

Über Papierionophorese bei Spannungsgefällen von 50 Volt/cm.

Von
H. Michl.

Aus dem II. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

Mit 3 Abbildungen.

(Eingelangt am 26. Febr. 1951. Vorgelegt in der Sitzung am 8. März 1951.)

In dem Bestreben, mit möglichst kleinen Substanzmengen arbeiten zu können, wurden in den letzten Jahren mehrere Verfahren geschaffen, die eine Iono- bzw. Elektrophorese mit geringem Materialeinsatz gestatten¹. Mit besonders wenig Material kommt man bei der Ionophorese auf Filtrierpapier aus, die von *Wieland*², *Biserte*³, *Cremer* und *Tiselius*⁴, *Durrum*⁵, *Turba* und *Enenkel*⁶ beschrieben wurde. Diese Autoren führten als Beispiele Trennungen von synthetischen Aminosäuregemischen und von Eiweißstoffen an.

Substanzknappheit stellte mich vor die gleiche Aufgabe. In einem Fall handelte es sich um die Zerlegung eines Eiweißhydrolysates⁷, in einem zweiten um die Reinheitsprüfung eines Polypeptides⁸; ein dritter Fall erforderte die Prüfung verschiedener Trennverfahren bei der Isolierung eines Glykoproteides⁷. Im Beispiel drei handelte es sich um Serienversuche.

Die bisherigen Anordnungen gaben in den erwähnten Fällen nur wenig befriedigende Resultate. Die Substanzen waren entweder überhaupt nicht voneinander getrennt worden, oder in Folge der langen Versuchs-

¹ *H. Labhart* und *H. Staub*, *Helv. chim. Acta* **30**, 1954 (1947).

² *Th. Wieland*, *Angew. Chem.* **60**, 313 (1948); *Naturwiss.* **35**, 29 (1948).

³ *G. Biserte*, *Biochem. Biophys. Acta* **4**, 417 (1950).

⁴ *E. L. Durrum*, *J. Amer. chem. Soc.* **72**, 2943 (1950).

⁵ *D. Cremer* und *A. Tiselius*, *Biochem. Z.* **320**, 273 (1950).

⁶ *F. Turba* und *H. J. Enenkel*, *Naturwiss.* **37**, 93 (1950).

⁷ *H. Michl*, *K. Riedl* und *F. Wessely*, *Mh. Chem.* **82**, 539 (1951).

⁸ *L. Schmid*, *H. Michl* und *G. Zwettler*, *Mh. Chem.* **82**, 526 (1951).

zeiten war eine unerträgliche Verbreiterung der einzelnen Zonen eingetreten. Es war auch nicht möglich, eine Trennung durch Wanderung über große Strecken zu erzwingen. Dadurch sank nämlich die Flächenkonzentration unter die Nachweisgrenze. Außerdem waren bei den Serienversuchen die langen Versuchszeiten (10 bis 15 Stdn.) sehr hinderlich.

Das einzige Mittel, die lästigen Diffusionserscheinungen zu verringern und die Versuchszeiten abzukürzen, bestand darin, höhere Spannungsgefälle zu verwenden. Das war nun mit den gebräuchlichen Apparaturen und Puffern nicht möglich, da starke elektroosmotische Störungen das Bild verwischten.

Die im folgenden beschriebene Apparatur vermeidet nun diese Nachteile und bietet folgende Vorteile:

1. Die Anwendung von mittleren Spannungsgefällen bis zu 50 Volt/cm (darunter ist der Mittelwert zu verstehen, der sich aus der angelegten Spannung und der Länge des Filtrierpapierstreifens zwischen den Elektroden berechnet). Die Versuchsdauer konnte damit auf 20 bis 30 Min. abgekürzt werden.

2. Ihre Dimensionen sind leicht variierbar, weil sie aus einfachsten Laboratoriumsgeräten zusammengesetzt ist. Die zur Untersuchung gelangenden Mengen können beliebig gewählt werden; die Apparatur läßt sich auch für präparative Zwecke im mg-Maßstab verwenden⁷.

3. Das Lösungsmittel, daß die Anwendung dieser hohen Spannungsgefälle erst gestattet, hat noch einen weiteren sehr hoch einzuschätzenden Vorteil: Es besteht aus einem Essigsäure-Pyridin-Gemisch in wäßriger Lösung und kann durch Erwärmen, Trocknen im Vakuum oder Behandeln mit geeigneten Lösungsmitteln leicht entfernt werden. Mühsam entsalzte Hydrolysate oder Peptidlösungen werden dadurch nicht wieder neuerlich mit Mineralsalzen verunreinigt. Die präparative Trennung gestaltet sich dadurch sehr einfach und schnell, Papierchromatogramme können unmittelbar anschließend durchgeführt werden.

