

PAPIERCHROMATOGRAPHISCHE TRENNUNG VON CYCLISCHEN PEPTIDEN-OLIGOMEREN DES CAPROLACTAMS

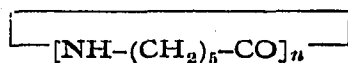
KAZIMIERZ CZEREPKO

*Institut für allgemeine Chemie und Institut für physiologische Chemie
der Medizinischen Akademie, Białystok (Polen)*

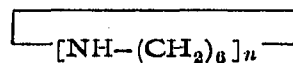
(Eingegangen den 16. April 1962)

Bei der Hitzepolymerisation von Caprolactam entsteht ein Gleichgewichtsgemisch, das neben Caprolactam auch dessen cyclische Oligomere enthält.

Die papierchromatographischen Untersuchungen dieser Ringmoleküle wurden erst von ZAHN UND REXROTH durchgeführt¹. Die Cycloamide (I, $n = 1$ bis 4) wurden in Pyridin-Wasser (70:30) 20 Stunden chromatographiert, ohne gute Ergebnisse zu erhalten. Die Unterschiede zwischen den R_F -Werten der einzelnen cyclischen Oligomeren waren sehr niedrig (0.02 bis 0.04). Im Phenol-Wasser (80:20) trennten sich die untersuchten Substanzen nicht und wanderten zusammen mit der Lösungsmittelfront. Um bessere Trennungsmöglichkeiten zu erhalten hatten ZAHN UND SPOOR in ihren späteren Arbeiten²⁻⁴ die Cycloamide mit Lithiumaluminiumhydrid zu den entsprechenden cyclischen Aminen (II) reduziert und diese in *sek.*-Butanol-Ameisen-



(I)



(II)

säure-Wasser (75:15:10) über 4 Tage chromatographiert. Dieses Verfahren erlaubte die Identifizierung und quantitative Analyse⁴ der cycl. Oligomeren (I, $n = 2$ bis 6) in Polycaprolactam Extrakten. Das benutzte Lösungsmittel trennte nicht die cycl. Di- und Trimere Amine voneinander.

Eine ausgezeichnete papierchromatographische Trennung von Ringamiden wurde von ROTHE mit einem neuen Lösungsmittel: Tetrahydrofuran-Petroläther-Wasser (186:14:10) erzielt⁵⁻⁷. Anschliessend wurde von ihm festgestellt, dass das Polycaprolactam auch die grösseren Ringamide (I, $n = 5$ bis 9) enthält.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine neue Methode zur Trennung der cycl. Oligomeren beschrieben, die auf einer spezifischen Affinität der phenolischen Substanzen zu den Peptidbindungen⁸ beruht. In dieser Methode ist Wasser, das mit Thymol gesättigt ist, die mobile Phase und das Thymol, mit welchem die Papierstreifen imprägniert wurden, die stationäre Phase.

Die Thymollösungen wurden bisher in der Papierchromatographie nur selten angewandt. GRASSMANN UND RIEDEL⁹ benutzten die Thymollösungen zur Identifizierung der DNP-Aminoalkohole, PAWELKIEWICZ UND WALERYCH¹⁰ zur Trennung der Corphyrine und BARTOSIŃSKI¹¹ zur Trennung der Riboflavine von ihren Nucleotiden.

EXPERIMENTELLER TEIL

Zur Ausführung unserer Versuche diente das Whatman Papier No. 1. Die Streifen (35×17.5 cm) wurden frisch mit 0.75 %-iger methanolischen Thymollösung imprägniert und an der Luft getrocknet. Man hatte die Papierstreifen erst in der Entfernung von 2 cm von der Startlinie imprägniert (Fig. 2). Das uns zur Verfügung stehende Caprolactam und die reinen cycl. Oligomeren lösten wir 1 %ig in einem Gemisch von Isopropanol-Methanol-Wasser (1:1:1)¹ und brachten auf die Papierstreifen auf. Als Lösungsmittel verwendeten wir Wasser mit Thymol gesättigt. Es wurde aufsteigend chromatographiert. Die Papierstreifen blieben ca. 4 Stunden in den Glaskammern bei $20 \pm 2^\circ$. Die Chromatogramme wurden bei Zimmertemperatur getrocknet. Die Anfärbung der Caprolactam- und cycl. Peptidenflecke erfolgte durch Besprühen mit methanolischer Kaliumwismutjodidlösung¹². Papierchromatogramme, die mit diesem Reagens entwickelt wurden gaben rote Flecke der komplexen Verbindungen des Caprolactams¹² und seiner cycl. Oligomeren¹³; der Hintergrund der Papierstreifen blieb gelb.

