

La determinazione quantitativa dei dinitrofenil-derivati degli amminoacidi mediante cromatografia automatica su colonna di gel di silice

L. TENTORI

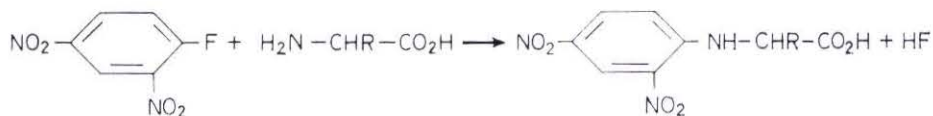
Laboratori di Biologia, Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italia

Come è noto i metodi analitici per la determinazione dei residui NH_2 -terminali delle proteine più usati sono quelli che prendono il nome rispettivamente da Sanger⁽¹⁾ e da Edman⁽²⁾.

In entrambi i metodi viene sfruttata l'azione di agenti chimici capaci di legare gli amminoacidi NH_2 -terminali con un legame che alla successiva idrolisi effettuata con le tecniche usuali risulta più stabile del legame peptidico presente nelle proteine.

Il metodo di Edman⁽²⁾ sfrutta la reazione fra il fenilisotiocianato e la proteina o il peptide con la formazione di un feniltiocarbammil-derivato; la successiva idrolisi in condizioni controllate libera il feniltioindantoinderivato del residuo NH_2 -terminale; per la determinazione quantitativa di quest'ultimo è stato messo a punto da Siöquist un metodo di separazione cromatografico su carta con successiva eluizione e determinazione spettrofotometrica nell'ultravioletto.

Il metodo di Sanger⁽¹⁾ si basa invece sulla reazione fra l'1-fluoro-2,4-dinitrobenzene e l'amminoacido NH_2 -terminale della proteina o del peptide in esame. La reazione fra il fluorodinitrobenzene ed il gruppo amminico terminale libero avviene secondo lo schema:



a temperatura ambiente ed in presenza di un tampone di bicarbonato di sodio. La proteina ed il peptide vengono successivamente idrolizzati ed il dinitrofenil-derivato dell'amminoacido NH_2 -terminale viene estratto e quindi separato e identificato mediante differenti tecniche che vanno dalla cro-

matografia su carta alla cromatografia di adsorbimento su colonne, alla cromatografia su strato sottile, alla elettroforesi su carta, alla distribuzione in controcorrente. Nel caso particolare delle proteine che stavamo studiando abbiamo ritenuto opportuno scegliere il metodo di Sanger (¹) per la determinazione degli amminoacidi NH_2 -terminali.

È interessante ricordare come si è sviluppato storicamente questo metodo. I DNP-derivati degli amminoacidi non furono da principio usati da Sanger per la determinazione dei residui NH_2 -terminali dei peptidi o delle proteine, ma allo scopo di avere a disposizione dei prodotti che, essendo colorati, fossero più identificabili facilmente degli N-acetil-amminoacidi usati da Martin e Synge per l'analisi di miscele di amminoacidi. Come è noto al loro punto isoelettrico gli amminoacidi esistono come ioni dipolari e come tali la loro solubilità in solventi non acquosi è minima. Quando questa caratteristica di dipolarità viene modificata, come per esempio per esterificazione del gruppo carbossilico o per acilazione del gruppo amminico, i derivati degli amminoacidi divengono in genere più facilmente solubili in solventi non acquosi a meno che, per particolari caratteristiche della loro struttura, non conservino la loro dipolarità.

Nello studio degli N-acetil-amminoacidi si osservò ben presto che non tutto l'azoto presente era estraibile dalla fase acquosa nella fase, ad esempio, cloroformica, e questo fatto fu interpretato da Synge come dovuto a differenze dei coefficienti di partizione dei differenti amminoacidi fra l'acqua ed il cloroformio. Di conseguenza Martin e Synge proposero un metodo di separazione degli N-acetil-amminoacidi mediante cromatografia di partizione usando come supporto inerte il gel di silice, come fase stazionaria, ovviamente, l'acqua del gel di silice e come solvente una miscela di cloroformio e butanolo; per rivelare il movimento delle bande questi Autori usavano metil-arancio come indicatore. Sanger, a questo punto, sostituì gli N-acetil-amminoacidi con i DNP-amminoacidi per lavorare con delle sostanze naturalmente colorate.

Quando Sanger sviluppò il suo metodo per la determinazione dei residui NH_2 -terminali usò per la separazione dei DNP-derivati la cromatografia di partizione su colonne di gel di silice; tuttavia ben presto si osservò che con questa tecnica non si aveva una risoluzione molto soddisfacente delle bande, probabilmente a causa dell'adsorbimento sul gel di silice di parte delle sostanze da separare; questo difetto che appariva particolarmente accentuato nel caso degli idrolizzati proteici veniva solo parzialmente alleviato dalla presenza nel cloroformio di basse concentrazioni variabili di butanolo; per di più, a parte il fatto che non era possibile separare le due leucine, la presenza negli idrolizzati di altri soluti influenzava sensibilmente la distribuzione delle bande degli amminoacidi monoammino-monocarbossilici che vengono studiati con questo metodo.

Per questo motivo la separazione su gel di silice è stata abbandonata in favore degli altri metodi di separazione fino a quando, piuttosto recentemente, Kessner e coll. ⁽³⁾ hanno descritto un metodo che permette la separazione di un gran numero di DNP-derivati in 22 ore mediante cromatografia su colonne di gel di silice. Questi Autori hanno attribuito i primi insuccessi che si erano osservati con le colonne di gel di silice a differenti cause: alle variazioni nelle proprietà delle differenti partite di gel di silice, alla frequente rottura delle colonne, e alla necessità di usare più di una colonna di piccola misura per ottenere con diversi solventi differenti tipi di separazione, e quindi alla necessità di cromatografare di volta in volta miscele di standard su colonne equivalenti per identificare i DNP-amminoacidi. Orbene, Kessner e coll. ⁽³⁾, avendo stabilito che la rottura e la formazione di canali nell'interno di una colonna possono essere eliminati mediante una accurata deaerazione dei solventi usati per la eluzione, sono stati in grado di impaccare (*pack*) colonne di gel di silice di 100 cm senza mai osservare rottura o canalizzazione di esse e di raggiungere quindi con l'uso di una sola colonna risultati sempre riproducibili. Con colonne di $0,9 \times 100$ cm di gel di silice idratato con 65 ml di H_2SO_4 0,5 N per 100 g di gel di silice, eluite alla temperatura di 35° , con un gradiente realizzato con due camere di mescolamento e quattro camere di riserva e composto di n-eptano, di alcool amilico terziario (tAA) e di metiletilchetone (MEK), questi Autori hanno ottenuto in 22 ore la separazione di una miscela di 20 DNP-amminoacidi sintetici.

In queste condizioni DNP-isoleucina e DNP-leucina non vengono separate; il dinitrofenolo e la dinitroanilina, che sono sempre presenti negli idrolizzati di proteine dinitrofenilate, non compaiono nel grafico poichè si tratta di una esperienza eseguita con una miscela sintetica. In realtà gli Autori osservano che in queste condizioni sperimentali il dinitrofenolo emergerebbe all'inizio del cromatogramma e ben distinto dal primo picco composto da isoleucina-leucina; la dinitroanilina invece emergerebbe nella zona alanina-prolina comprendendo i picchi di questi due dinitrofenilderivati; secondo gli Autori però è possibile, variando le condizioni di idratazione e di temperatura, allontanare la dinitroanilina da questa zona; alternativamente si potrebbe allontanare per sublimazione la dinitroanilina dall'idrolizzato della proteina dinitrofenilata prima di adsorbire tale idrolizzato sulla colonna; si tratta tuttavia di un procedimento molto complicato durante il quale, per di più, si corre il rischio di alterare gli altri DNP-amminoacidi presenti nella miscela.

