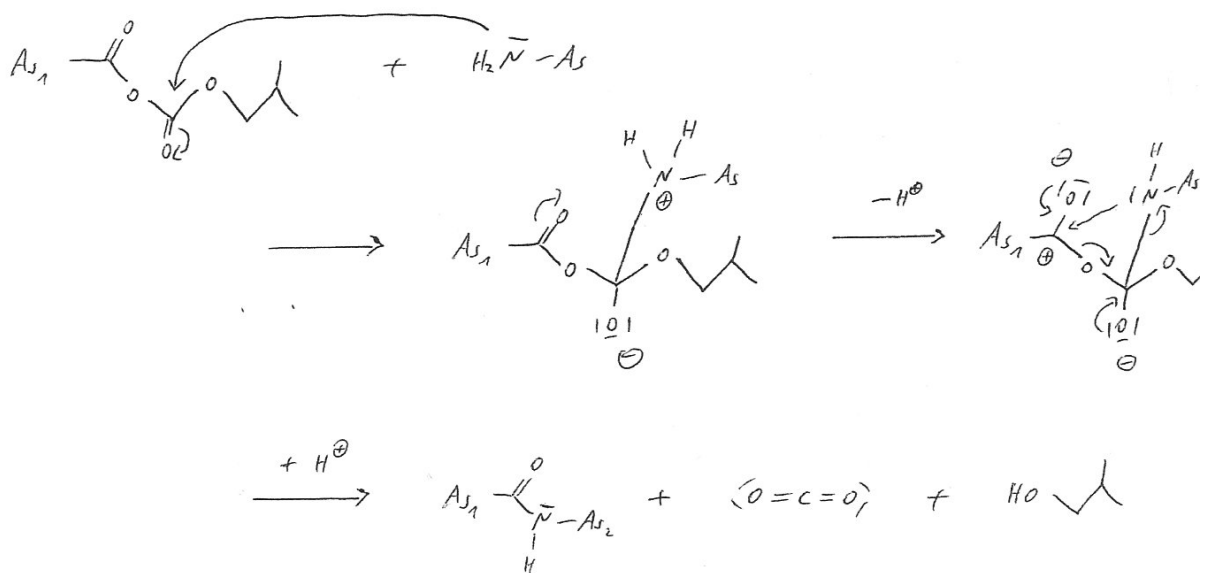
Synthese eines chromogenen Substrates - Modul Organische Biochemie

2. Reaktionsmechanismen

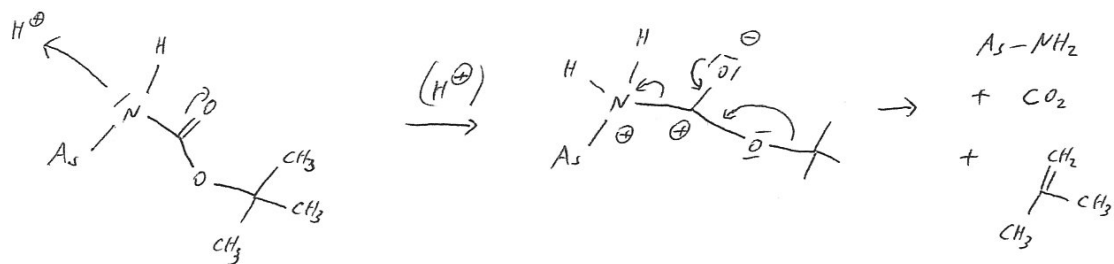
① Aktivierung der AS über intermediäre gemischte Anhydride



