

Papierchromatographie

Von A. H. GORDON Ph. D.

Aus dem Biologischen Institut der Carlsberg-Stiftung Kopenhagen

Die Arbeitsmethoden der ein- und zweidimensionalen Papierchromatographie, die zur qualitativen und quantitativen Bestimmung kleinsten Substanzmengen steigende Bedeutung gewinnen, werden insbesondere am Beispiel der Aminosäuren gezeigt.

Eine Beschreibung der Papierchromatographie läßt sich am besten mit einem kurzen Abriß der Technik, aus der sie entstanden ist, einleiten. Es war die Trennung der Aminosäuren in Form ihrer Acetyl-Derivate an Säulen aus Silicagel (*Martin* und *Syngle*¹). Das hier angewandte Prinzip war von dem der klassischen Chromatographie völlig verschieden. Es wird nicht die verschiedene Adsorbierbarkeit an dem Säulenmaterial benutzt, sondern die Unterschiede des Verteilungskoeffizienten zwischen einem organischen Lösungsmittel, das mit Wasser nur teilweise mischbar ist, und Wasser selbst. Bei diesen Verteilungskoeffizienten läuft das organische Lösungsmittel durch Silicagel-Partikel, die etwa 40% ihres Gewichtes an Wasser enthalten. Dabei werden die Substanzen, die in dem organischen Lösungsmittel am besten löslich sind, in der Säule am weitesten nach unten gelangen, während die im Wasser besser löslichen weiter oben Zonen bilden. Diese Schichten werden durch einen Indikator sichtbar gemacht, z. B. Methylorange, das in der wäßrigen Phase gelöst ist. Wenn die Zonen schmal und oben und unten scharf begrenzt sind, kann man annehmen, daß Adsorption gar nicht oder nur in geringem Maße stattgefunden hat. Lösungsmittelsysteme, die für die Trennung der Acetylaminosäuren brauchbar sind, wurden von *Gordon*, *Martin* und *Syngle*²) beschrieben.

Eindimensionale Papierchromatographie

Als wir nun versuchten, die freien Aminosäuren auf diese Art zu trennen, waren die Zonen keineswegs schmal, sondern bildeten immer lange Schwänze, die eine gute Trennung unmöglich machten. Wir suchten deshalb nach einem Material, das weniger stark adsorbiert als Silicagel und fanden es im Whatman-Filtrerpapier Nr. 1 oder 4, das nahezu ideale Eigenschaften besitzt und mit denen Trennungen gut gelingen. So wurde die Substitution der Aminosäuren vermieden, durch die die Unterschiede zwischen ihnen verschwunden und die Trennung wegen der dann nahezu gleichen Löslichkeit sehr erschwert wurde. Die mechanischen Eigenschaften des Filtrerpapiers machen das sonst übliche Glasrohr unnötig, stattdessen wird ein Streifen des Papiers, auf das oben ein Tropfen der zu analysierenden Lösung gebracht worden ist, so aufgehängt, daß das obere Ende in einen Trog taucht, in dem sich mit Wasser gesättigtes Phenol, s-Collidin oder Butanol befindet. Um das Verdunsten zu verhindern und die Sättigung mit Wasser dauernd aufrecht zu erhalten, wird der ganze Apparat in eine feuchte Kammer eingeschlossen (Bild 1 u. 2). Nach Entwicklung des Chromatogramms wird das Lösungsmittel weg-

gedunstet und die Lage der verschiedenen Aminosäuren durch Besprühen mit 0,1proz. butanolischer Ninhydrin-Lösung und Erhitzen auf 100° in einigen Minuten sichtbar gemacht (*Consden*, *Gordon* und *Martin*³). Die Färbungen der Aminosäuren mit Ninhydrin sind sehr intensiv, so daß die Anwesenheit von nur 0,1–0,5 γ der meisten Aminosäuren bemerkbar werden kann. Jedoch geht die Farbstärke nicht der Menge an Aminosäure proportional, so daß die Intensität des Farbfleckes höchstens als größtordnungsmäßiger Hinweis auf die Aminosäure-Menge dienen kann. Durch verschiedene Farbreagenzien, von denen einige später noch erwähnt werden, können zahlreiche andere Substanzen, die passende Löslichkeitseigenschaften für die Papierchromatographie besitzen, ebenfalls getrennt und identifiziert werden. Beispiele hierfür sind die Zucker (*Partridge*⁴), organische Säuren, wie die Penicilline (*Goodall*⁵), Purine und Pyrimidine.

