

177. Fritz Reindel und Walther Hoppe: Über eine Färbemethode zum Anfärben von Aminosäuren, Peptiden und Proteinen auf Papierchromatogrammen und Papierelektropherogrammen

[Aus dem Institut für landwirtschaftliche Technologie Weihenstephan, der Technischen Hochschule München]

(Eingegangen am 29. Mai 1954)

Durch Chlorieren von Papierelektropherogrammen bzw. Papierchromatogrammen unter genau beschriebenen Bedingungen gelingt es, Aminosäuren, Peptide oder Proteine in die Chloraminderivate überzuführen. Diese werden dann mit *o*-Tolidin oder Benzidin in essigsaurer Lösung unter Zusatz von Kaliumjodid durch tiefblau bis blauschwarz gefärbte Verbindungen am Papier dauerhaft angefärbt. Die Empfindlichkeit der Methode beträgt 1.4 γ Amino-Stickstoff/ccm ($1/10000$ m Amino-Stickstoff).

Vor etwa 1 Jahr veröffentlichten wir eine vorläufige Mitteilung über eine neue Färbemethode für Eiweiß, Peptide und Aminosäuren auf Papierchromatogrammen und Elektropherogrammen¹⁾. Die nach der damals angegebenen Arbeitsweise erzielten Färbungen befriedigten auch uns in der Folgezeit nicht voll. Wir haben sie in der Zwischenzeit so verbessert, daß sie nunmehr eine äußerst empfindliche, reproduzierbare Färbemethode für die genannten Körperklassen und ähnlich konstituierte Verbindungen darstellt.

Unter den zahlreichen, bekannt gewordenen Färbemethoden für Proteine, Peptide und Aminosäuren auf Chromatogrammen bzw. Elektropherogrammen hat sich wohl die Färbung mit Amidoschwarz 10b nach W. Grassmann^{2,3)} durch die breite Anwendungsmöglichkeit, vor allem in den Kliniken, in vielen Fällen bewährt. Die Methode gestattet sogar, durch Messung der Lichtabsorption unmittelbar auf dem Papierstreifen Aussagen über das relative Verhältnis der Proteine zu machen. Niedrige Peptide und Aminosäuren werden durch die Methode nicht erfaßt. Das Hauptanwendungsgebiet der Grassmannschen Färb- und Auswertungsmethode ist das Gebiet der tierischen Eiweißstoffe, speziell des Serumweißes.

Die Anfärbung der Aminosäuren, z. Tl. auch die Anfärbung von niedrigen Peptiden, mit Ninhydrin hat sich als sehr brauchbar erwiesen, zum mindesten für die qualitative Feststellung der beteiligten Aminosäuren, da hier speziell die verschiedene Farbtonung⁴⁾ eine willkommene Hilfe für die Identifizierung mancher Aminosäuren darstellt. Dagegen ist die quantitative Bestimmung gerade wegen der verschiedenen Farböne sehr schwierig, so daß die an sich erwünschte unmittelbare Bestimmung der Farbintensität auf den Chromatogrammen selbst nur zu schwer reproduzierbaren Ergebnissen führt, wiewohl auch hier eine Reihe von Arbeiten in dieser Richtung vorliegen^{5,6)}. Bessere Ergebnisse erzielt man, wenn die durch Chromatographie getrennten Aminosäuren nach Zerschneiden des getrockneten Chromatogrammes eluiert werden und die Farbreaktion mit Ninhydrin im Eluat^{7,8)} durchführt und die Lichtabsorption in der Küvette gemessen wird.

¹⁾ F. Reindel u. W. Hoppe, *Naturwissenschaften* **40**, 221 [1953].

²⁾ W. Grassmann u. K. Hannig, *Naturwissenschaften* **37**, 496 [1950].

³⁾ W. Grassmann, K. Hannig u. M. Knedel, *Dtsch. med. Wschr.* **76**, 333 [1951].

⁴⁾ G. Harris u. J. R. A. Pollock, *J. Inst. Brewing* **59**, 28 [1953].

⁵⁾ J. F. Roland jr. u. A. M. Gross, *Analytic. Chem.* **26**, 502 [1954].

