

## 305. Über die papierchromatographische Bestimmung von Alkali- und Erdalkaliionen in biologischen Materialien

von H. Seiler, E. Sorkin und H. Erlenmeyer.

(13. X. 52.)

Mit der Möglichkeit, die Alkali- und Erdalkaliionen papierchromatographisch zu trennen<sup>1)</sup> und sowohl qualitativ als auch quantitativ<sup>2)</sup> nach der Sichtbarmachung durch Violursäure zu bestimmen, stellt sich die Frage, ob eine Ionenanalyse von biologischen Materialien, insbesondere von Serum und Harn, mit dieser Methode durchgeführt werden kann. An Hand von Beispielen soll im folgenden über eine von uns benutzte Arbeitsweise berichtet werden, die bei sorgfältiger Befolgung gute Resultate zeitigt.

Vorbehandlung des Papiers. Wie früher gezeigt<sup>3)</sup>, enthält das *Whatman*-Papier Nr. 1 störende Mengen von  $\text{Ca}^{++}$  und  $\text{Na}^+$ , die sich durch dreitägiges Waschen nach der absteigenden Methode mit einem Gemisch aus 100 cm<sup>3</sup> n-Butanol, 100 cm<sup>3</sup> Wasser und 40 cm<sup>3</sup> Eisessig praktisch entfernen lassen.

### 1. Bestimmung der Ionen im Serum.

Die Untersuchungen wurden mit einem Menschenserum durchgeführt, dessen Basengehalt konduktometrisch bestimmt 148,9 mVal betrug<sup>3)</sup>.

Zur Ausfällung des Eiweiss werden 2 cm<sup>3</sup> des Serums mit 10 cm<sup>3</sup> 20-proz. Trichloressigsäure und 10 cm<sup>3</sup> Wasser versetzt. Vom Filtrat werden 17 cm<sup>3</sup> abpipettiert, entsprechend 1,545 cm<sup>3</sup> Serum, die mit 20 cm<sup>3</sup> Wasser verdünnt auf dem Ionenaustauscher Amberlite 410 (in seiner Acetatform gegeben) langsam ausgetauscht werden. Durchlaufgeschwindigkeit ca. 1 cm<sup>3</sup>/Min. Man wäscht mit ca. der dreifachen Menge des Austauschervolumens. Die die Acetate enthaltende Lösung wird alsdann in einer Platinschale auf dem Dampfbad bis zur Trockne eingedampft und der Rückstand in 1 cm<sup>3</sup> 2-n. Essigsäure aufgenommen.

Bei der nun folgenden chromatographischen Trennung ist Folgendes zu beobachten.

Wie wir in der vorangegangenen Mitteilung<sup>2)</sup> berichtet hatten, gelingt die chromatographische Trennung von  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  mit dem von uns benützten Lösungsmittelgemisch nur, wenn das Konzentrationsverhältnis einen bestimmten Wert überschreitet. Bei einer eingehenderen experimentellen Überprüfung zeigte es sich, dass dieser Grenzwert des Konzentrationsverhältnisses stark abhängt: 1. von der Versuchstemperatur und 2. von der Konstruktion der Glaströge, in denen die Trennung erfolgt.

Wir haben bei den zu beschreibenden Versuchen bei 23° gearbeitet und die Tröge mit aufgeschliffenen und beschwerten Glasplatten verschlossen<sup>4)</sup>. Es wird unter diesen Arbeitsumständen, wie sich zeigte, auch dann noch eine Trennung von  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  erzielt, wenn sie im Verhältnis 18:1 vorhanden sind.

1) H. Erlenmeyer, H. v. Hahn & E. Sorkin, *Helv.* **34**, 1419 (1951).

2) H. Seiler, E. Sorkin & H. Erlenmeyer, *Helv.* **35**, 120 (1952).

3) Für die Beschaffung des Serums und die Durchführung der konduktometrischen Messung möchten wir auch an dieser Stelle Herrn Dr. H. Süllmann, Chirurgische Abteilung des Bürgerspitals Basel, verbindlichst danken.

4) Der kleinste Spalt kann die Trennung stören.

