

CHROM. 11,742

Note

Identifizierung seltener Aminosäuren durch Mikrodansylierung

HARTMUT LAATSCH

Organisch-Chemisches Institut der Universität Göttingen, Tammannstrasse 2, D-3400 Göttingen (B.R.D.)

(Eingegangen am 8. Dezember 1978)

Durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie ihrer fluoreszierenden 5-Dimethylaminonaphthalin-1-sulfonyl-(Dansyl-)derivate lassen sich Aminosäuren mit freien Amino- oder phenolischen Hydroxylgruppen besonders an Polyamid schnell und mit grosser Treffsicherheit identifizieren. Die Dansylierung gehört deshalb inzwischen zu den Standardmethoden der Aminosäure- und Peptidanalytik, wie zahlreiche Publikationen und mehrere Zusammenfassungen zeigen^{1–3}.

Da die bisherigen Arbeiten über Dansylierungen überwiegend physiologisch-chemisch orientiert sind, wurden fast ausschliesslich Aminosäuren untersucht, wie sie in höheren Organismen vorkommen ("physiologische" Aminosäuren). Bei der Analyse mikrobieller Peptide ist dagegen auch mit ungewöhnlichen Säuren zu rechnen, deren Dansylderivate selbst in ausführlicheren chromatographischen R_F -Karten^{4,5} nicht enthalten sind. Bisher war deshalb die chromatographische Analyse z.B. eines Peptidantibiotikums wenig aussagekräftig, da die Gefahr von Fehlinterpretationen durch mangelnde Kenntnis des chromatographischen Verhaltens seltener Aminosäuren gross war.

Mit der vorliegenden Untersuchung über die Dansylierung von 90 Aminosäuren und 11 weiter möglicher Analysen-Bestandteile (z.B. Aminozyucker) wird begonnen, diese Lücke zu schliessen.

EXPERIMENTELLES

Methodik

Für zweidimensionale Trennungen an Polyamid besonders bewährt hat sich ein von Schulze und Neuhoff^{6,7} angegebenes Laufmittelsystem, das mehr als 60 der hier untersuchten Dansylderivate schon an 3×3 cm Polyamidfolien nach zweimaliger Entwicklung reproduzierbar auftrennt (Fig. 1 und 2) und neben der Materialersparnis durch das kleine Folienformat den Vorteil kurzer Entwicklungszeiten bietet.

Experimente

100 μ l der zu untersuchenden Aminosäuremischung (jeweils etwa 0.5 mM in 0.05 M NaHCO_3 -Puffer, pH 10.0) wurden mit 250 μ l einer frischen Dansylchlorid-Lösung in Aceton (2.7 mg/ml) vermischt und 30 min bei 37° aufbewahrt. Von dieser Lösung wurden 0.1–0.5 μ l zur Chromatographie mit einer dünn ausgezogenen Glas-