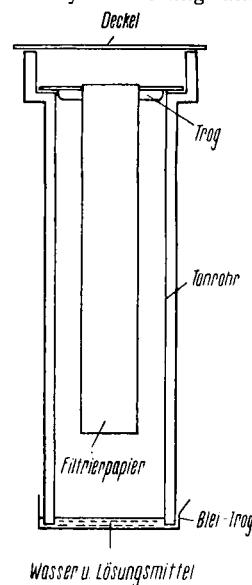


Bild 1
Längsschnitt durch die Gesamtapparatur

Zweidimensionale Papierchromatographie

Für viele Aminosäuren gibt die eindimensionale Chromatographie genügende Trennschärfe, doch kommt es vor, daß die Verteilungskoeffizienten mit einem bestimmten Lösungsmittel für eine gute Trennung zu ähnlich sind. In solchen Fällen kann im allgemeinen ein zweites Lösungsmittel gefunden werden, in dem die Verteilungskoeffizienten größer Unterschiede haben. Um ein solches zweites Lösungsmittel zu benutzen, wird die zu untersuchende aminosäure-haltige Lösung in der Nähe einer Ecke eines quadratischen Stückes Filtrerpapier aufgesetzt und längs einer Kante entwickelt. Danach wird das Lösungsmittel weggetrocknet und das Papier um 90° gedreht und mit dieser Kante in einen Tropf mit dem zweiten Lösungsmittel gehängt, so daß die Flecken jetzt rechtwinklig zur ersten Richtung wandern. Schließlich wird das Papier getrocknet und mit Ninhydrin behandelt, wie bei der eindimensionalen Chromatographie. Auf diese Weise kann die Mehrzahl der Aminosäuren in einem Gang voneinander

¹⁾ Biochem. J. 35, 1358 [1941].

²⁾ Ebenda 36, 79 [1942].

³⁾ Nature [London] 158, 674 [1946].

⁴⁾ Biochem. J. 35, 1358 [1941].

⁵⁾ Ebenda 36, 79 [1942].

