

BESTIMMUNG DER DI- UND POLYAMINE IM URIN

CHROMATOGRAPHISCHE METHODEN ZUR ANREICHERUNG, TRENNUNG UND IDENTIFIZIERUNG*

SUSE HOLDER UND H. J. BREMER**

*Universitäts-Kinderklinik***, 74 Tübingen (Deutschland)*

(Eingegangen den 23. März 1966)

Über die quantitative Ausscheidung von Di- und Polyaminen im Urin unter physiologischen und pathologischen Bedingungen ist sehr wenig bekannt. Ein wesentlicher Grund hierfür liegt in der Schwierigkeit der Abtrennung von anderen Aminen sowie in der Trennung der Diamine untereinander.

Über eine erhöhte Ausscheidung von Cadaverin und Putrescin im Urin bei der Cystinurie berichteten bereits 1889 v. UDRÁNSKY UND BAUMANN¹. Ausserdem konnte 2,2'-Dithiobis(äthylamin) in den letzten Jahren im Urin nachgewiesen werden².

Polyamine wie Spermidin und Spermin wurden bisher im menschlichen Urin nicht gefunden. Dass diese Substanzen jedoch gelegentlich im Urin vorkommen, zeigt folgende eigene Beobachtung: Ein 4 Monate alter Junge mit einer floriden Rachitis, die erst auf sehr grosse Dosen Vitamin D ansprach, einer Hypocalcaemie und einer Hyperaminacidurie schied während der akuten Phase der Krankheit grössere Mengen Spermidin und Spermin aus.

In dieser Arbeit wird über Methoden berichtet, die die Anreicherung dieser Amine aus dem Urin und ihre säulenchromatographische Trennung gestatten. Zusätzlich werden einige Fliessmittel zur dünnenschichtchromatographischen Trennung dieser Amine und ihrer Dinitrophenylderivate angegeben.

METHODEN UND ERGEBNISSE

Anreicherung der Di- und Polyamine aus dem Urin

Zur Anreicherung der Di- und Polyamine wurde Urin (50 bis 200 ml) durch eine mit Dowex 50 X 2 (Dowex 50 X 2, 200-400 mesh, H⁺-Form, 1 × 15 cm) gefüllte Säule gegeben. Das Harz wurde entsprechend den Vorschriften von KAKIMOTO UND ARMSTRONG³ vorbehandelt. Die Elution erfolgte mit 100 ml 6 N HCl. Zur Bestimmung der quantitativen Absorption und Elution wurden zu 50 ml Urin Testsubstanzen der Firmen Calbiochem, Los Angeles, und Schuchardt, München, zugesetzt, der Urin auf pH 5 eingestellt, über die Säule gegeben und mit 100 ml H₂O nachgewaschen. Nach Elution mit HCl wurde das Eluat im Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt.

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

** Sonderdruckanforderungen an Dr. H. J. BREMER, Universitäts-Kinderklinik, 74 Tübingen, Deutschland.

*** Direktor: Prof. Dr. K. BETKE.

Säulenchromatographische Trennung der Di- und Polyamine

Mit der von ROSENTHAL UND TABOR⁴ angegebenen Methode zur Trennung der Polyamine an Amberlite XE-64, K⁺-Form, mittels eines bei pH 7.1 gepufferten Na₂SO₄-Gradienten gelang uns keine Auftrennung von Cadaverin und Putrescin. Mit der folgenden Modifikation der Methode erreichten wir jedoch neben einer guten Abtrennung der Di- und Polyamine von Aminosäuren und Monoaminen eine Trennung der Di- und Polyamine untereinander:

Amberlite IRP-64 wurde entsprechend den Vorschriften von ROSENTHAL UND TABOR⁴ in die K⁺-Form überführt und anschliessend solange mit H₂O nachgewaschen, bis das Effluent neutral war. Das entgaste und im Wasserbad auf 37° vorgewärmte Harz wurde in eine 0.9 × 30 cm lange Säule gefüllt, die während des Füllens und des ganzen Laufes auf 37° temperiert wurde.

Das zur Trockne eingedampfte Eluat von der Dowex 50-Säule wurde in 10 ml H₂O aufgenommen, mit einigen Tropfen 1 N KOH neutralisiert und mit einer Schlauchpumpe auf die Säule gepumpt. Die Gradientenelution mit einem Konvexgradienten erfolgte mit einer Salzlösung, die 3.2 Äq. KCl in 1 Liter 0.1 molarem Kaliumphosphatpuffer, pH 7.1, enthält. Das Mischgefäss war mit 200 ml H₂O gefüllt. Der Gradient wurde approximativ nach der Formel $C = C_1(1 - C_2/C_1)e^{-p/a}$ berechnet und durch merkurimetrische Chloridtitration kontrolliert. Ein konstantes Durchflussvolumen von 30 ml pro Stunde wurde mit einer Schlauchpumpe erreicht. Das Fraktionsvolumen betrug 4 ml. Nach 500 ml wurde zur Entwicklung von Spermin auf direkte Elution mit gesättigter KCl-Lösung umgeschaltet. Die Elutionsfolge sowie den Chloridgradienten zeigt die Fig. 1. Die Ausbeute der einzelnen Di- und Polyamine nach Anreicherung und Trennung betrug zwischen 85 und 95 %.

