

Neuere Anwendungen der Hochspannungselektrophorese

Von Prof. Dr. TH. WIELAND und Dr. G. PFLEIDERER

Aus dem Institut für Organische Chemie und seiner Biochemischen Abteilung, Universität Frankfurt/M.

Die im hiesigen Institut entwickelte Apparatur zur gekühlten Hochspannungselektrophorese hat sich seit 1955 bei der analytischen und mikropräparativen Trennung verschiedener organischer Substanzen (Aminosäuren, Peptiden, Phenolen, Phosphorsäure-Derivaten, Enzymen u. a.) weiterhin als sehr nützlich erwiesen. Es wird über neue Anwendungen, methodische Einzelheiten und Fehlermöglichkeiten beim Gebrauch des Apparates berichtet.

1955 berichteten wir über eine Anordnung zur Trägerelektrophorese, die als Vorteile gegenüber der 1948 von uns zuerst beschriebenen „feuchten Kammer“¹⁾ das Arbeiten mit höheren Spannungen ($50\text{--}60 \text{ V cm}^{-1}$) auf sehr wirksam gekühlter Glasunterlage und auf 35 cm breiten und ebenso langen Trägerschichten aufweist²⁾. Inzwischen konnten weitere Erfahrungen bei der analytischen und präparativen Trennung an verschiedenartigen Stoffklassen gemacht werden. Man ist heute vielfach noch der Ansicht, die modernen analytischen Trennmethoden, besonders die Trägerelektrophorese, seien die Domäne der biochemischen Fachrichtung. Wenn auch zweifellos gerade dieser Forschungszweig dem neuen Verfahren entscheidende Fortschritte verdankt, so haben wir es bei seiner Anwendung auf rein organisch-chemische Probleme oft als sehr wesentliche Hilfe kennengelernt. Der größere Teil der folgenden Ausführungen befaßt sich wieder mit Papier als Trägermaterial.

Qualität der Filterpapiere

(untersucht v. H. Bodemann u. F. Jaenicke)

Nahezu alle im Handel befindlichen Papiersorten enthalten wasserlösliche Verunreinigungen. Diese scheinen z. T. peptidartiger Natur zu sein³⁾. Eluiert man einen Papierbogen durch kapillaren Abstieg mit Wasser, so hinterbleibt nach dem Verdampfen des Eluats ein amorpher gelber bis brauner Rückstand (bis zu 50 mg pro m^2 !), der nach der für Peptide üblichen Hydrolyse mit Salzsäure im Papierchromatogramm, besser im Papierphrogramm mit

großer Deutlichkeit die Ninhydrin-positiven Banden mehrerer α -Aminosäuren zeigt (Bild 1). In mancher Arbeit scheinen diese Substanzen nicht oder zu wenig beachtet worden zu sein. Da sie recht fest im Papier haften, genügt es nicht, die Bögen durch Spülen zu waschen, sondern man muß wie beim absteigenden Chromatogramm, größere Mengen von Wasser, bis zu 1 l pro $50 \times 50 \text{ cm}$ Bogen, durchsickern lassen, um den Gehalt auf ein Minimum zu reduzieren. Beim Zusatz von 8-Oxychinolin zum Waschwasser werden auch die in mancher Hinsicht störenden Schwermetallionen (vorwiegend Fe^{3+} und Cu^{2+}) entfernt, die sich jedoch in den neuen reinen Papierfabrikaten nur noch in Spuren vorfinden.

Die Kapazität der Papiere ist natürlich von ihrer Dicke abhängig, aber von Substanz zu Substanz sehr verschieden. Für Aminosäuren scheint sie besonders gering zu sein. Auf dem Karton Macherey & Nagel (MN) 827 erhält man z. B. saubere Trennungen, wenn von jeder Aminosäure höchstens 1–2 mg auf 30 cm langer Startlinie aufgetragen sind. Die doppelte Menge führt schon zur Überladung des Papiers und damit zum Ausbleiben der Trennung. Hingegen gelingt es ohne weiteres bei Nucleotiden (z. B. Diphosphopyridinnucleotid, DPN) oder Peptiden insgesamt 200 mg eines nicht zu komplexen Gemisches, d. h. pro Komponente 50–100 mg, darauf zu trennen.