Für ein normales Serum ist ein Verhältnis von 15:1 zu erwarten. Um eine gute Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-Trennung zu erreichen, ist es in diesem Fall jedoch ratsam, der zu untersuchenden Lösung eine bekannte Menge von K<sup>+</sup> zuzufügen. Zugleich wird dadurch auch das Ablesen des K<sup>+</sup>-Wertes erleichtert. Ebenso ratsam ist es, durch einen Zusatz von Mg<sup>++</sup> die Ablesung des kleinen Mg<sup>++</sup>-Fleckens sicherer zu gestalten.

Wir haben in der folgenden Weise gearbeitet. Es wurden auf dem vorbehandelten Papier nebeneinander an 3 Punkten auf einer 2,5 cm vom unteren Rand liegenden Linie aufgetragen:

Punkt 1: Obere Kontrollwerte von Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>++</sup> und Ca<sup>++</sup>. Von den Acetat-Lösungen nacheinander — wobei immer zwischen den einzelnen Auftragungen gut mit Hilfe einer Infrarotlampe oder eines Föhns getrocknet wird — mit Hilfe der früher beschriebenen Mikrobürette<sup>1)</sup>:

5 Auftr. je 0,004 cm <sup>3</sup> enthaltend	60 $\gamma$ Na <sup>+</sup> = 300 $\gamma$ Na <sup>+</sup>
2 Auftr. je 0,004 cm <sup>3</sup> enthaltend	76,2 $\gamma$ K <sup>+</sup> = 152,4 $\gamma$ K <sup>+</sup>
3 Auftr. je 0,004 cm <sup>3</sup> enthaltend	5,22 $\gamma$ Mg <sup>++</sup> = 15,66 $\gamma$ Mg <sup>++</sup>
2 Auftr. je 0,004 cm <sup>3</sup> enthaltend	8,22 $\gamma$ Ca <sup>++</sup> = 16,44 $\gamma$ Ca <sup>++</sup>

Punkt 2: Die zu untersuchende Lösung nebst K<sup>+</sup>- und Mg<sup>++</sup>-Zusätzen. In 12 Auftragungen je 0,004 cm<sup>3</sup> = 0,048 cm<sup>3</sup> der zu untersuchenden Lösung:

1 Auftr. je 0,004 cm <sup>3</sup> enthaltend	76,2 $\gamma$ K <sup>+</sup> = 76,2 $\gamma$ K <sup>+</sup>
2 Auftr. je 0,004 cm <sup>3</sup> enthaltend	5,22 $\gamma$ Mg <sup>++</sup> = 10,44 $\gamma$ Mg <sup>++</sup>

Punkt 3: Untere Kontrollwerte von Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>++</sup> und Ca<sup>++</sup>.

3 Auftr. je 0,004 cm <sup>3</sup> enthaltend	60 $\gamma$ Na <sup>+</sup> = 180 $\gamma$ Na <sup>+</sup>
1 Auftr. je 0,004 cm <sup>3</sup> enthaltend	76,2 $\gamma$ K <sup>+</sup> = 76,2 $\gamma$ K <sup>+</sup>
2 Auftr. je 0,004 cm <sup>3</sup> enthaltend	5,22 $\gamma$ Mg <sup>++</sup> = 10,44 $\gamma$ Mg <sup>++</sup>
1 Auftr. je 0,004 cm <sup>3</sup> enthaltend	8,22 $\gamma$ Ca <sup>++</sup> = 8,22 $\gamma$ Ca <sup>++</sup>