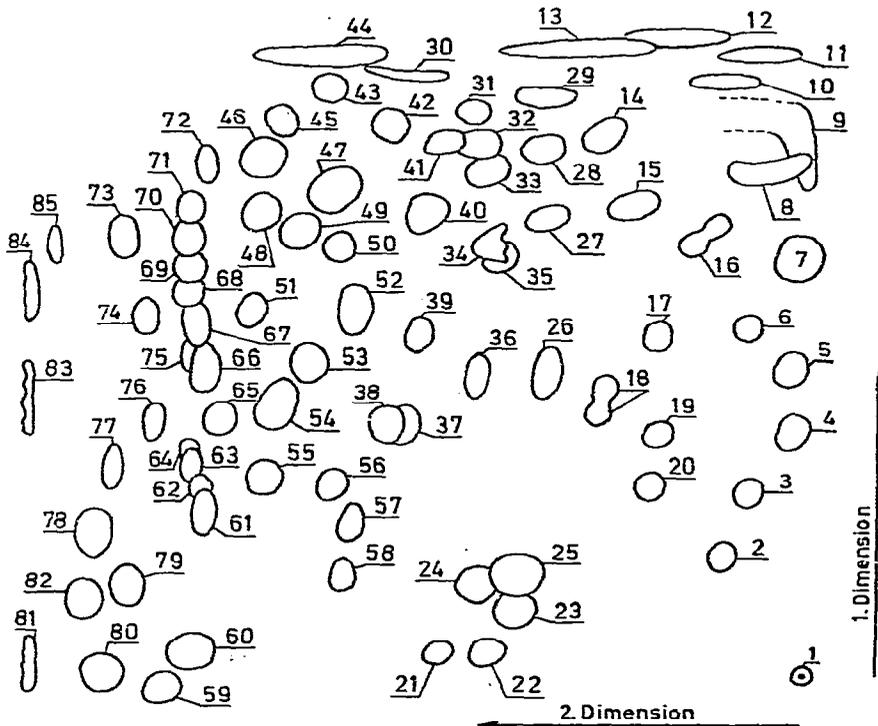


Fig. 1. Fleckkarte der Dansylderivate. Chromatographie in der 1. Dimension in 4 Vol.-% Ameisensäure in Wasser, in der 2. Dimension in 20 Vol.-% Eisessig in Benzol. 1 = Start, 2 = Cystin, 3 = 5-Hydroxytryptophan*, 4 = Taurin, 5 = Cysteinsäure, 6 = *meso*-Diaminobornsteinsäure, 7 = Dansylsulfonsäure (blau), 8 = β -Aminoäthan-phosphonsäure, 9 = Dansylsulfinsäure (blau), 10 = α -Aminoäthanphosphonsäure, 11 = Arginin, Canavanin, Cystin*, *meso*-Diaminobornsteinsäure*, Diaminopimelinsäure*, Glucosamin, δ -Hydroxylysin*, Mannosamin, 12 = *erythro*- und *threo*-2,3-Diaminobuttersäure*, Diaminopropionsäure*, Histidin*, 13 = 1-Methylhistidin, 14 = Serin, 15 = Asparaginsäure, 16 = 3,4-Dihydroxyphenylalanin* (gelb), 3,4-Dihydroxyphenyl- α -methylalanin* (gelb), 17 = Carboxymethylcystein, 18 = Diaminopimelinsäure, 19 = Tyrosin*, 20 = Cystathionin, *allo*-Cystathionin, 5-Hydroxytryptophan* (gelb), 21 = 5-Hydroxytryptophan (gelb), 22 = 3,5-Dijodtyrosin, 23/24 = 3,4-Dihydroxyphenylalanin* (gelb), 25 = Tryptophan, 26 = δ -Hydroxylysin, 27 = Glutaminsäure, 28 = Citrullin*, Methionindioxid, Homoserin, Threonin, *allo*-Threonin, 29 = Asparagin, 30 = Histidin* (gelb), 31 = Glutamin, 32 = Methylthreonin, 33 = 4-Hydroxyprolin, 34 = Tyrosin* (gelb), α -Methyl-*p*-tyrosin* (gelb), α -Methyl-*m*-tyrosin (gelb), 35 = Methylglutaminsäure, 36 = Diaminopropionsäure, 37 = 2,4-Diaminobuttersäure, *threo*-2,3-Diaminobuttersäure, 38 = Ornithin, 39 = β -Hydroxyaleucin, 40 = Glycin, 41 = γ -Amino- β -hydroxybuttersäure, 42 = Hydroxyvalin, 43 = Methioninoxid, 44 = 3-Methylhistidin, 45 = Ethanolamin, 46 = *O*-Methylserin, 47 = Ammoniak (blau), 48 = β -Alanin, 49 = Alanin, 50 = β -Aminopimelinsäure, 51 = α - und γ -Aminobuttersäure, 52 = *erythro*-2,3-Diaminobuttersäure, 53 = Pyroglutaminsäure** (gelb), 54 = Methionin, 55 = Phenylalanin, 56 = α -Phenylglycin, 57 = Lysin, 58 = 3,4-Dihydroxyphenylalanin* (gelb), 3,4-Dihydroxyphenyl- α -methylalanin (gelb), 59 = 3,4-Dihydroxyphenylalanin (gelb), 60 = Tyrosin (gelb), 61 = Histidin (gelb), Norleucin, 62 = Leucin, 63 = Isoleucin, 64 = *allo*-Isoleucin, 65 = Norvalin, 66 = Valin, 67 = δ -Aminovaleriansäure, 68 = β -Aminoisobuttersäure, Sarkosin, 69 = *N*-Methylalanin, 70 = β -Aminobuttersäure, α -Aminoisobuttersäure, 71 = *O*-Methylvalin, 72 = Diethanolamin, γ -Aminobuttersäureamid*, 73 = α -Methyl-*p*-tyrosin (blau), 74 = Prolin, 75 = Isovalin, 76 = ϵ -Aminocaprönsäure, 77 = Pipecolinsäure, 78 = *N*-Methylvalin, 79 = *N*-Methylphenylalanin, 80 = α -Methyl-*m*-tyrosin (gelb), 81 = 5-Methoxytryptophan (blau), 82 = *N*-Methylisoleucin, *N*-Methylleucin, 83 = Diethylamin, γ -Aminobuttersäurelactam**, 84 = Dimethylamin, 85 = Methylamin. Keine Dansylderivate wurden erhalten aus: 4-Aminobenzoesäure, 2-Aminobenzoesäure, γ -Aminobuttersäurelactam**, Kreatin, Kreatinin, Picolinsäure, Pyroglutaminsäure**, Pyrrolcarbonsäure und Valerolactam. * = Teildansyliert; ** = Derivat bildet sich nur über die Dansyl-aminosäure.

