

Zakład Chemii Ogólnej. Instytut Chemii Podstawowych. Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: prof. dr Stanisław Biliński

Andrzej GÓRSKI, Jerzy ISKIERKO,
Barbara KANADYS-SOBIERAJ

Analiza chromatograficzna DANS- i DABS-pochodnych niektórych aminokwasów niebiałkowych

Хроматографический анализ DANS- и DABS-производных некоторых
небелковых аминокислот

DANS- and DABS-derivatives of Certain Non-protein Amino Acids
in Chromatographic Analysis

Aminokwasy są głównymi składnikami białek, substancji o różnorodnych funkcjach biologicznych i najważniejszymi związkami uczestniczącymi w przemianach azotowych. Wyodrębnianie i identyfikacja wolnych aminokwasów, również aminokwasów niebiałkowych, a także analiza jakościowa składu aminokwasowego białek jest możliwa dzięki ciągle doskonalonym metodom chromatograficznym. Wiąże się z tym poszukiwanie nowych odczynników, dających pochodne o zmienionych właściwościach fizykochemicznych, między innymi o mniejszej polarności cząsteczki, oraz poszukiwanie odczynników zwiększających czułość detekcji.

Spośród wielu opracowanych odczynników, reagujących z aminokwasami, najczęściej stosowane są: 2,4-dwunitrofluorobenzen (DNP) [5], fenyloizotiocjanian (PTC) [2, 7] i chlorek kwasu 5-dwumetyloaminonaftaleno-1-sulfonowego (DANS-Cl) [8]. Jednym z reagentów wprowadzonych do analizy chromatograficznej aminokwasów w latach siedemdziesiątych jest chlorek kwasu 4-N,N-dwumetyloamino-azobenzenu-4'-sulfonowego (DABS-Cl) [1, 4]. Reagenty, takie jak DANS-Cl czy DABS-Cl, dają barwne lub fluoryzujące w UV pochodne aminokwasów o dużej cząsteczce, co ułatwia ich detekcję. Inne właściwości fizykochemiczne pochodnej w porównaniu do wolnych aminokwasów pozwalają często na lepszy rozdział chromatograficzny.

W skład białek wchodzi ok. 20 aminokwasów zwanych białkowymi, pozostałe, które zostały poznane w liczbie ok. 200, określane są jako niebiałkowe. W badaniach nad aminokwasami niebiałkowymi wyspecjalizowało się kilka ośrodków, między innymi Fowden i wsp. [3]. Aminokwasy niebiałkowe pełnią określone funkcje metaboliczne, jak na przykład kwas γ -amino-masłowy, powstający w roślinach przez dekarboksylację glutaminianu. Przemiana tego kwasu w glutaminian

lub glutaminę wskazuje, że pełni on w roślinach rolę substancji magazynującej azot. Inne niebiałkowe aminokwasy są wtórnymi produktami przemian, niektóre, jak kanawanina, występująca w roślinach, wykazuje własności toksyczne dla organizmów zwierzęcych.

Celem przedstawionej pracy była analiza chromatograficzna 10 aminokwasów niebiałkowych, badanych równolegle z niektórymi aminokwasami białkowymi. Zarówno wolne, jak też DANS- i DABS-pochodne aminokwasy rozdzielano chromatograficznie na żelu krzemionkowym w różnych układach rozpuszczalników. Analizowano wpływ budowy na rozdział chromatograficzny takich aminokwasów, jak histydyna i jej L-1 i L-3-metylowe homologi, glicyna i jej metylowa pochodna — sarkozyna, różniące się budową pierścienia — prolina i kwas D-azetidino-2-karboksylowy, izomery α , β , γ kwasów aminomasłowych, cytrulina, kanawanina i arginina — różniące się nieznacznie budową cząsteczki, norleucyna i różniąca się od niej długością łańcucha oraz obecnością siarki w łańcuchu — etionina, kwas ϵ -aminokapronowy, różniący się od norleucyny położeniem grupy $-NH_2$, oraz S-2-amino-etylocysteina.

