

Papierchromatographische Trennung von ϵ -Aminocapronsäure und α -Aminosäuren sowie homologer Oligo- ϵ -aminocapronsäuren

ϵ -Aminocapronsäure spielt in jüngster Zeit als Proteasen-Hemmstoff und insbesondere als Antifibrinolytikum eine Rolle in Medizin und Biochemie¹⁻⁸. Ihre Anwendung eröffnet auch im Hinblick auf das Krebsproblem interessante Aspekte (siehe dazu Lit. 9).

Bei *in vivo*-Versuchen mit ϵ -Aminocapronsäure benötigten wir zum chromatographischen Nachweis dieser unphysiologischen Aminosäure in Gewebeextrakten ein Lösungsmittelsystem, das ihre Erkennung neben den im Gewebe vorkommenden freien α -Aminosäuren gestattet. Nach unseren Erfahrungen mit dem Gemisch 2,4,6-Collidin/Boratpuffer pH 9 konnten wir mit diesem System eine gute Trennung erwarten. Ein ähnliches Gemisch (Collidin-Lutidin/Boratpuffer pH 9) wurde erst-

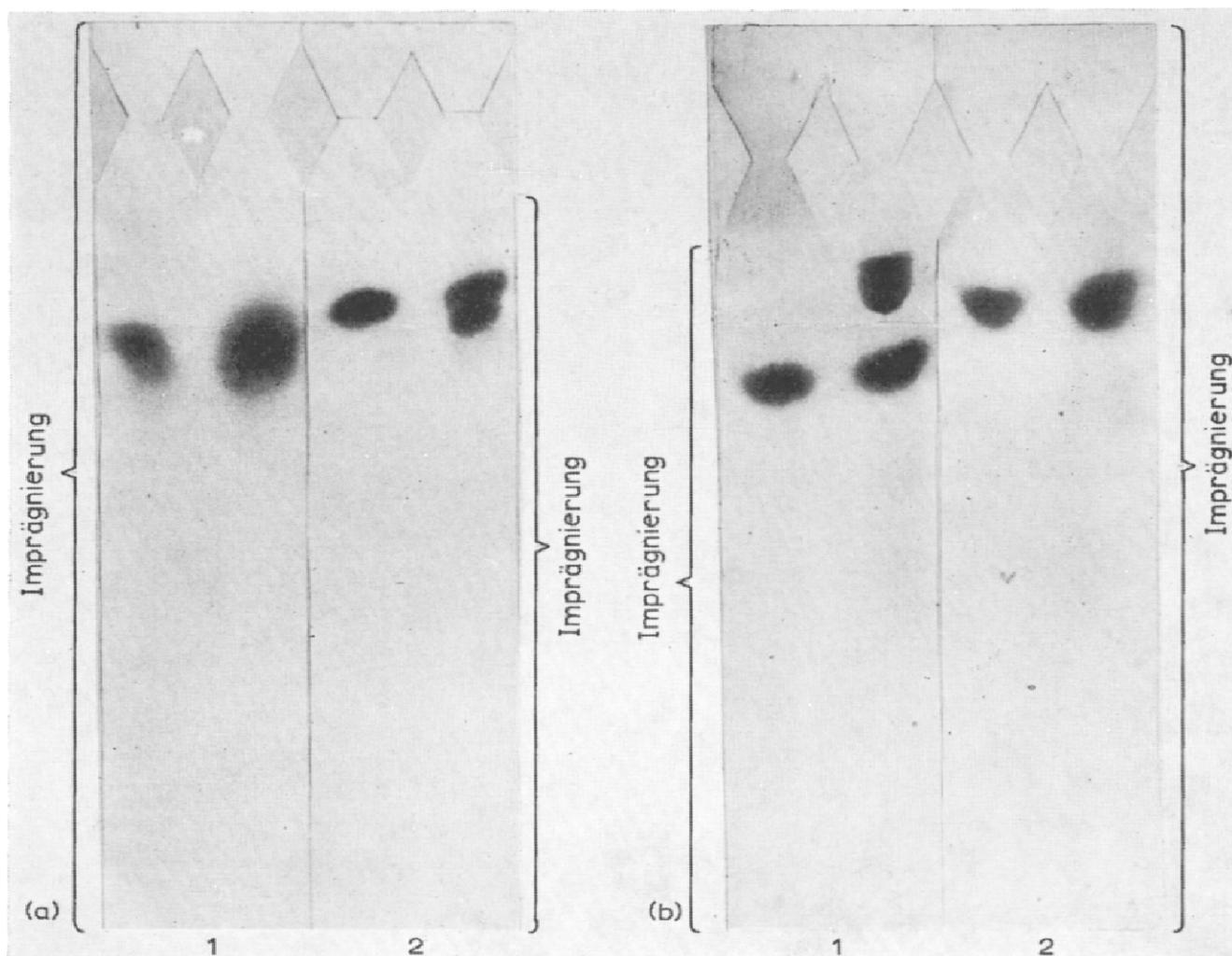


Fig. 1. (a) Trennung von ϵ -Aminocapronsäure und Threonin. Temperatur: $20 \pm 2^\circ$. (1) Auf vollständig imprägniertem Papier. Links: ϵ -NH₂-Cap; rechts: ϵ -NH₂-Cap/Thre. Durchlauf: 72 St. (2) Auf teilweise imprägniertem Papier. Links: ϵ -NH₂-Cap; rechts: ϵ -NH₂-Cap/Thre. Durchlauf: 48 St. (b) Trennung von ϵ -Aminocapronsäure und Arginin. (1) Auf teilweise imprägniertem Papier. Durchlauf: 48 St. (2) Auf vollständig imprägniertem Papier. Durchlauf: 48 St.

malig von McFARREN¹⁰ zur Trennung von α -Aminosäuren auf mit Puffer imprägniertem Papier benutzt (siehe dazu auch Lit. 11).

Experimenteller Teil

Zur Verwendung kam 2,4,6-Collidin, das durch Schütteln mit Brom, Natriumthiosulfat, stehen über NaOH und Destillation¹² gereinigt wurde. Boratpuffer vom pH 9 wurde nach HAI¹³ bereit und bei Versuchstemperatur (20°) mit Collidin gesättigt. Die obere Phase wurde als Laufmittel benutzt. Zur Imprägnierung wurde das Papier mit dem Puffer getränkt und danach an der Luft bei Raumtemperatur getrocknet. Als Chromatographiepapier verwendeten wir FN 4 (VEB Spezialpapierfabrik Niederschlag, Erzgeb.) und 2043b mgI (Schleicher/Schüll). Die Chromatographie erfolgte nach einer modifizierten Keilstreifenmethode (siehe Fig. 1 und 2) absteigend. Freie Aminosäuren und Peptide wurden mit Ninhydrin, N-acylierte Derivate mit Chlor/*o*-Tolidin-KJ nach ZAHN UND REXROTH¹⁴ sichtbar gemacht.