kapillare in der rechten unteren Ecke (je 2 mm vom Rand entfernt) einer 3×3 cm Polyamidfolie (Mikropolyamid F 1700; Schleicher und Schüll, Dassel, B.R.D.) punktförmig aufgetragen. Die Entwicklung erfolgte in der ersten Dimension in 4 Vol.-% Ameisensäure in Wasser, und nach Zwischentrocknung in der zweiten Dimension mit 20 Vol.-% Essigsäure in Benzol. Die Chromatogramme wurden nach dem Trocknen im UV-Licht bei 366 nm ausgewertet.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Da aus mehrfach dansylierbaren Aminosäuren mit Reagenzunterschuss Gemische aus teil- und perdansylierten Verbindungen entstehen können, waren aus den hier untersuchten Substanzen mehr als 120 Dansylderivate zu erwarten. Die Teildansylierung kann daher zu erheblich unübersichtlicheren Chromatogrammen

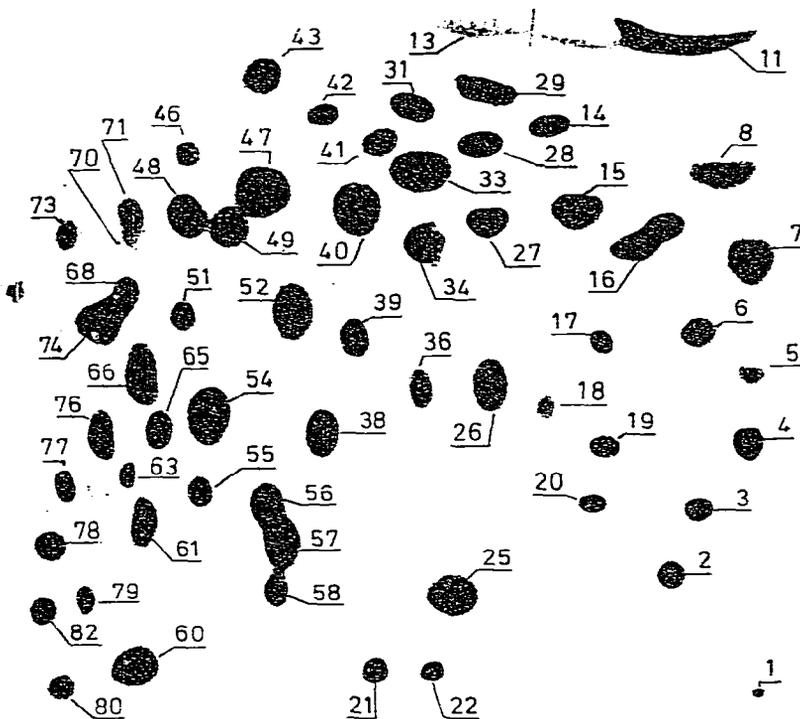


Fig. 2. Chromatogramm einer teildansylierten Mischung aus 52 Komponenten an 3×3 cm Mikropolyamid. Bezifferung wie in Fig. 1.

als die Untersuchung ausdansylierter Mischungen führen. So sind z.B. durch Teildansylierung von 3,4-Dihydroxyphenylalanin sieben Dansylderivate zu erwarten, von denen sich sechs nachweisen liessen. Die Reaktion mit Reagenzüberschuss führt dagegen zu einem einzigen Produkt. Die Chromatographie teildansylierter Proben kann dennoch sinnvoll sein, da sich bestimmte Aminosäuren (z.B. Histidin, 5-Hydroxytryptophan, Tyrosin) eindeutig anhand ihrer charakteristisch angeordneten, geformten (Fleck 34, Fig. 1), oder in bestimmten Farben fluoreszierenden Monodansylflecken zuordnen lassen.

