

## 200. Über eine neue Variante der kombinierten Papierionophorese und Papierchromatographie

von C. G. Honegger.

(17. VII. 56.)

1. Allgemeines. Erstmals wurde die Kombination von Papierionophorese und Papierchromatographie im Sinne einer zweidimensionalen Auftrennung 1948 von *Haugaard & Kroner*<sup>1)</sup> beschrieben, wobei Papierchromatographie und -ionophorese gleichzeitig angewandt wurden. Eine zeitlich getrennte Anwendung beider Verfahren hat sich als vorteilhaft erwiesen. Dabei können die beiden Trennungen entweder auf einem Papier oder auf zwei verschiedenen Papieren durchgeführt werden, wobei noch die Reihenfolge der Operationen verschieden gewählt werden kann.

Die Verwendung nur eines Papiers bringt folgende Schwierigkeiten mit sich: Wählt man als ersten Arbeitsgang die Ionophorese, so ist dafür ein leichtflüchtiger Puffer oder ein solcher zu verwenden, der die anschliessende Chromatographie nicht stört. Diese Methode wurde erstmals von *Kickhöfen & Westphal*<sup>2)</sup> angewandt. Wählt man dagegen wie *Blass et al.*<sup>3)</sup> die Chromatographie als erste Operation, so ist der Benetzungsgrad des Ionophoresestreifens durch die Saugfähigkeit des Papiers bereits vorbestimmt und deshalb nicht mehr frei wählbar, da durch ein späteres Abtupfen von Puffer Substanzverluste auftreten würden. Für die Ionophorese ist es jedoch günstiger, von nur mässig mit Puffer befeuchteten Papierstreifen auszugehen<sup>4)</sup>, wodurch das Auftreten von Flüssigkeitsströmungen weitgehend verhindert wird. Ausserdem können durch unregelmässiges Aufsaugen von Puffer Verschiebungen in den Ionophoresewerten auftreten.

Deshalb wurden die zwei Operationen auf verschiedenen Papieren ausgeführt, wie dies erstmalig *Durram*<sup>5)</sup> 1950 mit seiner „strip transfer“-Methode vorgeschlagen hat.

Nach *Durram* wird ein schmaler, aus dem Papierchromatogramm herausgeschnittener Streifen auf den feuchten Ionophoresestreifen gelegt und ionophoretisch aufgetrennt.

<sup>1)</sup> *G. Haugaard & T. D. Kroner*, J. Amer. chem. Soc. **70**, 2135 (1948). Vgl. auch *H. Seiler, K. Artz & H. Erlenmeyer*, Helv. **39**, 783 (1956).

<sup>2)</sup> *B. Kickhöfen & O. Westphal*, Z. Naturforschg. **7b**, 659 (1952).

<sup>3)</sup> *J. Blass, M. Machebœuf & P. Rebeyrotte*, Bull. Soc. Chim. biol. **35**, 953 (1953); *J. Blass, O. Lecomte & J. Polonovski*, ibid. **36**, 627 (1954). Vgl. auch *S. Lissitzky, J. Garcia & J. Roche*, Experientia **10**, 379 (1954).

<sup>4)</sup> *R. Weber*, Helv. **34**, 2031 (1951).

<sup>5)</sup> *E. L. Durram*, J. Amer. chem. Soc. **72**, 2943 (1950); J. Colloid Sci. **6**, 274 (1951).

In eigenen Versuchen bewährte sich diese Methode jedoch nicht, da die Ablösung der Substanzen aus dem Chromatographiestreifen unregelmässig erfolgt, was in einer Kometbildung der Flecken zum Ausdruck kommt.

In der hier zu beschreibenden Modifikation wird die Ionophorese zuerst ausgeführt. Die Übertragung vom Ionophorese- auf das Chromatographiepapier geschieht mittels Elution.

