

CHROM. 10,261

Note

Darstellung und gaschromatographische Trennung von N,N-Dimethylaminosäurebutylestern

Th. SEVERIN und H. POPP-GINSBACH

Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität München, Sophienstr. 10, D-8000 München 2 (B.R.D.)

(Eingegangen am 5. April 1977; geänderte Fassung eingegangen am 27. Mai 1977)

Kaiser *et al.*¹ sowie andere Arbeitskreise²⁻⁵ haben in den vergangenen Jahren eingehende Untersuchungen über Möglichkeiten zur gaschromatographischen (GC) Analyse von Aminosäuren veröffentlicht. Da Aminosäuren nicht unzersetzt flüchtig sind, ist eine Derivatisierung notwendig. Als besonders geeignet erwiesen sich die N-Trifluoracetylaminosäurebutylester¹; aber auch andere Acylgruppen und Esterkomponenten wurden herangezogen²⁻⁹. Überträgt man das Verfahren auf Peptide, so gelangt man rasch in einen Bereich, wo die Flüchtigkeit derartig derivatisierter Verbindungen für eine GC-Bestimmung nicht mehr ausreicht. Zur Trennung von Peptiden hat man daher verestert, mit Trifluoroacethydrid umgesetzt und dann alle Säureamidgruppen mit Natriumhydrid und Methyljodid methyliert¹⁰.

Bei unseren Untersuchungen über Umsetzungen in erhitzten Lebensmitteln suchten wir ein einfaches Verfahren zur Umwandlung von Aminosäuren bzw. ihrer Reaktionsprodukte mit Zuckern in leicht flüchtige Derivate. Bei Verbindungen unbekannter Struktur sollte die Derivatisierung eine Interpretation der verschiedenen Spektren (MS, IR, NMR) möglichst erleichtern. So ergab sich u.a. das Problem, Reaktionsprodukte reduzierender Zucker mit peptidgebundenem Lysin zu analysieren.

Aus der präparativen organischen Chemie ist bekannt, dass Amine mit Formaldehyd und Natriumcyanoborhydrid methylierbar sind¹¹. Wir haben auf diese Weise Aminosäurebutylester (und -methylester) zu N,N-Dimethylderivaten umgesetzt und die so erhaltenen Verbindungen gaschromatographisch getrennt.

Schon früher behandelte Bowman¹² Aminosäuren mit Formaldehyd in Wasserstoffatmosphäre und stellte so N,N-Dimethylaminosäuren her.

EXPERIMENTELLES

Derivatbildung

Etwa 1 g eines Aminosäuregemisches wird mit 100 ml 3 N HCl in *n*-Butanol 30 min auf 100° erhitzt. Man dampft anschliessend im Vakuum zur Trockne ein, nimmt den Rückstand mit 10 ml Wasser auf und versetzt mit 9 ml Formaldehyd (40% in Wasser). Diese Lösung wird langsam zu 1.1 g Natriumcyanoborhydrid ge-

geben (nicht umgekehrt!)* und der pH-Wert des Reaktionsgemisches mit 3 *N* Salzsäure auf 7–8 eingestellt. Man lässt 30 min stehen, stellt, wenn nötig den pH-Wert erneut auf 7–8 ein und extrahiert dann die Lösung dreimal mit je 20 ml Methylenchlorid. Die vereinigten Methylenchloridextrakte werden über Natriumsulfat getrocknet und anschliessend im Vakuum auf 2–3 ml eingeeengt. Dieser Rückstand wird mit 3 ml eines Gemisches aus Pyridin und Acetanhydrid (4:1) versetzt. Man schüttelt kräftig, lässt 5 min stehen und gaschromatographiert. Diese Methode eignet sich auch zur Derivatisierung von kleineren Substanzmengen.

Gaschromatographie

Die GC-Bedingungen waren: Varian Aerograph Series 2800, Flammenionisations-detektor; Injektor-Temperatur, 220°; Detektor-Temperatur, 220°; Trägergas (Stickstoff), 25 ml/min; Luft, 300 ml/min; Wasserstoff, 30 ml/min.

Die folgende Säulen wurden verwendet: 5% SE-30 auf Chromosorb W AW DMCS (60–80 mesh), 4 m × 1/8 Zoll; 2.5% SP-1000 auf Chromosorb G AW DMCS (80–100 mesh), 1.8 m × 1/8 Zoll; 5% Apiezon M auf Chromosorb W AW (80–100 mesh), (2 m × 1/8 Zoll); 5% OV-17 auf Chromosorb W AW DMCS (80–100 mesh), 2 m × 1/8 Zoll.