② Kopplungsreaktion

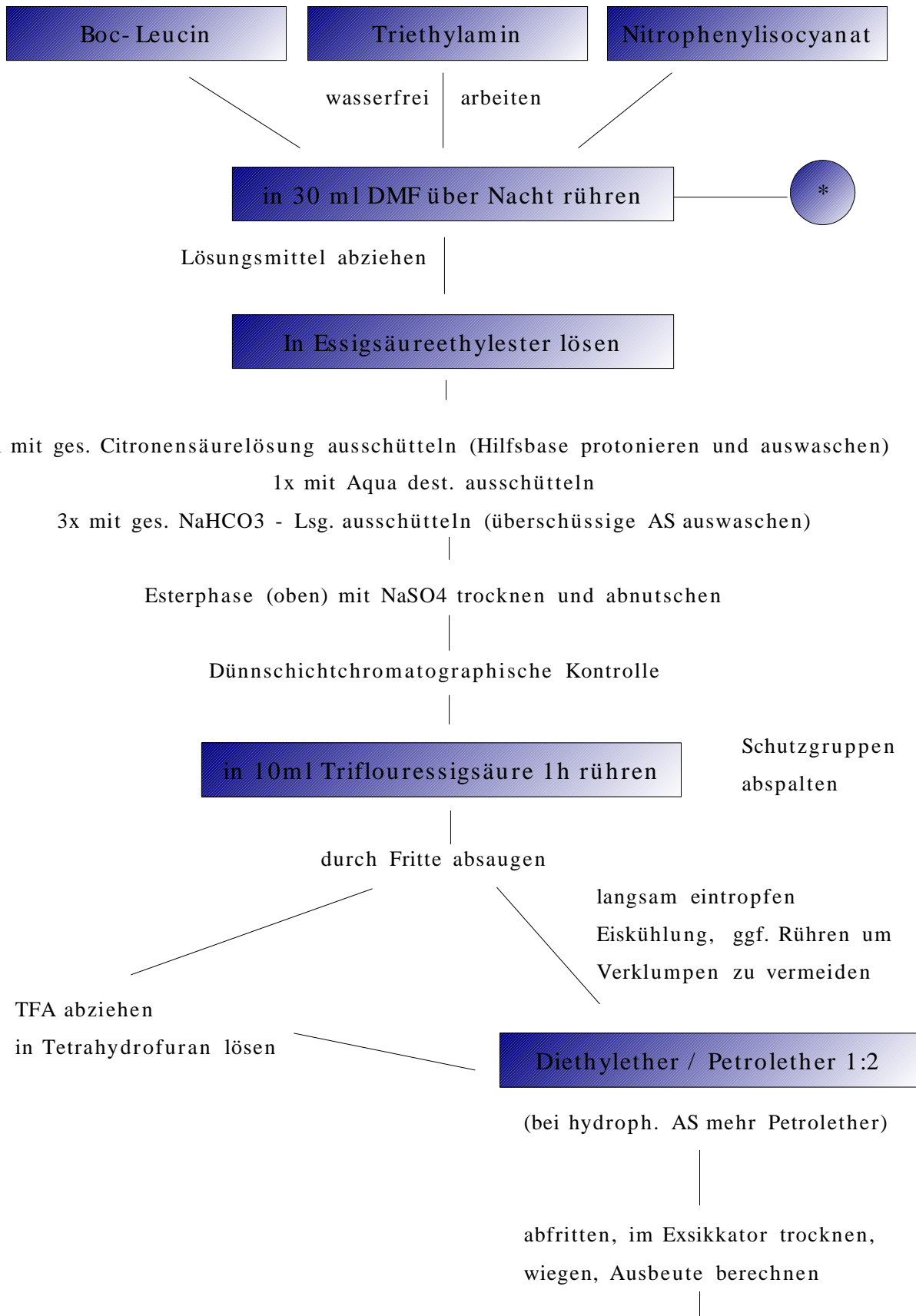


③ Abspaltung der Schutzgruppen



# Synthese eines chromogenen Substrates - Modul Organische Biochemie

## 3. Ablauf der Synthese



Synthese eines chromogenen Substrates - Modul Organische Biochemie

nächste AS aktivieren:  
Boc- AS in Dichlormethan  
Chlorameisensäureisobutylester  
30 min bei -10°C Kältemischung

in 30 ml DMF lösen  
+ N-Methylmorpholin, um das  
gefällte TFA Salz zu lösen

Verfahren für jede neue AS wiederholen



Bernsteinsäureanhydrid

Triethylamin

in 30 ml DMF lösen

Reaktionsverlauf mittels DC im  
Abstand von 10 min kontrollieren

erneute Triethylamin Zugabe, um frei  
werdende Protonen abzufangen und die  
Reaktion zu ziehen