Sulla base del lavoro di Kessner e coll. ⁽³⁾ è stato recentemente realizzato e messo in commercio un apparecchio semiautomatico per la determinazione quantitativa dei DNP-amminoacidi mediante cromatografia su colonne di gel di silice. Schematicamente l'apparecchio è costituito da un

dispositivo di tipo autograd a nove camere in vetro per la realizzazione del gradiente di eluzione: l'eluente dopo essere passato attraverso un saturatore contenente H_2SO_4 0,1 N viene pompato a flusso costante da una micropompa dosatrice sulla colonna di $0,9 \times 120$ cm di gel di silice su cui è stata adsorbita la miscela di DNP-amminoacidi in esame.

L'effluente della colonna passa a flusso continuo in un colorimetro che ne legge a 340 m μ la densità ottica, in una cuvetta da 2 ml con un cammino ottico di 10 mm; la densità ottica viene registrata, anch'essa in modo continuo, da un registratore. Volendo è possibile raccogliere le varie frazioni dell'eluente mediante un collettore di frazioni.

Inizialmente abbiamo usato l'apparecchio seguendo rigorosamente la procedura consigliata in linea di massima dalla ditta fornitrice. Ci siamo però ben presto resi conto che nelle condizioni sperimentali consigliate non si otteneva una risoluzione soddisfacente. Pertanto abbiamo eseguito una serie di esperimenti tenendo fisso il gradiente di eluzione e variando gli altri parametri che influiscono in modo determinante nella separazione delle miscele di DNP-amminoacidi e precisamente l'idratazione del gel di silice, la velocità di flusso della soluzione eluente e la temperatura della colonna.

Le condizioni sperimentali che ci hanno fornito i migliori risultati sono schematicamente riportate nella Tab. 1.

TABELLA 1 (*)

Gradiente di eluzione nella separazione di miscele di DNP-amminoacidi, formula n. 1

	Alcool amilico terziario (tAA)	n-Eptano	Metiletilchetone (MEK)
Camera 1	3	97	—
» 2	3	97	—
» 3	3	97	—
» 4	10	90	—
» 5	15	85	—
» 6	15	85	—
» 7	—	—	84
» 8	—	—	84
» 9	—	—	84

(*) Ripresa da (4).

Velocità di flusso: 120 ml/ora.

Pressione: circa 60 PSI.

Temperatura: 47° C.

Idratazione del gel di silice: ml 54,38 H_2SO_4 0,5N per 100 g di gel di silice secco.

Il gradiente di eluizione viene realizzato disponendo i solventi nelle nove camere nella maniera seguente: la prima camera, cioè quella dalla quale il solvente viene aspirato dalla micropompa dosatrice, conteneva 97 ml di eptano e 3 ml di tAA. È da notare che è di estrema importanza che il contenuto di questa camera sia portato e mantenuto alla temperatura di circa 60° allo scopo di deaerare completamente il solvente; come abbiamo già detto è questa una condizione determinante per evitare rotture o canalizzazioni della colonna di gel di silice; in pratica questo si realizza disponendo intorno alla camera un riscaldatore elettrico a rete. Le successive camere numero due e tre contenevano le stesse quantità degli stessi solventi. Nella camera 4 la quantità di eptano era ridotta a 90 ml e la quantità di tAA portata a 10 ml. Le camere 5 e 6 contenevano 85 ml di eptano e 15 di tAA. Infine le camere 7-8 e 9 contenevano solo 84 ml di MEK.

Il flusso, assicurato con notevole precisione da una micropompa dosatrice Milton-Roy, era di 120 ml per ora e produceva sulla colonna una pressione di circa 60 PSI. La temperatura della colonna veniva mantenuta costantemente a 47°C per mezzo di un ultratermostato. Per quanto riguarda l'idratazione del gel di silice, che veniva ottenuta con 54,38 ml di H_2SO_4 0,5N per 100 g di gel di silice secca, è bene sottolineare che occorre eseguirla con particolare cura perchè l'idratazione è uno dei punti più delicati per assicurare la riproducibilità dei risultati. Il gel di silice deve essere infatti portato a peso costante, il che si ottiene dopo una permanenza in stufa a 110° per cinque ore.

In queste condizioni sperimentali è stata ottenuta la separazione riprodotta nella parte superiore della Fig. 1. Il grafico si riferisce ad una miscela di 19 DNP-amminoacidi sintetici con aggiunta di dinitrofenolo e dinitroanilina, che viene risolta in 6 ore. Come appare evidente sia il dinitrofenolo che la dinitroanilina non disturbano le zone del cromatogramma che interessano i DNP-amminoacidi; è vero che il picco della dinitroanilina coincide con quello del triptofano, tuttavia è da tener presente che il triptofano viene distrutto durante l'idrolisi acida delle proteine.

Analogamente a quanto osservato da Kessner, non è possibile risolvere la zona isoleucina-leucina senza alterare completamente la risoluzione nelle altre zone del cromatogramma. La DNP-metionina-solfossido durante la cromatografia viene quantitativamente trasformata in DNP-metionina-solfone e viene quindi eluita con il picco di quest'ultima: in pratica comunque questi due composti non sono presenti nelle proteine come tali ma derivano dalla metionina ed il loro ricupero deve essere sommato con quello di questa ultima. Come appare dal grafico del cromatogramma, è anche evidente che durante le prime due ore di esperimento non si verifica l'eluizione di nessun DNP-derivato, se si fa eccezione per il dinitrofenolo che come è noto è un prodotto di idrolisi del dinitrofluorobenzene.

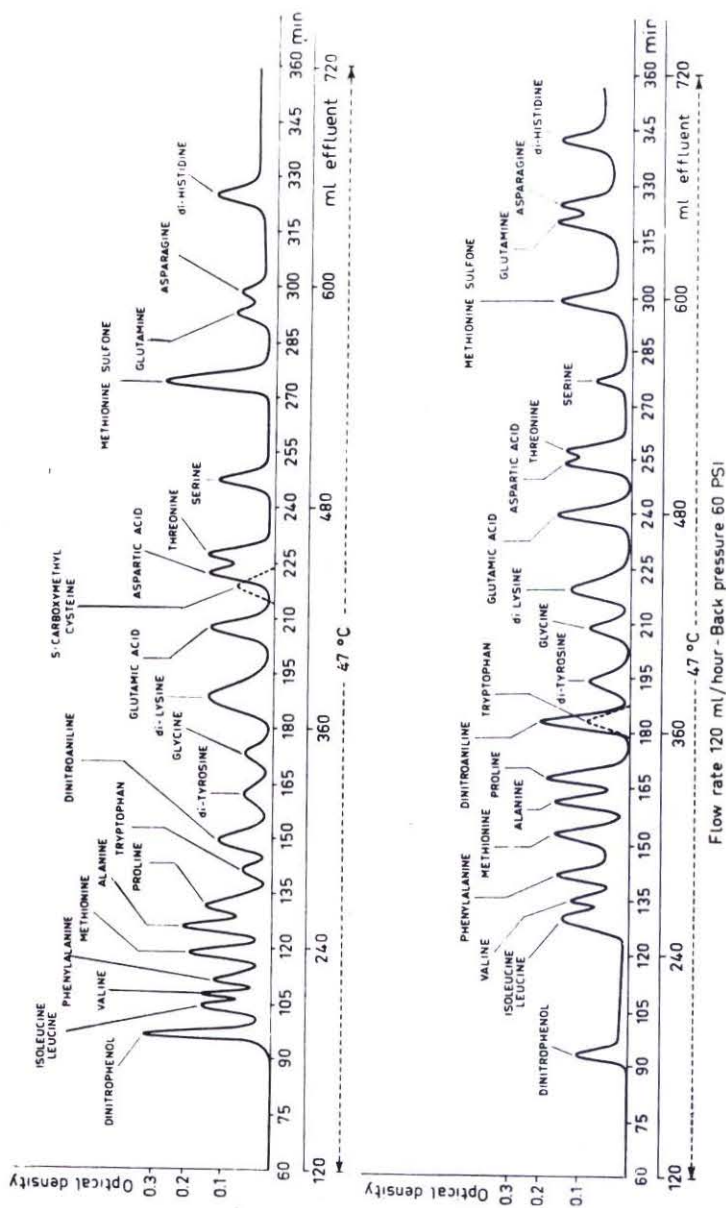


Fig. 1. — Separazione dei DNP-aminoacidi sintetici etere-solubili su colonne di 1×120 cm. Idratazione del gel di silice 54,38%. *In alto*: gradiente di eluzione formula n. 1. *In basso*: gradiente di eluzione formula n. 2. Riprodotta da (4).

