

Zakład Chemii Ogólnej. Instytut Chemii Podstawowych, Akademia Medyczna w Lublinie
Kierownik: doc. dr hab. S. Biliński

Janusz KLIMEK i Irena BŁAZIAK

O niektórych praktycznych aspektach syntezy DNS-Cl i DNS-aminokwasów

О некоторых практических аспектах синтеза DNS-Cl и DNS-аминокислот

About Some Practical Aspects of DNS-Cl Synthesis and of DNS-Amino Acids

Do określenia na drodze chemicznej N-końcowych aminokwasów peptydów i białek stosuje się technikę opracowaną przez Sanger'a (7), Edmana (2), oraz Gray i Hartley (4). W przedstawionej pracy postanowiono rozważyć możliwość praktycznego wykorzystania ostatniej z przedstawionych metod. W najogólniejszym skrócie polega ona na reakcji chlorku kwasu 1-dwumetyloamino-naftaleno-5-sulfonowego (DNS-Cl) z grupami aminowymi białek peptydów i aminokwasów. Powstające substancje cechuje intensywna żółta fluorescencja w nadfiolecie pozwalająca wykrywać te związki już w ilości 0,01—0,1 nM. Tego rodzaju czułość umożliwia analizowanie minimalnych ilości substancji, co ma ogromne znaczenie przy badaniu rzadkich i trudnych do otrzymania substratów (1). Praktyczna realizacja tej metody nie była dotąd możliwa, ponieważ podstawowy odczynnik DNS-Cl jest niedostępny na rynku. Tak więc stało się uzasadnione otrzymanie powyższego z dostępnych i tanich substratów oraz wypróbowanie go do syntezy wzorcowych DNS-aminokwasów. Zarówno DNS-Cl, jak też DNS-aminokwasy są niezbędne do badania N-końcowych fragmentów łańcuchów polipeptydowych białek i peptydów.

MATERIAŁY I METODY

Kwas Laurenta — kwas 1-amino-5-naftalenosulfonowy (techniczny) — Instytut Chemii Organicznej UMCS. Żel krzemionkowy — G do chromatografii cienko-warstwowej — Merck. Bezpośrednio przed naniesieniem na płytki przygotowywano mieszaninę 8 g żelu i 17 ml H₂O. PCl₅ — import NRF. Pozostałe odczynniki pochodziły z Centrali Chemicznej — Gliwice: alkohol metylowy cz. d. a., jodek metylu cz., roztwór 30% NaOH w wodzie, siarczan sodu bezwodny cz. d. a., aceton bezwodny cz. d. a., oraz wzorce aminokwasowe.

Chlorek kwasu 1-dwumetyloamino-5-naftalenosulfonowego (DNS-Cl) otrzymano na drodze metylowania grupy aminowej kwasu Laurenta (3) oraz przez chlorowanie grupy sulfonowej (8). DNS-aminokwasy pochodziły z kondensacji wzorc-

wych aminokwasów z DNS-Cl (6). Jednorodność syntetyzowanych DNS-aminokwasów ustalano chromatograficznie na płytkach pokrytych żelalem krzemionkowym-G (5). Położenie DNS-aminokwasów oraz parametry do obliczenia współczynników Rf ustalano w świetle lampy HPW Philips z filtrem Wooda. Powlekaacz do chromatografii cienkowarstwowej — Warsztaty Konstrukcyjne AM w Lublinie.

BADANIA WŁASNE

Synteza kwasu 1-dwumetyloamino-5-naftaleno sulfonowego (DNS-OH)

Do rury 2×50 cm z grubościennego szkła wprowadzano 12,3 g dwukrotnie krystalizowanego z wody kwasu Laurenta, 40 cm³ alkoholu metylowego, 7,46 ml jodku metylu oraz 12 cm³ 30% NaOH. Zawartość po zapieniu rury ogrzewano przez 10 godzin w temperaturze 100°C. Otrzymany w ten sposób stop rozpuszczano w 5% NaOH. Po odrzuceniu części nierozpuszczalnej neutralizowano roztwór rozcieńczonym HCl wobec papierka uniwersalnego. W tych warunkach krystalizowała N-dwumetylowa pochodna kwasu Laurenta, którą dwukrotnie krystalizowano z wody.

Temperatura topnienia — rozkład.

Wyniki spalania: obliczone C — 53,53%, H — 5,58%, N — 5,20%

otrzymane C — 52,25%, H — 5,89%, N — 5,48%

Synteza chlorku kwasu — 1-dwumetyloamino-5-naftaleno sulfonowego (DNS-Cl)

0,25 g kwasu 1-dwumetyloamino-5-naftaleno sulfonowego rozcierano z 0,20 g PCl₅ w agatowym moździerzu. Zawartość moździerza rozpuszczano w 10 ml zimnego bezwodnego acetonu, po czym na zimno sączono. Część nierozpuszczalną odrzucano. Otrzymany żółto zabarwiony roztwór zawierał właściwy produkt. Roztwór zabezpieczano niewielką ilością bezwodnego Na₂SO₄. Zachowywał on stabilność przez jeden tydzień w przypadku przechowywania go w chłodni (+5°) bez dostępu światła.