Analiza chromatograficzna wymienionych aminokwasów w postaci DANS- i DABS-pochodnych miała na celu porównanie wpływu podstawników na wartości R_F i selektywność chromatograficznego rozdziału w odniesieniu do wolnych aminokwasów. Poza tym podjęto próbę identyfikacji aminokwasów niebiałkowych obok białkowych, różniących się nieznacznie budową cząsteczki.

MATERIAŁY I METODY

Do analizy chromatograficznej użyto 17 aminokwasów firmy Calbiochem San Diego California: etioninę, S-2-aminoetylocysteinę, kwas ϵ -aminokapronowy, kanawaninę, cytrulinę, sarkozynę, kwas D-azetidino-2-karboksylowy, histydynę oraz α -1-metylohistydynę i L-3-metylohistydynę, izomery α , β i γ kwasu aminomasłowego, glicynę oraz prolinę, argininę i norleucynę.

Stosowano następujące odczynniki: DANS-Cl firmy Serva — Szwajcaria, oraz DABS-Cl — wysyntetyzowany w Pracowni Technologicznej Zakładu Chemii Nieorganicznej AM w Lublinie. Chromatografię prowadzono na płytkach pokrytych żel krzemionkowym — D.C. Alufolien Kieselgel 60 F₂₅₉ o grubości żelu 0,2 mm — firmy Merck.

Używano następujących rozpuszczalników: acetonu, chloroformu, butanolu, metanolu, octanu etylu, propanolu, kwasu octowego — firmy PPH Polskie Odczynniki Chemiczne — Gliwice.

Otrzymywanie DANS-pochodnych aminokwasów

DANS-pochodne otrzymywano metodą Webera [8]. Aminokwasy w ilości 10^{-5} M rozpuszczano w 0,2 ml 0,1 M roztworu $NaHCO_3$ o pH 8,9. Do roztworu dodano 0,6 ml odczynnika DANS-Cl w acetonie (6 mg DANS-Cl/ml acetonu). Miesza-

ninę pozostawiono na 2 godz. w temperaturze pokojowej. Suszono do sucha strumieniem azotu, osad rozpuszczano w mieszaninie 0,1 M CH_3COOH — aceton w stosunku 2 : 3 (v/v).

Otrzymywanie DABS-pochodnych aminokwasów

DABS-pochodne otrzymano według przepisu, jaki podaje Lin i wsp. [4]. Aminokwasy w ilości 600 nmoli rozpuszczano w 0,2 ml 0,1 M roztworu NaHCO_3 ($\text{pH}=8,9$). Dodawano 0,3 ml roztworu acetonowego DABS-Cl (3,3 mg/ml). Mieszaninę ogrzewano przez 6 min. w temp. 70°C . Suszono strumieniem azotu. Otrzymany osad DABS-pochodnych aminokwasów rozpuszczano w acetonie.

Rozdział chromatograficzny

Wolne aminokwasy oraz ich DANS- i DABS-pochodne rozdzielano chromatograficznie na żelu krzemionkowym. Chromatografię prowadzono na płytkach pokrytych żelalem o grubości warstwy 0,2 mm w szklanych komorach wysyconych parami rozpuszczalnika. Długość drogi rozwijania wynosiła 16 cm. Chromatogramy po rozwinięciu suszono strumieniem ciepłego powietrza. Miejsce położenia rozdzielanych DANS-pochodnych na chromatogramie określano w świetle UV, wykorzystując ich fluorescencję. DABS-pochodne aminokwasów dawały widoczne wyraźnie w świetle widzialnym pomarańczowe plamy. Położenie na chromatogramie analizowanych wolnych aminokwasów określano na podstawie ich reakcji z ninhydriną.

Do rozdzielania chromatograficznego używano następujących układów rozpuszczalników:

- 1) butanol—kwas octowy—woda (v/v) — 4 : 1 : 1;
- 2) chloroform—metanol—kwas octowy (v/v) — 75 : 25 : 5;
- 3) chloroform—metanol—kwas octowy—woda (v/v) — 75 : 25 : 5 : 1;
- 4) chloroform—octan etylu—metanol—kwas octowy (v/v) — 30 : 50 : 20 : 1;
- 5) chloroform—kwas octowy—toluen—butanol (v/v) — 7 : 1 : 1 : 1;
- 6) butanol—propanol—woda (v/v) — 3 : 5 : 2.

