
Zakład Chemii Ogólnej, Instytut Chemii Podstawowych, Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: prof. dr hab. Stanisław Biliński
Pracownia Technologiczna Zakładu Chemii Nieorganicznej, Instytut Chemii Podstawowych,
Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: dr Tadeusz Wolski

Jerzy ISKIERKO, Andrzej GÓRSKI,
Tadeusz WOLSKI

Zastosowanie odczynników derywatyzujących do analizy chromatograficznej krótkich peptydów

Применение реактивов, образующих производные, для хроматографического анализа коротких пептидов

The Application of Derivatizing Reagents for Chromatographic Analysis of Short Peptides

Chromatograficznemu rozdzielaniu peptydów poświęcone są prace wielu autorów (4, 9). Moore i Baker (8) wyznaczyli R_F szeregu syntetycznych peptydów o znanej sekwencji rozdzielanych metodą chromatografii bibułowej w różnych układach rozpuszczalników. Cytowani wyżej autorzy, stosując wprowadzone przez Pardee (9) równanie matematyczne, próbowali na podstawie składu aminokwasowego określać teoretycznie R_F badanych peptydów i porównywali je z wynikami uzyskanymi doświadczalnie. Problemy izolacji i rozdzielania krótkich peptydów nabrały szczególnego znaczenia w ostatnich kilkunastu latach, co wiąże się z wykryciem i wyizolowaniem z materiału biologicznego wielu peptydów spełniających funkcje hormonów i antybiotyków (10). Poznano szereg neurotransmitterów peptydowych odpowiedzialnych za różne funkcje organizmu. Burzyński i wsp. (1, 2) wyizolowali z moczu ludzkiego krótkie peptydy blokujące biosyntezę tkanki nowotworowej. Zostały one nazwane antyneoplastonami.

Z rozdzieleniem i izolacją peptydów pochodzących z częściowej hydrolizy białek wiąże się postęp w dziedzinie badań ich struktury pierwszorzędowej (4). Istnieją trudności w chromatograficznym rozdzielaniu krótkich peptydów metodą chromatografii bibułowej i cienkowsarstwowej. Dotyczy to przede wszystkim peptydów o takim samym składzie aminokwasowym, a różnej sekwencji.

W poszukiwaniu lepszych wyników rozdzielania krótkich peptydów metodą analizy chromatograficznej przeprowadzono je w odpowiednie pochodne. Jako odczynniki derywatyzujące zastosowano: chlorek kwasu 5-dwumetyloaminonafthaleno-1-

sulfonowego (DANS-Cl), chlorek kwasu 4-N,N-dwumetyloaminoazobenzenu-4'-sulfonowego (DABS-Cl) (3, 7) oraz chlorek kwasu 4-N,N-dwumetyloamino-benzeno-azonaftaleno-4'-sulfonowego (DBNS-Cl) (14). DANS-Cl daje pochodne aminokwasów peptydów i białek, które identyfikuje się w świetle UV. Przy częstym stosowaniu chromatografii cienkowarstwowej w analizie aminokwasów ważnym problemem jest czułość i łatwość detekcji rozdzielanych pochodnych. Wymogi te spełniają zarówno DABS-Cl, jak i DBNS-Cl, których pochodne są łatwo wykrywalne w świetle widzialnym. DABS-Cl jako odczynnik grupowy dla aminokwasów został zastosowany po raz pierwszy w r. 1975 przez Lin i Chianga (7). Preparatyką i rozdziałem DABS-pochodnych aminokwasów zajmowali się również Wolski i wsp. (12, 13). Opracowali też prostszą metodę otrzymywania DABS-Cl (15).

Celem przedstawionej pracy jest optymalizacja warunków chromatograficznego rozdziału dwupeptydów o takim samym składzie aminokwasowym, a różnej sekwencji w postaci ich DANS-, DABS- i DBNS-pochodnych oraz trójpeptydów posiadających pewien stały fragment cząsteczki, tzn. identyczne N- i C-końcowe aminokwasy, a różne środkowe, bądź różniące się tylko N-końcowym aminokwasem przy pozostałym takim samym fragmencie molekuly. Starano się wyjaśnić wpływ sekwencji aminokwasowej na współczynniki R_F . Określić, który z aminokwasów N-, czy C-końcowy przy takim samym pozostałym fragmencie peptydu ma większy wpływ na wartości współczynników R_F .

CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Odczynniki

Do badań użyto następujących dwupeptydów, wysyntetyzowanych w Zakładzie Chemii Peptydów Uniwersytetu Warszawskiego:

- Gli-Asp — glicylo-asparaginowy kwas,
- Gli-Ala — glicylo-alanina,
- Gli-Leu — glicylo-leucyna,
- Gli-Fen — glicylo-fenylalanina,
- Ala-Gli — alanylo-glicyna,
- Leu-Gli — leucylo-glicyna.

Ponadto użyto trójpeptydów, wysyntetyzowanych w Zakładzie Chemii Organicznej Instytutu Chemii Uniwersytetu Gdańskiego:

- Gli-Gli-Gli — glicylo-glicylo-glicyna,
- Ala-Gli-Gli — alanylo-glicylo-glicyna,
- Leu-Gli-Gli — leucylo-glicylo-glicyna,
- Ala-His-Leu — alanylo-histydylo-leucyna,
- Ala-Trp-Leu — alanylo-tryptofylo-leucyna,
- Ala-Liz-Leu — alanylo-lizylo-leucyna.

Stosowano trzy odczynniki reagujące z grupą aminową peptydów:

- DANS-Cl — chlorek kwasu 5-dwumetyloaminonaftaleno-1-sulfonowego firmy Serva — Szwajcaria;

DABS-Cl — chlorek kwasu 4-N,N-dwumetyloaminoazobenzenu-4'-sulfonowego;

DBNS-Cl — chlorek kwasu 4-N,N-dwumetyloamino-benzenu-azonaftaleno-4'-sulfonowego.

Wyżej wymienione dwa odczynniki zostały wysyntetyzowane w Pracowni Technologicznej Zakładu Chemii Nieorganicznej AM w Lublinie.

Otrzymywanie DANS-, DABS- i DBNS- pochodnych peptydów

Dwu- i trójpeptydy w ilości 0,3 μ mola rozpuszczono w 0,5 ml buforu węglanowego o $pH=8,9$. Następnie do roztworu dodawano 0,2 ml DANS-Cl lub 0,5 ml DABS-Cl, albo DBNS-Cl w acetonie. W 1 ml acetonowego roztworu było zawarte 6 mg DANS-Cl lub 3,3 mg DABS-Cl, albo DBNS-Cl. Mieszaninę reakcyjną pozostawiano w temperaturze pokojowej w ciemni na przeciąg 2 godz. Po tym czasie nadmiar acetonu odparowywano, a DANS-peptydy suszono gazowym azotem. W podobny sposób otrzymywano DBNS-peptydy. Natomiast DABS-pochodne uzyskiwano przez ogrzewanie peptydów z reagentem na łaźni wodnej w temp. 70° w ciągu 6 min.

Pochodne peptydów rozdzielano metodą chromatografii cienkowarstwowej na żelu krzemionkowym, stosując płytki chromatograficzne D.C. Alufolien Kieselgel 60 F 254 o grubości warstwy 0,2 mm firmy Merck. Chromatogramy rozwijano trzema układami rozpuszczalników: a — benzen—pirydyna—kwas octowy (80 : 20 : 2), b — benzen—pirydyna—kwas octowy (80 : 40 : 2), c — chloroform—alkohol izoamylowy I-rzędowy—kwas octowy (70 : 30 : 3).

DABS-pochodne trójpeptydów rozdzielano dodatkowo w układzie benzen—pirydyna—kwas octowy, zawierającym większą ilość pirydyny przy tej samej zawartości kwasu octowego i benzenu, to jest: 80 : 50 : 2 i 80 : 60 : 2. Rozdział chromatograficzny przeprowadzono w kamerach o wymiarach $9 \times 5 \times 24$ cm techniką wstępującą.