Quantitative Bestimmung der Substanzen im Säuleneulat

Die Bestimmung erfolgte durch Umwandlung der Amine in ihre Dinitrophenyl-derivate. Nach Extraktion in Cyclohexanon wurde die Absorption bei 420 nm gemessen⁵. Unter diesen Bedingungen wurde folgende optische Dichte pro 0.1 µMol Substanz für die einzelnen Verbindungen ermittelt:

Cadaverin	0.627
Putrescin	0.603
1,3-Diaminopropan	0.548
2,2'-Dithiobis(äthylamin)	0.553
Spermidin	0.722
Spermin	0.953

Dünnschichtchromatographisch liessen sich in Putrescin, 1,3-Diaminopropan und 2,2'-Dithiobis(äthylamin) farbgebende Verunreinigungen nachweisen, die sicher die Extinktion beeinflussen.

Identifizierungsmöglichkeiten der säulenchromatographisch getrennten Di- und Polyamine
Bestimmung des Absorptionsquotienten der Dinitrophenyl-derivate in Dioxan nach
 DUBIN⁶ bei 350 und 390 nm.

* C = Konzentration der Elutionsflüssigkeit in jedem Punkt p ; C_1 = Konzentration der Stammlösung; C_2 = Ausgangskonzentration im Mischgefäss; a = Volumen im Mischgefäss; p = Durchflussvolumen durch die Säule.

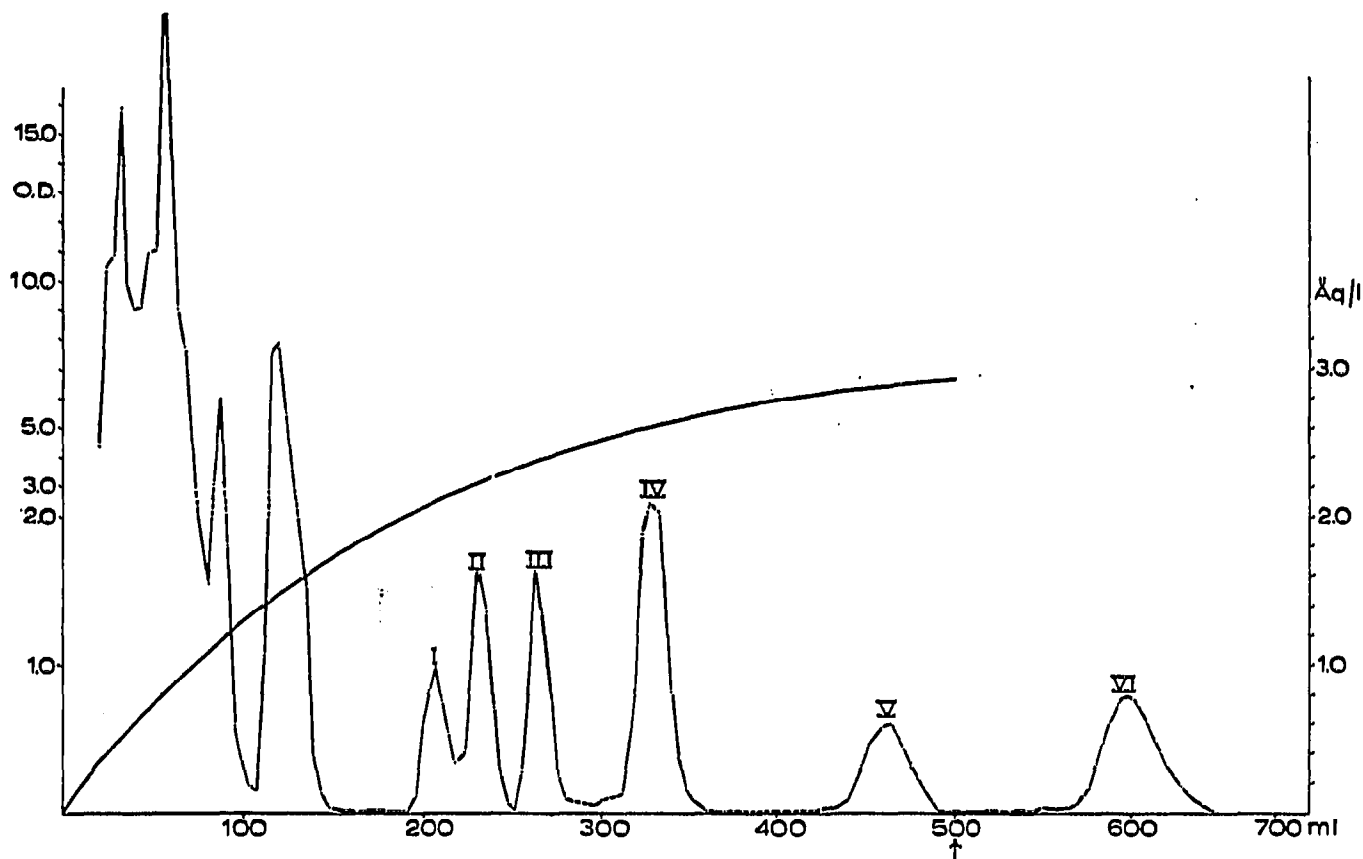


Fig. 1. Elutionsfolge der zu 50 ml Urin zugesetzten Testsubstanzen. Anreicherung an Dowex 50 X 2 und Trennung über Amberlite IRP-64 mit einer gepufferten KCl-Lösung. Der KCl-Gradient ist eingezeichnet, die Konzentration ist in Äq/l angegeben. Nach 500 ml (Pfeil) Umschaltung auf direkte Elution mit gesättigter KCl-Lösung zur Entwicklung von Spermin. Peak I = 2,2'-Dithio-bis(äthylamin), II = Cadaverin, III = Putrescin, IV = 1,3-Diaminopropan, V = Spermidin und VI = Spermin.