Trotz der grossen Trennschärfe war eine vollständige Unterscheidung aller untersuchten per-Dansylaminosäuren selbst auf 5×5 cm Folien nicht möglich und es ist fraglich, ob die Trennung bei der hohen Fleckdichte im Chromatogramm durch andere Laufmittelsysteme wesentlich verbessert werden kann. So sind z.B. die polaren hydrophilen Aminosäuren im rechten oberen Quadranten des Chromatogramms (Fig. 1) nur zum Teil unterscheidbar: mit gleichem R_F -Wert wie Threonin laufen Homoserin, Methioninoxid, Citrullin und *allo*-Threonin, von denen letzteres sich auch im Aminosäureanalysator ("physiologischer Lauf") wie Threonin verhält.

In der zweiten Dimension zeigen 11 Aminosäuren (61–72) gleichen R_F -Wert und werden nur unvollständig getrennt.

Die annähernd sichere Identifizierung eines Fluoreszenzflecks im Chromatogramm gelingt daher nur durch folgende Arbeitsweise.

(a) Der zu untersuchenden Dansyl-Aminosäuremischung werden mehrere bekannte Dansyl-Aminosäuren mit ähnlichem chromatographischen Verhalten als Bezugssubstanzen zugemischt, wobei nach Chromatographie ein Muster von Referenzpunkten entsteht, das einem Ausschnitt der Fig. 1 entsprechen muss*.

(b) Die nun mit Hilfe der R_F -Karte zugeordnete Säure der Untersuchungssubstanz muss im Gemisch mit einem authentischen Vergleichspräparat bei Identität dessen Fluoreszenzfleck verstärken und völlig überdecken.

(c) Bei R_F -Werten, denen mehrere Säuren zugeordnet werden können, ist der entsprechende Fluoreszenzfleck auszukratzen und sein Inhaltsstoff in einem zweiten Laufmittelsystem zu rechromatographieren⁸.

Während die zweifelsfreie Identifizierung einer Aminosäure durch Chromatographie ihres Dansylderivates schwierig ist und die Untersuchung weiterer, hier noch nicht aufgeführter Säuren und neuer Laufmittelsysteme verlangt, können andererseits alle diejenigen Aminosäuren mit grosser Sicherheit ausgeschlossen werden, für die an entsprechender Stelle im Chromatogramm keine Fluoreszenz beobachtet wird. Dies begründet den besonderen Wert der Dansylmethode bei Untersuchungen auf seltene Aminosäuren.

DANK

Den Herren Prof. Dr. H. Brockmann, Doz. Dr. A. Zeeck, Dr. K. Frobél (Universität Göttingen), Prof. Dr. V. Neuhoff und Dr. E. Schulze (Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin, Göttingen) danke ich für Proben seltener Aminosäuren. Herr H.-G. Zimmer hat freundlicherweise das Chromatogramm (Fig. 2) fotografiert⁹.

REFERENCES

- 1 V. Neuhoff, in V. Neuhoff (Herausgeber), *Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics*, Band 14, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1973, S. 85.
- 2 N. Seiler, *Methods Biochem. Anal.*, 18 (1970), 259.

* In Abhängigkeit von der Foliencarge, Schwankungen der Temperatur oder Laufmittelzusammensetzung (Verdampfungsverluste) können sich gegenüber Fig. 1 abweichende R_F -Werte ergeben. Die relative Lage der Flecken zueinander bleibt jedoch konstant; siehe auch Lit. 1.

- 3 J. Rosmus und Z. Deyl, *Chromatogr. Rev.*, 13 (1971) 163.
- 4 R. L. Munier und A. M. Drapier, *Chromatographia*, 5 (1972) 306.
- 5 R. L. Munier und C. Gervais, *Chromatographia*, 8 (1975) 410.
- 6 E. Schulze und V. Neuhoff, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 357 (1976) 225.
- 7 E. Schulze und V. Neuhoff, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 357 (1976) 593.
- 8 V. Neuhoff, in V. Neuhoff (Herausgeber), *Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics*, Band 14, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1973, S. 115.
- 9 H.-G. Zimmer und V. Neuhoff, *G-I-T Fachz. Lab.*, (1977) 104.