⁶⁾ E. Hiller, F. Zinnert u. G. Frese, *Biochem. Z.* **323**, 245 [1952].

⁷⁾ St. Moore u. W. H. Stein, *J. biol. Chemistry* **176**, 367 [1948].

⁸⁾ F. G. Fischer u. H. Dörfel, *Biochem. Z.* **324**, 544 [1953].

Der Wunsch nach einer neuen Färbemethode für Aminosäuren, Peptide und Proteine entstand in erster Linie infolge unserer ungünstigen Erfahrungen beim Arbeiten mit pflanzlichen Produkten, sowohl beim Arbeiten nach Grassmann als auch mit Ninhydrin. In den Pflanzensäften sind in der Regel nur kleinere Mengen hochmolekularer Proteine vorhanden, neben größeren Mengen von Peptiden und Aminosäuren, die aber speziell durch Amidoschwarz 10b nicht gefärbt werden. Die Anregung zu der neuen Methode ging von einer Arbeit von H. N. Rydon und P. W. G. Smith⁹⁾ aus, welche die Aminosäuren, Peptide usw. auf dem getrockneten Chromatogramm durch Einhängen desselben in eine Chloratmosphäre in Chloraminderivate überführen und diese nach Entfernung überschüss. Chlors durch einen Luftstrom durch Besprühen mit einer Jodkalistärke-Lösung durch blauschwarze Flecken sichtbar machen. Obwohl diese Methode alle für uns wichtigen Körperklassen durch Farbflecken sichtbar macht und auch genügend empfindlich ist, entsprach sie nicht unseren Erwartungen, da einmal die Entfernung des überschüssigen Chlors Schwierigkeiten macht, so daß das Papier auch an den Stellen, wo keine Aminosäure sich befindet, einen erheblichen Blindwert aufweist, andererseits die Chloraminderivate sich als nicht genügend stabil erwiesen, um eine längere Behandlung des chlorierten Chromatogramms im Luftstrom zu gestatten; geringe Mengen von Aminosäuren können so unerkant bleiben. Ein weiterer Nachteil ist die relativ schlechte Haltbarkeit der Farbflecken.

Als wesentliche Änderung gegenüber der Methode von Rydon und Smith chlorieren wir die Papierstreifen nicht im trockenen Zustand, sondern befeuchten mit einer Mischung von wäßrigem Alkohol und Aceton und entwickeln den eigentlichen blauen Farbstoff durch Baden der chlorierten Streifen in einer essigsäuren, schwachen Benzidinlösung. Bei dieser schon früher¹⁾ geschilderten Methodik gelingt es, auch einen Blindwert des Papiers völlig auszuschalten und die Anfärbung wesentlich zu beschleunigen.

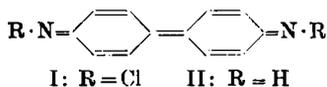
In unserer vorläufigen Mitteilung hielten wir chlordioxydhaltiges Chlor (entwickelt aus KClO_3 und HCl) zur Erzielung schöner blauer Flecken für notwendig; es hat sich gezeigt, daß dies nicht unbedingt der Fall ist. Ferner konnten durch einen Zusatz von Kaliumjodid zur Lösung des Tolidins bzw. Benzidins mit allen Aminosäurekonzentrationen unlösliche und weitaus dunklere Anfärbungen erzielt werden, wodurch die Empfindlichkeit gesteigert wird. Ohne Kaliumjodid (Arbeitsweise der vorläufigen Mitteilung) war die Färbung vornehmlich bei höheren Konzentrationen recht beträchtlich löslich und wurde vom Lösungsmittel zum Teil ausgewaschen.

Manche Beobachtungen, die wir bei der verbesserten Färbemethode machten, werden nur verständlich, wenn man sich die Konstitution der durch Einwirkung von Halogen auf Benzidin bzw. *o*-Tolidin zu erwartenden gefärbten Verbindungen vergegenwärtigt. Nach einer klassischen Arbeit von Schlenk¹⁰⁾ führt die Einwirkung von Chlor oder Hypochloriten (in unserem Falle Chloraminen) auf Benzidin erst zum merichinoiden System, dann zu Diphen-

⁹⁾ H. N. Rydon u. P. W. G. Smith, Nature [London] **169**, 922 [1952].