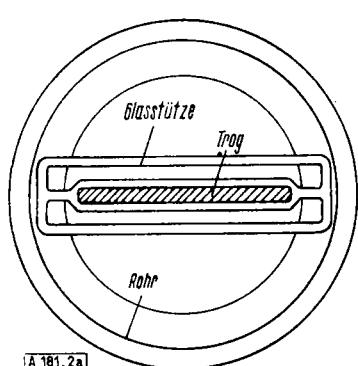


Bild 2a
Befestigung des Troges von oben

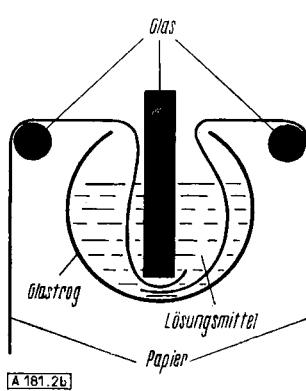


Bild 2b
Querschnitt durch den Tropf für eindimensionale Chromatogramme

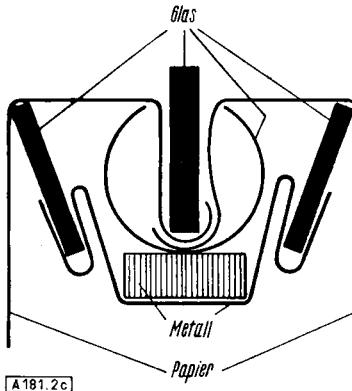


Bild 2c
Querschnitt durch den Tropf für zweidimensionale Chromatogramme

getrennt werden. Werden nur Mischungen reiner Aminosäuren chromatographiert, sind die Flecken rund oder nur wenig oval. Erhebliche Verzerrung tritt jedoch dann ein, wenn Gewebsextrakte oder Mischungen, die größere Mengen anorganischer Salze enthalten, getrennt werden sollen. Ist viel Salz zugegen, muß es entfernt werden, bevor die Lösung chromatographiert werden kann, andernfalls erhält man unbefriedigende Resultate.

Entfernung störender Lösungsbestandteile

Sind nur Salze starker Säuren zugegen, können sie meist leicht aus Mischungen von Aminosäuren mit Hilfe der Elektrodialyse nach der Methode von *Consden, Gordon und Martin*⁶⁾ entfernt werden. Bei dieser Methode werden die Kationen, wie Na^+ und K^+ von einer Quecksilberkathode aufgenommen, während die Anionen der starken Säuren durch die Cellophanmembran in den Anodenraum wandern, der mit verdünnter Schwefelsäure gefüllt ist. Aminosäuren und andere schwache Säuren können nicht in den Anodenraum gelangen, da ihre Moleküle die negative Ladung verlieren, wenn sie die Cellophanmembran erreichen. Damit erhalten Aminosäuren eine positive Nettoladung und wandern zur Kathode, in der sie unlöslich sind. Den benutzten Apparat zeigt das Bild 3. Dialysate von Gewebsextrakten

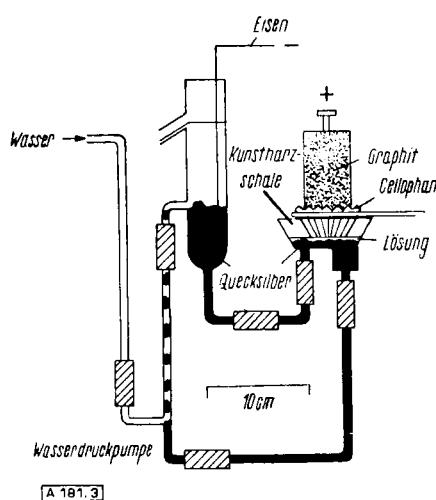


Bild 3
Apparatur zur Entsalzung von Hydrolysaten durch Elektrodialyse

Ionophorese (*Consden, Gordon und Martin*⁷⁾) oder die Chromatographie an einem synthetischen Ionenaustauscherharz (*Freudenberg, Walch und Molter*⁸), (*Consden, Gordon und Martin*⁹).

Qualitative Auswertung der Chromatogramme

Man kommt in der Entschlüsselung solch komplizierter Chromatogramme ferner weiter, wenn man mehrere Papierchromatographien ausführt und versucht, die Natur der Flecken sicherzustellen, die nicht unmittelbar aus ihrer Lage auf dem Chromatogramm identifiziert werden können. Das kann nach mehreren Methoden geschehen. Die folgende ist vielleicht die wichtigste von ihnen¹⁰⁾.

Mehrere Tropfen der zu untersuchenden Lösung werden längs einer Kante eines breiten Filtrerpapierstreifens aufgebracht, entwickelt und getrocknet. Dann wird das Chromatogramm eines dieser Flecken abgeschnitten und mit Ninhydrin gefärbt. Dieser Streifen dient als Muster, um die Lage der verschiedenen Komponenten auf dem Restchromatogramm festzulegen. Dies wird nun in Querstreifen, die die einzelnen Komponenten enthalten, zerschnitten und diese werden aus dem Papier ausgewaschen, indem Wasser durch den Papierstreifen in ein passend geformtes Kapillarrohr hindurchsickern gelassen wird (*Consden, Gordon und Martin*⁶) (Bild 4). Die so erhaltenen Lösungen können hydrolysiert oder anderweitig umgesetzt und dann abermals papierchromatographiert werden. So lassen sich häufig Aminosäuren auffinden, die vorher z. B. peptid-artig miteinander ver-

