

TRENNUNG VON 2,4-DINITROPHENYL-AMINOSÄUREN DURCH HOCHSPANNUNGS-PAPIERELEKTROPHORESE

SIEGFRIED FITTKAU

Physiologisch-chemisches Institut der Martin-Luther Universität, Halle, Saale (Deutschland)*

(Eingegangen den 20. September 1964)

Zur Trennung der bei der Analyse N-terminaler Gruppen von Peptiden und Proteinen anfallenden Dinitrophenyl-aminosäuren (DNP-Aminosäuren) wird neben der Papierchromatographie¹ heute mit Erfolg die Dünnschichtchromatographie² eingesetzt. Während DNP-Verbindungen auch durch Säulenchromatographie an modifizierten Kieselsäuren³⁻⁵, Polyamidpulver⁶⁻⁸ und Ionenaustauschern⁹ getrennt werden können, scheint die Gaschromatographie z.B. der Methylester dinitrophenylierter Aminosäuren¹⁰ bisher nur begrenzt anwendbar. Die Gegenstromverteilung wurde bei der Isolierung von DNP-Peptiden herangezogen^{11,12}.

Die Möglichkeit der papierelektrophoretischen Trennung bei Potentialen bis 10 V/cm wird in einer Arbeit von THORNBURG *et al.*¹³ über die ionophoretische Beweglichkeit der DNP-Derivate von Aminosäuren und einigen niedermolekularen Peptiden aufgezeigt. Unter Verwendung organischer Puffer hoher Ionenstärke aber niedriger Leitfähigkeit sind die Wanderungstrecken für pH-Werte von 3.3, 4.7, 7.2 und 9.3 in Amaranth-Einheiten angegeben (Amaranth = 1-(4-Sulfo-1-naphthylazo)-2-naphthol-3,6-disulfosäure).

Praktisch eingesetzt wurde die Niedervoltelektrophorese zur Lösung einzelner Probleme, wie der Trennung der DNP-Derivate von Glutaminsäure und Asparaginsäure, Arginin und Cysteinsäure bei pH 7.1⁴, von ϵ -DNP-Lysin und DNP-Cysteinsäure in Phosphatpuffer pH 7.0¹⁴ oder der wasserlöslichen mono- und disubstituierten basischen Aminosäuren in Boratpuffer bzw. Ammoniak^{1,15}.

Da über das Verhalten der DNP-Aminosäuren bei der Hochspannungselektrophorese bislang kaum Erfahrungen vorliegen und diese Methode mit schärfer begrenzten Zonen oder Flecken bei wesentlich verkürzter Versuchsdauer erhebliche Vorteile gegenüber einer Elektrophorese bei niederen Spannungen zeigt, soll im folgenden darüber berichtet werden.

MATERIAL UND METHODEN

1. DNP-Aminosäuren

Darstellung der DNP-Aminosäuren durch Umsetzung freier Aminosäuren mit 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol bei Gegenwart von NaHCO₃ nach LEVY¹⁶. N ϵ -DNP-Lysin wird über den Cu-Komplex nach PORTER UND SANGER¹⁷ erhalten, N α -DNP-Lysin durch Dinitrophenylierung von N ϵ -Acetyllysin¹⁸ und Hydrolyse mit 2 N HCl. N α -DNP-Histidin entsteht bei der Aminolyse von Di-DNP-Histidin mit Histidin¹⁹. Die

* Direktor: Prof. Dr. H. HANSON.

Schmelzpunkte stimmen mit den in der Literatur angegebenen Werten überein. DNP-DL-Sarkosin Schmp. 186° Zers.; DNP-L-Cysteinsäure Schmp. 174°.

Alle Verbindungen waren papierchromatographisch im System Toluol-Pyridin-Äthylenchlorhydrin-0.8 N Ammoniak (30:9:18:18) und in 1.5-M Phosphatpuffer pH 7 sowie bei der Hochspannungselektrophorese einheitlich.

