

Kohlensäure entsprechend gekühlt. Der für die Untersuchung verwendete Tetrachlorkohlenstoff hatte etwa 50 Tage ruhig im Regal gestanden und wurde vorsichtig zwecks weitgehender Verhinderung einer Luftaufnahme in ein Vorkühlgefäß gegossen und danach in die Meßzelle gefüllt. Hierauf wurde so lange gewartet, bis sich die Dielektrizitätskonstante nicht mehr änderte, demnach zwischen Zelle und Kühlbecher kein Temperaturgefälle mehr vorhanden war. Danach wurde die Dielektrizitätskonstante ermittelt, 2 min beschalt und sofort wieder gemessen. Die durch Ultraschall-Absorption im Tetrachlorkohlenstoff bewirkte, wenn auch geringfügige Erwärmung rief einen kleinen Gang der Dielektrizitätskonstanten hervor, der ca. 5 min nach der Beschallung beendet war. Der nach dieser Zeit gemessene Wert änderte sich nicht mehr. Mehrfach wiederholte Beschallungen bewirkten keine Änderung der Dielektrizitätskonstanten, ein Zeichen, daß die Dauer der ersten Beschallung für eine weitgehende Entgasung ausreichte. Dieser Befund deckt sich auch mit Entgasungs-Beobachtungen. Im allgem. genügt bereits 1 min Ultraschall-Einwirkung bei mäßiger Intensität, um eine weitreichende Gasaustreibung zu erzielen.

Die Dielektrizitätskonstante des Tetrachlorkohlenstoffs änderte sich durch die Entgasung um $+2,27 \cdot 10^{-3}$, ein bemerkenswerter Betrag, der zeigt, daß dann, wenn die Gasphase unberücksichtigt bleibt, beträchtliche Fehler bei dielektrometrischen Bestimmungen die Folge sein können.

Bei Anwendung von Ultraschall als Entgasungsmittel muß berücksichtigt werden, daß u. U. nicht unbedenklich beliebige Ultraschall-Energien bei mehrphasigen Systemen angewandt werden dürfen. Während es scheint, daß viele reine Kohlenwasserstoffe – vor allem dipolfreie – von Ultraschall beliebiger Intensität überhaupt nicht tangiert werden, tritt bei Wasser oberhalb des

Kavitations-Schwellwertes Abspaltung von Sauerstoff durch Glimmelektrolyse⁵⁾ ein. Die Glimmentladung wird durch die hohen Wandbeladungen, die infolge Abhebelektrizität (Lenard-Effekt) in den Gaskügelchen entstehen, bewirkt. Der Kavitations-Schwellwert liegt bei einer bereits recht hohen Schallintensität. Besonders zu beachten ist, daß bei Anwesenheit von Spuren von Kohlenwasserstoffen in Wasser durch Ultraschall chemische Wirkungen bei Intensitäten, die weit unter dem Kavitations-Schwellwert liegen, zustande kommen können. Wie *Haut, Studt und Rust*⁶⁾ in anderem Zusammenhang festgestellt haben, findet bei Anwesenheit von Spuren von Tetrachlorkohlenstoff sowie von anderen aliphatischen Polyhalogeniden in Wasser schon bei sehr kleinen Ultraschall-Intensitäten Halogenabgabe statt. Wie schon erwähnt, reichen selbst sehr große Intensitäten nicht aus, um reinen Tetrachlorkohlenstoff irgendwie chemisch zu beeinflussen. Der Wirkungsmechanismus könnte im vorbeschriebenen Falle darin begründet sein, daß sich Tetrachlorkohlenstoffmolekeln-Aggregate, etwa in Form von Solvaten, in Wasser bilden, von denen einige Eigenfrequenzen besitzen, die mit der Ultraschall-Frequenz übereinstimmen. Es sind dann Wahrscheinlichkeiten dafür, daß in den Aggregaten Moleküle zerbrechen, denkbar.

Es empfiehlt sich daher, bei der Präzisions-Dielektrometric mehrphasiger, flüssiger Systeme zu prüfen, ob durch die gegebenenfalls angewendete Ultraschall-Gasaustreibung eine chemische Umsetzung im System zustande kommt. Bei den aromatischen Polyhalogeniden z. B. wurde eine chemische Veränderung im vorbeschriebenen Sinne nicht beobachtet⁶⁾.

Eingeg. am 15. August 1950

[A 297]

⁵⁾ A. Klemenc u. T. Kantor, Z. phys. Chemie B 27, 359 [1934].