bunden waren. Wenn die freie Amino-Gruppe eines Peptids festgestellt werden soll, kann die Lösung nach dem Eluieren aus dem Chromatogramm mit Stickoxyden behandelt werden, die aus Natriumnitrit und Salzsäure entwickelt werden. Anschließende Hydrolyse und Chromatographie ergibt nur Flecken derjenigen Aminosäuren, deren Amino-Gruppen an der Peptid-Bindung beteiligt waren. Bei den Dipeptiden sind die Ergebnisse derartiger Untersuchungen ausreichend zur vollständigen Charakterisierung (mit Ausnahme der Stereochemie). Die Verwendung von Musterchromatogrammen beim Auswaschen zweidimensionaler Chromatogramme ist schwieriger, da die Lage der Flecken schwerer festzulegen ist. Ein nützlicher Kunstgriff ist der, das getrocknete Chromatogramm mit einer sehr verdünnten Ninhydrin-Lösung (0,01 % in Butanol) zu besprühen. Nach dem Erhitzen treten nur die stärkeren Flecken hervor und der größte Teil des chromatographierten Materials bleibt erhalten. Die geringen Mengen gefärbter Substanz stören nicht bei der Vervollständigung des Chromatogramms nach der vorhin beschriebenen Methode. Sehr günstig ist es, wenn die Substanzen fluoreszieren, da man dann die Flecken im UV-Licht lokalisieren kann. Leider zeigen häufig Verunreinigungen verschiedene starke Fluoreszenz, wodurch diese Methode erschwert wird.

Die allgemeinste und vielleicht brauchbarste Methode zur Identifizierung von Substanzen, die auf Papierchromatogrammen ausgewaschen worden sind, ist die, sie mit der reinen Verbindung auf die Verdacht besteht zu mischen und nun Parallelchromatogramme der unbekannten, der reinen und der Mischprobe auszuführen. Wenn die Flecken auf allen drei an der gleichen Stelle liegen, hat man mit großer Wahrscheinlichkeit die Substanz identifiziert, besonders dann, wenn die Chromatographie mit verschiedenen anderen Lösungsmitteln wiederholt wird.

Quantitative Auswertung der Chromatogramme

Es sind zahlreiche Versuche gemacht worden, die Papierchromatographie zu einer quantitativen Methode zu gestalten. Die dabei auftretenden Schwierigkeiten hängen weitgehend von dem zu trennenden Material ab. Bei den Purinen sind sie vielleicht am geringsten, wegen der großen und sehr charakteristischen UV-Absorptionskoeffizienten dieser Verbindungen. *Hotchkiss*¹¹⁾ hat mit Erfolg eine Methode ausgearbeitet, die davon Gebrauch macht und bei der die durch Papierchromatographie getrennten Purine mit einer Genauigkeit von 90–95 % quantitativ bestimmt werden können.

Das Problem ist bei den Aminosäuren schwieriger, da ja die Ninhydrin-Färbungen im allgemeinen nicht der Aminosäure-Menge proportional sind. Trotzdem sollen kolorimetrische Methoden mit Ninhydrin unter genau eingehaltenen Bedingungen genau sein (*Naftalin*¹²⁾). Die Angaben müssen aber erst bestätigt werden.