OMÓWIENIE WYNIKÓW I WNIOSKI

Do zaplanowanych badań użyto 17 aminokwasów, z czego 10 to aminokwasy niebiałkowe. Wybrane aminokwasy rozdzielano chromatograficznie jako wolne oraz jako DANS- i DABS-pochodne w 6 różnych układach rozpuszczalników. Wolne aminokwasy rozdzielano w 3 układach rozpuszczalników (tab. 1).

Jak wynika z danych tab. 1, wszystkie analizowane wolne aminokwasy rozdzielały się stosunkowo dobrze, tylko w układzie butanol—kwas octowy—woda (4 : 1 : 1). W pozostałych stosowanych układach większość aminokwasów pozostawała na linii startu, tylko norleucyna, etionina i kwas ϵ -amino-kapronowy w układach 2 i 3 ulegają przesunięciu z linii startu. Wartość R_F DANS- i DABS-pochodnych zestawiono w tab. 2 i 3.

Tab. 1. Wartości R_F wolnych aminokwasów w układach:

- 1) butanol—kwas octowy—woda (v/v) — 4 : 1 : 1;
- 2) chloroform—metanol—kwas octowy (v/v) — 75 : 25 : 5;
- 3) chloroform—metanol—kwas octowy—woda (v/v) — 75 : 25 : 5 : 1.

Values R_F free amino acids in systems of solvents:

- 1) butanol—acetic acid—water (v/v) — 4 : 1 : 1;
- 2) chloroform—methanol—acetic acid (v/v) — 75 : 25 : 5;
- 3) chloroform—methanol—acetic acid—water (v/v) — 75 : 25 : 5 : 1.

Lp.	Aminokwas	Wartości R_F w układach:		
		1	2	3
1	Histydyna	0,053	0	0
2	L-1 metylohistydyna	0,030	0	0
3	L-3 metylohistydyna	0,038	0	0
4	Glicyna	0,107	0	0,170
5	Sarkozyna	0,069	0	0
6	Kwas α -aminomasłowy	0,215	0	0
7	Kwas β -aminomasłowy	0,200	0	0
8	Kwas γ -aminomasłowy	0,223	0	0,02
9	Prolina	0,130	0	0,170
10	Kwas d -azotidino- -2-karboksylowy	0,100	0	0
11	Arginina	0,073	0	0
12	Cytrulina	0,110	0	0,180
13	Kanawanina	0,057	0	0
14	Etionina	0,350	0,110	0,230
15	Norleucyna	0,390	0,064	0,140
16	Kwas ϵ -aminokapronowy	0,310	0,130	0,140
17	S-2-amino-etylocysteina	0,049	0	0

DANS- i DABS-pochodne w układzie butanol—kwas octowy—woda (4 : 1 : 1) mają średnio dwukrotnie wyższe wartości R_F niż wolne aminokwasy. W układzie tym DABS-pochodne analizowanych aminokwasów mają wyższe wartości R_F niż DANS-pochodne. Wynika to z obecności podstawnika DANS- lub DABS- w cząsteczce, zmieniającego jej własności fizykochemiczne, co wiąże się z mniejszą polarnością cząsteczki i zablokowaniem grupy $-NH_2$ przez podstawnik. O powinowactwie adsorpcyjnym tych pochodnych do powierzchni żelu decyduje ugrupowanie $-SO_2-NH-$. W układzie chloroform—kwas octowy—toluen—butanol (7 : 1 : 1 : 1) DANS- i DABS-pochodne histydyny, jej L-1 i L-3 metylowe homologi oraz arginina i kanawanina pozostają na linii startu. Aminokwasy te są najbardziej zasadowe i fakt, że ich DANS- i DABS-pochodne pozostają na linii startu, należy tłumaczyć silnymi oddziaływaniami czą-

Tab. 2. Wartości R_F DANS-pochodnych aminokwasów w układach:

- 1) butanol—kwas octowy—woda (v/v) — 4 : 1 : 1;
- 2) chloroform—metanol—kwas octowy (v/v) — 75 : 25 : 5;
- 3) chloroform—metanol—kwas octowy—woda (v/v) — 75 : 25 : 5 : 1;
- 4) chloroform—octan etylu—metanol—kwas octowy (v/v) — 30 : 50 : 20 : 1;
- 5) chloroform—kwas octowy—toluen—butanol (v/v) — 7 : 1 : 1 : 1;
- 6) butanol—propanol—woda (v/v) — 3 : 5 : 2.