2. Puffersysteme

Da die absoluten Wanderungsstrecken bei der Elektrophorese ausser vom pH-Wert und der anliegenden Spannung auch von der entwickelten Joule'schen Wärme

TABELLE I

FÜR DIE ELEKTROPHORESE DER DNP-AMINOSÄUREN ANGEWENDETE PUFFERSYSTEME

Die Leitfähigkeitswerte ($\kappa \times 10^3$) liegen zwischen 2 und 6.5. In der letzten Spalte ist die Stromstärke pro cm Streifenbreite zu Beginn und am Ende einer zweistündigen Elektrophorese aufgeführt.

Pyridin (ml)	Eisessig (ml)	Wasser (ml)	pH-Wert	mA/cm
300	9	2400	6.5-6.6	1.2-1.7
40	6	2400	5.9	1.1-1.7
38	32	3000	4.8-4.9	1.6-2.6
19	47	3000	4.2	1.1-1.5
12	158	2400	3.2-3.3	0.8-1.1

Ameisensäure 85% (ml)	Eisessig (ml)	Wasser (ml)	pH-Wert	mA/cm
150	50	2000	1.8-1.9	0.9-1.2

abhängig sind, wurden Puffersysteme annähernd gleicher Leitfähigkeit verwendet (Tabelle I). Die Ergebnisse von Leitfähigkeitsmessungen an dem für die Hochspannungselektrophorese besonders geeigneten Pyridin-Acetatpuffer sind in Fig. 1 und 2 graphisch dargestellt. Messtemperatur 17.5°.

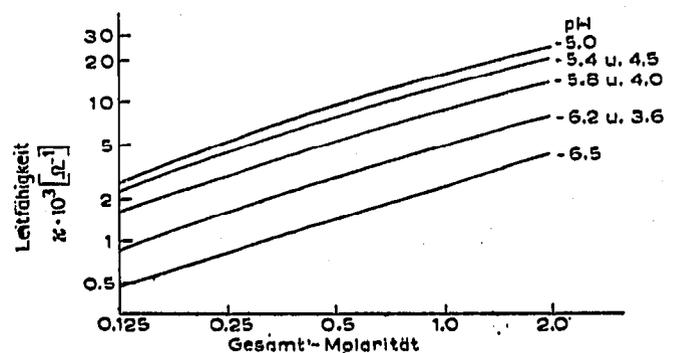
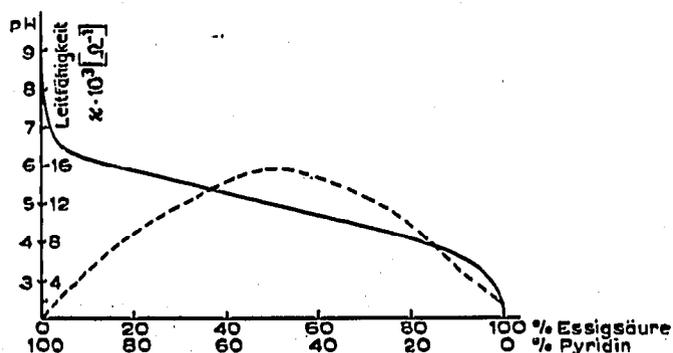


Fig. 1. 2 M Pyridin-Acetatpuffer. Abhängigkeit des pH-Wertes (—) und der Leitfähigkeit κ (---) von der Zusammensetzung.

Fig. 2. Leitfähigkeit κ als Funktion der Verdünnung für Pyridin-Acetatpuffer verschiedener pH-Werte.

3. Hochspannungs-PapierELEKTROPHORESE

Es wurde das an anderer Stelle beschriebene Gerät benutzt²⁰, bei dem der bis 30 cm breite Papierstreifen auf einem von Kühlsole durchströmten Metallblock aufliegt. Papier: Schleicher & Schüll 2043a, getränkt mit dem jeweiligen Puffer und mit einer Walzenpresse nach WERNER UND WESTPHAL²¹ auf einen Feuchtigkeitsgehalt von 120 % des Papiertrockengewichtes gebracht. Auftragungen: kathodenseitig 12 cm vom Rand entfernt, 5 μ l 0.02 M Lösungen der DNP-Aminosäuren in Aceton oder Dimethylformamid, N α -DNP-Lysin und N ϵ -DNP-Lysin in 1 N HCl; Spannung: 4000 V bei 60 cm Streifenlänge Δ 67 V/cm; Versuchsdauer: 120 Min.