Synthese eines chromogenen Substrates - Modul Organische Biochemie

Tabelle: *Physikalische Eigenschaften verwendeter Reagenzien*

Reagenz	Molekulargewicht	Dichte
Boc- Leu	231,0 g/mol	
Boc- Phe	265,3 g/mol	
Boc- Gly	175,2 g/mol	
p- Nitrophenylisocyanat	164,0 g/mol	
Chlorameisensäure- isobutylester	136,6 g/mol	1,0449 g/ml
Bernsteinsäureanhydrid	100,07 g/mol	
Triethylamin	101,0 g/mol	0,726 g/ml
N-Methylmorpholin	101,1 g/mol	0,920 g/ml

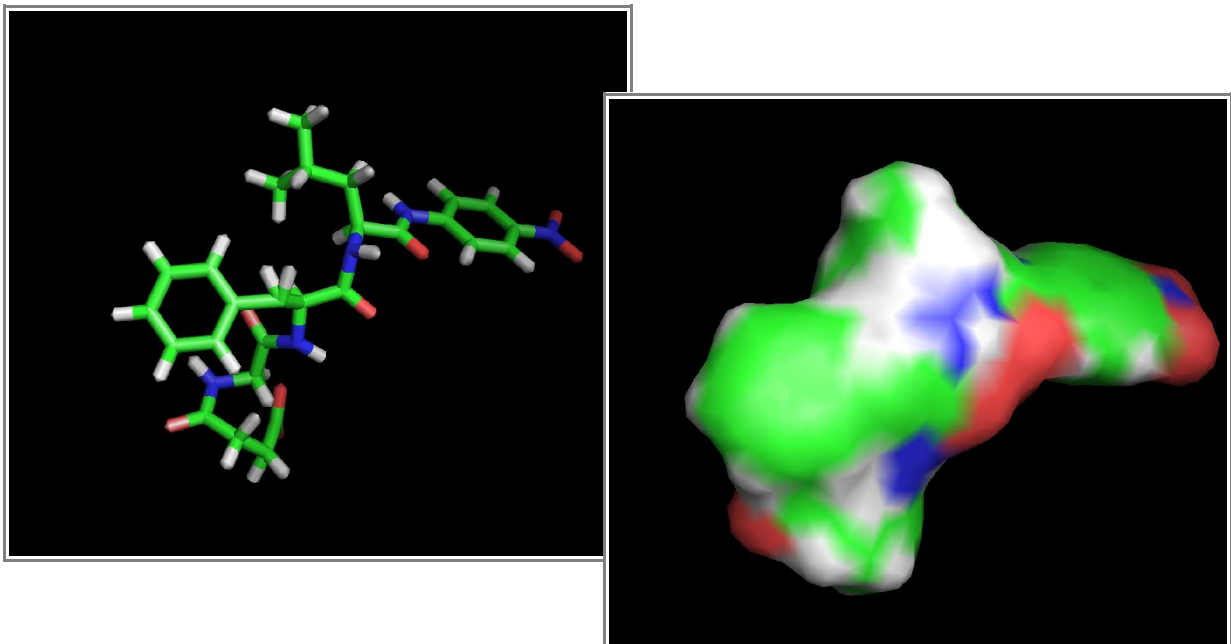


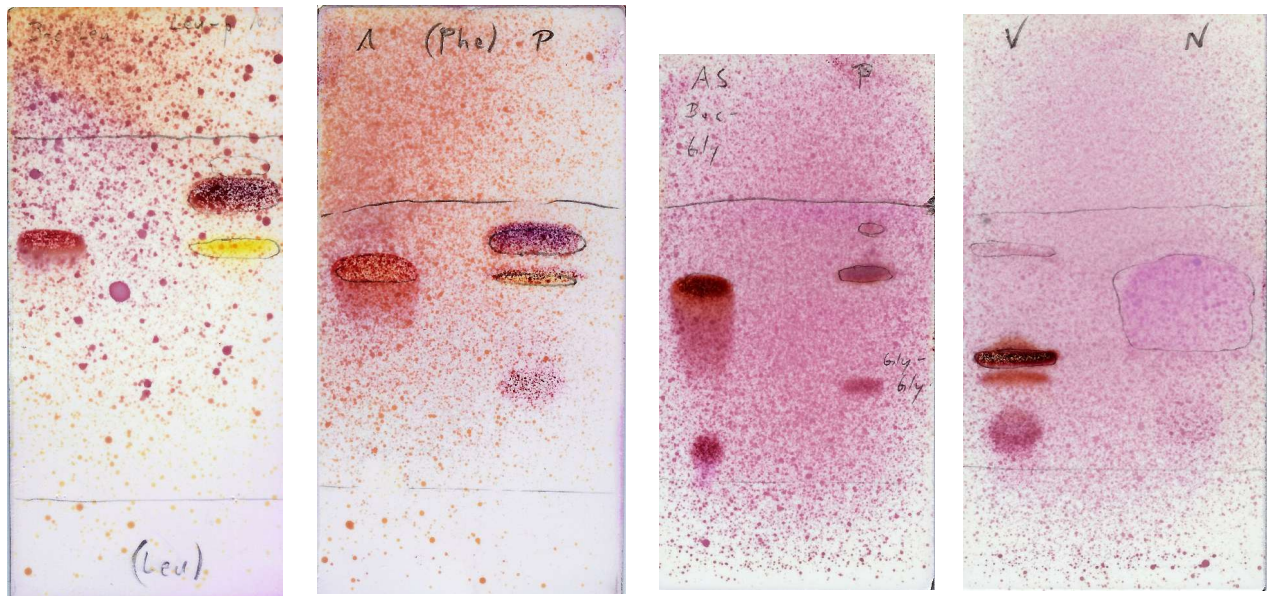
Abbildung: *Stab- und Oberflächenmodell von Succ- Gly- Phe- Leu- p- Nitroanilid*

Synthese eines chromogenen Substrates - Modul Organische Biochemie

Tabelle: *Eingesetzte Substanzmengen und Ausbeuten*

Kopplung	Aminosäure	Hilfsbase	Sonstiges	Lösungsmittel	Ausbeute