Values R_F DANS-derivative amino acids in systems of solvents:

- 1) butanol—acetic acid—water (v/v) — 4 : 1 : 1;
- 2) chloroform—methanol—acetic acid (v/v) — 75 : 25 : 5;
- 3) chloroform—methanol—acetic acid—water (v/v) — 75 : 25 : 5 : 1;
- 4) chloroform—ethyl acetate—methanol—acetic acid (v/v) — 30 : 50 : 20 : 1;
- 5) chloroform—acetic acid—toluene—butanol (v/v) — 7 : 1 : 1 : 1;
- 6) butanol—propanol—water (v/v) — 3 : 5 : 2.

Lp	DANS-pochodne aminokwasów	Wartości R_F w układach:					
		1	2	3	4	5	6
1	Histydyna	0,24	0,11	0,36	0	0	0,24
2	L-1-metylohistydyna	0,12	0,08	0,22	0	0	0,11
3	L-3-metylohistydyna	0,13	0,06	0,19	0	0	0,13
4	Glicyna	0,56	0,57	0,58	0,25	0,24	0,46
5	Sarkozyna	0,58	0,74	0,75	0,32	0,48	0,45
6	Kwas α -aminomasłowy	0,66	0,78	0,76	0,46	0,47	0,52
7	Kwas β -aminomasłowy	0,69	0,83	0,80	0,56	0,57	0,55
8	Kwas γ -aminomasłowy	0,71	0,84	0,80	0,57	0,57	0,57
9	Prolina	0,62	0,78	0,79	0,58	0,57	0,43
10	Kwas α -azetidino-2-karboksylowy	0,57	0,64	0,72	0,22	0,47	0,38
11	Arginina	0,34	0,18	0,05	0,23	0	0,34
12	Cytrulina	0,45	0,29	0,08	0,32	0,03	0,34
13	Kanawalina	0,38	0,18	0,03	0,23	0	0,39
14	Etionina	0,64	0,78	0,42	0,82	0,49	0,52
15	Norleucyna	0,69	0,79	0,49	0,82	0,52	0,51
16	Kwas ϵ -aminokapronowy	0,71	0,88	0,53	0,88	0,67	0,64
17	S-2-amino-etylcysteina	0,63	0,75	0,38	0,81	0,21	0,56

steczek z aktywną powierzchnią żelu poprzez wolne grupy $-NH_2$. Również w układzie chloroform—octan etylu—metanol—kwas octowy (tab. 2 i 3) pochodne tych aminokwasów mają bardzo niskie wartości R_F lub pozostają na linii startu. W pozostałych układach DANS- i DABS-histydyna ma wyraźnie wyższe R_F niż jej metylowe homologi, przy czym pochodne L-3 metylohistydyny posiadają najniższe wartości R_F . Należy to tłumaczyć wpływem podstawnika metylowego przy azocie pierścienia i bardziej zasadowym charakterem pochodnej, co przejawia się w silniejszym oddziaływaniu jej z adsorbentem. Najbardziej optymalnym układem z przebadanych sześciu, do rozdziału histydyny i jej homologów w postaci DANS- i DABS-pochodnych, jak się wydaje, jest układ butanol—propanol—woda (3 : 5 : 2). Należy stwierdzić, że DANS- i DABS-pochodne tych aminokwasów (tab. 2 i 3) nie rozdzielają się w układzie 4 i 5,

Tab. 3. Wartości R_F DABS-pochodnych aminokwasów w układach rozpuszczalników jak w tab. 2Values R_F DABS-derivative amino acids (systems of solvents see Table 2)