Położenie DANS-pochodnych peptydów określano za pomocą lampy UV. Plamy DANS-pochodnych dawały fluorescencję. Natomiast DABS- i DBNS-pochodne występowały w postaci barwnych plam w świetle widzialnym.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

W tab. 1 zestawiono współczynniki R_F dla DANS-, DABS- i DBNS-pochodnych dwupeptydów o takim samym N-końcowym aminokwasie, a różniących się C-końcowym aminokwasem. Stwierdzono, że na wartości współczynników R_F DANS-, DABS- i DBNS-pochodnych poszczególnych peptydów mają decydujący wpływ ich C-końcowe aminokwasy. Wielkości R_F omawianych pochodnych układają się zgodnie ze wzrostem R_F ich C-końcowych aminokwasów. Z trzech stosowanych układów najwyższe wartości R_F uzyskano dla omawianych pochodnych dwupeptydów w układzie: chloroform—alkohol izoamylowy I-rzędowy—kwas octowy (70 : 30 : 3). DANS-, DABS- i DBNS-pochodne dwupeptydu, zawierającego jako C-końcowy aminokwas — kwas asparaginowy, przy stosowanych układach rozpuszczalników nie ulegają przesunięciu z linii startowej. Wartości R_F pozostałych dwupeptydów zwiększają się wraz z ilością pirydyny w układzie: benzen—pirydyna—kwas octowy.

Tab. 1. Współczynniki R_F dla DANS-, DABS- i DBNS-pochodnych dwupeptydów w trzech różnych układach rozpuszczalników
 R_F Coefficients for DANS-, DABS- and DBNS-derivatives of bi-peptides in three different system of solvents

L. p.	Wzór peptydu	Współczynniki R_F								
		DANS-pochodne			DABS-pochodne			DBNS-pochodne		
		a	b	c	a	b	c	a	b	c
1.	$H_2N-Gli-ASp-COOH$	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
2.	$H_2N-Gli-Ala-COOH$	0,10	0,18	0,33	0,09	0,17	0,40	0,08	0,14	0,42
3.	$H_2N-Gli-Pen-COOH$	0,14	0,22	0,57	0,11	0,23	0,70	0,11	0,18	0,67
4.	$H_2N-Gli-Leu-COOH$	0,20	0,29	0,65	0,18	0,34	0,75	0,16	0,25	0,70

Objaśnienia: a — benzen—pirydyna—kwas octowy (80 : 20 : 2), b — benzen—pirydyna—kwas octowy (80 : 40 : 2), c — chloroform—alkohol izoamylovyy I-rzędowy—kwas octowy (70 : 30 : 3).

Explanation: a — benzene—pyridine—acetic acid (80 : 20 : 2), b — benzene—pyridine—acetic acid (80 : 40 : 2), c — chloroform—order-I isoamyl alcohol—acetic acid (70 : 30 : 3).

W tab. 2 zestawiono współczynniki R_F dla izomerów dwupeptydów o takim samym składzie aminokwasowym, a różnej sekwencji. Stwierdzono większy wpływ na wielkości współczynnika R_F ich C-końcowych niż N-końcowych aminokwasów.

W tab. 3 zestawiono współczynniki R_F dla DANS- i DBNS-pochodnych trójpeptydów o takich samych dwóch aminokwasach, a różniących

Tab. 2. Współczynniki R_F dla DANS, DABS- i DBNS-pochodnych dwupeptydów o analogicznym składzie aminokwasowym (peptydy 1, 2 oraz 3 i 4) o różnej sekwencji
 R_F Coefficients for DANS-, DABS- and DBNS-derivatives of bi-peptides with analogous amino-acid composition (peptides 1, 2 and 3, 4) and different sequence

L. P.	Wzór peptydu	Współczynniki R_F								
		DANS-pochodne			DABS-pochodne			DBNS-pochodne		
		a	b	c	a	b	c	a	b	c
1.	$H_2N-Gli-Ala-COOH$	0,10	0,18	0,33	0,09	0,17	0,40	0,08	0,14	0,42
2.	$H_2N-Ala-Gli-COOH$	0,07	0,11	0,25	0,08	0,15	0,37	0,07	0,13	0,37
3.	$H_2N-Gli-Leu-COOH$	0,20	0,29	0,66	0,18	0,34	0,75	0,16	0,16	0,70
4.	$H_2N-Leu-Gli-COOH$	0,13	0,19	0,50	0,16	0,30	0,65	0,13	0,13	0,64

Do rozwijania chromatogramów używano trzech różnych układów rozpuszczalników (a, b, c), jak podano w tab. 1.

