

Chromatographie an Carboxyl-Papier

Von THEODOR WIELAND und A. BERG¹⁾

Aus dem Organisch-Chemischen Institut der Universität Mainz

Chromatographische Untersuchungen mit Filtrierpapieren mit einem Carboxyl-Gehalt von 1 bis 4% gaben sowohl bei Aminosäuren als auch bei Aminen und anorganischen Ionen aussichtsreiche Ergebnisse.

Nach E. C. Yackel und O. Kenyon²⁾ läßt sich ein Teil der Glucose-Reste der Cellulose mit Distickstofftetroxyd zu Uronsäuren oxydieren. Die Makromolekel erhält dadurch den Charakter einer polyvalenten Carbonsäure, die als Kationenaustauscher reagieren kann³⁾. Wird die Oxydation über einen Gehalt von 5% COOH (etwa jeder 5. Glukan-Baustein am Kohlenstoff 6 oxydiert) hinausgetrieben, so resultieren Präparate, die schon bei einem p_H von 8–9 als Alkalisalze in Wasser löslich sind und sich deshalb nur im saueren Gebiet zur Chromatographie eignen. In Zusammenarbeit mit der Zellstoff-Fabrik Waldhof wurden deshalb Filtrierpapiere entwickelt, deren Carboxyl-Gehalt 1–4% betrug. Die vergleichende Carboxyl-Bestimmung geschah durch Titration der von 0,3–0,5 g Papier aus 50 cm² einer wäßrigen 4proz. Calciumacetat-Lösung nach 30 min in Freiheit gesetzten Essigsäure⁴⁾. Auf solchen Papierbogen konnten einige Substanzgemische erfolgreich chromatographisch getrennt werden.

Aminosäuren

Im Wasser als Lösungsmittel bleiben die basischen Aminosäuren fast völlig am Auftragungspunkt zurück, während die neutralen und sauren mit der Lösungsmittelfront wandern. Verwendet man an Stelle von Wasser wäßrige Pufferlösungen von p_H 8 oder basische, so wandern auch hierbei die sauren und neutralen mit $R_f \sim 1$, aber die basischen setzen sich mit verschiedener Geschwindigkeit in Bewegung. Dabei zeigt Histidin als schwächst-basische Aminosäure (p_I 7,59) den größten, Lysin (p_I 9,74) den mittleren und Arginin (p_I 10,76) den kleinsten R_f -Wert. In Bild 1 sind diese Werte bei Verwendung von m/20 Ammoniumformiat als Entwicklungsflüssigkeit am 1% COOH-haltigen Papier für die drei Aminosäuren in Abhängigkeit von p_H dargestellt.

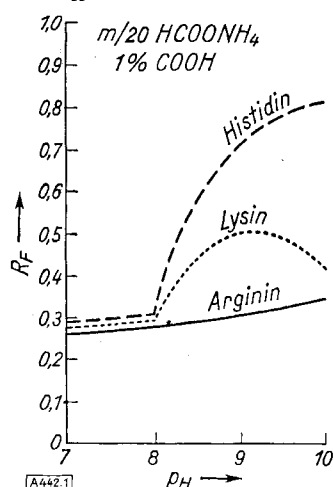


Bild 1. Abhängigkeit der R_f -Werte vom p_H

Wie man sieht, erweist sich das p_H von 9 als optimal zur Trennung. Außer vom p_H werden die R_f -Werte, wie das beim Vorliegen eines Ionenaustauschmechanismus nicht

¹⁾ Teil der Dissert. A. Berg, Mainz, 1952.

²⁾ J. Amer. Chem. Soc. 64, 121 [1942]; U.S.-Pat. 2232990, vom 25. 2. 1941.

³⁾ G. F. Davidson, J. Text.-Inst. 39, 187 [1948]; 41, 361 [1950].

⁴⁾ M. Lüdke, Biochem. Z. 269, 372 [1934].

anders zu erwarten ist, von der Ionenstärke des Puffers und dem Gehalt des Papiers an austauschenden Gruppen beeinflusst. In Bild 2 ist diese Abhängigkeit des R_f -Wertes beim Arginin von der Konzentration des Puffers und dem Carboxyl-Gehalt des Papiers aufgezeichnet.