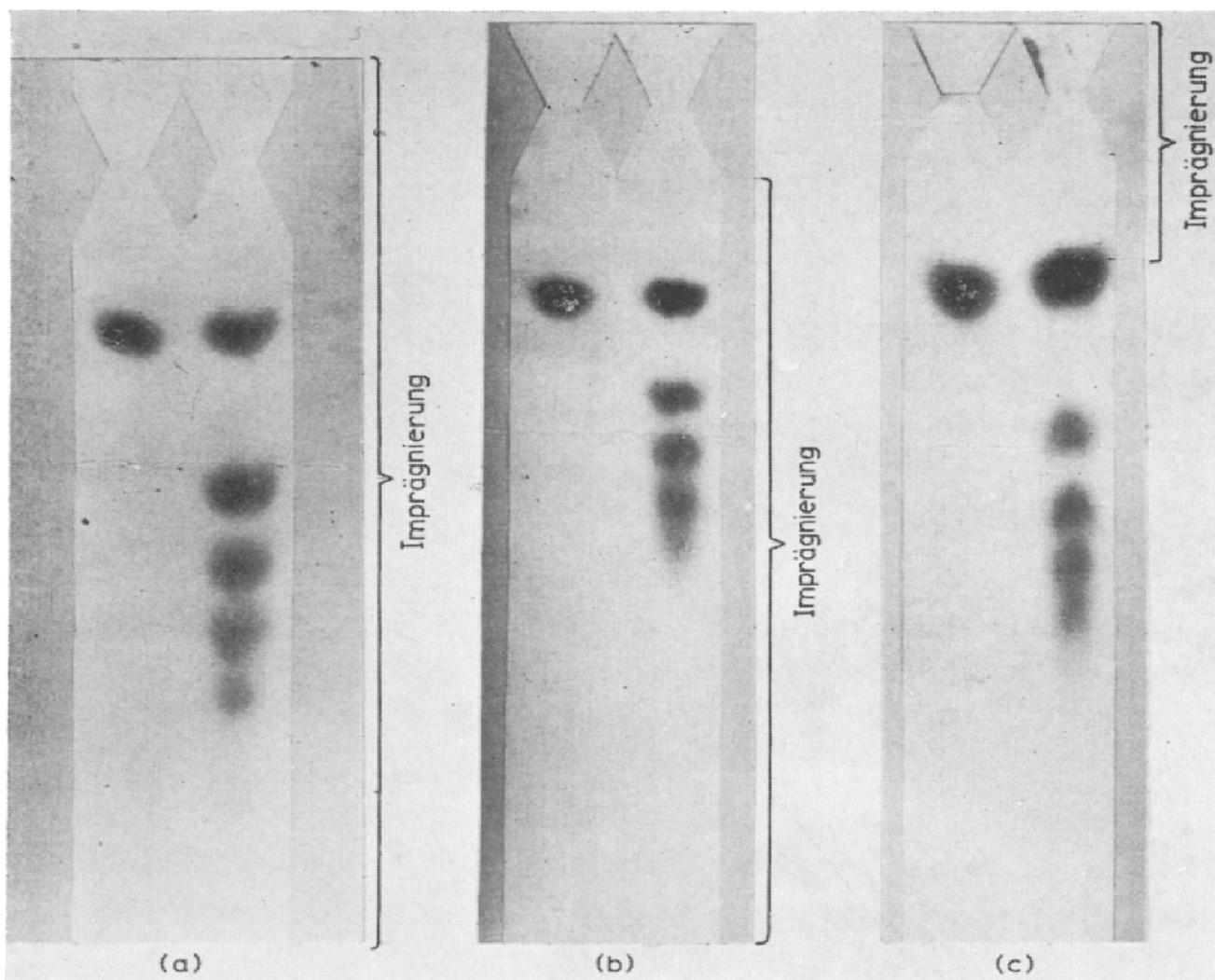


Fig. 2. Oligomerhomologen-Trennung auf verschieden imprägniertem Papier. Links jeweils ϵ -Aminocapronsäure; rechts von oben nach unten Mono-, Di-, Tri-, Tetra- und Penta-aminocapronsäure. Temperatur: $20 \pm 2^\circ$. (a) Vollständige Imprägnierung. Durchlauf: 96 St. (b) Imprägnierung 3 cm vom Start. Durchlauf: 48 St. (c) Imprägnierung der ersten Laufstrecke bis 6 cm unterhalb vom Start. Durchlauf: 48 St.

Ergebnisse

Trennung von ϵ -Aminocapronsäure und α -Aminosäuren. Nach vollständiger Imprägnierung des Papiers liessen sich die meisten α -Aminosäuren neben ϵ -Aminocapronsäure eindeutig erkennen. Eine Trennung von ϵ -Aminocapronsäure, Threonin, Histidin, Arginin und Alanin war nicht möglich. In Tabelle I sind die entsprechenden R_F -Werte aufgeführt.

TABELLE I

R_F -WERTE VON ϵ -AMINOCAPRONSAURE (ϵ -NH₂-CAP) UND α -AMINOSAUREN
Temperatur: 20 \pm 1°, 44 St.

Aminosäure	FN4	2043b mgl	Aminosäure	FN4	2043b mgl
Cys	0.03	0.03	Thre	0.14	0.13
Glu	0.04	0.04	Pro	0.16	0.14
Asp	0.04	0.04	Val	0.24	0.21
Lys	0.09	0.08	Met	0.28	0.25
Ser	0.10	0.09	Ileu	0.31	0.27
Gly	0.10	0.09	Leu	0.34	0.31
Arg	0.13	0.12	Phe	0.39	0.35
Ala	0.13	0.12	Tyr	0.48	0.43
ϵ -NH ₂ -Cap	0.13	0.11	Try	0.54	0.50