¹⁰⁾ W. Schlenk u. A. Knorr, Liebigs Ann. Chem. **363**, 313 [1908].

chinondiimiden (II), bei weiterer Einwirkung von Chlor zu Diphenchinondichlorimid (I). Dementsprechend können bei der Anfärbung von Chromatogrammen Produkte ganz verschiedener Farbe und vor allem Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln bzw. Wasser entstehen, wobei die tiefblauen merichinoiden Verbindungen die größte Farbtintensität zeigen. Bei der im Versuchsteil beschriebenen Färbemethode werden die erwähnten Verbindungen in umgekehrter Reihenfolge durchschritten. Im Augenblick des Einbringens des chlorierten Chromatogrammstreifens in das sehr verdünnte Benzidin- bzw. *o*-Tolidin-Bad entstehen Verbindungen vom Typ I, die bei weiterer Einwirkung von Benzidin bzw. *o*-Tolidin vielleicht über die Verbindung II schließlich in die tiefgefärbten merichinoiden Verbindungen übergehen.



Wesentlich ist, daß die gebildeten Farbstoffe unlöslich in organischen Lösungsmitteln und Wasser sind, so daß die Farbklecken auf den Chromatogrammen ihren Ort nicht verändern, oder ausgewaschen werden. Diese Bedingung wird durch Zusatz von Kaliumjodidlösung zum Farbbad mit Sicherheit erfüllt, wodurch sofort bei Benzidin tiefblaue, bei Tolidin noch tiefer gefärbte blauschwarze unlösliche Farbstoffe auf völlig weißem Grund entstehen. Auf dem Papier erzeugte Flecken mit $1/1000$ *m* Aminosäurelösung (bei einigen Aminosäuren im nassen Zustand des Papiers $1/10000$ *m*) lassen sich noch deutlich erkennen. Die Flecken bleichen bei längerem Liegen etwas aus; außerdem wird der ungefärbte Teil des Papiers im Laufe der Zeit schwach gelb. Diese Nachfärbung läßt sich, wie wir festgestellt haben, durch Waschen mit 2-proz. Essigsäure weitgehend verhindern.

Diese Färbemethode hat gegenüber dem Ninhydrin den Vorteil der größeren Empfindlichkeit und besseren Haltbarkeit, sie ist außerdem wesentlich billiger, was für manches wissenschaftliche Institut, das viele Chromatogramme und Elektropherogramme pro Tag anzufertigen hat, von nicht geringer Bedeutung ist.

Die Abbildungen 1–3 (S. 1106) stellen einige Aufnahmen mit der neuen Färbemethode dar.

Es liegt nahe, diese Methode nicht nur zur qualitativen Erkennung der Aminosäuren, Peptide und Proteine zu verwenden, sondern sie auch nach der quantitativen Seite hin auszubauen. Es wäre z. B. möglich, die Auswertung durch Bestimmung der Lichtdurchlässigkeit der Farbklecken unmittelbar auf dem Chromatogramm vorzunehmen in Anlehnung an die Arbeitsweise von Grassmann mit Amidoschwarz 10b oder nach G. Schwuttke^{11,12}) durch Reflexionsmessungen. Auf Grund unserer bisherigen Erfahrungen kann man bereits sagen, daß eine quantitative Auswertung nach dieser Richtung wegen der großen Empfindlichkeit nur in einem Konzentrationsbereich von ca. $m/50$ – $m/2000$ möglich ist, da nur hier Proportionalität zwischen Aminosäurekonzentration

¹¹⁾ F. Pruckner, M. von der Schulenburg u. G. Schwuttke, *Naturwissenschaften* **38**, 45 [1951].

¹²⁾ G. Schwuttke, *Z. angew. Physik* **5**, 303 [1953].

tration und Lichtabsorption gegeben ist. Wir prüfen ferner die Möglichkeit, ob sich die auf Papier gebildeten Chloramine nach Zerschneiden des Chromatogrammes durch Eintragen in Kaliumjodidlösung jodometrisch bestimmen lassen. Die Arbeiten in dieser Richtung sind aber erst in der Entwicklung begriffen.