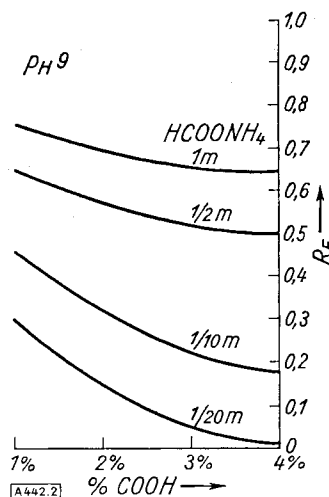


Bild 2

R_f -Wert des Arginins in Abhängigkeit vom COOH-Gehalt des Papiers und der Molarität des Puffers (Ammoniumformiat, p_H 9)

Für die Praxis eignet sich als Entwicklungsflüssigkeit am besten eine m/20 Ammoniumformiat-Lösung vom p_H 9. Ein damit aufsteigend ausgeführtes Papierchromatogramm der basischen Aminosäuren im Vergleich mit Asparaginsäure und Leucin auf 1%-COOH-haltigem Papier ist nach Sichtbarmachen der Flecken mit Ninhydrin in Bild 3 wiedergegeben.

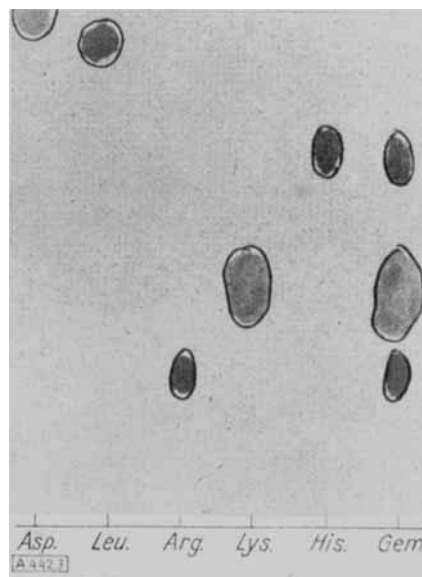


Bild 3

Papierchromatogramm verschiedener Aminosäuren auf 1% COOH-haltigem Papier mit Ammoniumformiat-Lösung (m/20, p_H 9) als Entwicklungsflüssigkeit

Zum Beweis dafür, daß die Trennung auf einer Wirkung von Carboxyl-Gruppen beruht, haben wir das Papier einige Stunden mit Diazomethan in Äther behandelt, wonach die Carboxyl-Bestimmung negativ ausfiel und alle Aminosäuren sich mit der unregelmäßig wandernden Flüssigkeitsfront fortbewegten.

Amine

Die papierchromatographische Trennung von Aminen ist auf Carboxyl-Papier ebenfalls möglich. Wie in einigen orientierenden Versuchen festgestellt wurde, läßt sich Cysteamin vom Histamin glatt in der bei den basischen Aminosäuren bewährten Salzlösung vom gleichen p_H abtrennen. Histamin zeigte hierbei R_f 0,16, Cysteamin R_f 0,45. Auch die Trennung einiger Alkaloide aus Calabassen-Curare konnte ähnlich ausgeführt werden.

Anorganische Ionen

Auch hier wurden nur eine Reihe orientierender Versuche ausgeführt, die die prinzipielle Anwendbarkeit des Carboxyl-Papiers zeigen. Wie aus Bild 4 ersichtlich, lassen sich z. B. Blei, Wismut und Quecksilber in m/10 Ammoniumacetat-Lösung von p_H 3 auf 1%-COOH-haltigem Papier scharf trennen. Das entwickelte, noch feuchte Chromatogramm wurde in eine Atmosphäre von H_2S gebracht. Silber hat sich bei dieser Pufferkonzentration vom Blei schlecht getrennt, kann jedoch im m/20 Puffer vom gleichen p_H vom Blei abgetrennt werden, das dann fast am Ausgangspunkt zurückbleibt. Ein zweidimensionales Vorgehen führt also hier leicht zum Ziel. Auch die Trennung von Arsen, Antimon und Zinn ist bei p_H 5 mit m/20 Ammoniumacetat-Lösung gut möglich, worin Antimon als Antimonyl-Ion nahe dem Startpunkt bleibt und Arsen als Arseniat etwa mit R_f 0,8, Zinn als Zinn(II)-Ion mit $R_f \sim 1$ wandern. Die systematische Durchprüfung weiterer Puffer- oder Salzlösungen, u. U. unter Zuhilfenahme komplexbildender Komponenten wird sicherlich weitere Anwendungsmöglichkeiten des Carboxyl-Papiers bringen.