4. Es gibt Substanzen, z. B. organische Säuren, deren Nachweis am Papier durch Puffersalze gestört wird. Diese Substanzen können bei Verwendung obigen Lösungsmittels ohne Schwierigkeiten erkannt werden. Die Leistungsfähigkeit der Anordnung sei an folgenden Beispielen dargestellt (ihre experimentelle Durchführung ist im Versuchsteil zu finden):

1. Diagramm eines Eiweißhydrolysates (Abb. 1a).

Die Streifen bedeuten von unten nach oben: Asparaginsäure, Markierung der Ausgangsstellung, Glutaminsäure, Monoaminomonocarbonsäuren, Histidin, Lysin, Arginin.

Man sieht, daß unter den gewählten Bedingungen (pH 4, 20°) sowohl die Gruppen der Monoaminomonocarbonsäuren, Monoaminodicarbonsäuren und Hexonbasen, als auch die einzelnen Monoaminodicarbonsäuren

und Hexonbasen voneinander getrennt werden. Für die Trennung Lysin-Arginin ist es notwendig, das Hydrolysat gut zu entsalzen. Die Auftrennung der Monoaminocarbonsäuren und Hexonbasen ist von Bedeutung, da es bei der Papierchromatographie schwierig und zeitraubend ist, eine solche zu erreichen. Beide Methoden ergänzen sich also in glücklicher Weise.

2. Diagramm eines Antigens aus *Brucella abortus bang*⁸ (Abb. 1b).

Die Streifen sind von unten nach oben in folgender Art zu deuten: um die Ausgangslinie liegt die Hauptfraktion, ein Polypeptid-Polysaccharid-

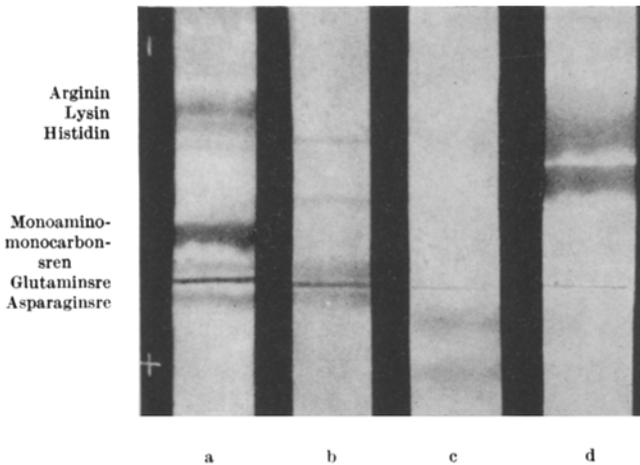


Abb. 1.

Komplex. Der zweite und der dritte Streifen sind Begleitstoffe von Peptidcharakter.

Wie aus zahlreichen Versuchen und auch aus Abb. 1b hervorgeht, ergeben Peptide bei obiger Anordnung besonders klare und scharfe Streifen. Der Wert der Methode ist also für diese Körperklasse unverkennbar.

3. Diagramm organischer Säuren (Abb. 1c).

Die Streifen bedeuten von unten nach oben: Äpfelsäure, Bernsteinsäure und die Markierung der Ausgangsstellung. Bei diesem Versuch wurden unseres Wissens erstmalig nicht flüchtige organische Säuren mit Hilfe der Papierionophorese getrennt.

4. Diagramm anorganischer Ionen (Abb. 1d).

Die Streifen bedeuten von unten nach oben: Markierung der Ausgangsstellung, Cupriion, Cadmiumion. Die Trennung dieser Ionen ist

überraschend, da sich die Ionenbeweglichkeiten der beiden Stoffe nur um 0,2% unterscheiden⁹.

Die beiden letzten Versuche zeigen, daß sich die Papierionophorese keineswegs auf die Trennung von Eiweiß und dessen Abbauprodukten beschränken muß, sondern allgemeiner anwendbar und entwicklungs-fähig zu sein scheint.

Experimenteller Teil.

Beschreibung der Apparatur.