Allo scopo di anticipare l'inizio della eluizione della miscela dei DNP-derivati abbiamo allora studiato la composizione del gradiente di eluizione servendoci del grafico delle contribuzioni delle nove camere dell'autograd nella composizione del gradiente. (Fig. 2).

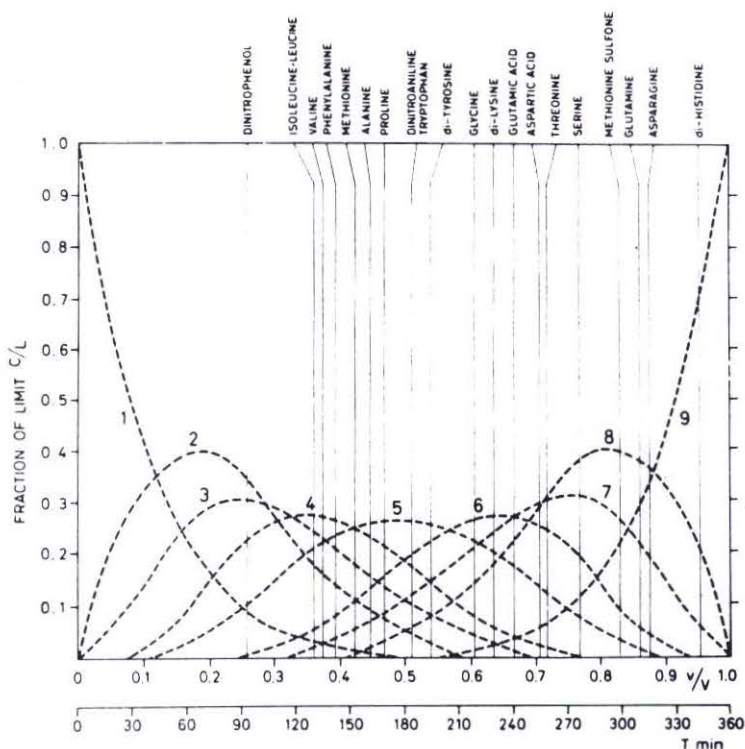


Fig. 2. — Contributo delle singole camere in un sistema a 9 camere. Gradiente di eluizione formula n. 1. Riprodotta da (4).

Sulle ascisse è riportata la percentuale del gradiente rispetto al volume totale del gradiente ed in questo caso anche il tempo corrispondente, in minuti, sull'ordinata invece sono disegnate le percentuali di contribuzione; le curve rappresentano quindi la percentuale di contribuzione di ciascuna camera per ciascuna frazione del gradiente.

Su questo grafico abbiamo disegnato il punto di emergenza dalla colonna di ciascuno dei DNP-derivati della miscela. Abbiamo così potuto constatare che questi cominciano ad emergere dopo che è passato il 36 per cento circa del gradiente, quando inizia la contribuzione della camera n. 7, cioè quando nel gradiente comincia ad intervenire l'azione del metiletilchetone.

Sulla base di questa constatazione abbiamo pensato di anticipare la contribuzione del metiletilchetone, pur essendo consapevoli che questo artificio tecnico avrebbe potuto provocare un avvicinamento fra loro dei primi picchi. Abbiamo quindi studiato il gradiente formula 2 (Tab. 2) nel quale il metiletilchetone è presente fin dalla camera 5. Il gradiente è così

TABELLA 2 (*)

Gradiente di eluizione nella separazione di miscele di DNP-amminoacidi, formula n. 2

	Alcool amilico terziario (tAA)	n-Eptano	Metiletilchetone (MEK)
Camera 1	5	95	—
» 2	6	94	—
» 3	7	93	—
» 4	10	90	—
» 5	15	75	8,5
» 6	15	60	21
» 7	—	—	84
» 8	—	—	84
» 9	—	—	84

(*) Ripresa da (4).

Velocità di flusso : 120 ml/ora.

Pressione : circa 60 PSI.

Temperatura : 47° C.

Idratazione del gel di silice : ml 54,38 H₂SO₄ 0,5N per 100 g di gel di silice secco.

costituito: la camera n. 1 contiene 95 ml di n-eptano e 5 ml di tAA, la camera n. 2 94 ml di eptano e 6 ml di tAA, la camera n. 3 93 ml di n-eptano e 7 ml di tAA, la camera n. 4 90 ml di n-eptano e 10 ml di tAA, la camera n. 5 75 ml di eptano, 15 ml di tAA e 8,5 ml di MEK, la camera n. 6 60 ml di n-eptano, 15 ml di tAA e 25 ml di MEK, e finalmente le camere n. 7, 8 e 9 come al solito, 84 ml di MEK. Le altre condizioni sperimentali non sono modificate. I risultati ottenuti sono raffigurati nella parte inferiore della Fig. 1. L'eluizione dei 21 DNP-derivati eteresolubili ha inizio con circa mezz'ora di anticipo ed è completa in 5 ore e mezzo. La risoluzione è generalmente altrettanto buona di quella ottenuta con il gradiente formula 1: un notevole miglioramento si osserva nella risoluzione della zona DNP-triptofano-dinitroanilina-di DNP-tirosina; anche

migliorata è la risoluzione nella zona acido aspartico-treonina e nella zona glutammina-asparagina. Nel cromatogramma appare non bene risolta la DNP-S-carbossimetilcisteina; ma il problema della risoluzione della cisteina e dei suoi derivati sarà trattato più diffusamente in seguito.

Anche in questo caso abbiamo riportato sul grafico delle contribuzioni (Fig. 3) i punti di emergenza dei vari DNP-derivati. L'eluizione dei primi composti comincia dopo l'inizio della contribuzione delle camere 5 e 6 che

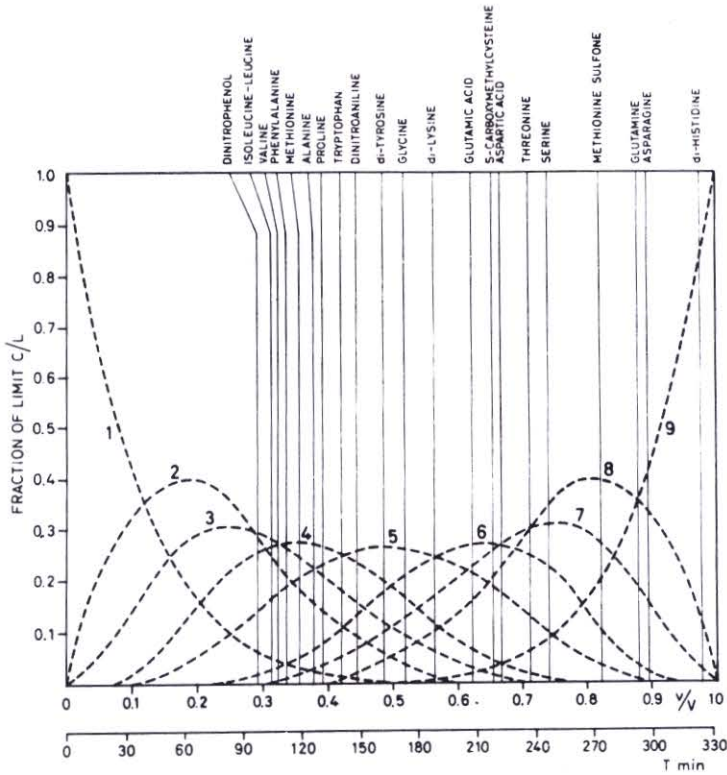


Fig. 3. — Contributo delle singole camere in un sistema a 9 camere. Gradienti di eluizione formula n. 2. Riprodotta da (4).

contengono MEK: questo fatto ci ha convinto della inutilità di anticipare ancora l'entrata nel sistema di questo solvente che avrebbe probabilmente avuto come unica conseguenza un ulteriore avvicinamento delle zone dei primi DNP-derivati.

