

Dünnschicht-Chromatographie von Aminosäurederivaten auf Kieselgel G. N-(2,4-Dinitrophenyl)-Aminosäuren und 3-Phenyl-2-thiohydantoine*

Von M. BRENNER, A. NIEDERWIESER und G. PATAKI**

Dinitrophenyl-Aminosäuren (DNP-Aminosäuren) und Phenylthiohydantoine (PTH-Aminosäuren) entstehen, wenn man Proteine oder Peptide mit Dinitrofluorbenzol bzw. Phenyl-Senföl behandelt und das Kondensationsprodukt in geeigneter Weise abbaut^{1,2}. Ihre Abtrennung aus dem Reaktionsgemisch und namentlich ihre Identifizierung ist von erheblicher praktischer Bedeutung, weil die genannten Reaktionsfolgen bei systematischer Anwendung die Sequenzanalyse von Peptidstrukturen ermöglichen. Zahlreiche Autoren haben sich mit dem Problem beschäftigt.

Zur Trennung und Charakterisierung der DNP-Aminosäuren wurde empfohlen: Chromatographie auf neutralem Kieselgel¹, gepuffertem Kieselgel³, Kieselsäure-Celite⁴, Kieselgur⁵, gepuffertem Hyflo-Super-Cel⁶, Papier⁷, acetyliertem Papier⁸, chloriertem Kautschuk⁹, Amberlite IRC-50 und Duolite C-25¹⁰, Polyamid¹¹, ferner Ionophorese auf Kieselgel¹² und schliesslich Gegenstromverteilung¹³. Alle diese Methoden erfordern entweder einen gewissen apparativen Aufwand oder relativ viel Zeit.

Der Nachweis der einzelnen PTH-Aminosäuren bereitet noch etwas mehr Mühe. Der ursprüngliche Vorschlag einer alkalischen² oder sauren¹⁴ Hydrolyse zwecks anschliessender Identifizierung der freigesetzten Aminosäuren hat nicht befriedigt, weil dabei Arg, CySH, (Cys)₂, Ser, Thr, Try, Asp(NH₂) und Glu(NH₂) zerstört werden. 1953 berichteten LANDMANN et al.¹⁵ sowie SJÖQUIST¹⁶ über eindimensionale papierchromatographische Trennung der PTH-Aminosäuren selber. Die Unterscheidung versagte indessen einerseits¹⁵ bei Met, Val und Phe, bei Leu und Pro sowie bei Lys und Tyr, andererseits¹⁶ bei Thr und Val, bei Ileu und Val sowie bei Asp(NH₂) und Glu(NH₂). Kürzlich hat SJÖQUIST¹⁷ ein neues Verfahren angegeben, wobei die wichtigsten PTH-Aminosäuren in vier gleichzeitig laufenden eindimensionalen Papierchromatogrammen unter Verwendung von vier verschiedenen Lösungsmittelsystemen getrennt und quantitativ bestimmt werden können. Asp, Lys, Pro und Hypo lassen sich dabei aber nur indirekt erfassen, und von Leu und Ileu ist nur die Summe bestimmbar. Die Nachweisgrenze liegt bei 0,5–1 µg PTH-Aminosäure (Grote-Reagens^{15,18}, Jodazid^{16,19}, Fluoreszenztest²⁰). SJÖQUIST hat in Fortsetzung einer Untersuchung von ROVERY, FABRE und DESNUELLE²¹ auch ein säulenchromatographisches

Trenn- und Bestimmungsverfahren für PTH-Aminosäuren ausgearbeitet²².

Wie bei der Analyse von Aminosäuremischungen^{23,24} beweist die Dünnschicht-Chromatographie auch bei der Identifizierung der DNP- und PTH-Aminosäuren ihre Überlegenheit. Diese besteht vor allem in der Zeitersparnis und in einer Erhöhung der Empfindlichkeit um mindestens eine Zehnerpotenz²⁵. Dazu kommt namentlich bei den DNP-Derivaten eine bessere Auftrennung, indem zum Beispiel DNP-Leu und DNP-Ileu mühelos unterscheidbar werden.