Bei der Ausarbeitung der Methode war weiterhin folgende Überlegung ausschlaggebend: die Menge eines Substanzgemisches, die von einer punktförmigen Auftragungsstelle aus durch Papierionophorese noch gut aufgetrennt werden kann, ist kleiner als bei der Papierchromatographie. Um grössere Substanzmengen ionophoretisch noch gut aufzutrennen, trägt man daher mit Vorteil das Substanzgemisch als Strich auf. Nun ist es aber für die Papierchromatographie sehr ungünstig, von vertikalen Strichen auszugehen. Es wurde deshalb eine Methode entwickelt, bei der das Substanzgemisch erst ionophoretisch, ausgehend von strichförmigen Auftragestellen, aufgetrennt und dann vom Ionophoresestreifen mit einem geeigneten Lösungsmittel auf das Chromatographiepapier eluiert wird. Die strichförmigen Substanzflecken werden durch die Elution auf dem Chromatographiepapier fokussiert. Bei dieser Arbeitsweise ist die freie Wahl von Papier und Puffersystem für die beiden Auftrennungsmethoden sichergestellt, und der Benetzungsgrad des Ionophoresestreifens kann beliebig gewählt werden.

2. Technik. Von dem entwickelten und getrockneten Papierionogramm wird der Streifen, welcher das Eichgemisch enthält, das die Bezugswerte der Substanzen zueinander liefert, angefärbt. Dadurch kann der für die Elution zu verwendende Bereich bestimmt werden. Aus dem Papierionogramm wird nun je nach der aufgetragenen Substanzmenge ein 2—4 cm breiter Streifen so herausgeschnitten, dass ein gerader oberer und ein gezackter unterer Rand (unter Verwendung einer Zackschere) erhalten wird. Mit einer Pinzette wird der Streifen mit den Zacken nach unten auf eine Plexiglasplatte A von  $50 \times 4 \times 0,4$  cm gelegt, die je am Ende auf der innern Seite mit einem Keil und auf der äussern Seite zur Erhöhung der Steifheit mit einem vierkantigen Plexiglasstab versehen wurde (Fig. 1).

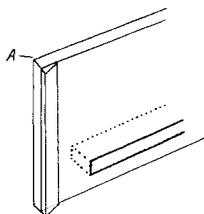


Fig. 1.

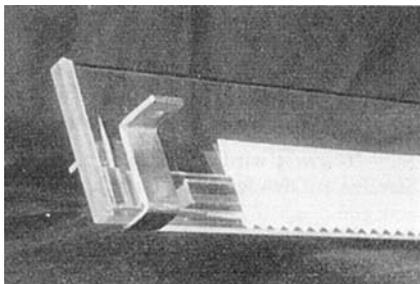


Fig. 2.

Auf den Ionophoresestreifen wird dann eine schmale Glasplatte B von  $50 \times 1 \times 0,3$  cm gelegt. Die Platten werden an ihren Enden durch zwei Metallklammern von 1 cm Breite zusammengedrückt. Der Keil der hinteren Platte soll beim Zusammenpressen die Spannung

erhöhen. Wegen der nötigen Steifheit musste für das vordere, schmale Plättchen Glas verwendet werden. Der Ionophoresestreifen wird derart eingespannt, dass die Zacken 2–3 mm unten heraussehen (Fig. 2). Das Ganze wird nun in eine Haltevorrichtung aus Plexiglas (Fig. 3) gebracht, wobei die oberen Flügel der Klammern auf Plexiglas-

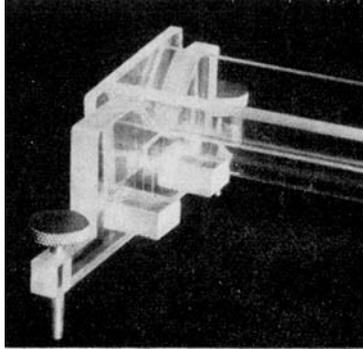


Fig. 3.

klötzchen aufliegen, welche an der Innenseite der Haltevorrichtung angebracht sind. Von dem oberhalb liegenden Plexiglastrog wird ein Filterpapierstreifen auf den Ionophoresestreifen geführt; die beiden Streifen werden mit einem Plexiglasplättchen C von  $50 \times 2,5 \times 0,3$  cm, das in die Klammern geschoben werden kann, festgepresst (fertige Montierung: Fig. 4, im Querschnitt Fig. 5). Auch dieses Plättchen ist zur Herabsetzung der Elastizität