Con queste condizioni sperimentali era stato praticamente risolto il problema di una rapida separazione, sempre riproducibile, dei DNP-ammi-

noacidi etere-solubili. Tuttavia rimaneva il problema di trovare le condizioni sperimentali per la separazione dei DNP-amminoacidi idrosolubili. Questi composti sono anche essi importanti per lo studio dei residui NH_2 -terminali dei peptidi e delle proteine poichè fra essi come è noto sono compresi la DNP-arginina, l'acido DNP-cisteico, la di DNP-istidina, la quale ultima pur essendo classificata fra i DNP-amminoacidi eteresolubili è piuttosto difficile da estrarre completamente dalle soluzioni acquose di DNP-amminoacidi. Pertanto il nostro obbiettivo era di ottenere la separazione, in un solo esperimento, di tutti i DNP-amminoacidi sia etere- che idro-solubili, allo scopo di evitare il passo della estrazione eterea degli idrolizzati proteici per avere un quadro completo dei DNP-amminoacidi presenti in questi idrolizzati.

Avevamo già osservato che alla fine di ogni esperimento era possibile eluire completamente i composti colorati rimasti sulla colonna semplicemente facendo passare sulla colonna del metiletilchetone puro; questo fatto faceva presumere che esiste un coefficiente di partizione per i DNP-amminoacidi idrosolubili fra il MEK e l'acqua, ed era altrettanto presumibile che questo coefficiente di partizione fosse differente per i diversi DNP-amminoacidi idrosolubili.

Il problema quindi doveva consistere esclusivamente nel dare il tempo al MEK di eluire dalla colonna i DNP-amminoacidi idrosolubili. D'altra parte non era possibile anticipare ancora la contribuzione del MEK introducendo questo solvente nelle camere 3 e 4 senza avere la conseguenza indesiderabile di avvicinare troppo fra di loro le zone dei primi DNP-amminoacidi: a nostro parere la soluzione del problema consisteva nell'aumentare il tempo di cromatografia lasciando invariata la forma del gradiente e lasciando anche invariata la velocità di flusso che come sappiamo è determinante per una buona eluizione. Abbiamo pertanto aumentato il contenuto di ciascuna camera del 50 % lasciando invariata la composizione percentuale del solvente contenuto in ciascuna di esse ottenendo il gradiente formula 3 (Tab. 3). La prima camera contiene 7,5 ml di tAA e 142,5 ml di n-eptano, la seconda contiene 9 ml di tAA e 141 ml di n-eptano, la terza 10,5 ml di tAA e 139,5 di n-eptano, la quarta 15 ml di tAA e 135 di n-eptano, la quinta 22,5 di tAA, 112,5 di n-eptano e 12,75 di MEK, la sesta 10 ml di tAA, 70 ml di n-eptano e 61 ml di MEK, le ultime tre contengono 126 ml di MEK. Le altre condizioni sperimentali, flusso, pressione, idratazione, venivano mantenute costanti; per quello che riguarda la temperatura l'esperienza ci ha dimostrato che per ottenere una migliore risoluzione nella prima zona del cromatogramma e la eluizione completa di DNP-amminoacidi idrosolubili, è necessario iniziare l'esperimento alla temperatura, come al solito, di 47° e portare successivamente la temperatura a $28^\circ - 30^\circ$ dopo 90 minuti dall'inizio dell'esperimento.

TABELLA 3 (*)

Gradiente di eluizione nella separazione di miscele di DNP-amminoacidi, formula n. 3

	Alcool amilico terziario (t.AA)	n-Eptano	Metiletilchetone (MEK)
Camera 1	7,5	142,5	—
» 2	9	141	—
» 3	10,5	139,5	—
» 4	15	135	—
» 5	22,5	112,5	12,75
» 6	10	70	61
» 7	—	—	126
» 8	—	—	126
» 9	—	—	126

(*) Ripresa da (4).

Velocità di flusso : 120 ml/ora.*Pressione* : circa 60 PSI.*Temperatura* : 47° - 30° C.*Idratazione del gel di silice* : ml 54,38 H₂SO₄ 0,5N per 100 g di gel di silice secco.

La separazione di una miscela di 24 DNP-amminoacidi (Fig. 4) etere-solubili ed idrosolubili si ottiene in 10 ore e, come è evidente dal grafico della cromatografia, la risoluzione è in genere molto soddisfacente. C'è da osservare però che la di DNP-cistina e la di DNP-cisteina emergono con la DNP-treonina.

È quindi necessario, quando nell'analisi dei residui NH₂-terminali si trova un DNP-derivato che emerge nella posizione della DNP-treonina, assicurarsi che si tratti veramente di treonina sottoponendo la proteina o il peptide alla ossidazione con acido performico; questo trattamento ossida quantitativamente la cistina e la cisteina con formazione di acido cisteico che emerge come acido DNP-cisteico, ben separato, nella zona degli idrosolubili. Per distinguere un eventuale residuo NH₂-terminale cistina da un residuo NH₂-terminale cisteina è necessario invece sottoporre preventivamente la proteina o il peptide ad alchilazione con iodoacetammide; dopo dinitrofenilazione avremo che nel caso della cisteina NH₂-terminale si otterrà DNP-S-carbossimetilcisteina che, come è evidente nel cromatogramma, emerge come picco isolato fra l'acido DNP-glutammico e l'acido DNP-aspartico. Durante la dinitrofenilazione nel caso di proteine o peptidi contenenti residui cisteinili non terminali, il gruppo SH libero di questi residui va incontro a dinitrofenilazione, dando luogo a mono DNP-S-cisteina che emerge insieme con l'acido DNP-glutammico. Anche in questo caso, quando nel

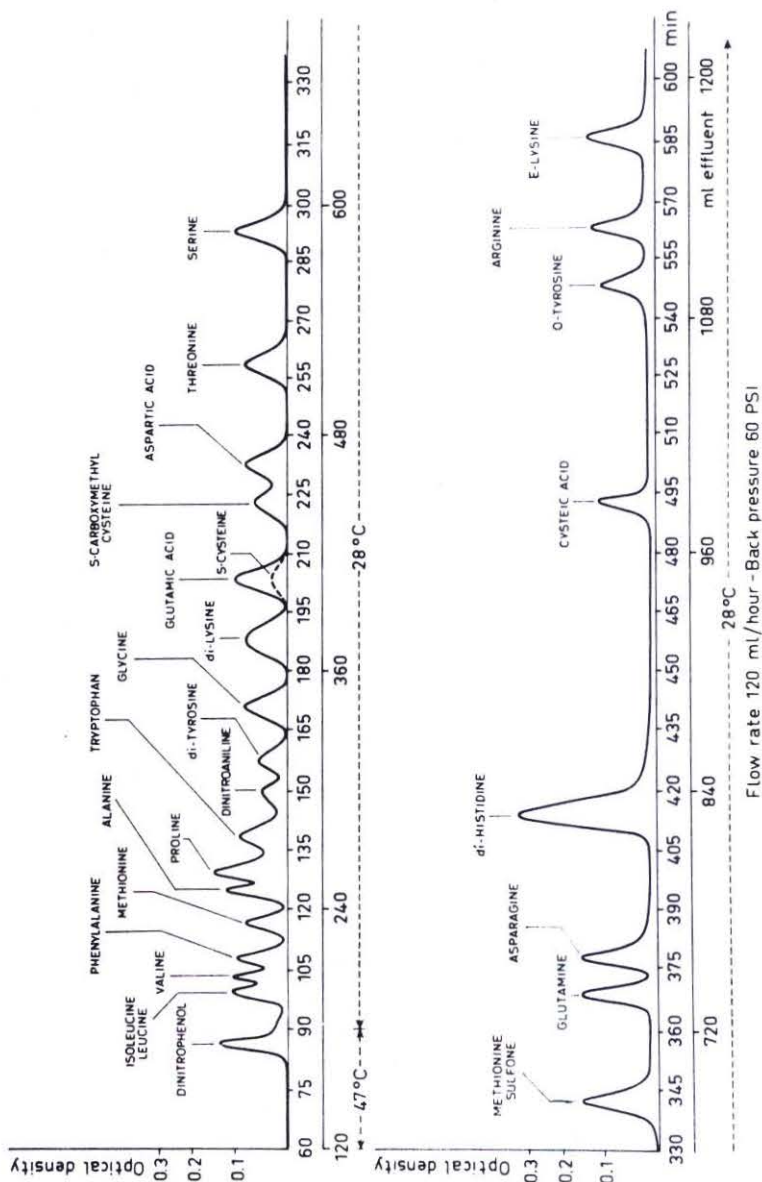


Fig. 4. — Separazione dei DNP-aminoacidi sintetici etere - ed idro-solubili su colonne di 1×120 cm. Idratazione del gel di silice 54.38 %. Gradiente di eluzione formula n. 3. Riprodotta da (4).