Am erfolgreichsten ist dies Problem bis jetzt angegangen worden unter Verwendung der Reaktion der Aminosäuren mit

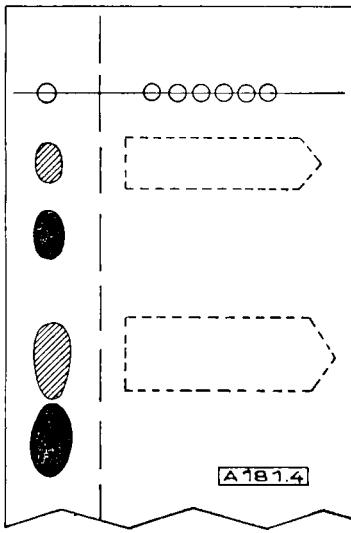


Bild 4
Untersuchung von Eiweißhydrolysaten im eindimensionalen Chromatogramm

Die zu untersuchende Lösung wird entlang der Startlinie aufgetropft (offene Kreise). Nach Entwicklung des Chromatogramms wird der linke Streifen entlang der gebrochenen Linie abgeschnitten und mit Ninhydrin behandelt, um Aminosäuren (schwarz) und Peptide (schräffiert) sichtbar zu machen. Dieser Streifen dient als Muster; der Rest des Chromatogramms wird zerschnitten, wie die gestrichelten Linien zeigen und die Peptide zur weiteren Untersuchung eluiert.

⁶⁾ Biochemic. J. 41, 590 [1947]; vgl. diese Ztschr. 60, 286 [1948] sowie ebenda 60, 259 [1948].

⁷⁾ Ebenda 40, 33 [1946].

⁸⁾ Naturwiss. 30, 87 [1942].

⁹⁾ Biochemic. J. 42, 443 [1948].

¹⁰⁾ Vgl. dazu auch diese Ztschr. 60, 82 [1948].

¹¹⁾ J. biol. Chemistry 175, 315 [1948].
¹²⁾ Nature [London] 181, 763 [1948].

Kupferphosphat, wobei diese lösliche Kupfer-Komplexe bilden (Pope und Stevens¹³). Nach der Methode von Martin und Mittelmann¹⁴) werden die Einzelabschnitte des Chromatogramms mit einer Aufschämmung von Kupferphosphat geschützt, die entstehenden Kupfer-Komplexe abfiltriert und polarographisch bestimmt. Von Woiwod¹⁵) werden die so erhaltenen Kupfer-Lösungen kolorimetrisch mit Natrium-diäthyl-dithiocarbamat bestimmt. Beide Methoden haben ihre Vorteile, trotzdem ist es noch zu früh, zu entscheiden, welche die zuverlässigeren und praktischeren sein wird für die quantitative Bestimmung der Aminosäuren nach der Elution aus Papierchromatogrammen.

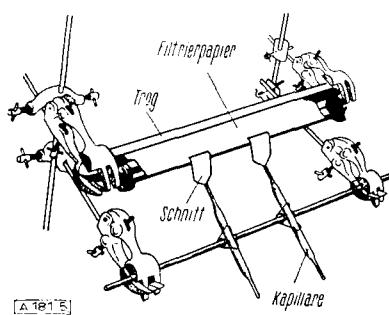


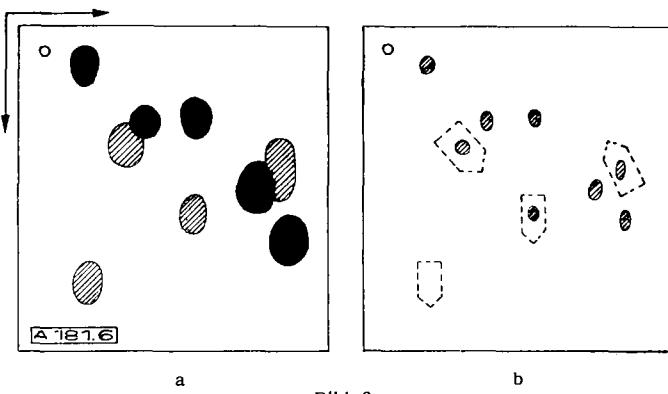
Bild 5

Anordnung zum Überführen von Substanzen aus Chromatogrammausschnitten (nach Bild 4 u. 6) in Kapillaren.
tischere sein wird für die quantitative Bestimmung der Aminosäuren nach der Elution aus Papierchromatogrammen.