His	0.14	0.13			

Zur Verbesserung des Trenneffektes haben wir die Imprägnierung des Papiers derartig vorgenommen, dass die Streifen erst 3 cm vom Startfleck entfernt mit dem Puffer getränkt wurden. (Ein ähnliches Verfahren der teilweisen Imprägnierung wurde von CEREPKO¹⁵ für die Chromatographie der cyclischen Oligoamide der ϵ -Aminocapronsäure in wässrg. Thymol auf mit methanol. Thymol getränktem Papier angewandt.) Die Aminosäuren durchlaufen so erst eine unimprägnierte Strecke mit grösserer Geschwindigkeit. In der darauffolgenden imprägnierten Zone wird ihr Lauf verlangsamt. Fig. 1a zeigt die so erfolgte Trennung von ϵ -Aminocapronsäure (ϵ -NH₂-Cap) und Threonin neben dem ungetrennten Gemisch ϵ -NH₂-Cap/Thre auf vollständig imprägniertem Papier, Fig. 1b die entsprechende Trennung von ϵ -NH₂-Cap/Arg. ϵ -Amino-capronsäure und Arginin lassen sich auch auf unimprägniertem Papier im gleichen System ausgezeichnet trennen. Eine Trennung von ϵ -NH₂-Cap/Ala und ϵ -NH₂-Cap/His war auch mit dieser Methode nicht möglich; ebensowenig führten andere Variationen der Imprägnierung (s.u.) zum Erfolg. Eine Unterscheidung dieser Aminosäuren kann aber in Butanol-Eisessig-Wasser Systemen erfolgen (siehe dazu HAI¹⁶).