corso di una analisi per i residui NH_2 -terminali si trova un DNP-derivato che emerge nella zona dell'acido DNP-glutammico, occorre ossidare la proteina con acido performico, per escludere che in realtà non si tratti di mono DNP-S-cisteina ed inoltre per essere in grado di calcolare con esattezza l'effettivo ricupero dell'acido DNP-glutammico. Nella Fig. 5 è rappresen-

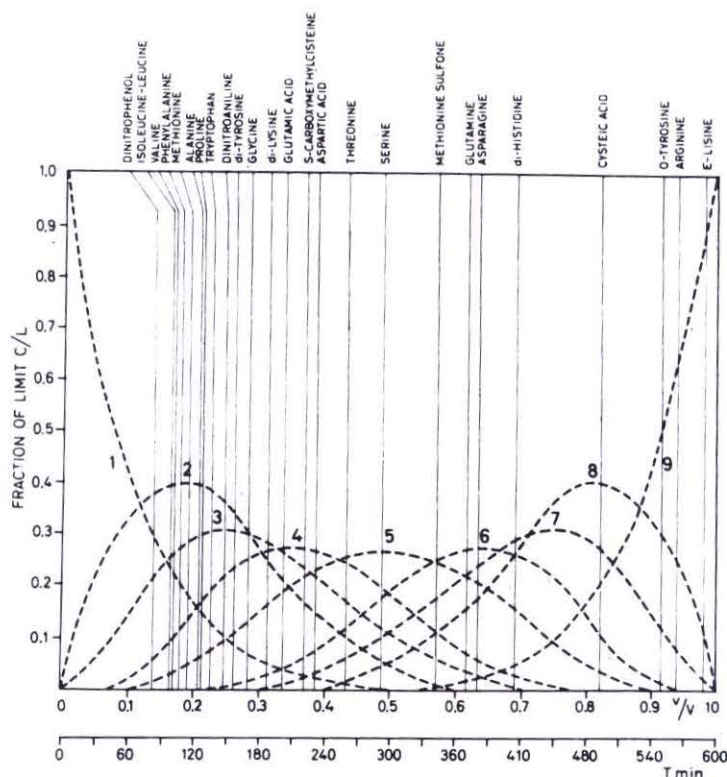


Fig. 5. — Contributo delle singole camere in un sistema a 9 camere. Gradiente di eluzione formula n. 3. Riprodotta da (4).

tata come al solito la contribuzione delle camere dell'autograd nella formazione del gradiente n. 3 ed i punti di emergenza dalla colonna dei vari DNP-amminoacidi.

A questo punto ci è sembrato che poteva avere un interesse pratico realizzare delle condizioni sperimentali che consentissero anche una separazione rapida, necessaria in particolari condizioni, dei soli DNP-amminoacidi idrosolubili. Abbiamo pertanto studiato la formula di gradiente n. 4 che è rappresentata nella Tab. 4, nella quale la contribuzione del MEK ha inizio nella camera n. 3 e quindi in pratica fin dall'inizio dell'esperimento. Le camere n. 1 e 2 contengono 15 ml di tAA e 85 ml di n-eptano, le

TABELLA 4 (*)

Gradiente di eluizione nella separazione di miscele di DNP-amminoacidi, formula n. 4

		Alcool amilico terziario (tAA)	n-Eptano	Metiletilchetone (MEK)
Camera	1	15	85	—
»	2	15	85	—
»	3	—	46	46
»	4	—	46	46
»	5	—	—	84
»	6	—	—	84
»	7	—	—	84
»	8	—	—	84
»	9	—	—	84

* Ripresa da (4).

Velocità di flusso: 150 ml/ora.

Pressione: circa 25 PSI.

Temperatura: 28° C.

Idratazione del gel di silice: ml 54,38 H₂SO₄ 0,5 N per 100 g di gel di silice secco.

camere n. 3 e 4 contengono 46 ml di n-eptano e 46 ml di MEK, nelle camere 5-6-7-8 e 9 sono contenuti 84 ml di MEK. Con questo gradiente abbiamo usato gel di silice sempre idratato con 54,38 ml di H₂SO₄ 0,5 N per 100 g di gel di silice e sempre equilibrato con eptano, in colonne di 1 × 50 cm. Il flusso è stato aumentato a 150 ml per ora, con una pressione di circa 25 PSI e con una temperatura di 28°. La risoluzione che si ottiene, riportata nella Fig. 6, è eccellente ed è completa in 225 minuti.

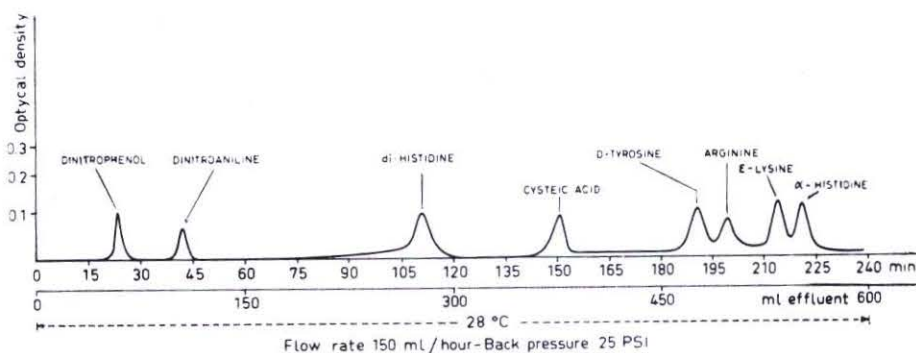


Fig. 6. — Separazione dei DNP-amminoacidi sintetici idro-solubili su colonne di 1 × 50 cm. Idratazione del gel di silice 54,38 %. Gradiente di eluizione formula n. 4. Riprodotta da (4).

Chiunque usi per lungo tempo e in modo continuativo delle apparecchiature di tipo automatico è indotto dall'esperienza alla ricerca di modificazioni che possano essere vantaggiose per un miglioramento delle loro prestazioni. Pertanto anche l'apparecchio originale per l'analisi dei DNP-derivati degli amminoacidi è stato da noi modificato nel corso del nostro lavoro e i miglioramenti apportati sono schematicamente rappresentati nella Fig. 7.

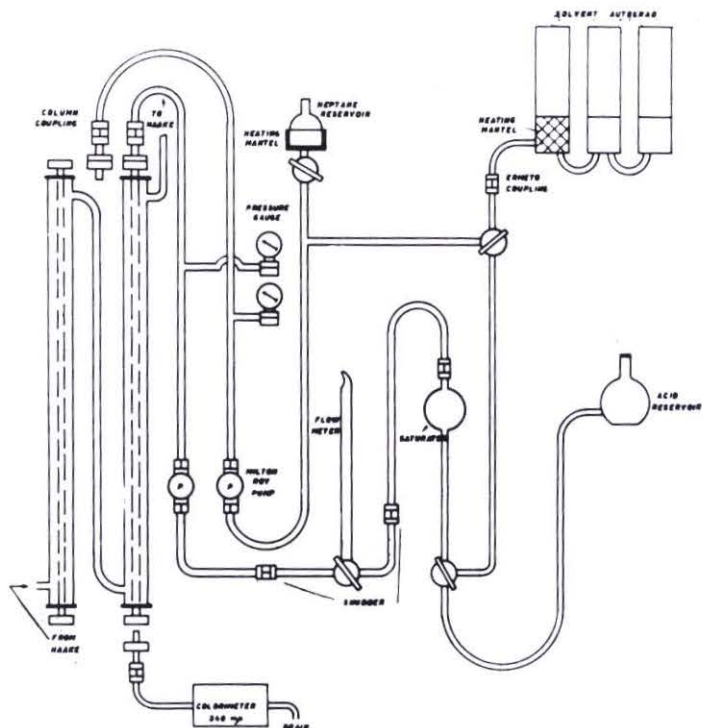


Fig. 7. — Apparecchiatura Technicon per l'analisi automatica dei DNP-derivati. Riprodotta da (4).