¹³) Biochemic. J. 33, 1070 [1939].

¹⁴) Ebenda, 43, 353 [1948].

¹⁵) Nature [London] 161, 169 [1948].



a

b

Bild 6
Untersuchung des zweidimensionalen Chromatogramms eines Eiweißhydrolysat

a und b stellen übereinstimmende Papierchromatogramme derselben Substanz dar. Die Probelösung wurde auf die offenen Kreise aufgetropft; die Pfeile deuten die Richtung der Entwicklung des Chromatogrammes in zwei Lösungsmitteln an. Im Testchromatogramm a sind Aminosäuren durch schwarze, Peptide durch schraffierte Flecken angedeutet. Nach Besprühen mit sehr verdünnter Ninhydrin-Lösung zeigt das Duplikat b schwache, z. T. kaum sichtbare Flecken, die entlang den gestrichelten Linien ausgeschnitten werden

Eingeg. am 10. Nov. 1948.

[A 181]

Gasanalyse mit dem Massenspektrometer

Von Dr. habil. H. NEUERT, Weil/Rhein

Zunächst speziell zur Messung relativer Häufigkeiten von Isotopen ein und desselben Elementes¹⁾ konstruiert, ist das Massenspektrometer besonders in USA während des Krieges für gasanalytische Zwecke entwickelt worden^{2).} Bisher wurden vor allem Kohlenwasserstoffe³⁾ und Kunststoffe analysiert (z. B. Flugbenzin, synthetischer Kautschuk). Man kann weiterhin Aufschlüsse über Ionisation, Elektronenstoß-Dissoziation, thermische Dissoziation und Kracken von Kohlenwasserstoffen erhalten.

A. Einführung in die physikalischen Grundlagen des Meßverfahrens.
B. Technische Ausführung des Massenspektrometers.
C. Das Massenspektrum.

D. Zur technischen Weiterentwicklung der Massenspektrometer.
E. Anwendungsbiete.
F. Bildung metastabiler Ionen durch Elektronenstoß.

A. Einführung in die physikalischen Grundlagen des Meßverfahrens

Die dem Meßverfahren zugrunde liegenden physikalischen Vorgänge sind im Prinzip einfach. Ein meist sehr schwacher Strom des zu analysierenden Gases durchfließt eine zunächst unter Hochvakuum befindliche Röhre. Das eine Ende der Röhre enthält die Ionenquelle. In ihr wird das eintretende Gas zunächst durch einen Strahl künstlich erzeugter Elektronen möglichst definierter Energie ionisiert. Die gebildeten Ionen erhalten dann durch geeignete elektrische Felder praktisch die gleiche Energie und verlassen die Ionenquelle durch eine enge Blende in Richtung der Rohrachse. Dieser Ionenstrahl tritt nun in ein senkrecht zur Vakuumröhre stehendes Magnetfeld ein, in dem die vorwiegend einfach elektrisch geladenen Ionen aus ihrer ursprünglich geradlinigen Bahn auf Kreisbahnen abgelenkt werden. Die Krümmung ist dabei abhängig von der Masse, der elektrischen Ladung und der Geschwindigkeit der Ionen:

$$(1) \quad r^2 = \frac{m}{e} \cdot V c^2 / 150 \text{ Hz}$$

r = Radius in cm
m = Masse in g
e = Ladung in el. stat. Einh.
V = Spannung in Volt
c = Lichtgeschwindigkeit
H = Magnetfeldstärke in Gauß.