RESULTATE UND DISKUSSION

Zur Imprägnierung der Papierstreifen hatten wir die methanolischen Thymollösungen von verschiedenen Konzentrationen angewandt. Die besten Ergebnisse wurden auf mit 0.75 %iger Thymollösung imprägnierten Papierstreifen erzielt. Mit der Steigerung des Gehalts an Thymol im Papier, nahmen die R_F -Werte des Caprolactams und cycl. Oligomeren bedeutend ab (Fig. 1). Die Anwendung niedriger Thymolkonzentrationen führte zur Schweifbildung bei niederen Cycloamiden ($I, n = 1$ bis 3).

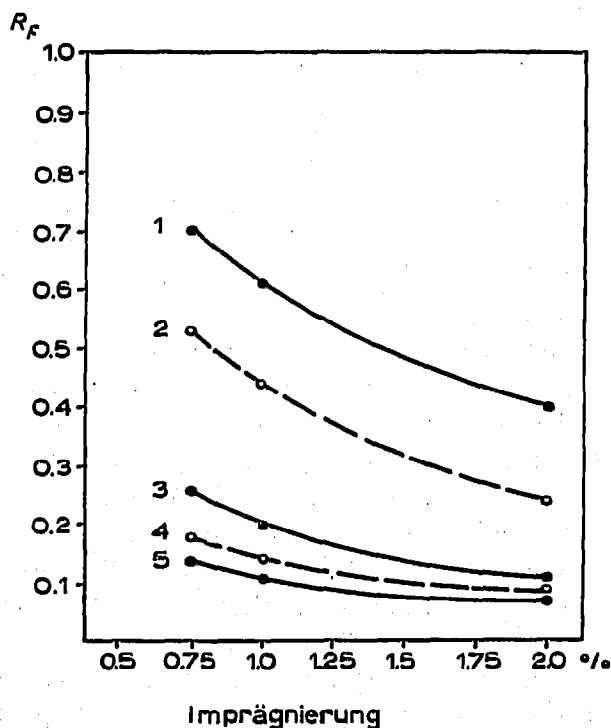


Fig. 1. R_F -Werte von Cycloamiden bei verschiedenem Imprägnierungsgrad des Papiers mit Thymol. (1) Monomer; (2) Dimer; (3) Trimer; (4) Tetramer; (5) Pentamer.

Es wurde festgestellt, dass man besser die höheren cycl. Peptiden trennen kann, wenn die Papierstreifen nicht auf ihrer ganzen Oberfläche, sondern erst in der Entfernung von 2 cm von der Startlinie imprägniert werden. Die Ergebnisse sind auf der Fig. 2 und in der Tabelle I dargestellt.

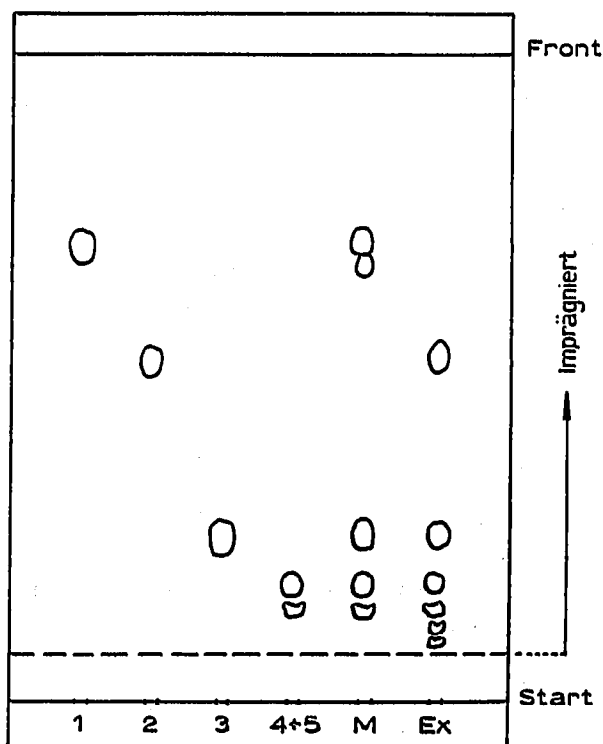


Fig. 2. Chromatogram der Cycloamide (I) auf Whatman Papier No. 1 imprägniert mit 0.75 % methanolischer Thymollösung. Mobile Phase: Wasser mit Thymol gesättigt. (1) Caprolactam; (2) Dimer; (3) Trimer; (4) Tetramer; (5) Pentamer; (M) Gemisch von (1), (2), (3), (4), und (5); Ex = Polycaprolactam Extrakt.

Die Cycloamide wanderten auf den Papierchromatogrammen gemäss ihrem steigenden Molekulargewicht. Am weitesten wandert das Monomer, dann folgen Dimer, Trimer und die höheren Homologen in der Reihenfolge ihrer Ringgrösse. Diesen Trennungseffekt kann man auf die Bildung der zwischen Peptidbindungen $-\text{NH}\cdot\text{CO}-$ der cycl. Oligomeren und Hydroxylgruppen des Thymols entstehenden Wasserstoffbrücken zuschreiben.