Nell'apparecchio originale il gradiente a partire dalla camera n. 1 dell'autograd, riscaldato per deaerare il solvente con un riscaldatore elettrico a rete, passa attraverso un saturatore contenente una soluzione diluita di acido solforico e viene pompato a flusso costante da una micropompa dosatrice sulla colonna di 1×120 cm di gel di silice: l'effluente della colonna passa attraverso un colorimetro che ne legge continuamente la densità ottica a $340 \text{ m}\mu$.

La lettura avveniva inizialmente in una cuvetta avente la capacità di 2 ml ed un cammino ottico di 10 mm; per migliorare la sensibilità e per

diminuire la possibilità di rimescolamento dell'effluente dovuta al volume relativamente elevato della cuvetta questa è stata sostituita con una nuova cuvetta della capacità di 100 μ l, avente un cammino ottico di 15 mm.

Inoltre per avere la possibilità di impaccare una seconda colonna senza essere costretti ad usare come riserva di n-eptano l'autograd, e quindi contemporaneamente allo svolgersi nell'altra colonna di una corsa analitica, abbiamo introdotto una riserva di n-eptano, che viene preventivamente acidificato con la solita soluzione diluita di H_2SO_4 , riscaldata da un riscaldatore elettrico sempre allo scopo di deaerare il solvente prima che questo venga convogliato verso la colonna n. 2 per mezzo di una seconda micropompa dosatrice (pompa di impaccaggio): una serie di rubinetti a tre vie, collegati con la riserva di eptano, permette di deviare il flusso del solvente dalla pompa di impaccaggio a quella di eluzione, attraverso il saturatore ed il flussometro, allo scopo sia di controllare la regolarità del flusso e della pressione all'inizio di un nuovo esperimento, sia di lavare il sistema di tubi dal MEK residuo alla fine di un esperimento.

Un'altra modificazione riguarda il sistema di impaccaggio della colonna; il riempimento e l'impaccaggio della colonna vengono eseguiti, nel sistema originale, per semplice gravità mettendo la parte superiore della colonna che si intende impaccare in comunicazione con un vaso in cui è contenuta la sospensione di gel di silice in eptano continuamente agitata mediante un agitatore: quando il gel di silice è tutto sedimentato nella colonna, con la pompa dosatrice di eluizione viene applicata una pressione che provoca la riduzione in altezza dell'adsorbente: ne deriva la necessità di rifornire di nuovo la colonna di una ulteriore quantità di gel di silice per riportarla all'altezza voluta e di applicare di nuovo la pressione per mezzo della micropompa e così via; praticamente è quindi impossibile ottenere un impaccaggio uniforme della colonna e di conseguenza una perfetta riproducibilità dei risultati da una esperienza all'altra.

Allo scopo di ovviare a questi inconvenienti è stato studiato e realizzato in Istituto, con la collaborazione dell'Ing. Scaccia-Scarafoni, il sistema riprodotto nella Fig. 8. Questo consiste in un recipiente di acciaio inossidabile con un coperchio che viene avvitato a perfetta tenuta. Nel recipiente è contenuta una lamina sagomata di acciaio inossidabile, collegata, mediante uno stelo che attraversa il coperchio a perfetta tenuta, con un motorino elettrico. Il recipiente è collegato in uscita con una connessione in teflon che permette di adattarlo alla colonna di vetro; il coperchio è anche esso attraversato da un tubo in entrata perfettamente adattabile alla connessione in teflon collegata alla tubatura proveniente dalla pompa di impaccaggio. Dopo aver collegato il recipiente alla colonna, il sistema viene riempito con la quantità di sospensione di gel di silice in eptano necessaria per ottenere un riempimento della colonna fino all'altezza voluta; si avvita quindi

il coperchio, si mette in moto l'agitatore, si connette l'apertura di entrata con la pompa di impaccaggio e si immette nel sistema un flusso costante di eptano uguale a quello che verrà usato durante l'esperimento fino a quando la colonna non è pronta.

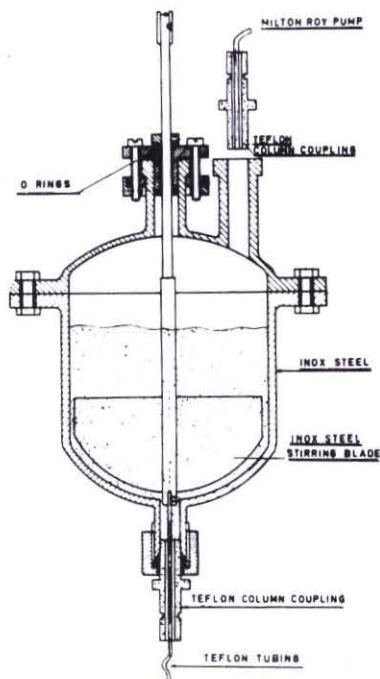


Fig. 8. — Apparecchiatura per la preparazione delle colonne. Riprodotta da⁽⁴⁾.

Tutte le esperienze delle quali abbiamo parlato fino ad ora sono state eseguite con miscele di vari DNP-amminoacidi sintetici dapprima costituite da prodotti cromatograficamente puri della ditta Mann e successivamente da prodotti cromatograficamente puri della ditta Gallard-Schlesinger. Naturalmente per ciascun tipo di separazione sono stati eseguiti diversi esperimenti per verificarne la riproducibilità che si è dimostrata in ogni caso perfetta; tuttavia il problema principale era quello di stabilire la riproducibilità in senso quantitativo di questo tipo di analisi cromatografica e di verificarne la precisione stabilendone i limiti di errore. Per la calibrazione abbiamo usato miscele contenenti circa 0,1 micromoli di DNP-amminoacidi accuratamente misurati.

L'integrazione dei picchi ottenuti con queste miscele è stata eseguita con il metodo dell'altezza-larghezza, moltiplicando l'altezza dei picchi, dopo averla ovviamente corretta per gli spostamenti della linea di base, per la larghezza misurata a metà altezza di essi anche questa dopo correzione per gli spostamenti dalla linea di base. I risultati di queste operazioni

sono dei numeri che sono proporzionali all'area dei picchi cui si riferiscono; quando questi numeri vengono riportati a picchi ottenuti con 0,1 micro-moli dei DNP-amminoacidi, prendono il nome di costanti di integrazione HW del DNP-amminoacido cui si riferiscono e sono necessari per il calcolo del recupero di ciascun DNP-amminoacido. Nella Tab. 5 sono riportate le costanti di integrazione di ciascuno dei DNP-amminoacidi usati negli esperimenti ottenuti sia usando la cuvetta con cammino ottico di 10 mm (colonna 1) sia usando la cuvetta con cammino ottico di 15 mm (colonna 2).