Lp.	DABS-pochodne aminokwasów	Wartości R_F w układach:					
		1	2	3	4	5	6
1	Histydyna	0,39	0,11	0,27	0	0	0,40
2	L-1-metylohistydyna	0,26	0,08	0,22	0	0	0,20
3	L-3-metylohistydyna	0,28	0,06	0,19	0	0	0,23
4	Glicyna	0,60	0,37	0,59	0,25	0,36	0,48
5	Sarkosyna	0,66	0,73	0,76	0,32	0,59	0,46
6	Kwas α -aminomasłowy	0,73	0,78	0,77	0,46	0,67	0,59
7	Kwas β -aminomasłowy	0,75	0,83	0,80	0,56	0,67	0,60
8	Kwas γ -aminomasłowy	0,77	0,84	0,80	0,57	0,64	0,63
9	Prolina	0,66	0,77	0,78	0,38	0,59	0,43
10	Kwas δ -szetidino-2-karboksylowy	0,59	0,64	0,72	0,22	0,48	0,41
11	Arginina	0,41	0,09	0,23	0,03	0	0,37
12	Cytrulina	0,56	0,30	0,39	0,10	0,08	0,40
13	Kanawenina	0,46	0,11	0,24	0,03	0,00	0,43
14	Etionina	0,72	0,82	0,86	0,50	0,66	0,57
15	Norleucyna	0,75	0,84	0,90	0,54	0,70	0,62
16	Kwas ϵ -aminokapronowy	0,76	0,89	0,92	0,58	0,70	0,65
17	S-2-amino-etylocysteina	0,38	0,11	0,24	0,07	0,00	0,37

natomiast wykazują dobry rozdział w układzie 3. W stosowanych układach rozpuszczalników prawie wszystkie DABS-pochodne analizowanych aminokwasów mają wyższe wartości R_F niż DANS-pochodne, z wyjątkiem DANS-pochodnych S-2-etylo-aminocysteiny, wykazującej niższe wartości R_F niż jej DABS-pochodna. Pochodne DANS- i DABS-sarkozyny mają wyższe wartości R_F niż DANS- i DABS-glicyny (tab. 2 i 3), odwrotnie jak przy rozdziale tych wolnych aminokwasów (tab. 1).

Rodnik metylowy wpływa wprawdzie na wzrost zasadowości azotu, ale utrudnia tworzenie wiązania wodorowego pomiędzy N a grupą silanolową adsorbentu, powodując spadek powinowactwa adsorbcyjnego do powierzchni żelu [6]. Zarówno DANS-, jak i DABS-pochodne glicyny i sarkozyny nie rozdzielają się w układzie 6. DABS-pochodne tych aminokwasów w pozostałych układach wykazują bardzo wyraźne zróżnicowanie w wartościach R_F . Najlepszy rozdział zarówno DANS- jak i DABS-pochodnych tych aminokwasów uzyskano w układzie 5.

Wartości R_F pochodnych DANS- i DABS- kwasów α -, β -, γ -aminomasłowych wzrastały wraz z odległością grupy $-NH_2$ od grupy $-COOH$. Prawidłowość tę stwierdza się z wyjątkiem układów 5 i 6, gdzie DABS-pochodne kwasu γ -aminomasłowego mają niższą wartość R_F niż pochodne izomerów α i β . Pochodne zarówno DANS- jak i DABS- izomerów β i γ kwasów izomasłowych wykazują bardzo nieznaczne zróżnicowanie w wartościach R_F we wszystkich układach. DABS-pochodne izomerów α i β dobrze rozdzielają się w układach 2 i 4 (tab. 3), natomiast DANS-

-pochodne tych izomerów w układach 4 i 5 (tab. 2). DANS- i DABS-prolina ma wyższe wartości R_F niż DANS- i DABS-pochodne kwasu azetidino-2-karboksylowego. Różnice w wartościach R_F oraz to, że pochodne proliny mają wyższe R_F , należy tłumaczyć kształtem pierścienia aromatycznego i jego wpływem na adsorpcję. Praktycznie we wszystkich badanych układach DANS- i DABS-pochodne rozdzielają się bardzo dobrze.