⁶⁾ R. Haut, H. J. Studt u. H. H. Rust, diese Ztschr. 62, 186 [1950].

Über die Trennung von Enzymgemischen durch Elektrophorese in Filtrierpapier

Von Doz. Dr. K. WALLENFELS und Dr. E. v. PECHMANN

Aus dem biochemicalen Laboratorium Tutzing der C. F. Boehringer & Soehne, G. m. b. H., Mannheim-Waldhof

Nach elektrophoretischer Trennung von Extrakt aus Pilzkulturen gelingt es Amylase, Proteinase, Lipase und Phosphatase getrennt nachzuweisen.

Der wäßrige Extrakt aus einer Pilzkultur, wie sie für die Herstellung technischer Enzympräparate nach Art der Takadiastase oder von therapeutisch anwendbaren Fermentpräparaten benutzt wird, stellt ein Gemisch zahlreicher Fermente dar, welches nur mit großen Schwierigkeiten in die einzelnen Komponenten zu trennen ist. Es gelingt weder durch fraktionierte Alkohol- oder Aceton-Fällung noch durch Ammonsulfat-Fraktionierung Präparate zu erhalten, in welchen einzelne Wirkungen fehlen oder auch nur erheblich vermindert bzw. vermehrt sind. Wir führen dieses Verhalten darauf zurück, daß in diesen Extrakten die verschiedenen Fermente nicht frei vorliegen, sondern in einer an gewisse Kolloide der zerfallenen Zellen gebundenen Form. Durch die genannten Fällungsmittel werden die Fermente in einem an die Kolloide adsorbierten Zustand zusammen mit diesen niedergeschlagen.

Unterwirft man nun einen Extrakt aus geeigneten Pilzkulturen der Elektrophorese, so gelingt es, die Gemische in einzelne Komponenten aufzutrennen und Amylase, Proteinase, Lipase und Phosphatase getrennt nachzuweisen. Wir haben zu diesem Zweck die einfache Anordnung der Elektrophorese in Filtrierpapier nach *Th. Wieland* und *E. Fischer*¹⁾ benutzt.

Beschreibung der Versuche

Elektrophorese:

Auf einen Streifen Filtrierpapier Whatman No. 4 von 10 cm Breite und 40 cm Länge werden entlang einem in der Mitte gezogenen Bleistiftstrich 25 mm³ Fermentlösung gleichmäßig aufgetragen derart, daß ein gleich breiter Streifen von etwa 3 mm Breite quer zur Streifenrichtung entsteht. Das Papier wird dann mittels

eines Fixativzerstübers vorsichtig mit Pufferlösung von p_H 6.8 besprüht, so daß es gleichmäßig angefeuchtet ist, ohne daß die aufgebrachte Fermentlösung zerfließt. Man spannt das Papier so dann in eine feuchte Kammer von den Ausmaßen 150×150 mm taucht die herausstehenden Papierenden in je eine Petrischale mit Pufferlösung (Phosphatpuffer, p_H 6.8, m/30) und legt durch Eintauchen zweier mit einem Diaphragma verschlossenen Rohre, in welchem sich Pufferlösung und Kohleelektroden befinden, eine Gleichspannung von ca. 120 Volt an. Unter diesen Verhältnissen beträgt der Stromdurchgang etwa 3 mA. Nach 12 h wird das Papier aus der Kammer genommen, und die nassen Enden werden mit Filtrierpapier abgetrocknet.

Nachweis der Fermente auf dem Papier:

Das vorsichtig abgetrocknete Papier wird in der Längsrichtung in Streifen von 2 cm Breite zerschnitten. Nach der Markierung der Polrichtung wird je 1 Streifen für den Nachweis eines Fermentes benutzt.

Nachweis der Proteinase: Ein Filmstreifen von 150 mm Länge (unentwickelter Kinofilm) wird mit einer Phosphatpufferlösung von p_H 6.8 befeuchtet, so daß die Gelatineschicht aufquillt. Dann wird einer der Filtrierpapierstreifen auf die Gelatineschicht aufgelegt und ebenfalls mit m/15 Phosphatpuffer durch Besprühen befeuchtet. Der Film mit dem Filtrierpapier wird nun in die Elektrophoresekammer eingespannt und diese in einen Brutschrank von 30° gelegt. Gegebenenfalls muß man nach kurzer Zeit das Filtrierpapier nochmals mit Pufferlösung anfeuchten. Je nach der Aktivität des Fermentes beobachtet man nach 20–60 min, daß das Papier an einer Stelle eine größere Feuchtigkeit aufweist, weil hier die Gelatineschicht des Films

¹⁾ Naturwiss. 35, 29 [1948].

verflüssigt wurde. Zieht man nun den Papierstreifen ab, so löst sich an dieser Stelle die ganze Gelatine vom Film und dieser wird hier durchsichtig (s. Bild 1).