ERGEBNISSE

Bei jeder Art der Elektrophorese unterliegen die absoluten Wanderungstrecken der zu trennenden Komponenten gewissen Schwankungen. Sie sind bei gleichen Versuchsbedingungen, wie Feldstärke, Ionenstärke und pH des Puffers, abhängig von der aufgetragenen Substanzmenge infolge gegenseitiger Beeinflussung der Substanzen im Startgemisch sowie über endosmotische Effekte auch vom Auftragsort. Recht konstante Beziehungen erhält man, wenn die Wanderungstrecken auf eine Standardsubstanz bezogen werden. Als solche wurde das DNP-Alanin gewählt und die in Tabelle II aufgeführten relativen Wanderungswege als $R_{DNP-Ala}$ -Werte ausgedrückt. Sie sind das arithmetische Mittel aus mehreren Einzelbestimmungen und zeigen Abweichungen von ± 5 %, in Acetat-Formiatpuffer pH 1.9 bis ± 10 % vom Mittelwert.

Aus dem Totalhydrolysat eines dinitrophenylierten Proteins oder Peptids wird durch Ätherextraktion neben der Gruppe der ätherlöslichen die der säure- bzw. wasserlöslichen DNP-Aminosäuren erhalten. Die chromatographische Differenzierung der DNP-Aminosäuren der wässrigen Phase (DNP-Cysteinsäure, α -DNP-Arginin, α - und ϵ -DNP-Lysin, α -DNP-Histidin und Di-DNP-Histidin) ist infolge des hohen Gehaltes an freien Aminosäuren schwierig und macht deren Abtrennung an einer Hyflo-SuperCel-Säule erforderlich²². Durch Hochspannungselektrophorese der wässrigen Phase oder deren *n*-Butanol-Essigester-Extraktes bei pH 1.9 hingegen gelingt mühelos die Abtrennung der freien Aminosäuren von den DNP-Verbindungen²³; gleichzeitig können letztere an Hand ihrer Position im Pherogramm identifiziert werden. Di-DNP-Histidin bleibt am Start liegen, DNP-Cysteinsäure wandert anodisch heraus, während die monosubstituierten basischen Aminosäuren, bis auf das Paar α -DNP-Arginin/ ϵ -DNP-Lysin gut getrennt, in Richtung Kathode wandern. α -DNP-Arginin und ϵ -DNP-Lysin, deren $R_{DNP-Ala}$ -Werte von Pherogramm zu Pherogramm variieren und in erheblichem Masse von der Auftragsstelle abhängig sind, lassen sich nach Elution durch Rechromatographie auf der Dünnschichtplatte im Toluolsystem oder in reinem Pyridin trennen².

Auch auf die Entfernung des in der ätherlöslichen Fraktion in beträchtlicher Menge enthaltenen Dinitrophenols durch Absublimieren oder Chromatographie an einer Aluminiumoxid-Säule kann verzichtet werden, da Dinitrophenol bei der Hochspannungselektrophorese im pH-Bereich von 1.9 bis 6.5 am Auftragsort liegen bleibt. Somit ist eine Differenzierung gegenüber DNP-Valin, DNP-Methionin und DNP-Prolin möglich, die dünnschichtchromatographisch Schwierigkeiten bereitet. DNP-Methionin wird nach H₂O₂-Oxydation zum Sulfon durch Elektrophorese bei

TABELLE II

RELATIVE WANDERUNGSSTRECKEN VON DNP-AMINOSÄUREN, BEZOGEN AUF DNP-ALANIN = 1
Bei Wanderung in Richtung Kathode sind die *R*-Werte mit positivem Vorzeichen versehen. Experimentelle Daten siehe unter Methodik.