Trennung von Oligo- ϵ -aminocapronsäuren. Das 2,4,6-Collidin/Boratpuffer-System erwies sich als sehr wirksam zur Trennung oligomerer Peptide der ϵ -Aminocapronsäure. Die Trennung der Oligomeren erfolgte bisher entweder nach ZAHN UND HILDEBRAND¹⁷ in den Systemen 2-Butanol-Ameisensäure-Wasser und 2-Butanol-wässrg. Ammoniak oder nach ROTHE¹⁸ im System *n*-Butanol-Eisessig-Wasser (BEW). Die genannten

Systeme ergeben aber keine ausreichende Trennung der homologen Aminocaprone. Wegen der relativ grossen R_F -Werte im BEW-System (Di-Aminocaprone 0.60, Tri-, Tetra- und Pentamer > 0.60) ist auch eine chromatographische Trennung im Durchlauf nicht möglich. Das 2,4,6-Collidin/Boratpuffer-Gemisch ergibt nach vollständiger Imprägnierung des Papiers für die oligomeren ϵ -Aminocaprone folgende R_F -Werte (siehe Tabelle II).

TABELLE II

R_F -WERTE FÜR OLIGO- ϵ -AMINOCAPRONSÄUREN UND EINIGE DERIVATE

Z = $C_6H_5CH_2OCO-$, Cap = $-NH(CH_2)_5CO-$ nach Lit. 17, Bz = $C_6H_5CH_2-$
Temp.: $20 \pm 1^\circ C$, 40 St.

Substanz	FN_4	2043b mg/l	Substanz	FN_4	2043b mg/l
H(Cap)OH	0.13	0.11	Z(Cap)OH	0.72	0.70
H(Cap) ₂ OH	0.25	0.21	Z(Cap) ₂ OH	0.76	0.72
H(Cap) ₃ OH	0.30	0.27	Z(Cap) ₃ OH	0.78	0.74
H(Cap) ₄ OH	0.34	0.31	Z(Cap) ₄ OH	0.79	0.75
H(Cap) ₅ OH	0.38	0.35	Z(Cap) ₅ OH	0.80	0.78
			Z(Cap) ₆ OH	0.81	0.79
			Z(Cap) ₂ OBz	0.96	0.93
			Z(Cap) ₃ OBz	0.96	0.93

Die Substanzen laufen als gut abgegrenzte Flecke geringer Ausdehnung, was ihre Trennung sehr erleichtert. Nach 90-stündiger Chromatographie im Durchlauf liegen sämtliche Homologe bis zum Pentameren gut getrennt neben einander vor (Fig. 2a). Eine Auftrennung noch höherer Oligomere ist im angewandten System nicht mehr möglich. Hexa-aminocaprone verbleibt z.T. am Start, ein Teil läuft mit dem Pentameren.

Änderung der Imprägnierung führte auch hier zu einer Verbesserung der Trennung. Fig. 2b und c zeigen Mono- bis Penta-aminocaprone nach verschiedener Imprägnierung des Papiers. Eine gute Trennung ist hier bereits ohne Durchlauf des Lösungsmittelgemisches nach 48 Stunden erfolgt. Teilweise Imprägnierung erst 3 cm vom Start entfernt (Fig. 2b) ergibt kleine, gut abgesetzte Flecke. Lässt man die Substanzen aus einer imprägnierten Zone in eine unimprägnierte Zone laufen, dann vergrössern sich die Flecke mit der Laufgeschwindigkeit. Dieses Verfahren (Fig. 2c) liefert ebenfalls eine befriedigende Trennung. Als recht günstig erwies sich ferner eine streifenweise Imprägnierung (1 cm breite Streifen in jeweils 2 cm Abstand) quer zur Laufrichtung. Auf unimprägniertem Papier wurden im gleichen System nur die niederen Oligomeren scharf getrennt. Diese modifizierten Verfahren sind also dann zu empfehlen, wenn man auf die zeitraubende Durchlaufchromatographie verzichten will. Sie erlauben allerdings nicht in jedem Fall eine scharfe Trennung von Tetra- und Pentameren.