Rechromatographie der isolierten Verbindungen an Dowex 50 X 8. ROSENTHAL UND TABOR⁴ gaben eine Methode zur Trennung von Spermidin und Spermin an Dowex 50 X 2 mit HCl-Elution an. Die Rechromatographie und die Trennung der einzelnen Diamine gelang mit der folgenden Modifikation dieser Methode:

Dowex 50 X 8 (200–400 mesh, H⁺-Form, 0.9 × 50 cm) wurde zur Trennung benutzt. Die Elution erfolgte mit 2 N HCl. Das Mischgefäß enthielt 300 ml 1 N HCl. Eine entsprechende Trennung der Testsubstanzen zeigt die Fig. 2. Die Diamine wurden in umgekehrter Reihenfolge als von Amberlite IRP-64 eluiert.

Die Extraktion der Amine aus den einzelnen Fraktionen des Säuleneluats (Amberlite IRP-64) erfolgte unter Verwendung des von McINTIRE *et al.*⁷ angegebenen Salzgemisches in *n*-Butanol oder Chloroform. Die organische Phase wurde anschließend mit 0.3 Volumen einer 0.3 N HCl ausgeschüttelt und der Extrakt zur Trockne eingengt. Nach Aufnahme in wenig H₂O wurde die Säule damit beschickt (Dowex 50 X 8).

Dünnschichtchromatographische Trennung der freien Amine und ihrer Dinitrophenylderivate. Als Sorptionsmittel für die Trennung der Dinitrophenylderivate wurde Kieselgel HF₂₅₄ nach STAHL (Fa. Merck, Darmstadt), für die der freien Amine MN-Cellulosepulver 300 (Fa. Macherey, Nagel & Co., Düren/Rhld.) in einer Schichtdicke

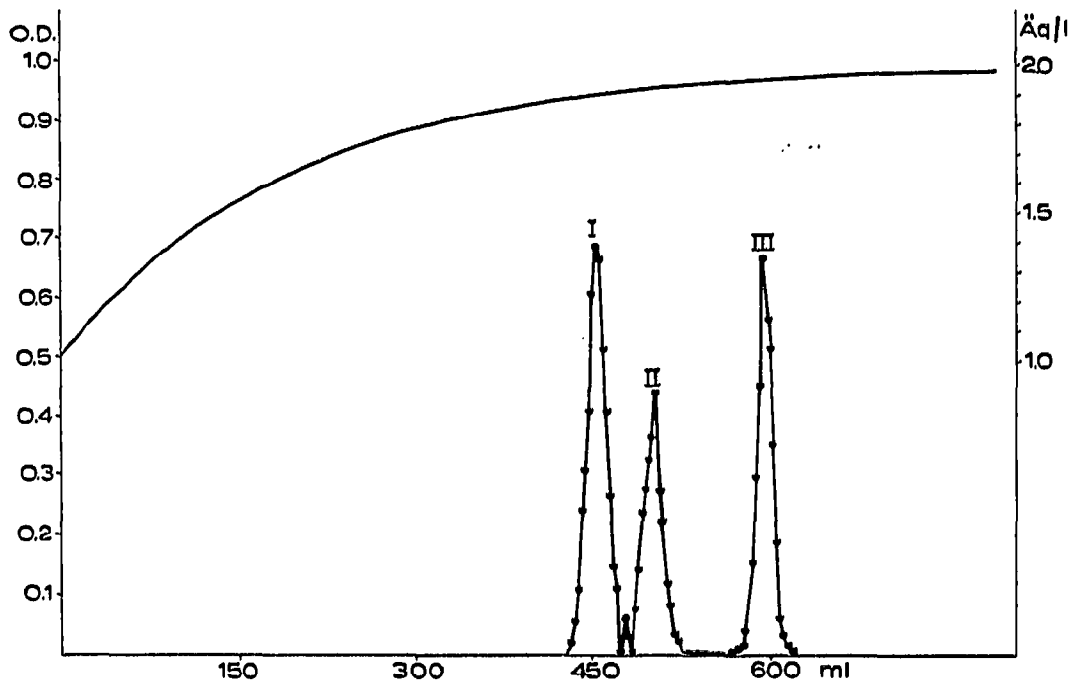


Fig. 2. Elutionsfolge der Testsubstanzen auf einer Dowex 50 X 8-Säule. Elution mit 2 N HCl im Mischgefäß 300 ml 1 N HCl. Der HCl-Gradient ist eingezeichnet, die Konzentration ist in Äq/l angegeben. Peak I = 1,3-Diaminopropan, II = Putrescin und III = Cadaverin.

von 250 μ auf Glasplatten mit dem Streichgerät der Fa. Desaga, Heidelberg, aufgetragen. Die Kieselgel-Platten wurden nach Lufttrocknung 15 Minuten bei 110° aktiviert. 0.02 ml der in Cyclohexanon extrahierten Dinitrophenylderivate der Di- und Polyamine wurden aufgetragen. Unter diesen Bedingungen wird auch unverändertes 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol extrahiert, welches sich dünnschichtchromatographisch aber von den Dinitrophenylderivaten abtrennt. Ergeben sich bei der Auswertung der Platten durch 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol Schwierigkeiten, so kann

TABELLE I

R_F -WERTE DER DINITROPHENYLDERIVATE (DNP) DER TESTSUBSTANZEN NACH TRENNUNG MIT DEN ANGEgebenEN FLIESSMITTELN AUF KIESELGEL HF₂₅₄

Die Laufbedingungen sind im Text angegeben.