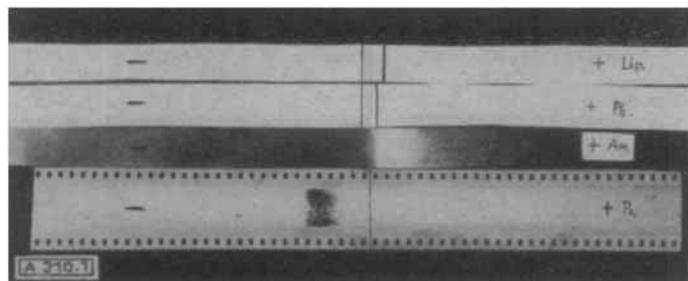


Bild 1

Nachweis der Amylase: Ein anderer Streifen wird mit 2proz. Stärkelösung vorsichtig besprüht und in einen mit Feuchtigkeit gesättigten Kasten der Temperatur 40–50° eingehängt. Besprüht man nach 15–30 min das Papier nun mit m/50 Jod-Lösung, so beobachtet man, daß die Jod-Stärke-Reaktion in einem etwa 12–15 mm breiten Bereich ausbleibt, in welchem offenbar die Stärke durch das im Papier befindliche Enzym abgebaut wurde (s. Bild 1).

Nachweis der Lipase: Als Substrat für die Lipase benützten wir eine 1proz. methanolische Lösung von p-Nitrophenylstearat²⁾. Die Substratlösung wird aufgesprüht, das Lösungsmittel läßt man verdunsten, dann wird der Streifen in den feuchten Kasten von 40° gehängt. Nach kurzer Zeit zeigt sich bereits die Lage der Lipase im Papier durch einen stark gelb gefärbten schmalen Streifen an. Die Intensität der Färbung verstärkt sich, wenn man das Papier über eine geöffnete Ammoniakflasche hält.

Nachweis der Phosphatase: Zur Sichtbarmachung der Phosphatase-Wirkung benützten wir eine 1proz. wäßrige Lösung von Phenolphthaleinphosphat³⁾. Die Methodik entspricht der für Lipase und Amylase angewandten.

²⁾ E. v. Pechmann, unveröffentlicht.

³⁾ Ch. Huggins u. P. Talalay, J. biol. Chemistry 159, 399 [1945].

Ergebnis

Bei Anlegung der Spannung von ca. 120 Volt wandert die Proteinase in 12 h bei einem m/30 Phosphatpuffer von p_H 6.8 etwa 23 mm zum negativen Pol hin, während sich die Amylase etwa 10 mm zum positiven Pol bewegt. Lipase und Phosphatase bewegen sich nur sehr wenig im elektrischen Feld, auch wenn man andere Puffer von anderem p_H -Wert anwendet. Sie werden, wie Versuche zur Papierchromatographie der Fermente gezeigt haben, sehr fest adsorbiert. Immerhin zeigt die Lipase bei p_H 6.8 eine geringe Verschiebung zum positiven Pol, während die Phosphatase nur im selben Bereich nachweisbar ist, in welchem das Gemisch vor der Elektrophorese aufgetragen wurde. Bezeichnet man auf dem Papier die Bereiche, in welchen sich in den einzelnen Streifen die Fermente nachweisen ließen, so erhält man eine Verteilung wie es Bild 2b darstellt, während 2a die Position des Gemisches vor der Elektrophorese illustriert.

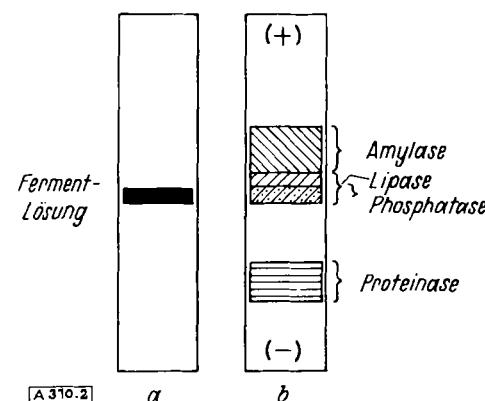


Bild 2

Wir sind damit beschäftigt, diese Auf trennung der Enzymgemische durch geeignete Anordnung auch präparativ auszunützen.