Die Übertragung der Befunde von Davidson (loc. cit.) bei synthetischen Farbstoffen läßt auch am Carboxyl-Papier bei dieser Stoffklasse gewisse Erfolge erwarten. Ebenso erscheint seine Verwendung für die Trennung von

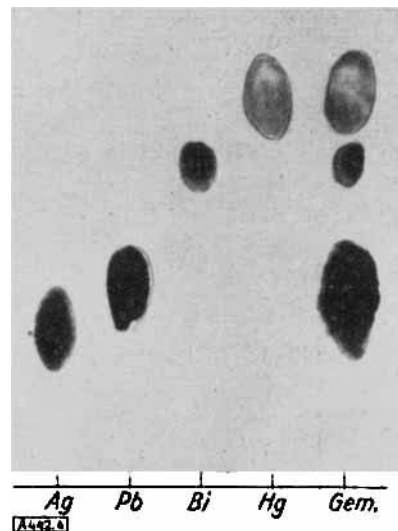


Bild 4
Papierchromatogramm einiger Kationen auf 1% COOH-haltigem Papier mit Ammoniumacetat-Lösung (m/10, p_H 3) entwickelt und mit H_2S sichtbar gemacht

Peptiden mit verschiedenem Gehalt an basischen Aminosäuren aussichtsreich. Neben der Erleichterung gewisser analytischer Aufgaben liegt der Wert des neuen Papiers in der einfachen Ausführung von Vorproben, da eine Übertragung solcher Ergebnisse auf die präparative Chromatographie am Pulver aus demselben Material möglich ist.

Eingeg. am 5. Juli 1952 [A 442]

Zuschriften

Kristallisation von Diphosphopyridinnucleotid (Cozymase)

Von Priv.-Doz. Dr. KURT WALLENFELS
und WALTER CHRISTIAN

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

Die Reinigung roher Cozymase-Präparate zu solchen hohen Reinheitsgraden, wie sie für gewisse enzymchemische Untersuchungen benötigt werden, ist eine mühsame und langwierige Laboratoriumsarbeit, bei welcher man von der fraktionierten Fällung als Metallsalz, der Adsorption an Aktivkohle¹⁾, der Gegenstromverteilung²⁾, der fraktionierten Elution aus Ionenaustauschern^{3, 4)} bzw. von der Kombination mehrerer derartiger Schritte Gebrauch macht. Die Reinheitsbestimmung der so erhaltenen Präparate beruht auf der Bestimmung des Extinktionskoeffizienten der hydrierten Verbindung (DPN red) bei der Wellenlänge 340 m μ , den man nach Reduktion mit Natriumdithionit oder einem geeigneten Enzym in Gegenwart eines entsprechenden Wasserstoff-Donators messen kann. Der diesen Bestimmungen zugrunde liegende Extinktionskoeffizient ϵ von reinem DPN red wird von verschiedenen Autoren verschieden hoch angegeben und schwankt zwischen 6.3 und 9.4 cm²/mg⁵⁾. Diese Differenzen beruhen offenbar darauf, daß alle benutzten Cozymase-Präparate amorph waren, so daß sich der wahre ϵ -Wert bisher noch nicht sicher festlegen ließ.

Durch Anwendung geeigneter Bedingungen⁶⁾ ist es uns gelungen, aus einem 75 %igen DPN des Handels⁷⁾ den Wirkstoff als kristallisiertes Chininsalz nahezu quantitativ abzuscheiden. Hierbei bleiben das überschüssige Chinin, die das DPN hartnäckig begleitenden anderen Nukleotide und etwa 10 % der DPN-Aktivität in der Mutterlauge zurück.

Das Chininsalz des DPN kristallisiert in feinen, meist zu fächer- und kugelförmigen Büscheln angeordneten Nadeln (Bild 1). Es weist einen DPN-Gehalt von 57.0 %, entsprechend einem DPN : Chinin-Verhältnis von 2 : 3, auf und schmilzt zwischen 162 und 170° C unter Zersetzung.



Bild 1
Chininsalz des DPN

¹⁾ G. A. LePage, J. biol. Chemistry 168, 623 [1947]; Biochemical Preparations, New York, 1949 S. 28.

²⁾ G. H. Hogeboom u. G. T. Barry, J. biol. Chemistry 176, 935 [1948].

³⁾ J. B. Neilands u. Ake Akeson, ebenda 188, 307 [1951].

⁴⁾ K. Wallenfels u. W. Christian, unveröffentlicht.

⁵⁾ F. Schlenk, in Sumner-Myrbäck: The Enzymes, Vol. II, Part 1 New York 1951, S. 263.

⁶⁾ Die ausführliche Beschreibung erfolgt a. a. O.

⁷⁾ Präparat der Fa. C. F. Boehringer & Soehne G. m. b. H., Mannheim-Waldhof.