	<i>Kieselgel HF₂₅₄ nach Stahl</i>			
	<i>Dioxan-Pyridin-Eisessig</i> (80:20:2)	<i>Chloroform-Äthanol</i> (99:1)	<i>Benzol-Pyridin-Eisessig</i> (65:30:10)	<i>Diäthyläther</i>
DNP-1,3-Diaminopropan	0.46	0.40	0.48	0.00
DNP-Putrescin	0.52	0.44	0.60	0.00
DNP-Cadaverin	0.64	0.64	0.72	0.54
DNP-Dithiobis(äthylamin)	0.64	0.46	0.62	0.28
DNP-Spermidin	0.40	0.28	0.40	0.00
DNP-Spermin	0.28	0.16	0.26	0.00

die gelbe Farbe des 1-Fluor-2,4-dinitrobenzols durch Besprühen mit Salzsäure zum Verschwinden gebracht werden. Der Lauf erfolgte bei Kammerättigung. Bei der Auswertung wurden die Platten im uv-Licht bei 254 nm betrachtet und die fluoreszierenden Flecken markiert. Die Tabelle I zeigt die R_F -Werte bei verschiedenen Fließmitteln, die Fig. 3 vier entsprechende Läufe.

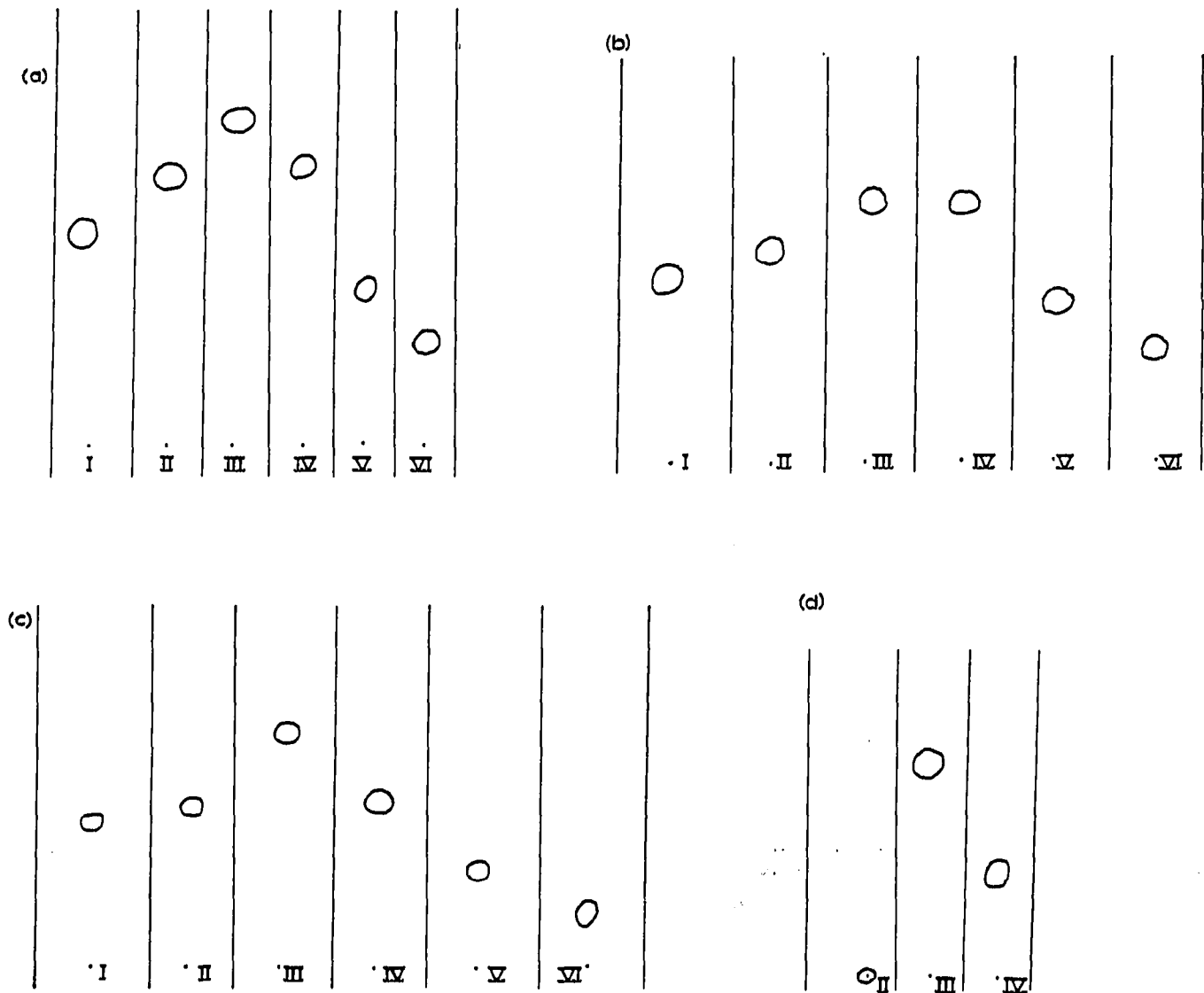


Fig. 3. Dünnschichtchromatographische Trennung der Dinitrophenylderivate von (I) 1,3-Diaminopropan, (II) Putrescin, (III) Cadaverin, (IV) Dithiobis(äthylamin), (V) Spermidin und (VI) Spermin auf Kieselgel HF₂₅₄ mit folgenden Fließmitteln: (a) Benzol-Pyridin-Eisessig (65:30:10), (b) Dioxan-Pyridin-Eisessig (80:20:2), (c) Chloroform-Äthanol (99:1), (d) Diäthyläther.

Freie Diamine wurden auf Celluloseplatten bei Kammerättigung chromatographiert (Fließmittel: Isopropanol-37%ige HCl-H₂O, 80:30:20). Die Anfärbung erfolgte mit Ninhydrin. Dabei färbte sich 2,2'-Dithiobis(äthylamin) unterschiedlich von den anderen Diaminen graublau (Fig. 4, Tabelle II).

Einige Diamin-Trennungen aus Urinen zeigt die Fig. 5.

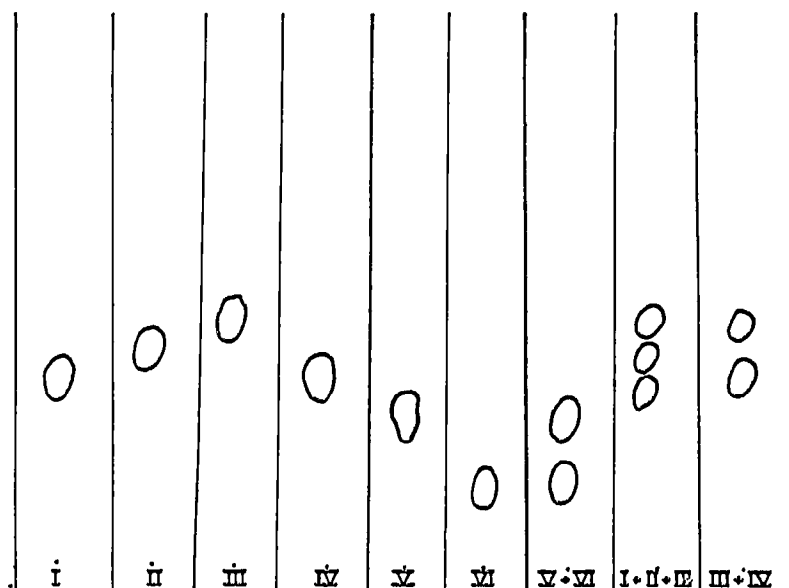