Eingeg. am 15. November 1950 [A 310]

Analytisch-technische Untersuchungen

Beiträge zur Bromometrie

Von Prof. Dr.-Ing. J. D'ANS und Dipl.-Ing. J. MATTNER, Berlin
Anorg.-chemisches Institut der Techn. Universität Berlin-Charlottenburg

Bei systematischer Nacharbeitung der bromometrischen Titrationsmethoden wurde eine brauchbare Apparatur zur Vermeidung von Bromverlusten durch Verdampfung entwickelt. Ferner wurde die Bromtitration mit Thiosulfat untersucht, eine jodometrische Endpunktsbestimmung bromometrischer Titrationen ausgearbeitet und u. a. die Titration von Rhodanid ausgebaut.

Die bromometrischen Analysenmethoden werden wenig in den einschlägigen Lehrbüchern¹⁾ behandelt, obwohl es an genügend Anwendungsbeispielen in der Originalliteratur²⁾ nicht mangelt. Meist wird die Titration oxydierbarer Substanzen mit einer Brom-Lösung oder einer angesäuerten Bromid-Bromat-Lösung beschrieben. In anderen Fällen ist auch die Verwendung von Bromat-Lösung allein zweckmäßig. Weniger bekannt ist die Bestimmung starker Oxydationsmittel mit Bromwasserstoff als Reduktionsmittel, analog der Verwendung des Kaliumjodids in der Jodometrie.

Zur Rücktitration des ausgeschiedenen oder überschüssigen Broms dient meist arsenige Säure; auch Thiosulfat ist vorgeschlagen worden. Als Indikator werden durch Brom zerstörbare Farbstoffe angewandt, wie Methylorange, Methylrot, Indigokarmin usw.

Das Oxydationspotential des Broms ist höher als das des Jods, so daß der Anwendungsbereich von Brom gegenüber Jod-Lösung erweitert ist. In seinem Reduktionspotential ist der Bromwasser-

stoff dagegen dem Jodwasserstoff wesentlich unterlegen. Die Anzahl der Oxydationsmittel, die bromometrisch zu titrieren sind, ist daher kleiner als die Zahl der jodometrisch bestimmmbaren.

Apparatur zur Vermeidung von Brom-Verlusten durch Verdampfung

Der hohe Dampfdruck von Brom-Lösungen beeinträchtigt die Genauigkeit der Titrationen sehr. Den Angaben der Originalliteratur kann man entnehmen, daß die Autoren dieses Fehlers nicht ganz Herr geworden sind. So erhielten z. B. C. del Fresno und L. Valdes³⁾ bei der potentiometrischen Titration von Brom-Lösung mit Thiosulfat trotz scharfen Potentialsprunges etwa um 8% zu niedrige Werte. Durch Zusatz von viel Alkalibromid – man muß nach D'Ans und Höfer⁴⁾ die Lösungen etwa 2n an Bromid machen – wird der Dampfdruck des Broms wesentlich erniedrigt. Diese Senkung der Brom-Tension genügt aber noch nicht für höhere Genauigkeitsansprüche, denn Fehler von 1% der Menge sind so kaum zu vermeiden. Die im folgenden beschriebene einfache Apparatur verhindert jeglichen Brom-Verlust.

¹⁾ Z. B. R. Fresenius, G. Jander, Handb. d. analyt. Chemie; Berl-Lunge, Chemisch-techn. Untersuchungsmethoden I, 373 [1931]; II, 112 [1932]; Jander-Jahr, 1931, 1, 98–102.

²⁾ Z. B. Manchot-Oberhauser, Z. anorg. Chem. 130, 161–67 [1923]; Chem. Zbl. 1924, I, 938 und später: Tomaki-Nakazono, Sci. Rep. Tōhoku Imp. Univ. Ser. I, 26, 743–48 [1938]; Chem. Zbl. 1938, II, 3123; Cernatescu-Ralea, Ann. sci. Univ. Jassy 20, 118–128 [1934].

³⁾ C. del Fresno u. L. Valdes, An. Soc. españ. Fisica. Quim. 34, 813–17 [1936].
⁴⁾ D'Ans u. Höfer, diese Ztschr. 47, 71 [1934].