Weitere Fehler, bei denen trotz der Einfachheit der Methodik unbefriedigende Phrogramme erhalten werden können, seien kurz angedeutet. Es sind dies, außer Unreinheiten im Papier

1.) zu starke Kühlung. Dabei kann es vorkommen, daß der puffergetränktes Träger stellenweise oder ganz auf der Kühlplatte festfriert.

2.) Anritzen der Papieroberfläche. Die zum Auftragen der Trennlösung verwendete Kapillare muß an der Spitze rund geschmolzen sein. Ein scharfkantiges Ende reißt besonders beim schweren Aufsetzen längs seiner Bahn kleine Fetzen aus der Papierfaserung, die wie winzige Reservoir für die Substanzen wirken und diese als feine parallele Streifen bei der Wanderung austreten lassen (Bild 2).

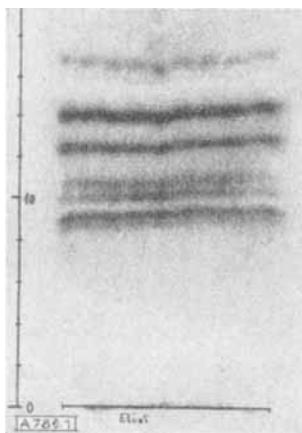


Bild 1

Aminosäuren des Hydrolysats eines Papiereluats; Laufzeit 80 min; 45 V/cm ; $p_{\text{R}} \sim 2$; Papier: Schleicher u. Schüll 2043

¹⁾ Th. Wieland u. E. Fischer, Naturwissenschaften 35, 29 [1948]; diese Ztschr. 60, 313 [1948].

²⁾ Th. Wieland u. G. Pfleiderer, diese Ztschr. 67, 257 [1955].

³⁾ V. Wynn, Nature [London] 164, 445 [1949]; C. S. Hanes, F. R. J. Hird u. F. A. Isherwood, Biochemic. J. 57, 25 [1952].

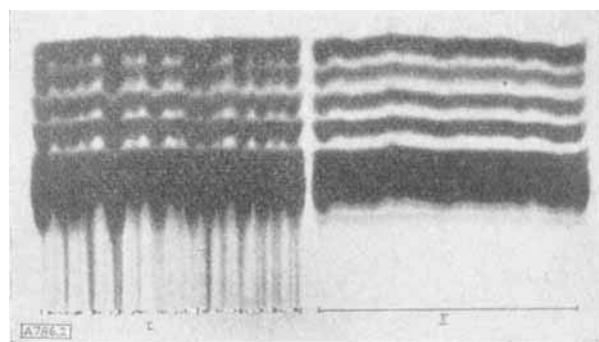


Bild 2
Phrogramme eines Aminosäure-Gemisches, links unsachgemäß aufgetragen

3.) Auftragen fremder Lösungsmittel. Lösungsmittel mit anderen elektrischen Eigenschaften als der verwendete Puffer führen zu einer Verzerrung des elektrischen Felds und damit zur Längsschrumpfung der getrennten Banden (Bild 3).

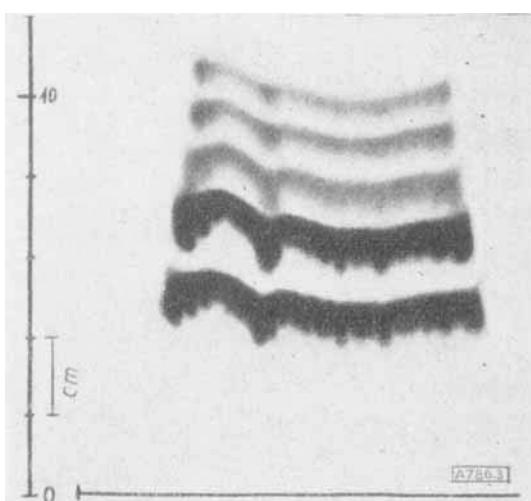


Bild 3

Pherogramm eines Aminosäure-Gemisches, aus methanolischer Lösung aufgetragen, 50 min; 40 V/cm; $p_{\text{H}} \sim 2$