Die Apparatur besteht aus einem Becherglas, Filtrierstutzen oder Standglas (1); die Dimensionen richten sich nach den jeweiligen Untersuchungen. Weiters benötigt man eine kleine Kristallisierschale (2) und eine geeignete

Klammer (3). Ferner ist eine Spannungsquelle von 500 bis 1000 Volt und 20 Milliampere erforderlich sowie zwei Zinnelektroden (4, 5) und ein Streifen Filtrierpapier (6). Die Kristallisierschale wird mit der Klammer etwa 2 cm

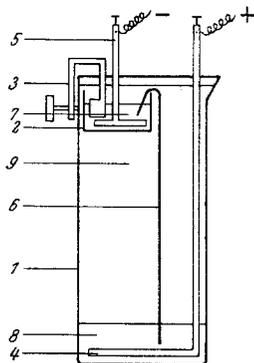


Abb. 2.

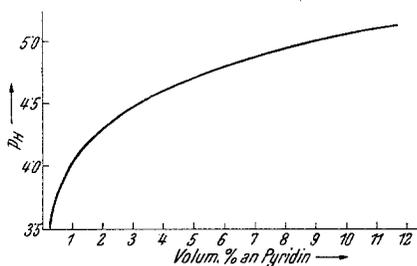


Abb. 3.

unterhalb des oberen Randes des Filtrierstutzens innen befestigt und mit dem unten angegebenen Lösungsmittel gefüllt (7), ebenso der Filtrierstutzen einige Zentimeter hoch (8). Der — wie unten beschrieben — vorbereitete Papierstreifen wird nun mit dem einen Ende in das Lösungsmittel in der Kristallisierschale, mit dem anderen Ende in das des Filtrierstutzens getaucht und dann der ganze Filtrierstutzen mit Toluol vollgefüllt (9). Von den Elektroden taucht die Anode (4) zweckmäßig in den Filtrierstutzen, die Kathode (5) in die Kristallisierschale ein.

Das Lösungsmittel besteht aus wäßr. 10 vol.-%iger Essigsäure und einer wechselnden Menge Pyridin. Abb. 3 liefert Anhaltspunkte über die Abhängigkeit des pH-Wertes vom Pyridingehalt der Lösung.

Die Titrationskurve von Abb. 3 wurde elektrometrisch mit einer Antimon-elektrode¹⁰, die mit dem Acetatpuffer nach Walpole¹¹ geeicht worden war, aufgenommen.

⁹ J. D'Ans und E. Lax, Taschenbuch für Chemiker und Physiker, S. 1237. Berlin. 1943.

¹⁰ G. A. Perley, Ind. Engng. Chem., Analyt. Edit. 11, 319 (1939).

¹¹ G. S. Walpole, J. chem. Soc. London 105, 2501 (1914).

Vorbereitung des Filtrierpapierstreifens.

Ein Streifen aus Filtrierpapier *Schleicher-Schüll* 602 hart, für Untersuchungszwecke etwa 2 cm breit, für präparative Zwecke entsprechend breiter, wird in das Lösungsmittel getaucht und zwischen Filtrierpapier gut abgepreßt. Dann wird an der gewünschten Stelle mit Hilfe eines feinen Marderhaarpinsels die Substanz in Form eines Streifens normal zur Längsrichtung des Papierstreifens aufgetragen und dieser direkt in den Apparat gehängt.

Versuchsbedingungen der Diagramme 1 bis 4 (Abb. 1a bis d).

Größe der Streifen: 2 × 15 cm.

Lösungsmittel: Bei Versuch 1 und 2 Essigsäure-Pyridin-Gemisch von pH 4; bei Versuch 3 und 4 10%ige Essigsäure.

Spannung und Stromstärke: 510 Volt, 3 bis 4 Milliampere; der Spannungsabfall erfolgte auf einer Strecke von 11 cm, das mittlere Spannungsgefälle betrug also 46,3 Volt/cm.

Versuchsdauer: 20 Min., Zimmertemp.

Entwicklung: 1 und 2 mit Ninhydrin; 4 mit Schwefelwasserstoff. Der Nachweis der nicht flüchtigen organischen Säuren erfolgte durch Besprühen mit einer Lösung von 232 mg KJ, 55,6 mg KBrO₃ und 300 mg Stärkepaste nach *Zulkovsky (Merck)* in 10 ml dest. Wasser. Im Laufe von 10 Min. entwickelte sich die Blaufärbung, die jedoch nur kurze Zeit anhält. Nach erfolgter Trocknung bleibt eine braune Färbung auf gelbem Untergrund. Die Empfindlichkeit für Säuren mit einer Dissoziationskonstante von 10⁻⁴ bis 10⁻⁶ ist etwa 5 γ/cm².