We wszystkich stosowanych układach rozpuszczalników pochodne takich aminokwasów, jak kanawanina i arginina, posiadających resztę guanidynową, w porównaniu do cytruliny — różniącej się od tych aminokwasów resztą mocznikową, mają wyraźnie niższe R_F od pochodnej cytruliny. Reszta guanidynowa nadaje im zdecydowanie bardziej zasadowy charakter i tym należy tłumaczyć duże powinowactwo ich pochodnych do adsorbentu. Najbardziej selektywnym układem do rozdzielania analizowanych aminokwasów był układ butanol—kwas octowy—woda (4 : 1 : 1) oraz butanol—propanol—woda (3 : 5 : 2).

Pochodne argininy i cytruliny (tab. 2 i 3) wykazują dobry rozdział, z wyjątkiem układu 5 i 6, natomiast DANS- i DABS-pochodne kanawaniny oraz etioniny nie rozdzielają się tylko w układzie 5. Norleucyna, kwas ϵ -amino-kapronowy i S-2-aminoetylocysteina w postaci DANS-pochodnych wykazują duże zróżnicowanie R_F , z wyjątkiem układu 1 (tab. 2). DABS-pochodne tych aminokwasów rozdzielają się dobrze w układzie 2 i 4, w pozostałych układach rozdział tych aminokwasów jest niezadowalający.

Przeprowadzone badania wykazały, że DANS- i DABS-pochodne aminokwasów posiadają wyższe R_F niż wolne aminokwasy oraz lepiej się rozdzielają. Analiza chromatograficzna aminokwasów w postaci ich DANS- i DABS-pochodnych w przypadku odpowiednio opracowanych układów rozpuszczalników może być przydatna do rozdzielania i identyfikacji aminokwasów niebiałkowych, różniących się nieznacznie budową od znanych aminokwasów białkowych.

PISMIENNICTWO

1. Chang J. Y., Creaser E. H.: Separation of 4-N,N-dimethylaminoazobenzene-4'-sulfonyl Amino Acids on Polyamides Sheets. *J. Chromatogr.* **116**, 215 (1976).
2. Edman P.: Method of Determination of the Amino Acids Sequence in Peptides. *Acta Chem. Scand.* **4**, 283 (1950).
3. Fowden L.: The Nonprotein Amino Acids of Plants. *Endeavour* **21**, 35 (1962).
4. Lin J. K., Chang J. Y.: Chromophoric Labelling of Amino Acids with 4-dimethylaminoazobenzene-4'-sulfonyl Chloride. *Anal. Chem.* **47**, 1634 (1975).
5. Sanger F.: Free Amino Groups of Insulin. *Biochem. J.* **39**, 507 (1945).
6. Soczewiński E., Gołkiewicz W.: A Simple Molecular Model of Adsorption Chromatography. II. Correlation of Adsorption Affinity of Organic Substances with their Acid-base Properties. *Chem. Anal.* **14**, 465 (1969).

7. Soczewiński E., Iskierko J., Kanadys B.: Structural Effects in the Liquid Partition of Phenylthiohydantoin Derivatives of Amino Acids. *Chem. Anal.* **23**, 533 (1978).
8. Weber G.: Fluorescent Conjugates of Ovalbumin and Bovine Serum Albumin. *Biochem. J.* **51**, 155 (1952).

Otrzymano 24 X 1983.

РЕЗЮМЕ

Исследованиям подвергалась возможность хроматографического распределения некоторых небелковых аминокислот как свободных, так и в виде их DANS- и DABS-производных, параллельно с некоторыми белковыми аминокислотами. Было доказано, что DANS- и DABS-производные аминокислоты обладают более высоким R_F , чем свободные аминокислоты и характеризуются лучшим хроматографическим распределением. Хроматографический анализ вышеназванных аминокислот в виде их DANS- и DABS-производных с применением соответствующих систем растворителей оказывается пригодным к распределению и идентификации небелковых аминокислот, незначительно отличающихся по своему строению от известных белковых аминокислот.

SUMMARY

The possibility of chromatographic split of certain non-protein amino acids, both free and their DANS- and DABS-derivative forms together with some protein amino acids was examined. It was proved that DANS- and DABS-derivatives of amino acids had higher R_F than free amino acids and had better chromatographic split. The chromatographic analysis of the above-mentioned amino acids in their DANS- and DABS-derivative forms with the use of a given set of solvents may be helpful in split and identification of non-protein amino acids hardly varying in structure from the already known protein amino acids.