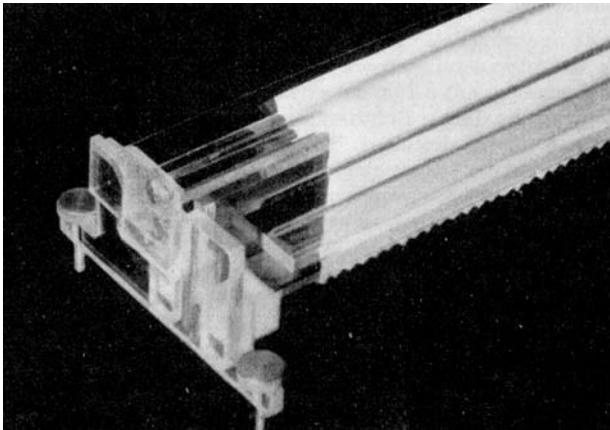


Fig. 4.

auf der äusseren Seite mit einem vierkantigen Plexiglasstab verstärkt. Beim Zusammenpressen durch die Klammern wird eine Spannung erreicht, wie sie für ein festes Aufliegen der vorderen Plättchen auf dem hinteren und damit auf den zwei Papierstreifen notwendig ist, wodurch eine gute Elution gewährleistet wird. Die Elutionsvorrichtung, die durch Schrauben horizontal verschiebbar ist, wird in der Weise auf einem Tisch angebracht, dass die Zacken des Ionophoresestreifens, welche unten heraussehen, auf das darunterliegende Chromatographiepapier 4 cm von dessen unterem Rand (richtiger Abstand für aufsteigende Chromatographie) gelangen. Als Tischplatte dient eine Glasplatte

von  $50 \times 45$  cm mit einer Aussparung von 3 cm an der Stelle, wo Ionophoresen- und Chromatographiepapier sich berühren (Fig. 6). Die Breite der Elutionsvorrichtung und damit die Abmessungen des Tisches werden den jeweiligen Bedürfnissen angepasst. In der eigenen Ausführung kann ein Ionophoresestreifen von  $46 \times 4$  cm eluiert werden.

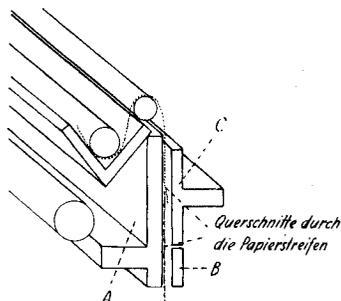


Fig. 5.

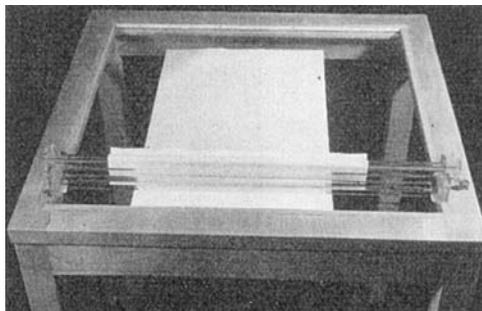


Fig. 6.

Nun wird der Trog mit dem Elutionsmittel gefüllt, das durch den Filterpapierstreifen auf den Ionophoresestreifen geführt wird und aus diesem die Substanzen auf das Chromatographiepapier überträgt, auf welchem die Wanderungswerte des Eichgemisches angezeichnet wurden. Um die Bildung grosser Flecken zu vermeiden, wird der Elutionsstrom von unten her mittels eines Föhnes eingetrocknet. Anschliessend erfolgt die aufsteigende Papierchromatographie. Für absteigende Chromatographie wäre der Abstand: Papierrand—Ionophoresestreifen anders zu wählen.