1 (Leucin)	2,5 mmol Boc- Leu	2,5 mmol Triethylamin	5 mmol p- Nitrophenyl- isocyanat	DMF	MW 252g/mol  Angenommen (2,5 mmol)
	577,5 mg	696 µl	410 mg	30 ml	100 %
2 (Phenyl- alanin)	2,5 mmol Boc- Phe	2,5 mmol N- Methyl- morpholin	2,5 mmol Chlorameisensäure isobutylester	Dichlor- methan, DMF	MW 399 g/mol  593 mg (1,48 mmol)
	663,3 mg	274,7 µl	327,1 µl	je 30 ml	60 %
3 (Glycin)	1,5 mmol Boc- Gly	1,5 mmol N- Methyl- morpholin	1,5 mmol Chlorameisensäure isobutylester	Dichlor- methan, DMF	MW 456 g/mol  452 mg (1 mmol)
	262,8 mg	164,8 µl	196,3 µl	je 30 ml	40 %
4 (Succinat)	- - -	2x 1,0 mmol Triethylamin	1,75 mmol Bernsteinsäure- anhydrid	DMF	MW 555g/mol  268 mg (482 µmol)
		je 139,1 µl	175,1 mg	30 ml	19 %

# Synthese eines chromogenen Substrates - Modul Organische Biochemie



Boc-L    L-pNA    Boc-F    F-L-pNA    Boc-G    G-F-L-pNA    vor    nach  
Bernsteinsäurekoppl.