<i>DNP-Alanin abs. (cm)</i>	13.7	19.0	15.7	16.3	14.3	4.2
<i>pH</i>	6.5-6.6	5.9	4.8-4.9	4.2	3.2-3.3	1.8-1.9
<i>DNP-Aminosäure</i>						
DNP- α -AnB*	0.97	0.97	0.93	0.91	0.88	0.90
DNP- β -Ala	0.98	0.92	0.75	0.48	0.18	0.20
DNP-Asp	1.74	1.67	1.56	1.28	0.97	1.01
DNP-Asp(NH ₂)	0.85	0.87	0.83	0.82	0.83	0.69
DNP-Glu	1.62	1.51	1.24	1.03	0.66-0.87	1.09
DNP-Glu(NH ₂)	0.86	0.83	0.83	0.86	0.89	0.96
DNP-Gly	0.98	0.90	0.86	0.82	0.79	0.77
DNP-Hydro	0.93	1.00	1.01	1.05	1.11	1.41
DNP-Leu	0.90	0.88	0.86	0.86	0.83	1.01
DNP-Met	0.83	0.89	0.84	0.83	0.45-0.89	0.88
DNP-Met·O	0.88	0.91	0.91	0.96	1.04	1.41
DNP-Met·O ₂	0.90	0.92	0.92	0.96	1.02	1.43
DNP-Phe	0.73	0.68	0.61	0.61	0.24-0.69	0.86
DNP-Pro	0.96	0.98	0.99	1.02	1.04	1.11
DNP-Sar	1.09	1.08	1.07	1.00	0.91	0.69
DNP-Ser	0.94	0.94	0.93	0.94	0.98	1.09
DNP-Thr	0.91	0.93	0.92	0.94	0.96	1.09
DNP-Try	0.40	0.37	0.26	0.24	0.27	0.31
DNP-Val	0.92	0.91	0.92	0.93	0.91	1.02
Di-DNP-CySH	0.38	0.27	0.20	0.18	0.25	0.36
Di-DNP-(Cys) ₂	0.96	0.31-0.84	0.50	0.21	0	0
Di-DNP-Lys	0.38	0.23	0.15	0.06	0.05	0
Di-DNP-Orn	0.45	0.32	0.24	0.27	0.23	0
Di-DNP-Tyr	0.02	0	0	0	0	0
DNP-CySO ₃ H	1.88	1.90	2.07	2.13	2.01	4.30
α -DNP-Arg	+0.05	+0.02	+0.04	0.01	+0.04	+2.9
α -DNP-Lys	+0.46	+0.70	+0.62	+0.75		+11.0
ϵ -DNP-Lys	+0.05	+0.02	+0.03	0.01	+0.04	+2.8
α -DNP-His	+0.07	+0.40	+0.57	+0.70		+8.0
Di-DNP-His	0.45	0.36	0.25	0.19	0	0

* α -AnB = α -Amino-*n*-buttersäure.

pH 1.9 von allen anderen ätherlöslichen DNP-Aminosäuren, bis auf DNP-Hydroxyprolin, getrennt.

DNP-Tryptophan und die disubstituierten Aminosäuren, vornehmlich Di-DNP-Lysin, Di-DNP-Ornithin und Di-DNP-Cystein, ziehen vom Start weg Schwänze nach sich und erschweren die hochspannungselektrophoretische Auftrennung. DNP-Phenylalanin, DNP-Glutaminsäure und DNP-Methionin bilden bei pH 3.2-3.3 länger gezogene Flecke, die in dem in Tabelle II aufgeführten $R_{DNP-Ala}$ -Bereich liegen. DNP-Phenylalanin lässt sich jedoch besser bei pH 5 und DNP-Glutaminsäure im Neutralbereich charakterisieren. Die *R*-Werte in Boratpuffer pH 8.6 stimmen mit denen in Pyridin-Acetatpuffer pH 6.5 überein. Eine Ausnahme macht DNP- β -Alanin mit einem *R*-Wert von 0.15. Die Trenneffekte sind auf Grund lang gezogener Flecke jedoch durchweg schlechter als in den Puffersystemen der Tabelle I.

Abschliessend lässt sich sagen, dass die Papierelektrophorese der DNP-Aminosäuren bei hohen Potentialen geeignet ist, neben chromatographischen Verfahren bei der Bearbeitung spezieller Trennprobleme eingesetzt zu werden.