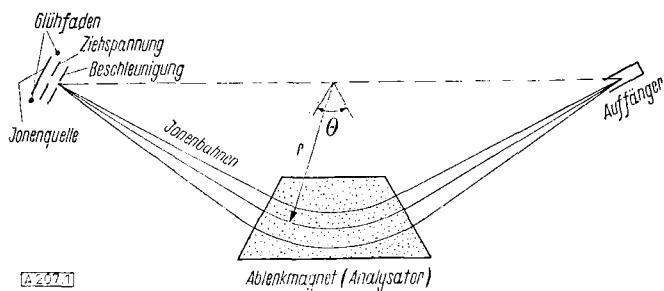


Bild 1

Schematische Darstellung der Ionenbahnen in einem Massenspektrometer

Da man von vornherein dafür sorgte, daß die Ionen gleiche Energie besitzen, ist die Ablenkung im Magnetfeld nach obiger Gleichung nur noch vom Verhältnis m/e und von H abhängig.

¹⁾ E. B. Jordan u. L. B. Young, J. appl. Physics 13, 526 [1942].

²⁾ J. A. Hippel, ebenda 13, 551 [1942].

³⁾ H. W. Washburn, H. F. Wiley, S. M. Rock u. C. E. Berry, Ind. Engng. Chem., analyt. Edit. 17, 74 [1945].

Ein aus mehreren Moleköl- oder Atomsorten (genauer m/e-Sorten) bestehender Ionenstrahl wird daher in einem solchen Magnetfeld in die einzelnen Ionensorten zerlegt, die das Magnetfeld dann getrennt verlassen und wieder geradlinig weiterfliegen. Dabei ist das Magnetfeld auf der Eintritts- wie auf der Austrittsseite durch eine senkrecht zur Rohrachse stehende Fläche begrenzt. Am anderen Ende der Vakuumröhre befindet sich ein Auffänger für die Ionen, dessen Eintrittsblende so eng gewählt wird, daß bei einem bestimmten Magnetfeld nur eine bestimmte Ionensorte mit genau gleichem m/e in diesen eintreten können. Man erreicht nun bei fester Ionenenergie durch Veränderung der Magnetfeldstärke, oder bei konstanter Magnetfeldstärke durch Veränderung der Ionenenergie, daß nacheinander alle vorhandenen Ionensorten in den Auffänger gelangen. Nimmt man zunächst einmal an, daß in der Ionenquelle alle ursprünglich vorhandenen Moleköl- bzw. Atomsorten mit gleicher Wahrscheinlichkeit ionisiert werden, dann ist der im Auffänger gemessene Ionenstrom ein direktes Maß für die Häufigkeit der gemessenen m/e-Sorte.

Da eine sehr geradlinige Ausblendung des die Ionenquelle verlassenden Ionenstrahls eine unerwünschte Herabsetzung der Strahlintensität zur Folge hätte, läßt man eine leichte Divergenz des Strahls zu. Die Theorie des Massenspektrometers zeigt nun, daß das analysierende Magnetfeld gleichzeitig auch die Rolle einer Zylinderlinse der Strahlenoptik übernimmt, d. h. daß die nun unter etwas verschiedenen Winkeln, aber immer noch fast senkrecht in das Magnetfeld eintretenden Strahlen dort für gleiche m/e auch eine Fokussierung erfahren. Und zwar treffen die Ionen der m/e-Sorte, die das Magnetfeld dann wieder ungefähr senkrecht zur Magnetfeldbegrenzungsfläche verlassen, schließlich in einem Punkt zusammen. Der Entstehungsort der Ionen, der Krümmungsmittelpunkt der Bahnen im Magnetfeld und der Fokussierungspunkt liegen auf einer Geraden. Die Vakuumröhre des Massenspektrometers ist aber gerade so gekrümmt, daß seine Achse ungefähr die Richtung der praktisch senkrecht in das Magnetfeld eintretenden und auch senkrecht aus diesem austretenden m/e-Sorte hat. Dadurch ist r in der obigen Gleichung festgelegt. Der Auffänger wird zweckmäßig im Fokus angebracht. Trotz der so erreichten Intensitätssteigerung sind die gemessenen Ionenströme noch immer sehr schwach (10^{-10} bis 10^{-15} Amp.).