Three different system of solvents (a, b, c) as in Table 1 were used to develop chromatogrammes.

się środkowym lub N-końcowym aminokwasem. Stwierdzono, że na wartości współczynnika R_F analizowanych pochodnych trójpeptydów ma pewien wpływ aminokwas zajmujący pozycję środkową — peptydy 4, 5, 6. W przypadku peptydów 1, 2 i 3, różniących się N-końcowym aminokwasem przy takim samym pozostałym fragmencie cząsteczki, obserwuje się także wpływ N-końcowego aminokwasu na wartości współczynnika R_F . Obserwacja ta stwarza możliwości identyfikacji i rozróżniania izomerów peptydów o takim samym składzie aminokwasowym, a różnej sekwencji.

Tab. 3. Współczynniki R_F DANS- i DBNS-pochodnych trójpeptydów w stosowanych trzech układach rozpuszczalników (a, b, c)

R_F Coefficients for DANS- and DBNS-derivatives of tripeptides in the three applied system of solvents

L.p.	Wzór peptydu	Współczynniki R_F					
		DANS-pochodne			DBNS-pochodne		
		a	b	c	a	b	c
1.	$H_2N-G11-G11-G11-COOH$	0,013	0,050	0,020	0,007	0,033	0,053
2.	$H_2N-Ala-G11-G11-COOH$	0,020	0,080	0,040	0,013	0,073	0,060
3.	$H_2N-Leu-G11-G11-COOH$	0,050	0,160	0,110	0,040	0,160	0,130
4.	$H_2N-Ala-His-Leu-COOH$	0,230	0,440	0,480	0,130	0,390	0,660
5.	$H_2N-Ala-Trp-Leu-COOH$	0,390	0,600	0,670	0,170	0,450	0,790
6.	$H_2N-Ala-Lys-Leu-COOH$	0,430	0,680	0,790	0,230	0,510	0,810

Trzy układy rozpuszczalników (a, b, c) jak w tab. 1.

Three different systems of solvents (a, b, c) as in Table 1.

Na podstawie badań stwierdzono zmianę wartości współczynników R_F DABS-pochodnych trójpeptydów w zależności od ilościowej zawartości pirydyny w układach rozwijających (tab. 4). Obserwowano wzrost R_F DABS-pochodnych trójpeptydów wraz z procentową zawartością pirydyny w układzie z benzenem i kwasem octowym. Zwraca uwagę fakt, że DANS-, DABS- i DBNS-pochodne analizowanych dwupeptydów posiadają zbliżone wartości R_F w badanych układach rozpuszczalników. Również DABS- i DBNS-pochodne trójpeptydów w układzie: benzen—pirydyna—kwas octowy mają zbliżone do siebie wartości współczynnika R_F , natomiast DANS-pochodne trójpeptydów charakteryzują się znacznie wyższymi R_F . Układ rozwijający: chloroform—alkohol izoamyłowy I-rzędowy—kwas octowy okazuje się nieprzydatny dla rozdzielania DABS-pochodnych trójpeptydów i zostaje zaniechany w dalszej pracy doświadczalnej. Natomiast układ ten daje zadowalające rezultaty przy rozdzielaniu DANS- i DBNS-pochodnych trójpeptydów.