Fig. 4. Trennung der freien Di- und Polyamine auf Zelluloseplatten. Fließmittel: Isopropanol-37%ige HCl-H₂O (80:30:20). I = 1,3-Diaminopropan; II = Putrescin; III = Cadaverin; IV = 2,2'-Dithiobis(äthylamin); V = Spermidin; VI = Spermin. (Putrescin, Cadaverin und Dithiobis(äthylamin) wurden als Dihydrochloride, Spermidin als Tetrahydrochlorid und Spermin als Phosphat aufgetragen.) Nachweis mit Ninhydrin.

TABELLE II

R_F-WERTE DER FREIEN DI- UND POLYAMINE AUF MN-ZELLULOSE 300 MIT DEM FLIESSMITTEL ISOPROPANOL-37%IGE HCl-H₂O (80:30:20)

Substanz	<i>R_F</i> -Werte
1,3-Diaminopropan	0.34
Putrescin	0.39
Cadaverin	0.45
2,2'-Dithiobis(äthylamin)	0.34
Spermidin	0.28
Spermin	0.13

DISKUSSION

Cadaverin und Putrescin werden von Darmbakterien bei unvollständiger Resorption von Diaminosäuren gebildet⁸. Sie kommen aber ebenso wie die Polyamine in vielen Organen des Körpers vor⁹. Neben Cadaverin und Putrescin wurde 1,3-Diaminopropan in Ribosomen aus *E. coli*¹⁰ und in der Faeces von Kühen¹¹ nachgewiesen.

Wegen der gewöhnlich sehr niedrigen und wechselnden Konzentration der Diamine im Urin war für ihre Bestimmung eine vorherige Anreicherung etwa durch Präzipitation oder durch Extraktion notwendig. Die Präzipitation wurde überwiegend mit Benzoylchlorid¹ oder mit Ammonium-Reineckat⁸ durchgeführt. Durch die Löslichkeitsverhältnisse bedingt, war eine genaue Bestimmung der Diamine nicht möglich, wenn sie in geringer Konzentration vorlagen.

PERRY und Mitarb.¹² extrahierten die Amine aus dem Urin mit Amberlite CG-50, um sie anschliessend über Amberlite CG-50 oder CG-120 aufzutrennen². Mit dieser Methode konnten die im normalen Urin vorkommenden Diamine Cadaverin, Putrescin und 2,2'-Dithiobis(äthylamin) nachgewiesen werden². Angaben über die Verluste dieser Substanzen bei der Aufarbeitung wurden von ihnen nicht gemacht.