*Die Mittel zur Durchführung dieser Arbeit verdanken wir Arbeitsbeschaffungskrediten des Bundes (M. B.), Herrn Prof. Dr. M. GEIGER-HUBER und der Ungarnhilfe der Doktoranden des Botanischen Instituts der Universität Basel, der Kommission für ungarische Flüchtlingsstudenten an der Universität Basel und einem persönlichen Beitrag der Familie M. BERNASCONI-HEISSERER in Münchenstein (G. P.) sowie einer Studienbeihilfe durch das Kultusministerium Baden-Württemberg (A. N.).

**Institut für organische Chemie der Universität Basel.

¹ F. SANGER, *Biochem. J.* **39**, 507 (1945); **40**, 261 (1946). – R. PORTER und F. SANGER, *Biochem. J.* **42**, 287 (1948). – F. SANGER, *Biochem. J.* **45**, 562 (1949).

² P. EDMAN, *Acta chem. scand.* **4**, 283 (1950).

³ S. BLACKBURN, *Nature* **163**, 955 (1949). – W. R. MIDDLEBROOK, *Nature* **164**, 501 (1949).

⁴ F. CH. GREEN und L. M. KAY, *Anal. Chem.* **24**, 726 (1952).

⁵ G. L. MILLS, *Biochem. J.* **50**, 707 (1952). – G. BRAUNITZER und K.-H. REUTHER, *Makromol. Chem.* **13/19**, 501 (1956).

⁶ P. H. BELL et al., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **51**, 897 (1949).

⁷ Eine Zusammenfassung geben G. BISERTE et al. in *J. Chromatogr.* **2**, 225 (1959) und **3**, 85 (1960).

⁸ H. S. BURTON, *Chem. & Ind. (London)* **1954**, 576.

⁹ S. M. PARTRIDGE und T. SWAIN, *Nature* **166**, 272 (1950).

¹⁰ T. SEKI, *J. Biochem. (Japan)* **47**, 253 (1960).

¹¹ H. STEUERLE und E. HILLE, *Biochem. Z.* **331**, 220 (1959). – E. HILLE, *Biochem. Z.* **333**, 269 (1960). – H. HÖRMANN und H. von PORTATIUS, *Z. physiol. Chem.* **315**, 141 (1959).

¹² R. L. M. SYNCE, *Biochem. J.* **44**, 542 (1949).

¹³ D. W. WOOLLEY, *J. biol. Chem.* **179**, 593 (1949).

¹⁴ H. FRAENKEL-CONRAT, *The Chemical Structure of Proteins*. A Ciba Foundation Symposium (Little Brown & Co., Boston 1953), p. 102.

¹⁵ W. A. LANDMANN, M. P. DRAKE und J. DILLAHA, *J. Amer. chem. Soc.* **75**, 3638 (1953).

¹⁶ J. SJÖQUIST, *Acta chem. scand.* **7**, 447 (1953).

¹⁷ J. SJÖQUIST, *Biochem. biophys. Acta* **41**, 20 (1960).

¹⁸ J. W. GROTE, *J. biol. Chem.* **93**, 25 (1931).

¹⁹ E. CHARGAFF, C. LEVINE und C. GREEN, *J. biol. Chem.* **175**, 67 (1948).

²⁰ P. EDMAN und J. SJÖQUIST, *Acta chem. scand.* **10**, 1507 (1956).

²¹ M. ROVERY, C. FABRE und P. DESNUELLE, *Biochem. biophys. Acta* **12**, 547 (1954).

²² J. SJÖQUIST, *Arkiv Kemi* **11**, 151 (1957).

²³ E. NÜRNBERG, *Arch. Pharm. (Berlin)* **292/64**, 610 (1959).

²⁴ M. BRENNER und A. NIEDERWIESER, *Exper.* **16**, 378 (1960). – A. NIEDERWIESER und G. PATAKI, *Chimia* **14**, 378 (1960).

²⁵ siehe auch E. CHERBULIEZ, B. BAEHLER und J. RABINOWITZ, *Helv. chim. Acta* **43**, 1871 (1960).