Tab. 4. Współczynniki R_F DABS-pochodnych trójpeptydów przy różnej ilościowej zawartości pirydyny w układzie rozwijającym
 R_F Coefficients for DABS-derivatives of tripeptides with different piridine content in the developing system

L.p.	DABS-pochodne trójpeptydów	Wartości współczynników R_F			
		a	b	c	d
1.	$H_2N-Gly-Gly-Gly-COOH$	0,000	0,020	0,030	0,050
2.	$H_2N-Ala-Gly-Gly-COOH$	0,013	0,060	0,090	0,130
3.	$H_2N-Leu-Gly-Gly-COOH$	0,067	0,190	0,290	0,310
4.	$H_2N-Ala-His-Leu-COOH$	0,400	0,610	0,640	0,700
5.	$H_2N-Ala-Trp-Leu-COOH$	0,420	0,470	0,540	0,650
6.	$H_2N-Ala-Ile-Leu-COOH$	0,450	0,690	0,750	0,810

Układy rozwijające: a — benzen—pirydyna—kwas octowy (80 : 20 : 2), b — benzen—pirydyna—kwas octowy (80 : 40 : 2), c — benzen—pirydyna—kwas octowy (80 : 50 : 2), d — benzen—pirydyna—kwas octowy (80 : 60 : 2).

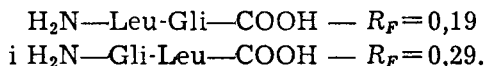
Developing systems: a — benzene—piridine—acetic acid (80 : 20 : 2), b — benzene—piridine—acetic acid (80 : 40 : 2), c — benzene—piridine—acetic acid (80 : 50 : 2), d — benzene—piridine—acetic acid (80 : 60 : 2).

DYSKUSJA I WNIOSKI

Dotychczasowe metody rozdzielania wolnych krótkich peptydów nie dają pozytywnych rezultatów. Izomery peptydów różniących się sekwencją aminokwasową, rozdzielane metodą chromatografii bibułowej i cienkowarstwowej, wykazują analogiczne lub bardzo zbliżone R_F (6). Wprowadzenie odczynników derywatyzujących DANS-Cl, DABS-Cl lub DBNS-Cl do chromatograficznej analizy krótkich peptydów stwarza możliwości właściwego ich rozdzielania oraz identyfikacji izomerów różniących się sekwencją. Jak wykazały prowadzone badania, wyżej wymienione reagenty mogą służyć nie tylko do analizy aminokwasów, ale również i krótkich peptydów. Przeprowadzenie wolnych peptydów w ich DANS-, DABS- czy też DBNS-pochodne zwiększa wielkość ich cząsteczki. Poza tym wprowadzenie dużych rodników aromatycznych do dwu- i trójpeptydów zmienia charakter fizykochemiczny cząsteczki. Dotyczy to między innymi zmniejszenia ich polarności, co dodatnio wpływa na rozdział chromatograficzny analizowanych peptydów.

Doświadczalnie wykazano możliwość regulowania wielkości współczynnika R_F dla poszczególnych pochodnych dwu- i trójpeptydów poprzez zmianę procentowej zawartości pirydyny w układzie: benzen—pirydyna—kwas octowy.

Przeprowadzone doświadczenia wskazują, że zasadniczy wpływ na wielkość współczynnika R_F pochodnej danego peptydu ma aminokwas z wolną grupą karboksylową, a nie aminową. Należy to tłumaczyć mniejszą polarnością grupy aminowej niż grupy karboksylowej. Przykład mogą stanowić między innymi DANS-pochodne izomerów dwupeptydów:



Spostrzeżenie to zasługuje na podkreślenie, ponieważ pozwala na podstawie znajomości składu aminokwasowego krótkich dwupeptydów, po przeprowadzeniu ich w DANS-, DABS- lub DBNS-pochodne, określić ich sekwencje, stosując metody chromatograficzne. Wniosek ten ma znaczenie praktyczne, ponieważ określenie sekwencji krótkich peptydów klasycznymi metodami, np. Edm ana (5), sprawia znaczne trudności. Degradacja Edmanowska w tych przypadkach często nie prowadzi do odszczępienia N-końcowego aminokwasu, a do uzyskania pochodnej dwu- lub trójpeptydu. Fakt ten utrudnia identyfikację N-końcowego aminokwasu i określenie kolejności aminokwasów krótkich peptydów.