Beschreibung der Versuche

Methodik der Anfärbung: Es lassen sich nur solche Chromatogramme bzw. Elektropherogramme anfärben, bei welchen Lösungsmittel bzw. Salze verwendet wurden, die die Anfärbung nicht behindern. Veronal z.B. scheidet als Puffersalz aus, bei Phenol sind besondere Bedingungen zu beachten.

Bei Verwendung von Lösungsmittelgemischen, wie z.B. Butanol-Wasser-Essigsäure zur Papierchromatographie, kann die Färbung unmittelbar dann erfolgen, wenn die Chromatogramme lufttrocken geworden sind, das gleiche gilt für Elektropherogramme, wenn man Borax-Citronensäure oder Acetatpuffer verwendet.

Zur Färbung benötigte Lösungen

- | | |
|-----------------------------|--|
| 1) Alkohol-Aceton = 1:1 | 4) Gesättigte Lösung von <i>o</i> -Tolidin |
| 2) 2-proz. Essigsäure | oder Benzidin in 2-proz. Essigsäure |
| 3) <i>m</i> /20 Kaliumjodid | 5) <i>n</i> /10 Kaliumpermanganat |
| | 6) 10-proz. Salzsäure |

Durchführung der Anfärbung: Die lufttrockenen Papierchromatogramme bzw. Elektropherogramme (bei Phenol muß man für die vollkommene Entfernung des Lösungsmittels sorgen) werden mit besonderer Vorsicht gegen Verschmutzung mit Alkohol-Aceton (1:1) befeuchtet und das überschüssige Befeuchtungsmittel mit sauberem Filterpapier abgesaugt. Dann wird der feuchte Streifen auf einen mit feinen, senkrechten Glasspitzen versehenen Glasrost gelegt, welcher sich in einer flachen Glaswanne befindet. In die Wanne werden hierauf 10 ccm (bei einer Wannengröße von 8 × 40 × 5 cm Höhe, sonst entsprechend mehr!) *n*/10 KMnO₄ und 10 ccm 10-proz. Salzsäure gegeben und dieselbe mit einem Deckel verschlossen. Durch leichtes Bewegen der Wanne (5 Min., Wecker!) wird das Chromatogramm bzw. Elektropherogramm chloriert und dann sofort in eine Lösung gebracht, welche aus 1 Tl. *n*/20 KJ und 1 Tl. gesättigter Lösung von *o*-Tolidin in 2-proz. Essigsäure besteht; durch Bewegen der Flüssigkeit wird für sofortige vollkommene Benetzung gesorgt*). Nach ca. 1, höchstens aber 2 Min., ist die maximale Farbtiefe erreicht; der Streifen wird aus dem Bade herausgenommen und zweimal kurze Zeit in jeweils einer frischen Lösung von 2-proz. Essigsäure gewaschen. Die Essigsäure wird mit Filterpapier, das gleich einem Löschpapier verwendet wird, abgesaugt und das Chromatogramm dann an der Luft getrocknet. Bei Verwendung von Benzidin an Stelle von *o*-Tolidin werden für 5 Tle. gesättigter Benzidinlösung in 2-proz. Essigsäure 1 Tl. *m*/20 KJ verwendet. Der dabei entstehende Niederschlag ist ohne Bedeutung für die Anfärbung. Das Baden in der Benzidinlösung muß bis zur maximalen Farbtiefe entsprechend längere Zeit erfolgen. Obwohl die Methode der Anfärbung bei Verwendung von *o*-Tolidin empfindlicher ist, ist die Haltbarkeit der Anfärbung mit Benzidin besser. Legt man auf besonders haltbare Färbungen Wert, ist die Aufbewahrung im Dunkeln zu empfehlen.

*) An Stelle des Badens in einer Schale kann das Chromatogramm auch mit der Tolidin-Lösung besprüht werden, wobei die verschiedenen Farbstufen (gelb, orange, rot und schließlich blau) im Sinne der Arbeit von Schlenk¹⁰⁾ es erlauben, die Konzentration der Aminosäuren informativ abzuschätzen.