È ovvio che i risultati riportati nella Tab. 5 sono la media dei dati ottenuti in diversi esperimenti, è altrettanto ovvio che usando uno qualsiasi dei sistemi di eluizione che sono stati descritti si ottiene sempre la stessa costante di integrazione; una riprova della riproducibilità quantitativa dei dati ottenuti è rappresentata dal fatto che le costanti di integrazione otte-

TABELLA 5 (*)

Costanti di integrazione (C_{HW}) dei DNP-amminoacidi

DNP-Amminoacidi 0,1 μ M	C_{HW} Cuvetta ml 2 Cammino ottico mm 10	C_{HW} Cuvetta μ l 100 Cammino ottico mm 15	DNP-Amminoacidi 0,1 μ M	C_{HW} Cuvetta ml 2 Cammino ottico mm 10	C_{HW} Cuvetta μ l 100 Cammino ottico mm 15
Isoleucina	1,75	2,60	Acido aspartico . .	1,80	3,07
Leucina	1,74	2,68	Treonina	2,24	3,36
Valina	2,39	3,64	Serina	1,80	2,85
Fenilalanina	1,96	3,02	Metionina Solfone .	2,28	3,42
Metionina	1,14	1,71	Glutammina	2,55	3,63
Alanina	2,19	3,41	Asparagina	2,54	3,84
Prolina	2,59	3,84	di-Istidina	2,52	3,28
Triptofano	1,66	2,49	Acido cisteico . . .	1,71	3,03
di-Tirosina	1,21	1,90	o-Tirosina	0,27	0,35
Glicina	0,94	1,55	Arginina	2,46	3,29
di-Lisina	2,81	4,73	ϵ -Listina	2,59	3,64
Acido glutammico . .	2,16	3,74	α -Istidina	1,64	2,46
S-Carbossi metilci- steina	1,03	1,54			

(*) Ripresa da (4).

Densità ottica 340 m μ .

Registratore: velocità della carta 25 cm/ora.

nute usando la cuvetta con cammino ottico di 10 mm sono inferiori del 50 % a quelle ottenute usando la cuvetta con cammino ottico di 15 mm. Naturalmente le costanti di integrazione per i DNP-amminoacidi idrosolubili separati con la colonna corta non sono confrontabili con quelle degli stessi composti separati con la colonna normale poichè nel primo caso il flusso della soluzione eluente è superiore.

I limiti di errore che abbiamo osservato, anche nei casi meno favorevoli non hanno mai superato il 4 %. Quantità di DNP-amminoacidi fino a 0,05 micromoli se si usa la cuvetta con cammino ottico di 10 mm e fino a 0,025 micromoli se si usa la cuvetta da 15 mm emergono in picchi ben definiti e riproducibili che possono essere usati sia per l'identificazione che per la calibrazione. C'è ancora, naturalmente, da osservare che queste costanti di integrazione sono strettamente dipendenti dalle condizioni sperimentali ed in particolare dal flusso del gradiente e dalla velocità della carta nel registratore; è quindi consigliabile ed opportuno che vengano stabilite per ciascun apparecchio a seconda delle necessità sperimentali. L'esposizione dell'argomento più strettamente connesso con il titolo di questo seminario sarebbe qui terminata. Tuttavia, poichè effettivamente questo metodo è stato da noi applicato alla determinazione dei residui NH_2 -terminali di alcune emoglobine di anfibio, non sembra fuori di luogo esporre alcune considerazioni relative alla risoluzione del problema della determinazione dei residui NH_2 -terminali delle proteine.

Rhinesmith e coll.⁽⁵⁾ hanno eseguito nel 1957 la determinazione dei residui NH_2 -terminali della emoglobina umana con il metodo di Sanger⁽¹⁾. In questo lavoro vengono discussi in modo molto esauriente i fattori che influiscono in maniera determinante sulla applicazione quantitativa del metodo di Sanger⁽¹⁾ alla determinazione degli amminoacidi NH_2 -terminali delle proteine. In breve questi fattori sono: 1) la dinitrofenilazione quantitativa della proteina; 2) l'idrolisi quantitativa della proteina; 3) l'equivalenza tra la proteina libera e la proteina dinitrofenilata; 4) la distribuzione dei DNP-amminoacidi terminali durante l'idrolisi della DNP-proteina, e finalmente 5) la perdita dei DNP-amminoacidi durante l'estrazione e le operazioni di cromatografia.

Mi sembra opportuno discutere brevemente ciascuno di questi punti.

1) Per quello che riguarda la dinitrofenilazione delle emoproteine, Rhinesmith e coll.⁽⁵⁾ consigliano il metodo di Levy e Li⁽⁶⁾, eseguito in mezzo acquoso ad evitare la possibilità di una iniziale denaturazione della proteina. Con questa tecnica gli Autori suddetti ottengono una dinitrofenilazione completa in 1 ora. Noi abbiamo seguito il metodo di Levy e Li⁽⁶⁾, in mezzo acquoso tamponato, usando un pH-stato per fare in modo che la reazione avvenga completamente nelle stesse condizioni ottimali di pH

cioè a pH 8,5 — 9. Registrando il grafico del pH-stato, cioè le aggiunte di NaOH che il pH-stato fa automaticamente alla miscela per mantenere costante il pH, contro il tempo di reazione, si può esprimere un giudizio sull'andamento della dinitrofenilazione (Fig. 9). Come si vede, la curva comincia a salire piuttosto rapidamente al momento dell'aggiunta del di-

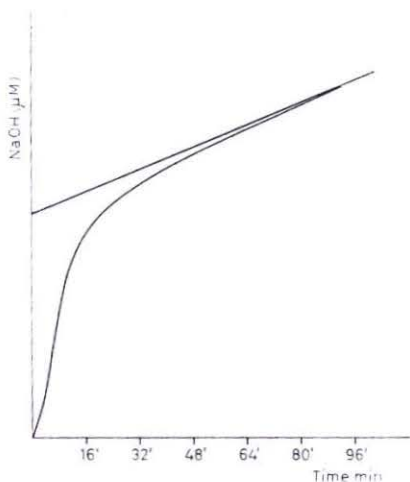


Fig. 9. — Consumo di NaOH durante la dinitrofenilazione. Riprodotta da (4).

nitrofluorobenzene, per la produzione di acido fluoridrico dovuta, come abbiamo detto, alla reazione del DNFB con la proteina; dopo un certo periodo la curva tende ad assumere un andamento costante dovuto esclusivamente alla presenza di CO_2 nel sistema.

A questo punto la reazione viene considerata completa ed estrapolando al tempo 0 questa seconda parte della curva è possibile calcolare l'idrato sodico effettivamente consumato per neutralizzare l'acido fluoridrico e quindi la quantità di DNFB che effettivamente ha reagito con la proteina ed ovviamente i residui di amminoacidi che sono stati dinitrofenilati. Secondo la nostra esperienza la dinitrofenilazione è completa con questo metodo dopo 90-120 minuti dall'inizio della reazione.

2) L'idrolisi della proteina dinitrofenilata non costituisce più oggi il problema che costituiva nel passato. Esiste infatti un procedimento ormai standardizzato che assicura una completa idrolisi dei legami peptidici e la minore possibile distruzione dei prodotti di idrolisi. Si tratta di una idrolisi acida eseguita in fiale chiuse sotto un vuoto spinto.

3) Per quello che riguarda il calcolo della equivalenza ponderale fra la proteina, diciamo così, nativa e la proteina dinitrofenilata, esso è attualmente molto semplificato sia dalla conoscenza della quantità di dinitrofluorobenzene consumato nella reazione di dinitrofenilazione, che, come ab-

biamo visto si può dedurre dalla curva del pH-stato, sia dalla conoscenza della composizione in amminoacidi della proteina, che può essere determinata sperimentalmente.