Przedstawione w niniejszej pracy wnioski należy traktować jako wstępne, ponieważ wymagają one dalszych badań na większym materiale doświadczalnym, co ze względu na ograniczoną ilość posiadanych krótkich peptydów nie może być zrealizowane.

Pani prof. dr hab. Stefani Drabarek, kierownikowi Zakładu Chemii Peptydów Uniwersytetu Warszawskiego, prof. dr. hab. Gotfrydowi Kupryzewskiemu, kierownikowi Zakładu Chemii Organicznej Uniwersytetu Gdańskiego, oraz prof. dr. hab. Ignacemu Z. Siemionowi, dyrektorowi Instytutu Chemii Uniwersytetu Wrocławskiego, składamy serdeczne podziękowania za udostępnienie peptydów.

PIŚMIENNICTWO

1. Burzyński S. R., Georgiades J.: Effect of Urinary Peptides on DNA, RNA and Protein Synthesis in Normal and Neoplastic cells. *Fed. Proc.* **32**, 766, 1973.
2. Burzyński S. R. i wsp.: Biologically Active Peptides in Human Urine: II. Effect on Intestinal Smooth Muscle and Heart. *Physiol. Chem. Phys.* **6**, 457, 1974.
3. Chang J. Y., Creaser E. H.: Separation of 4-N,N-Dimethyl-aminoazobenzene-4'-sulfonyl Amino acids on Polyamide Sheets. *J. Chromatogr.* **116**, 215, 1976.
4. Conden R. i wsp.: The Identification of Lower Peptides in Complex Mixtures. *Biochem. J.* **41**, 590, 1947.
5. Edman P.: Phenyl Isotiocyanate Degradation of Peptides. *Nature* **177**, 667, 1956.
6. Knight C. A.: Paper Chromatography of Some Lower Peptides. *J. Biol. Chem.* **190**, 753, 1951.

7. Lin J. K., Chang J. Y.: Chromophoric Labeling of Amino Acids with 4-Dimethylaminoazobenzene-4'-sulfonyl Chloride. *Anal. Chem.* **47**, 1634, 1975.
8. Moore T. B., Baker C. G.: Observed and Calculated R_F Values of Several Synthetic Peptides in Paper Chromatography. *J. Chromatogr.* **1**, 513, 1968.
9. Pardee A. B.: Calculation on Paper Chromatography of Peptides. *J. Biol. Chem.* **190**, 757, 1951.
10. Siemion I. Z.: Perspektywy chemicznej syntezy białek. PWN, Warszawa 1968.
11. Weber G.: Polarization of the Fluorescence of Macromolecules. *Biochem. J.* **51**, 155, 1952.
12. Wolski T. i wsp.: Chlorek kwasu 4-N,N-dwumetyloaminoazobenzenu-4'-sulfonowego — odczynnik o wysokiej czułości do analizy spektrofotometrycznej i chromatograficznej aminokwasów. *Chem. Anal.* **25**, 583, 1980.
13. Wolski T. i wsp.: Urząd Pat. PRL 123652. 1979.
14. Wolski T., Grodzicki Z.: Urząd Pat. PRL P-232905. 1981.
15. Wolski T., Grodzicki Z.: Urząd Pat. PRL P-231674. 1981.

Otrzymano 28 X 1982.

РЕЗЮМЕ

Авторами было произведено разделение DANS-, DABS-, DBNS-производных дву- и трипептидов тонкослойным хроматографическим методом. Кроме того было получено положительное разделение изомеров DANS-производных дипептидов одинакового состава, но с различными компонентами аминокислот. Была также получена возможность регулирования количества коэффициента R_F , исследуемых производных, изменением насыщенности пиридина в системе: бензол—пиридин—уксусная кислота.

SUMMARY

Distribution of DANS-, DABS- and DBNS-derivatives of bi- and tripeptides has been carried out using a thin-layer chromatography method. A successful separation of isomers of DANS-derivative dipeptides of the same composition but of different aminoacid sequence has been obtained. It also became possible to regulate the value of R_F coefficient of the analyzed derivatives by changing piridine concentration in the scheme: benzene—piridine—acetic acid.