Mit der von ROSENTHAL UND TABOR⁴ angegebenen Methode zur säulenchromatographischen Trennung der Polyamine an einer Amberlite XE-64-Säule war eine befriedigende Auftrennung der Diamine nicht zu erreichen. Bei Verwendung von KCl anstelle von Na_2SO_4 in der Elutionsflüssigkeit gelang dagegen eine vollständige Auftrennung.

Die angegebenen dünnschichtchromatographischen Methoden zur Trennung der Dinitrophenylderivate haben den Vorteil, dass die Dinitrophenylderivate direkt aus dem zur quantitativen Bestimmung verwendeten Cyclohexanon-Extrakt chromatographiert werden können. Die Fluoreszenz der Verbindungen war auf Kieselgel HF₂₅₄ weit besser als auf gewöhnlichem Kieselgel G sichtbar. Die Trennung war gleich gut. Mit dem Auge nicht mehr wahrnehmbare Fluoreszenz liess sich oft photographisch noch deutlich darstellen, so dass auch niedrige Peaks auf diese Weise noch identifiziert werden konnten. Die R_F -Werte hingen weitgehend von der Aktivierungsdauer der Platten ab.

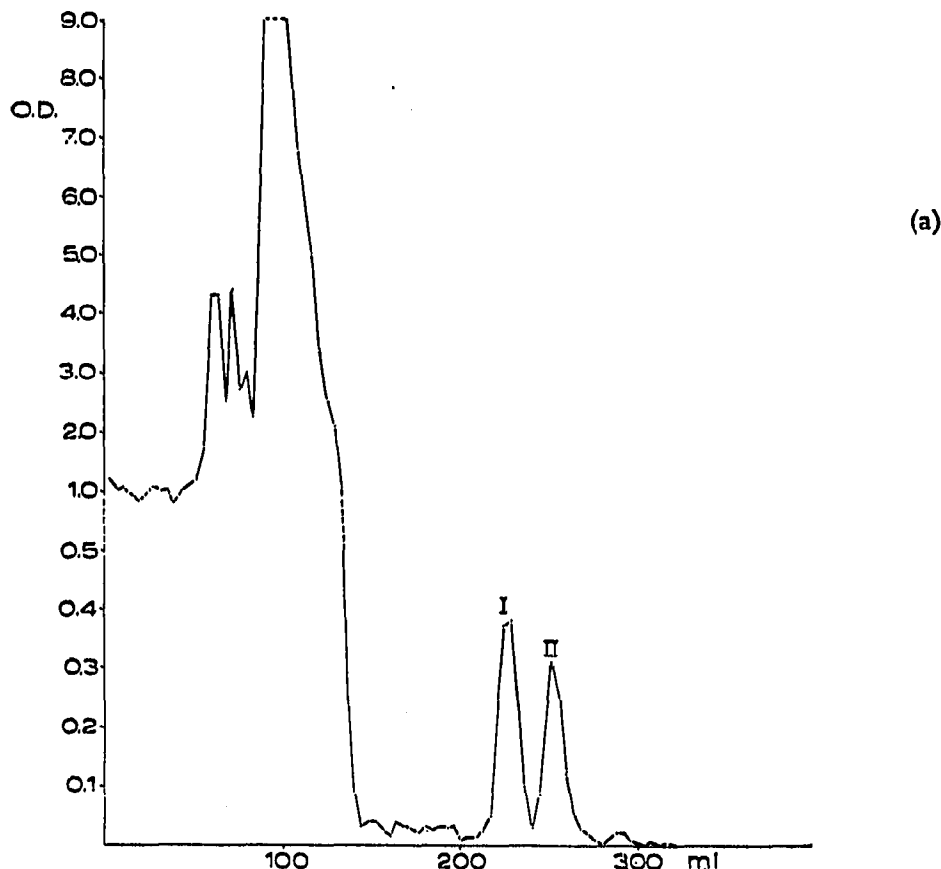
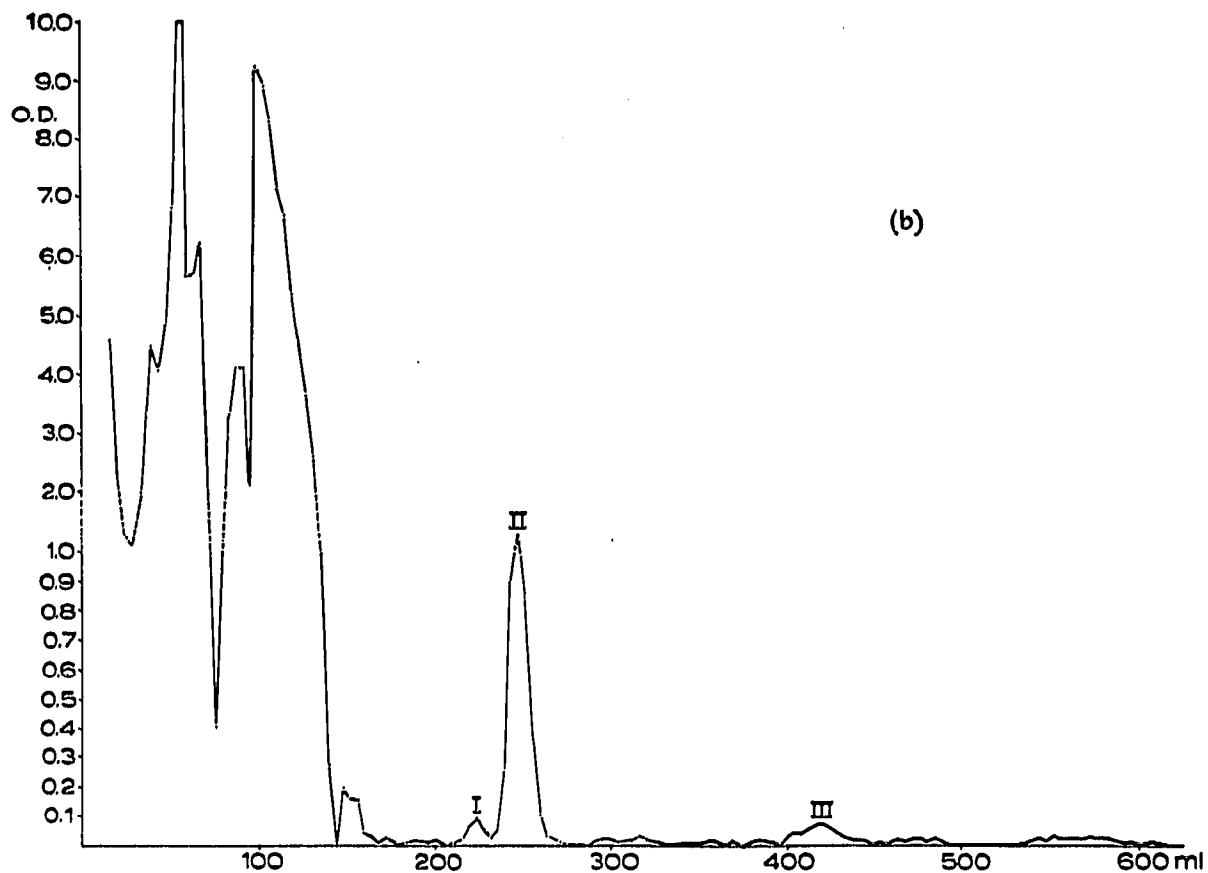
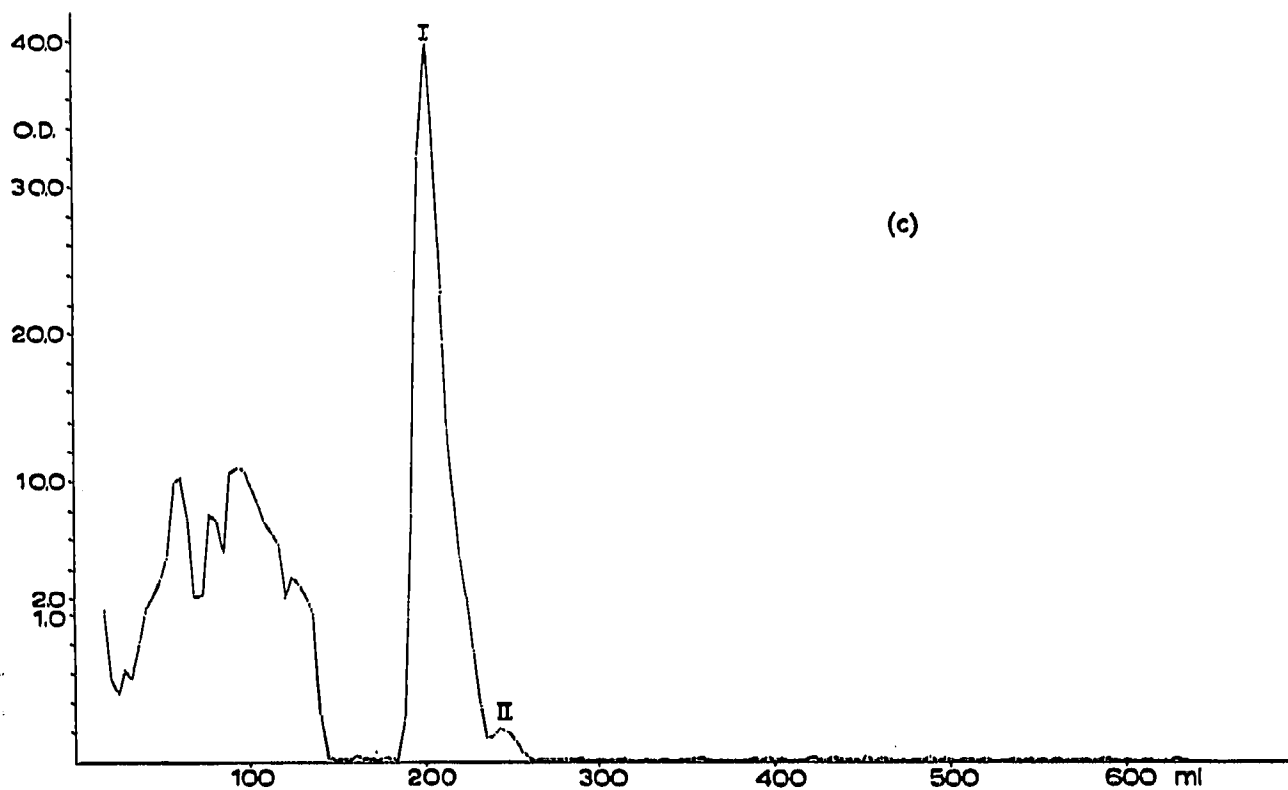


Fig. 5. Di- und Polyamintrennungen von Urinen, (a) von 100 ml Urin einer 3 jährigen Patientin mit Dysostosis enchondralis metaphysaria, (b) von 100 ml einer 3 jährigen Patientin mit De Toni-Debré-Fanconi-Syndrom und (c) von 100 ml einer 40 jährigen Patientin mit Cystinurie. Peak I = Cadaverin, II = Putrescin und III = Spermidin. Die Peaks wurden dünnschichtchromatographisch nach den angegebenen Methoden identifiziert.