## Abbildung: Dünnschichtchromatographische Kontrolle der Kopplungsreaktionen

Erläuterung: Auf der DC-Platte 4 wurde der Verlauf der Succinatkopplung dargestellt.

Auf den DC-Platten 1-3 findet sich folgendes Auftragsschema :

- links jeweils die als letztes gekoppelte Boc-AS
- rechts das erhaltene Peptid
- Laufmittel: CHCl<sub>3</sub> : MeOH : Benzol : H<sub>2</sub>O  
= 4 : 4 : 4 : 0,5

Beobachtungen:

Die DC-Platten 1&2 zeigen mit der gelben Bande ein Harnstoffderivat- Nebenprodukt der ersten Kopplung.

(NO<sub>2</sub>- Phenyl- NH- CO- NH- Phenyl- NO<sub>2</sub>)

Die DC-Platte 3 zeigt neben dem zugesetzten Boc- Gly, auch ein Gly- Gly- Dipeptid, das zu unerwünschten Nebenreaktionen und Verunreinigungen führen kann.

Links erscheint das Peptid ohne Succinyl-Rest, das aufgrund seiner freien Aminofunktion mit Ninhydrin anfärbbar ist.

Rechts ist keine gefärbte Bande mehr zu sehen. Der Succinylrest verhindert (im Gegensatz zu den Boc- Schutzgruppen) auch unter Wärmeeinwirkung eine Ninhydrinreaktion.

Die noch sichtbare diffuse Färbung ist vermutlich auf das zugesetzte Triethylamin zurückzuführen.

#### 4. Beobachtungen und Anmerkungen

- Wie in der Auswertung der Dünnschichtchromatographien beschrieben, enthielt das ausgegebene Boc-Glycin Anteile eines Boc-Glycyl-Glycin-Dipeptids. Zum Zeitpunkt der Synthese musste davon ausgegangen werden, dass dieses ebenfalls in das chromogene Substrat eingebaut wurde. Nach der abschliessenden massenspektrometrischen Analyse traten jedoch keine Peaks auf, die auf eine solche unerwünschte Kupplung hindeuteten.
- Im Verlauf des Versuchs traten zunehmend DC-Banden auf, die auf Verunreinigungen schliessen lassen. Tatsächlich konnte das dargestellte chromogene Substrat bei Praktikumsende nicht mehr rückstandsfrei in Methanol gelöst werden. Der unlösliche Niederschlag wurde deshalb abzentrifugiert und in THF aufgenommen. Beide Fraktionen wurden erneut auf eine DC-Platte aufgetragen, wobei die in THF gelöste Substanz auch im Laufmittel unlöslich blieb und entsprechend nicht aufgetrennt wurde. Ferner zeigte sie keine UV-Aktivität.
- Die zum letzten Waschschrift nach der Kopplung des Succinylrestes notwendige Zugabe von Citronensäurelösung erfolgte versehentlich direkt in die TFA-Lösung,

und nicht - wie vorgesehen - in die Essigsäureethyllösung.

Dies war insbesondere deshalb problematisch, da die wässrige Phase sich in TFA vollständig löst und keine Phasentrennung stattfindet.

In der Folge musste der pH-Wert durch Zugabe von Bicarbonat angehoben werden, um danach die gesamte Flüssigkeit am Rotationsverdampfer abziehen.

Erst durch Zugabe grösserer Mengen von Essigsäureethylester und Wasser konnte das Produkt wieder in Lösung gebracht werden.