3. Anwendungsbeispiel. Es gelangte ein Substanzgemisch von flüchtigen Basen zur Auftrennung, das folgendermassen gewonnen wurde: pottasche-alkalischer Normalurin wurde zur Basengewinnung mit *n*-Butanol extrahiert, die Basen mit 1-n. HCl ausgezogen und zur Trockne gebracht. Dieses Rohbasengemisch wurde bei einem pH von 10,5 unter Stickstoff mit Wasserdampf destilliert. Die wasserdampfflüchtigen Basen wurden in 1-n. HCl aufgefangen und die Lösung eingedampft. Vom getrockneten Salzgemisch wurde eine 2-proz. Lösung hergestellt; davon wurden  $10 \text{ mm}^3$  auf einen 2,5 cm langen Strich aufgetragen und papierionophoretisch aufgetrennt (Puffer: Citratpuffer pH = 3,8; Papier: LS 14,  $15 \times 57$  cm; Benetzungsgrad: 150%; Spannung: 1200 V; Stromstärke: 5,5 mA; Ionophoresedauer: 4 Std.). Vom ausgeschnittenen 3 cm breiten Ionophoresestreifen wurde dann das aufgetrennte Substanzgemisch wie beschrieben auf das Chromatographiepapier (SS 2043 b glatt,  $39 \times 26$  cm, imprägniert mit 1/15-m. Na-Phosphat) eluiert, 14 Std. aufsteigend chromatographiert (Chromatographiegemisch: *n*-Butanol: Alkohol: Wasser: Eisessig = 8:4:3:1) und mit Ninhydrin (0,1-proz. Lösung in Aceton) und *Pauly*-Reagens (5  $\text{cm}^3$  2,5-proz. diazotierte Sulfanilsäure + 5  $\text{cm}^3$  10-proz. Sodalösung) angefärbt.

Von den gebildeten 18 Flecken (Fig. 7) wurden durch vergleichende ionophoretische und chromatographische Bestimmungen mit den entsprechenden reinen Substanzen und deren Anfärbungen identifiziert: 1: Ammoniak; 2: Methylamin; 3: Dimethylamin; 6: Piperidin; 7: Nikotin; diese 5 Substanzen stellen normale Urinbestandteile dar; ferner 4: Äthylamin; 5: Pyrrolidin und 8: Colamin. Letztere Substanzen wurden im Normalurin bisher noch nicht nachgewiesen. Die Natur der Flecken 9—18 ist zur Zeit noch unbekannt<sup>6</sup>).

<sup>6</sup>) Über die nähere chemische Charakterisierung und klinische Bedeutung der Basen vgl.: *F. Georgi, C. G. Honegger, D. Jordan, H. P. Rieder & M. Rottenberg*, *Klin. Wschr.* **34**, 799 (1956).

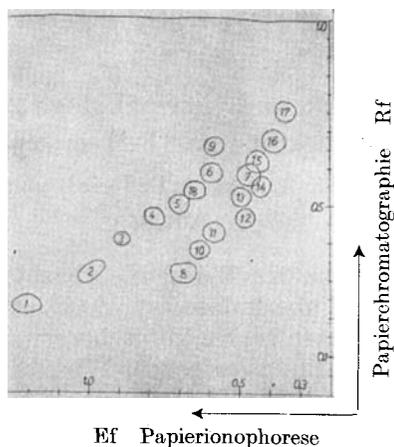


Fig. 7.

Die vorliegende Arbeit konnte mit Hilfe des unserem Laboratorium zur Verfügung stehenden *Barell-Fonds* durchgeführt werden, wofür wir auch an dieser Stelle unseren herzlichsten Dank aussprechen.

Bei der technischen Ausarbeitung der Elutionsvorrichtung war Herr *E. Lüscher* aus der Organisch-chemischen Anstalt in Basel in verdankenswerter Weise behilflich.

### Zusammenfassung.

1. Es werden eine neue Kombination von Papierionophorese und -chromatographie auf zwei verschiedenen Papieren und die dazu verwendete Apparatur beschrieben. Die Ionophorese wird zuerst ausgeführt. Darauf werden die Substanzen für die Chromatographie vom Ionophoresestreifen auf ein zweites Papier durch Elution übertragen.

2. Es wird die Anwendung der Methode auf die flüchtigen Basen aus Normalurin beschrieben. Von den 18 erhaltenen Substanzflecken sind 5 mit im Normalurin schon gefundenen Substanzen (Ammoniak, Methylamin, Dimethylamin, Piperidin und Nikotin) und 3 mit im Normalurin noch nicht nachgewiesenen Basen (Äthylamin, Colamin und Pyrrolidin) identifiziert worden.

Forschungslaboratorium der Psychiatrischen Universitätsklinik  
und der Neurologischen Universitäts-Poliklinik Basel,  
Mittlere Strasse 91.