(b)



(c)

Abgesehen von dem in der Einleitung erwähnten Fall, fanden wir bei Urinanalysen gesunder und kranker Kinder Cadaverin, Putrescin, Spermidin und eine Verbindung, der wahrscheinlich 1,3-Diaminopropan zugrunde liegt. Die beiden letzten Verbindungen wurden vorwiegend im Urin von Kindern gefunden, die an schweren Enteritiden mit toxischen Erscheinungen litten.

DANK

Wir danken Herrn Apotheker K. NESTEL, Pharmakologisches Institut der Universität Tübingen (Direktor Prof. Dr. F. LEMBECK), für wertvolle Hinweise bei der Durchführung der Dünnschichtchromatographie und Frl. D. BACHMANN für technische Assistenz.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde eine Methode entwickelt, die die Konzentrierung der natürlicherweise vorkommenden Di- und Polyamine aus dem Urin an Dowex 50 X 2 gestattet. Nach der Anreicherung und Elution von Dowex 50 X 2 werden die Di- und Polyamine voneinander und von den Monoaminen säulenchromatographisch mit einer Technik getrennt, der eine Gradientenelution an Amberlite IRP-64 mit einer Lösung, die 0.1 molaren Kaliumphosphat-Puffer, pH 7.1, versetzt mit 3.2 Äq. KCl pro Liter, enthält, zugrunde liegt. Mit dieser Methode können die einzelnen Di- und Polyamine getrennt bestimmt werden. Die Gesamtverluste pro Analyse betragen 5 bis 15 %.

Zum Zweck der Identifizierung wurden folgende Methoden entwickelt:

1. Ein zweites säulenchromatographisches System zur Trennung der Diamine auf Dowex 50 X 8 mit einem HCl-Gradienten.
 2. Vier Dünnschichtsysteme zur Trennung der Dinitrophenylderivate der Di- und Polyamine auf Kieselgel HF₂₅₄.
 3. Ein Dünnschichtsystem, das die freien Diamine auf MN-Zellulose 300 trennt.
- Diese Methoden können auch zur Analyse der Di- und Polyamine aus anderen biologischen Materialien benutzt werden.

SUMMARY

A technique for concentrating the naturally occurring di- and polyamines from urine on a Dowex 50 X 2 column has been developed. After concentration, the di- and polyamines are separated from one another and from the monoamines by a column technique, using Amberlite IRP-64 and gradient elution with a solution containing 0.1 mole of potassium phosphate buffer, pH 7.1, and 3.2 mole potassium chloride per liter. This method enables us to determine each di- and polyamine separately. Overall losses amount 5 to 15 %.

For purposes of identification the following methods have been developed:

1. A second chromatographic system for the separation of the diamines using a Dowex 50 X 8 column and an HCl-gradient.
2. Four thin-layer systems which separate the dinitrophenyl diamines and polyamines on a silica gel HF₂₅₄.
3. A thin-layer system which separates the free diamines on MN-cellulose 300.

These methods may also be used to analyse di- and polyamines in other biological material.

LITERATUR

- 1 L. V. UDRÁNSKY UND E. BAUMANN, *Z. Physiol. Chem.*, 13 (1889) 502.
- 2 T. L. PERRY UND W. A. SCHROEDER, *J. Chromatog.*, 12 (1963) 358.
- 3 Y. KAKIMOTO UND M. D. ARMSTRONG, *J. Biol. Chem.*, 237 (1962) 208.
- 4 S. M. ROSENTHAL UND C. W. TABOR, *J. Pharmacol. Exptl. Therap.*, 116 (1956) 131.
- 5 C. W. TABOR UND S. M. ROSENTHAL, in S. P. COLOWICK UND N. O. KAPLAN (Herausgeber), *Methods in Enzymology*, Vol. VI, Academic Press, New York, 1963, p. 615.
- 6 D. T. DUBIN, *J. Biol. Chem.*, 235 (1960) 783.
- 7 F. C. MCINTIRE, L. W. ROTH UND J. L. SHAW, *J. Biol. Chem.*, 170 (1947) 537.
- 8 M. D. MILNE, A. M. ASATOOR, K. D. G. EDWARDS UND L. W. LOUGHRIDGE, *Gut*, 2 (1961) 323.
- 9 H. TABOR, C. W. TABOR UND S. M. ROSENTHAL, *Ann. Rev. Biochem.*, 30 (1961) 579.
- 10 W. ZILLIG, W. KRONE UND M. ALBERS, *Z. Physiol. Chem.*, 317 (1959) 131.
- 11 D. L. VAN RHEENAN, *Rec. Trav. Chim.*, 82 (1963) 225.
- 12 T. L. PERRY, K. N. F. SHAW, D. WALKER UND D. REDLICH, *Pediatrics*, 30 (1962) 576.

J. Chromatog., 25 (1966) 48-57