- Um das chromogene Substrat als trockene Substanz zu erhalten, wurde es in 10 ml Acetonitril (Methylcyanid,  $\text{CH}_3\text{-CN}$ ) und 20 ml Wasser eingefroren und anschliessend über Nacht lyophilisiert, wobei das Lösungsmittel durch Sublimation entfernt wurde.

- Das Massenspektrum zeigt bei einem Molekulargewicht von 556,3 einen Peak, der dem chromogenen Substrat (MW: 553 g/mol) eindeutig zugeordnet werden kann.



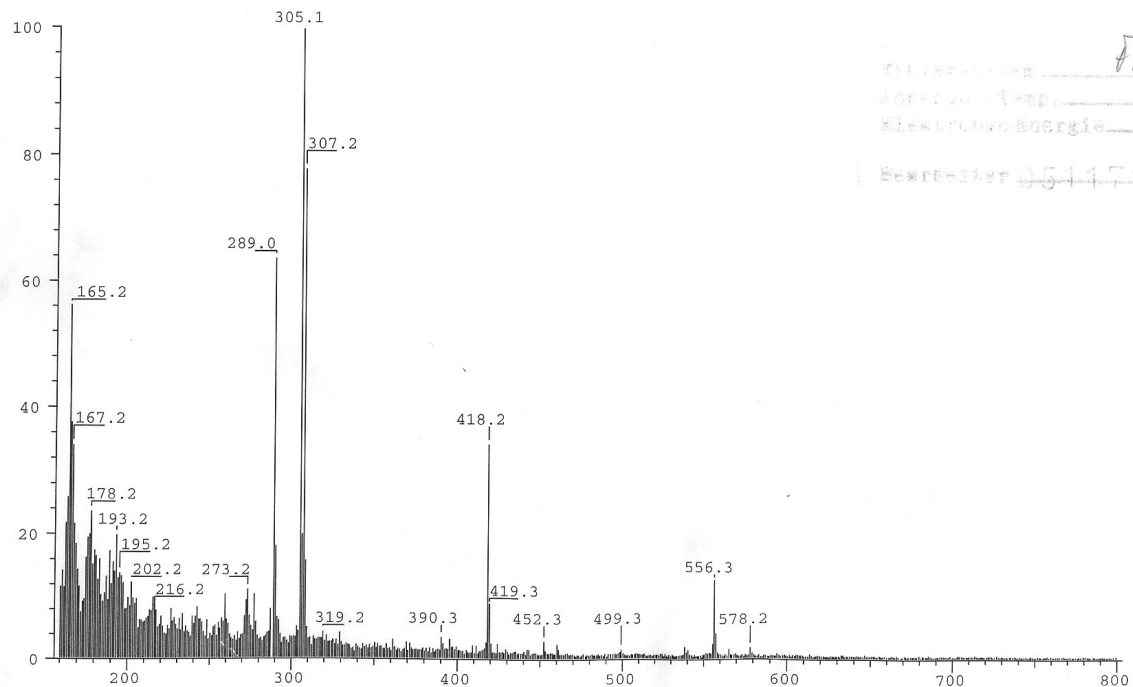
# Synthese eines chromogenen Substrates - Modul Organische Biochemie

SPEC: fab217 (23-JUN-05 09:50:57)  
Samp:  
Comm: Echner Suc-Gly-Phe-Leu-pNA  
Oper: Study:  
Base: 305.15 Massen: 160.01 > 1499.99  
Peak: 1000.0 mmu Intensity: 2612674  
Scan 20 @ 0.57 min (FAB +Q3MS LMR UP LR)

Scans: 1 > 34

Client:  
#Peaks: 1358  
RIC: 50253204

2.6E+06



FAB  
50°C  
N/A  
VH

Date: Thu Jun 23 09:52:30 2005 ICIS: 8.3.0 SP2 for OSF1 (V4.0) build 98-238 from 26-Aug-98

Abbildung: Massenspektrogramm