Synteza DNS-aminokwasów

Przygotowywano po 1 ml roztworu 6,5 μM wzorca aminokwasu w 0,1 M NaHCO₃, z którego pobierano 0,1 ml do zmieszania z równą objętością acetonowego roztworu DNS-Cl. Roztwory zabezpieczano przed światłem. W temperaturze pokojowej po 2 godzinach aceton usuwano pod próżnią. Suchą pozostałość rozpuszczano w 0,25 ml mieszaniny acetonu i 0,1 M kwasu octowego w stosunku objętościowym 3 : 2.

Badanie jednorodności chromatograficznej otrzymanych DNS-aminokwasów

Na płytki szklane 14 × 14 cm pokryte żelalem krzemionkowym-G bezpośrednio po aktywacji nanoszono punktowo po 2 μl acetonowego roz-

tworu DNS-aminokwasów w równych odstępach w odległości 2 cm od dolnej krawędzi płytki. Rozwijano przez 20 minut w układzie; benzen, pirydyna, kwas octowy w stosunku objętościowym 80 : 20 : 2. Po usunięciu rozpuszczalnika DNS-aminokwasy obserwowano w świetle lampy HPW z filtrem Wooda. Intensywne żółte świecenie manifestowało położenie powyższych substratów. Dokonano pomiarów i obliczono znanym sposobem współczynniki Rf, które za brano w tab. 1.

Tab. 1. Rf DNS-aminokwasów rozwijanych na żelu krzemionkowym-G w układzie: benzen, pirydyna, kwas octowy (lod) w stosunku V/V 80 : 20 : 2
Rf of DNS-amino acids developed on Silica Gel-G in solvent mixture: benzene, pyridine, acetic acid — 80 : 20 : 2 V/V

L. p.	DNS-aminokwas	Rf
1	DNS-Ala	0,35
2	DNS-beta-Ala	0,59
3	DNS-Asp	0,07
4	DNS-Asp-NH ₂	0,06
5	DNS-Cys	0,16
6	DNS-Fen	0,41
7	DNS-Gli	0,37
8	DNS-Glu	0,12
9	DNS-His	0,34
10	DNS-Ileu	0,65
11	DNS-Leu	0,78
12	DNS-Liz	0,20
13	DNS-Met	0,40
14	DNS-Pro-OH	0,62
15	DNS-Ser	0,36
16	DNS-Tre	0,25
17	DNS-Try	0,39
18	DNS-Tyr	0,58
19	DNS-Wal	0,48

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Badanie N-końcowych aminokwasów peptydów i białek przy pomocy DNS-Cl jest atrakcyjne, a to głównie dzięki temu, że metoda jest wysoce czułą 0,01—0,1 μ M. Pozwala to na znaczne obniżenie masy badanego substratu co w wielu przypadkach jest rzeczą szczególnej wagi. W naszych warunkach ta pożyteczna technika nie mogła dotąd znaleźć praktycznego

zastosowania, a to z uwagi na brak podstawowego odczynnika, jakim jest DNS-Cl oraz wzorców DNS-aminokwasów.

Nasza praca jest próbą rozwiązania prostymi środkami tego problemu z łatwo dostępnych surowców. Identyfikacji metylowej pochodnej kwasu Laurenta dokonano drogą analizy elementarnej. Wyniki wskazują, że otrzymano właściwy produkt. Synteza wzorców DNS-aminokwasów potwierdza to przypuszczenie, bowiem wykazują one chromatograficzną jednorodność oraz specyficzne Rf. Otrzymane na tej drodze DNS-Cl oraz wzorce DNS-aminokwasów z powodzeniem zastosowano do opracowania niektórych aspektów ilościowego oznaczania DNS-aminokwasów. Otrzymane wyniki są już opracowane i zostaną przedstawione w najbliższej publikacji.

Wnioski

1. Otrzymano DNS-Cl w oparciu o substraty dostępne na krajowym rynku.
2. Otrzymano DNS-aminokwasy o chromatograficznej jednorodności.
3. Wyznaczono współczynniki Rf DNS-aminokwasów w odniesieniu do chromatografii cienkowarstwowej na żelu krzemionkowym-G w układzie rozwijającym: benzen, pirydyna, kwas octowy (lodowaty) w stosunku objętościowym 80 : 20 : 2.

PIŚMIENNICTWO

1. Bresler S.: Wstęp do biologii molekularnej, 26—30, PWN, Warszawa 1972.
2. Edman P.: Acta Chem. Scand., 4, 283—293, 1950.
3. Fussgänger V.: Ber., 35, 976—984, 1902.
4. Gray W., Hartley B.: Biochem. J., 89, 59P—59P, 1963.
5. Klimek J., Wrońska J.: Chemia anal., 17, 1255—1258, 1972.
6. Needle D., Pollit R.: Biochem. J., 97, 607—608, 1965.
7. Sanger F.: Biochem. J., 39, 507—515, 1945.
8. Uehleke H.: Z. Naturforsch., 13b, 772—724, 1958.

Otrzymano 12 III 1973.

РЕЗЮМЕ

Провели синтез DNS-Cl и использовали этот продукт для получения DNS-аминокислот. Определили коэффициенты Rf для отдельных DNS-аминокислот. Констатировали хроматографическую однородность этих субстратов.

S U M M A R Y

The synthesis of DNS-Cl has been performed and its product has been utilized for obtaining DNS-amino acids. Coefficients R_f for individual DNS-amino acids were established and chromatographical homogeneity for these substances has been confirmed.