A questo proposito è da ricordare che quando il dinitrofluorobenzene reagisce con una proteina o peptide, oltre ovviamente a marcare, mediante dinitrofenilazione, il gruppo α -amminico dell'amminoacido N-terminale, reagisce anche con alcuni gruppi laterali di altri amminoacidi presenti nella catena polipeptidica. Precisamente tali gruppi laterali sono l'ossidrile del gruppo fenolico della tirosina che dà luogo alla O-DNP-tirosina, il gruppo amminico libero dal legame peptidico, che è contenuto nella lisina che dà luogo alla ϵ -DNP-lisina, il gruppo imminico dell'anello imidazolico della istidina che dà luogo alla N-imidazol-DNP-istidina, e infine il gruppo tiolico della cisteina, che dà luogo alla mono DNP-S-cisteina. Naturalmente qualora uno di questi amminoacidi fosse N-terminale di una proteina, questo residuo N-terminale verrebbe marcato anche nel gruppo α -amminico, che in questo caso sarebbe libero; si troverebbe, dopo l'idrolisi della proteina, un residuo di-dinitrofenilderivato cioè con due residui dinitrofenilici: in pratica possiamo trovare di-DNP-lisina, di-DNP-istidina, di-DNP-tirosina e di-DNP-cisteina. Appunto per liberarsi dei mono-DNP-amminoacidi che vengono comunque dinitrofenilati durante la dinitrofenilazione di una proteina o di un peptide, si fa seguire alla dinitrofenilazione ed alla idrolisi l'estrazione eterea poichè questi mono DNP-amminoacidi, conservando il loro carattere di dipolarità, restano nella fase acquosa; l'unico dei DNP-amminoacidi derivati dalla dinitrofenilazione del residuo NH_2 -terminale che resta anche esso nella fase acquosa, poichè conserva la dipolarità, è la DNP-arginina insieme all'acido DNP-cisteico che è comunque un prodotto di ossidazione. Del resto, come abbiamo già visto, è ora possibile separare con una sola colonna tutti i DNP-amminoacidi etere-solubili ed idrosolubili che possono essere liberati dalla idrolisi di una proteina dinitrofenilata.

Per tornare al calcolo del rapporto ponderale fra una proteina nativa e la stessa proteina dinitrofenilata, è ovvio che l'introduzione dei radicali dinitrofenilici nei suddetti amminoacidi compresi nella catena polipeptidica sposta questo rapporto in favore della proteina dinitrofenilata; è tuttavia possibile, conoscendo il numero dei residui lisile, istidile, tirosile e cisteinile contenuti in una molecola proteica, calcolare con esattezza l'incremento ponderale di questa proteina dovuto alla introduzione dei corrispondenti radicali dinitrofenilici ed introdurre quindi questo dato nel calcolo del ricupero del residuo NH_2 -terminale.

In questo calcolo va naturalmente tenuto conto anche dell'aumento ponderale della DNP-proteina dovuto alla umidità: la nostra esperienza ha confermato il dato di Rhinesmith e coll. ⁽⁵⁾ secondo i quali la DNP-pro-

teina, dopo una permanenza di tre giorni in essiccatore su acido solforico a temperatura ambiente perde circa il 5 % del suo peso.

4) È noto da tempo che la distruzione dei DNP-amminoacidi durante la idrolisi acida di una proteina dinitrofenilata è estremamente variabile a seconda dei vari amminoacidi, delle proteine e del tempo di idrolisi; è quindi assolutamente necessario stabilire per ogni proteina e per ogni amminoacido il tempo ottimale di idrolisi che assicuri il massimo di completezza della idrolisi ed il minimo di distruzione del DNP-amminoacido.

Non è possibile stabilire sperimentalmente questi dati calcolando i recuperi di una miscela di DNP-amminoacidi sintetici prima e dopo che questa miscela sia stata sottoposta alle stesse condizioni sperimentali in cui si esegue l'idrolisi della DNP-proteina, dato che nella distruzione dei DNP-amminoacidi durante l'idrolisi acida giuoca fra l'altro un ruolo importante anche la loro posizione nella molecola proteica.

Noi operiamo nel modo seguente: sottoponiamo la proteina dinitrofenilata a quattro differenti tempi di idrolisi e calcoliamo il recupero dei DNP-amminoacidi estrapolando al tempo 0 le curve così ottenute, come è dimostrato nella Fig. 10 nella quale sono rappresentati i risultati degli

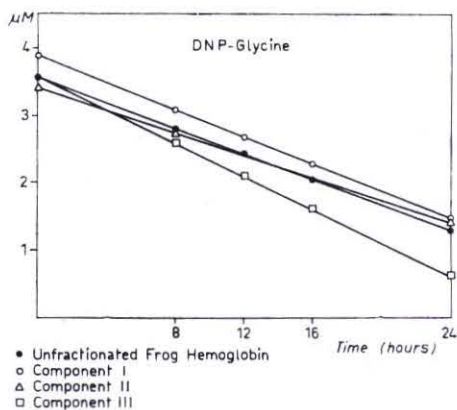


Fig. 10. — Estrapolazione a zero dei recuperi della glicina NH_2 -terminale della emoglobina totale di rana e dei tre componenti di essa, a tempi differenti. Sulle ordinate sono riportati i recuperi della DNP-glicina, e sulle ascisse i tempi di idrolisi. Riprodotta da (4).

esperimenti eseguiti per la determinazione dei recuperi della glicina NH_2 -terminale sia della emoglobina totale di rana che dei tre componenti di essa. Sulle ordinate sono riportati i recuperi della DNP-glicina e sull'ascissa i tempi di idrolisi.

5) La perdita dei DNP-derivati durante i procedimenti di estrazione è praticamente nulla; infatti i recuperi di una miscela di standard prima e dopo l'estrazione eterea sono identici.

Anche il procedimento cromatografico non comporta alcuna perdita di materiale, come è dimostrato dalla invariabilità delle costanti di integrazione.

Nelle condizioni sperimentali fissate in base a queste considerazioni abbiamo ottenuto nel caso della emoglobina umana un ricupero della valina NH_2 -terminale pari al 93 % del teorico calcolato sulla base del peso molecolare di 64500. Abbiamo inoltre riesaminato il ricupero ottenuto da Rhinesmith e coll. ⁽⁵⁾ introducendo nel calcolo il peso molecolare reale della emoglobina umana calcolato dalla sua composizione in amminoacidi, cioè 64500, alquanto differente da quello usato da questi Autori nel loro calcolo, che era stato determinato mediante ultracentrifugazione: il recupero così corretto risulta essere dell'87 %.

Nel caso delle varie emoproteine di anfibi che abbiamo studiato, i recuperi degli amminoacidi NH_2 -terminali sono compresi tra il 90 ed il 98 % rispetto ai teorici calcolati sulla base dei pesi molecolari determinati mediante ultracentrifugazione ed osmometria.

Un esempio è raffigurato nella Tab. 6 in cui sono riportati i recuperi della glicina N-terminale delle emoglobine di rana. Tenendo conto del fatto

TABELLA 6 (*)

Recuperi della glicina N-terminale della emoglobina di rana. Peso molecolare 68.000

	DNP-Glicina (M/MHb)
Hb di rana, non frazionata	3,6
I Componente	3,9
II Componente	3,4
III Componente	3,6

(*) Ripresa da ⁽⁴⁾.

che il peso molecolare usato per il calcolo, cioè 68000, è alquanto più alto di quello risultante da calcoli compiuti sulla base della composizione in amminoacidi di queste emoproteine, questi recuperi possono essere considerati davvero eccellenti.

BIBLIOGRAFIA

- (1) F. SANGER. The Free Amino Groups of Insulin. *Biochem. J.*, **39**, 507 (1945).
- (2) P. EDMAN. Method for Determination of the Amino Acid Sequence in Peptides. *Acta Chem. Scand.*, **4**, 283 (1950).
- (3) L. KESSNER, E. MUNTWYLER, G. E. GRIFFIN & I. ABRAMS. Automatic Column Chromatography of Ether-and Water-Soluble 2, 4-Dinitrophenyl-Derivatives of Amino Acids, Peptides, and Amines. *Anal. Chem.*, **35**, 83 (1963).

- (4) L. TENTORI, G. VIVALDI, S. CARTA, S. VELANI & I. MANDARÀ. The automatic separation by column chromatography of ether and water soluble 2, 4-DNP-derivatives of aminoacids. *Proc. 1965 Technicon Symp. on Analytical Chemistry*, New York, Mediad Inc. 1966, p. 659.
- (5) H. S. RHINESMITH, W. A. SCHROEDER & L. PAULING. The N-terminad Amino Acid Residues of Normal Adult Hemoglobin A. Quantitative Study of Certain Aspects of Sanger's DNP - Method. *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 609 (1957).
- (6) A. L. LEVY & C. H. LI. Kinetic studies on the reaction of N-terminal group reagents with α -corticotropin, and N- terminal group analysis. *J. Biol. Chem.*, **213**, 487 (1955).