Die beschriebene Methode wurde zur Analyse eines von Caprolactam befreiten Methanolextraktes des Polymeren angewandt. Auf den Papierchromatogrammen konnten wir gleichfalls die Flecke der höheren cycl. Oligomeren (Hexa- und Heptameren) nachweisen.

ZAHN und Mitarbeiter, sowie ROTHE hatten zur Identifizierung des Caprolactams und der Cycloamide das sogenannte Chlorverfahren¹ angewandt. Wir fanden dazu die Kaliumwismutjodidlösung besser geeignet. Dieses Reagens gibt mit Caprolactam und cycl. Oligomeren rote Komplexverbindungen, die leicht auf dem gelben Untergrund der Papiere nachweisbar sind.

Die Nachweisempfindlichkeit dieser Reaktion gegen cycl. Oligomeren (auf dem unbehandelten Papier) ist derselben Grösse wie bei Caprolactam und beträgt 5–10 μg .

TABELLE I

R_F -WERTE VON CAPROLACTAM UND CYCL. OLIGOMEREN AUF MIT THYMOL IMPRÄGNIERTEM PAPIER

$\left[\text{NH}-(\text{CH}_2)_5-\text{CO} \right]_n$	R_F -Werte		
	Imprägniert mit Thymollösung		
	0.75%	1.0%	2.0%
$n = 1$ Monomer	0.70	0.61	0.40
$n = 2$ Dimer	0.53*	0.44*	0.24
	0.68**	0.59**	
$n = 3$ Trimer	0.26	0.20	0.11
$n = 4$ Tetramer	0.18	0.14	0.09
$n = 5$ Pentamer	0.14	0.11	0.07
$n = 6$ Hexamer	0.11		
$n = 7$ Heptamer	0.09		

* Einzeln.

** In Mischung.

Die Imprägnierung der Papierstreifen mit Thymol erniedrigt etwas die Empfindlichkeit der Reaktion (10–20 μg).

Diese papierchromatographischen Untersuchungen wurden auch auf andere Lactame und cycl. Peptide ausgedehnt.

DANK

Für die Überlassung synthetischer Oligomeren (Di- bis Pentameren) möchte ich an dieser Stelle Herrn Dr. MANFRED ROTHE aus dem Institut für Faserstoff-Forschung der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin bestens danken. Fräulein LUDMILA ZIÓŁKOWSKA danke ich auch für ihre zuverlässige Hilfe.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde eine einfache papierchromatographische Methode zur Trennung cyclischer Oligomeren des Caprolactams auf mit 0.75 %iger Thymollösung getränktem Papier als stationäre Phase und mit Thymol gesättigtem Wasser als mobile Phase beschrieben.

Die Flecke des Caprolactams und der Ringamide wurden mit Kaliumwismutjodidreagens nachgewiesen. Die Empfindlichkeit dieser Reaktion liegt unter 10 μg .

SUMMARY

A simple method for separating cyclic oligomers of caprolactam by paper chromatography is described. The separation is carried out on filter paper strips impregnated with thymol (stationary phase). A saturated aqueous solution of thymol is used as the mobile phase.

Caprolactam and the cycloamides were identified by means of potassium bismuth iodide. The sensitivity of this reaction is below 10 μg .

LITERATUR

- ¹ H. ZAHN UND E. REXROTH, *Z. anal. Chem.*, 148 (1955) 181.
- ² H. ZAHN UND H. SPOOR, *Chem. Ber.*, 89 (1956) 1296.
- ³ H. ZAHN UND H. SPOOR, *Chem. Ber.*, 92 (1959) 1375.
- ⁴ H. SPOOR UND H. ZAHN, *Z. anal. Chem.*, 168 (1959) 190.
- ⁵ M. ROTHE, *I.U.P.A.C. Symposium on Macromolecules*, Prague, 1957, Commun. 90.
- ⁶ M. ROTHE, *J. Polymer Sci.*, 30 (1958) 227.
- ⁷ M. ROTHE, *Makromol. Chem.*, 35 (1960) 183.
- ⁸ W. GRASSMANN UND G. DEFFNER, *Z. physiol. Chem.*, 293 (1953) 89.
- ⁹ W. GRASSMANN UND A. RIEDEL, *Z. physiol. Chem.*, 312 (1958) 206.
- ¹⁰ J. PAWEŁKIEWICZ UND W. WALERYCH, *Acta Biochim. Polon.*, 6 (1959) 441.
- ¹¹ B. BARTOSIŃSKI, *Acta Biochim. Polon.*, 7 (1960) 85.
- ¹² K. CZEREPKO, *Mikrochim. Acta*, (1958) 638.
- ¹³ K. CZEREPKO, *VI Jubileuszowy Zjazd Polskiego Towarzystwa Chemicznego, Komunikaty*, Warszawa, 1959, S. 306.

J. Chromatog.; 9 (1962) 199-203