Darauf wird das Papier zu einem Zylinder geformt und in das Lösungsmittel gestellt. Als Lösungsmittel wird ein Gemisch von 80 Volumteilen Äthylalkohol (96-proz.) und 20 Volumteilen 2-n. Essigsäure verwendet. Es ist sehr wichtig, dass diese Mischung mindestens 2 Std. vorher in den Trog gegeben wird, damit die Dampfphase gesättigt ist und das Lösungsmittel die gleiche Temperatur wie der Trog hat. Bei der von uns gewählten Versuchstemperatur von 23° ist es gut, wenn der Trogdeckel beschwert wird, da er andernfalls leicht durch den inneren Dampfdruck gehoben werden kann. Als beste Entwicklungsdauer fanden wir 14—16 Std. Nach dieser Zeit wird das Chromatogramm herausgenommen und in einem Trockenofen bei 50° während ca. 30 Min. getrocknet. Danach wird das Chromatogramm mit einer 0,1-n. Lösung von Violursäure in Wasser abgesprüht. Diese Säurelösung soll möglichst frisch bereitet sein, da dann die Kontraste am schärfsten werden. Nach nochmaliger Trocknung, zuerst 30 Min. bei 50° und dann 30 Min. bei 100°, sind die Flecken der Alkali- und Erdalkaliviolurate gut sichtbar. Die Umrandung erfolgt auf einer mit bläulichem Licht beleuchteten Mattglasscheibe. Man umrandet an der äussersten sichtbaren Färbungsgrenze. Dieser Punkt dürfte individuell verschieden sein; umrandet man jedoch überall gleich, so wird der Fehler eliminiert. Die umrandeten Flecken werden mit dem Planimeter ausgemessen und der Gehalt im Serum nach der früher angegebenen Weise unter Berücksichtigung der K<sup>+</sup>- und Mg<sup>++</sup>-Zusätze berechnet.

In der folgenden Zusammenstellung sind die Ergebnisse von 5 Messungen angeführt (Tab. 1).

Die Tab. lässt erkennen, dass mit dieser Arbeitsweise gut reproduzierbare Werte erhalten werden können. Die Ergebnisse entsprechen den mit andern Methoden für ein normales Menschenersum erhaltenen Zahlen<sup>2)</sup>. Die Summe von 149,30 mVal der chromatographisch erhaltenen Mittelwerte steht in guter Übereinstimmung mit dem konduktometrisch ermittelten Wert von 148,9 mVal.

<sup>1)</sup> Es sollen die resultierenden Flecke möglichst gleiche Grösse aufweisen.

<sup>2)</sup> Neuere Angaben über solche Werte siehe *H. A. Krebs*, *Ann. Rev. Biochem.* **19**, 409 (1950).

Tabelle 1.

$\gamma$	mg/l	mVal	Mittelwert in mVal	Abweichung vom Mittel- wert in %
Na <sup>+</sup> 232,0	3128,3	136,0	135,8	0,1
231,5	3121,6	135,7		0,1
229,4	3093,3	134,60		1,0
238,8	3220,0	140,0		3,1
226,7	3055,6	132,85		2,2
K <sup>+</sup> 14,4	194,1	5,0	5,03	0,6
14,4	194,1	5,0		0,6
14,65	197,5	5,05		0,4
14,7	198,2	5,1		1,4
14,4	194,1	5,0		0,6
Mg <sup>++</sup> 2,7	36,4	3,0	2,9	3,4
2,7	36,4	3,0		3,4
2,5	33,7	2,8		3,4
2,4	32,35	2,7		6,9
2,8	37,7	3,1		6,9
Ca <sup>++</sup> 8,2	110,6	5,5	5,60	1,80
8,2	110,6	5,5		1,80
8,7	117,3	5,85		4,70
8,2	110,6	5,5		1,80
8,2	110,6	5,5		1,80
Summe:			149,33	

2. Bestimmung von Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup> im Harn.

Die für die chromatographische Bestimmung erforderliche Lösung der Acetate kann durch direkte Umsetzung des Harns mit dem Ionenaustauscher Amberlite 410 in seiner Acetatform erhalten werden. Die hierbei in der Lösung verbleibenden Aminosäuren stören nicht. Da im Harn das Verhältnis Na<sup>+</sup>:K<sup>+</sup> ungefähr 3:1 ist und genügend Mg<sup>++</sup> vorliegen, erübrigen sich Zusätze. Im übrigen wurde die Bestimmung in gleicher Weise wie bei der angegebenen Analyse des Serums durchgeführt. Aus den folgenden 2 Analysen ist die Arbeitsweise zu entnehmen (Tab. 2).