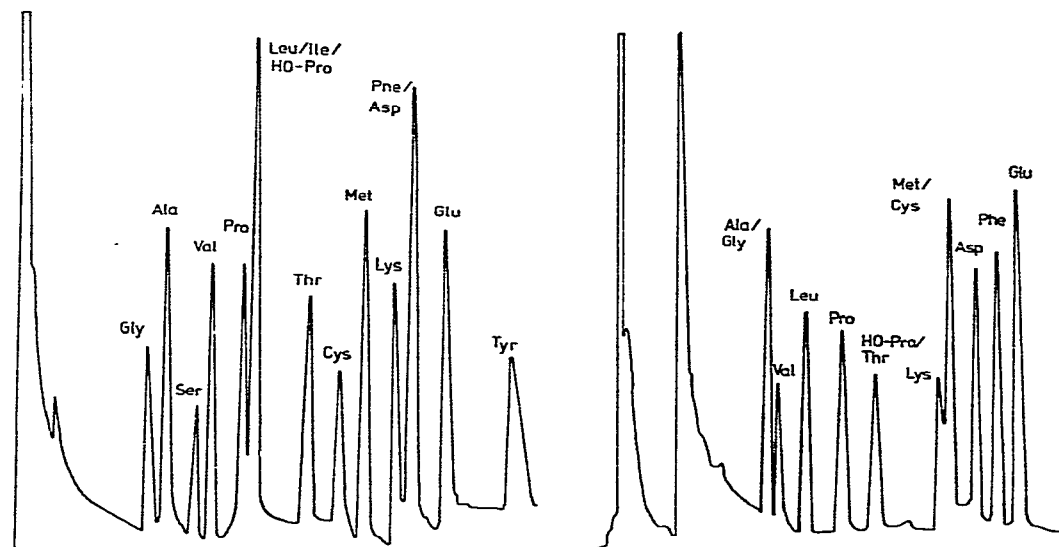


Fig. 1. GC-Trennung von *N,N*-Dimethylaminosäurebutylestern. Säule, 5% SE-30 auf Chromosorb W AW DMCS (60–80 mesh), 4 m × 1/8 Zoll. Anfangstemperatur, 60°; Temperaturrate, 4°/min; nach 25 min Temperaturrate, 6°/min.

Fig. 2. GC Trennung von *N,N*-Dimethylaminosäurebutylestern. Säule, 2.5% SP-1000 auf Chromosorb G AW DMCS (80–100 mesh) 1.8 m × 1/8 Zoll. Anfangstemperatur, 60°; Temperaturrate, 4°/min.

* Gibt man Natriumcyanoborhydrid zu dem Reaktionsgemisch, so können in stärkerem Umfang Nebenprodukte entstehen.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Aminosäurebutylester und -methylester sind mit Formaldehyd und Natriumcyanoborhydrid unter den von uns angewandten Bedingungen quantitativ methylierbar. Eine Prüfung am Beispiel des Alanins und Phenylalanins ergab, dass die Ausbeuten einschliesslich Veresterung über 95% liegen. Im Histidin wird der heterocyclische Ring nicht angegriffen, Tryptophan blieb unberücksichtigt, da sich diese Aminosäure bei saurer Hydrolyse von Proteinen zersetzt. Unbefriedigende Ergebnisse wurden mit Arginin erhalten; d.h. hier blieb die N-Methylierung unvollständig. Viele der natürlich vorkommenden Aminosäuren lassen sich nach Veresterung und N-Methylierung gaschromatographisch auftrennen. Dabei treten jedoch bei Verwendung einfacher Säulen von 2 m Länge einige Überlagerungen auf. Auf OV-17 z.B. werden Leucin und Isoleucin, Glutaminsäure und Methionin sowie Lysin und Phenylalanin nicht getrennt. Auf SP-1000 erscheinen Glycin und Alanin als ein Peak (Lysin und Methionin werden dagegen getrennt).

Einige Aminosäuren mit weiteren funktionellen Gruppen im Molekül, insbesondere Cystein, Serin, Threonin und Tyrosin konnten auf diese Weise nicht befriedigend erfasst werden. Daher haben wir zusätzlich mit Essigsäureanhydrid acetyliert¹³. Die Abbildungen zeigen Gaschromatogramme von Aminosäuregemischen, die zunächst verestert, dann N-methyliert und acetyliert wurden.

Auf einer 5% SE-30-Säule von 4 m Länge werden die Aminosäuren Phe und Asp sowie Leu, Ile und HO-Pro nicht getrennt. Auf einer 2.5% SP 1000-Säule (1.8 m) lassen sich Phe und Asp trennen. Dagegen erscheinen Met und Cys, Thr und HO-Pro sowie Gly, Ala und Ser jeweils als ein Peak. Auf einer 5% Apiezon M-Säule (2 m) überlagern sich die Paare Glu und Lys, Val und Pro, Ala und Ser sowie Leu, Ile und HO-Pro.

Aus der Gruppe der Peptide haben wir Alanylphenylalanin als Methylester mit Formaldehyd und Natriumcyanoborhydrid umgesetzt. Dabei wird nur die endständige Aminogruppe angegriffen; die Säureamidgruppe bleibt unverändert. Das auf diese Weise erhaltene Reaktionsprodukt ist gaschromatographisch leicht erfassbar.

Über die Anwendung dieses Verfahrens zur Untersuchung von Lebensmitteln werden wir gesondert berichten.

LITERATUR

- 1 F. E. Kaiser, C. W. Gehrke, R. W. Zumwalt und K. C. Kuo, *J. Chromatogr.*, 94 (1974) 113.
- 2 R. F. Adams, *J. Chromatogr.*, 95 (1974) 189.
- 3 B. Blessington und N. I. Y. Fiagbe, *J. Chromatogr.*, 68 (1972) 259.
- 4 M. Makita, S. Yamamoto und M. Kōno, *J. Chromatogr.*, 120 (1976) 129.
- 5 S. L. MacKenzie und D. Tenaschuk, *J. Chromatogr.*, 97 (1974) 19.
- 6 M. Makita, S. Yamamoto, K. Sakai und M. Shiraishi, *J. Chromatogr.*, 124 (1976) 92.
- 7 S. L. MacKenzie und D. Tenaschuk, *J. Chromatogr.*, 104 (1975) 176.
- 8 S. L. MacKenzie und D. Tenaschuk, *J. Chromatogr.*, 111 (1975) 413.
- 9 J. F. March, *Anal. Biochem.*, 69 (1975) 420.
- 10 H. Nau, *J. Chromatogr.*, 121 (1976) 376.
- 11 R. F. Borch, M. D. Bernstein und H. D. Durst, *J. Amer. Chem. Soc.* 93 (1976) 2897.
- 12 R. E. Bowman, *J. Chem. Soc.*, (1950) 1349.
- 13 J. R. Coulter und C. S. Hann, *J. Chromatogr.*, 36 (1968) 42.