ZUSAMMENFASSUNG

Unter Verwendung von Pyridin-Acetatpuffer und Acetat-Formiatpuffer gleicher Leitfähigkeit wurde die elektrophoretische Beweglichkeit von 31 DNP-Aminosäuren im pH-Bereich von 1.8–6.5 bei Potentialen von 67 V/cm untersucht.

Die relativen Wanderungstrecken sind auf DNP-Alanin bezogen und als $R_{DNP-Ala}$ -Werte tabellarisch aufgeführt.

Möglichkeiten des Einsatzes der Hochspannungs-Papierelektrophorese zur Trennung der wasser- und ätherlöslichen DNP-Aminosäuren werden aufgezeigt.

SUMMARY

The electrophoretic mobilities of 31 DNP-amino acids in pyridine-acetate buffers and in acetate-formate buffer, all of approximately the same conductivity, were determined in the pH range from 1.8 to 6.5, at a potential of 67 V/cm.

The distances travelled were measured relative to that of DNP-alanine and tabulated as $R_{DNP-Ala}$ values.

Possible applications of high-voltage paper electrophoresis to the separation of water-soluble and ether-soluble DNP-amino acids are discussed.

LITERATUR

- 1 G. BISERTE, J. W. HOLLEMAN, J. HOLLEMAN-DEHOVE UND P. SAUTIERE, *Chromatog. Rev.*, 2 (1960) 59.
- 2 M. BRENNER, A. NIEDERWIESER UND G. PATAKI, *Experientia*, 17 (1961) 145.
- 3 L. KESNER, E. MUNTWYLER, G. E. GRIFFIN UND J. ABRAMS, *Anal. Chem.*, 35 (1963) 83.
- 4 F. LUCAS, J. T. B. SHAW UND S. G. SMITH, *Anal. Biochem.*, 6 (1963) 335.
- 5 N. A. MATHESON, *Biochem. J.*, 88 (1963) 146.
- 6 H. STEUERLE UND E. HILLE, *Biochem. Z.*, 331 (1959) 220.
- 7 E. HILLE, *Biochem. Z.*, 333 (1960) 269.
- 8 W. GRASSMANN, H. HÖRMANN UND H. VON PORTATIUS, *Z. Physiol. Chem.*, 321 (1960) 120.
- 9 T. SEKI, *J. Biochem.*, 47 (1960) 253.
- 10 J. J. PISANO, W. J. A. VANDENHEUVEL UND E. C. HORNING, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 7 (1962) 82.
- 11 A. R. BATTERSBY UND L. C. CRAIG, *J. Am. Chem. Soc.*, 74 (1952) 4023.
- 12 R. R. REDFIELD UND C. B. ANFINSEN, *J. Biol. Chem.*, 221 (1956) 387.
- 13 W. W. THORNBURG, L. N. WERUM UND H. T. GORDON, *J. Chromatog.*, 6 (1961) 131.
- 14 C. B. ANFINSEN, M. SELA UND H. TRITCH, *Arch. Biochem. Biophys.*, 65 (1956) 156.
- 15 R. L. MUNIER UND G. SARRAZIN, *J. Chromatog.*, 12 (1963) 542.
- 16 A. L. LEVY, *Methods Biochem. Anal.*, 2 (1955) 381.
- 17 R. R. PORTER UND F. SANGER, *Biochem. J.*, 42 (1948) 287.
- 18 A. NEUBERGER UND F. SANGER, *Biochem. J.*, 37 (1943) 515.
- 19 H. ZAHN UND H. PFANNMÜLLER, *Biochem. Z.*, 330 (1958) 97.
- 20 S. FITTKAU, *Pharmazie*, 18 (1963) 678.
- 21 G. WERNER UND O. WESTPHAL, *Angew. Chem.*, 67 (1955) 251.
- 22 K. BAILEY UND F. R. BETTELHEIM, *Biochim. Biophys. Acta*, 18 (1955) 495.
- 23 S. FITTKAU, H. HANSON, I. MARQUARDT, H. DIESSNER UND U. KETTMANN, *Z. Physiol. Chem.*, 338 (1964) 180.