Trennung von Derivaten der ϵ -Aminocaprone. Das Collidin/Boratpuffer-System ermöglicht weiterhin die Erkennung von Carbobenzyloxy(Z)-oligo-aminocaprone neben Z-oligo-aminocapronebenzylestern (R_F -Werte siehe Tabelle II).

Das ist wichtig zur Reinheitsprüfung der Z-Oligoamid-benzylestern nach der Kuppelung von Z-Oligoamiden mit Oligoamid-benzylester mit Hilfe peptidchemischer Methoden²⁰. In den bisher angewandten Systemen BEW, TCW (Tetrahydrofuran-Cyclohexan-Wasser)¹⁹ und TE (Tetrachlorkohlenstoff-Eisessig)²¹ konnte Z-Aminocaprinsäure nicht von Z-Diaminocaprinsäurebenzylester getrennt werden²⁰.

Für gewissenhafte technische Mitarbeit habe ich Frau G. HÄNOLD zu danken.

Forschungstelle für Experimentelle Onkologie*
der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin
in Potsdam-Rehbrücke (D.D.R.)

KLAUS DIETER SCHWENKE

- 1 F. B. ABLONDI, J. J. HAGAN, M. PHILIPS UND E. C. DERENZO, *Arch. Biochem.*, 82 (1959) 153.
- 2 N. ALKJAERSIK, A. P. FLETCHER UND S. SHERRY, *J. Biol. Chem.*, 234 (1959) 832.
- 3 W. DOLESCHEL, W. AUERSWALD UND A. V. LÜTZOW, *Thromb. Diath. Haemorrhag.*, 8 (1962) 101.
- 4 W. AUERSWALD UND W. DOLESCHEL, *Wien. Med. Wschr.*, 112 (1962) 619.
- 5 J. D. GERATZ, *Biochim. Biophys. Acta*, 56 (1962) 599.
- 6 J. D. HUREAU, H. AUDHOU, P. VAYRE UND E. VAIREL, *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 158 (1964) 17.
- 7 H. W. LECHTENBERG, *Münch. Med. Wochschr.*, 106 (1964) 615.
- 8 A. DETTER, *Deut. Apotheker-Ztg.*, 104 (1964) 1185.
- 9 W. F. BALE, I. L. SPAR, R. L. GOODLAND UND M. J. IZZO, *Federation Proc.*, 20 (1961) 58.
- 10 E. F. MCFARREN, *Anal. Chem.*, 23 (1951) 168.
- 11 I. M. HAIS, in I. M. HAIS UND K. MACEK (Herausgeber), *Handbuch der Papierchromatographie*, Band I, 2. Aufl., Fischer, Jena, 1963, S. 527.
- 12 S. M. PARTRIDGE, *Biochem. J.*, 42 (1948) 238;
ref. bei F. CRAMER, *Papierchromatographie*, 4. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim, 1958, S. 44.
- 13 I. M. HAIS, in I. M. HAIS UND K. MACEK (Herausgeber), *Handbuch der Papierchromatographie*, Band I, 2. Aufl., Fischer, Jena, 1963, S. 959.
- 14 H. ZAHN UND E. REXROTH, *Z. Anal. Chem.*, 148 (1955) 181.
- 15 K. CEREPKO, *J. Chromatog.*, 9 (1962) 199.
- 16 I. M. HAIS, in I. M. HAIS UND K. MACEK (Herausgeber), *Handbuch der Papierchromatographie*, Band I, 2. Aufl., Fischer, Jena, 1963, S. 536.
- 17 H. ZAHN UND E. HILDEBRAND, *Chem. Ber.*, 90 (1957) 320; *ibid.*, 92 (1959) 1963.
- 18 M. ROTHE, *Habilitationsschrift*, Universität Halle, 1960.
- 19 M. ROTHE, *J. Polymer Sci.*, 30 (1958) 227.
- 20 K. D. SCHWENKE, *Faserforsch. Textiltech.*, 16 (1965) 61.
- 21 K. MACEK UND Z. PROCHAZKA, in I. M. HAIS UND K. MACEK (Herausgeber), *Handbuch der Papierchromatographie*, Band I, 2. Aufl., Fischer, Jena, 1963, S. 132;
G. REINISCH UND W. JÄGER, *Faserforsch. Textiltech.*, 16 (1965) 583.

Eingegangen den 27. September 1965

* Direktor: Dr. med. habil. F. SCHMIDT.

J. Chromatog., 22 (1966) 187-191