Es wurde 1 cm<sup>3</sup> Harn mit 5 cm<sup>3</sup> Wasser verdünnt, ausgetauscht, nachgewaschen, die Lösung eingedampft und der Rückstand mit 2-n. Essigsäure auf das ursprüngliche Volumen von 1 cm<sup>3</sup> gebracht. Auf die 3 Punkte des vorbehandelten Papiers wurde wie folgt aufgetragen:

Punkt 1: Obere Kontrollwerte:

5 Auftr. je 0,004 cm<sup>3</sup> mit 60  $\gamma$  Na<sup>+</sup> = 300  $\gamma$  Na<sup>+</sup>  
 3 Auftr. je 0,004 cm<sup>3</sup> mit 76,2  $\gamma$  K<sup>+</sup> = 228,6  $\gamma$  K<sup>+</sup>  
 2 Auftr. je 0,004 cm<sup>3</sup> mit 3,0  $\gamma$  Mg<sup>++</sup> = 6,0  $\gamma$  Mg<sup>++</sup>  
 2 Auftr. je 0,004 cm<sup>3</sup> mit 4,0  $\gamma$  Ca<sup>++</sup> = 8,0  $\gamma$  Ca<sup>++</sup>

Punkt 2: Die zu untersuchende Lösung:

12 Auftr. je 0,004 cm<sup>3</sup>, 1 Auftr. 0,002 cm<sup>3</sup> = 0,05 cm<sup>3</sup>

Punkt 3: Untere Kontrollwerte:

4 Auftr. je 0,004 cm<sup>3</sup> mit 60  $\gamma$  Na<sup>+</sup> = 240  $\gamma$  Na<sup>+</sup>  
 2 Auftr. je 0,004 cm<sup>3</sup> mit 76,2  $\gamma$  K<sup>+</sup> = 152,4  $\gamma$  K<sup>+</sup>  
 1 Auftr. je 0,004 cm<sup>3</sup> mit 3,0  $\gamma$  Mg<sup>++</sup> = 3,0  $\gamma$  Mg<sup>++</sup>  
 1 Auftr. je 0,004 cm<sup>3</sup> mit 4,0  $\gamma$  Ca<sup>++</sup> = 4,0  $\gamma$  Ca<sup>++</sup>

Tabelle 2.

$\gamma$	mg/l	mVal	Mittelwert in mVal	Abweichung vom Mittel- wert in %
Na <sup>+</sup> 276,1	5 522	240,1	238,3	± 0,76
272,0	5 440	236,6		
K <sup>+</sup> 160,0	3 200	81,8	81,05	± 0,9
157,0	3 140	80,3		
Mg <sup>++</sup> 3,4	68	5,6	5,45	± 2,75
3,2	64	5,3		
Ca <sup>++</sup> 5,9	118,0	5,9	5,8	± 1,7
5,7	113,8	5,7		
Summe:			330,60	

Herrn Dr. H. Süllmann verdanken wir viele Hinweise und Diskussionen.

#### SUMMARY.

A paperchromatographic method for the separation and determination of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>++</sup> and Mg<sup>++</sup> in serum and urine is described.

Anstalt für anorganische Chemie der Universität Basel.

### 306. Strukturchemische Untersuchungen an Derivaten des Phenylalanins

von K. U. Steiner<sup>1)</sup> und E. Sorkin.

(13. X. 52.)

Die Frage nach der Funktion der Halogenatome im Thyroxin und im 3,5-Dijodid-tyrosin hat bereits zu zahlreichen experimentellen Untersuchungen Anlass gegeben<sup>2a)</sup>. So lassen sich z. B. im Thyroxin die Jodatome teilweise oder ganz durch Brom- oder Chloratome ersetzen, wobei im Kaulquappen- und Axolotl-Test die charakteristischen Wirkungen des Thyroxins – wenn auch in vermindertem Ausmass – erhalten bleiben<sup>2b)</sup>. Den Jodatomen könnte daher möglicherweise auch raumerfüllende Funktion zukommen.

<sup>1)</sup> Auszug aus der Diss. K. U. Steiner, Basel 1951.

<sup>2)</sup> Zusammenfassungen: a) C. Harington, Fortschr. der Chemie organ. Naturstoffe 2, 103 (1939); b) C. Niemann, *ibid.* 7, 168 (1949).