4.) Übermäßige Salzmengen. Wenn auch die Papierelektrophorese als bequeme Entsalzungsmethode für nicht zu große Mengen angewandt werden kann, so machen sich doch übergröÙe Mengen (z. B. mehr als 20 mg Kochsalz im Auftragungsstreifen) störend bemerkbar. Die hierdurch verursachte Abschwächung des elektrischen Felds kann zu einer starken Verlangsamung der Wanderung von Substanzen führen.

5.) Verwendung eines ungeeigneten Puffers. Die von Michl⁴⁾ angegebenen Puffergemische aus Ameisensäure, Essigsäure, Pyridin und Wasser bewähren sich in vielen Fällen. Die große Kühlleistung des Apparates gestattet auch die Verwendung anorganischer Pufferlösungen und starker Elektrolyte. Hierbei ist aber zu beachten, daß ihre Ionen sehr rasch wandern und deshalb das Pufferungsvermögen nur 1–2 h erhalten bleibt. Günstige Eigenschaften hat, auch wegen seines Komplexbildungsvermögens, der Borsäure-Borat-Puffer.

Werden diese Fehler vermieden, so erhält man mit den meisten Papiersorten ausgezeichnete Trennungen. Sehr gut bewähren sich (der Dicke nach geordnet): Whatman 1, Schleicher & Schüll (S. u. S.) 2045a gl, MN 219 (aschefrei) (S. u. S.) 2043b Mgl, MN 214, Kartons MN 827 und 866.

Neuere Anwendungen

Wie jede Trennmethode, kann auch die Hochspannungselektrophorese für analytische oder präparative Zwecke herangezogen werden; es besteht hierzwischen nur ein gradueller Unterschied, da sich aus genügend vielen „analytischen“ Pherogrammen kristallisierbare und analysierbare Mengen reiner Substanzen gewinnen lassen. Von Vorteil ist für präparative Zwecke natürlich ein möglichst dicker Träger hoher Kapazität wie der oben genannte Filterkarton oder eine Schicht aus anderem faserigen, gelartigen oder feinkörnigen Material.

1.) Aminosäuren, Amine und Peptide

An 30 Pherogrammen wurde versucht, die Wanderungsstrecke einzelner Individuen analog dem R_f -Wert im Papierchromatogramm als Charakteristikum festzulegen. Hierzu werteten wir diese Strecken bei den verschiedenen Aminosäuren relativ zum Alanin aus und fanden, daß diese R_{Ala} -Werte (= Wanderungsstrecke einer Amino-

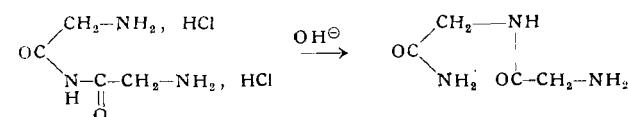
säure von der Startlinie: Wanderungsstrecke des Alanins) mit großer Präzision reproduzierbar sind. Sie betragen im Puffer vom $p_{\text{H}} 1,9$ ⁵⁾ für:

Lysin ..	1,40	Valin	0,82
Histidin	1,29	Leucin	{ 0,77
		Isoleucin	
Arginin	1,27	Methionin	0,72
Glycin	1,15	Glutaminsäure	0,69
Alanin	1,00	Asparaginsäure	0,64
Serin	0,84	Tyrosin	0,55

Die größten Abweichungen vom Mittelwert betragen hierbei nur $\pm 2\%$ unabhängig von der Papiersorte oder davon, ob mehr oder weniger große Konzentrationen an anorganischen Salzen wie Alkalichloriden oder -sulfaten in den Analysenlösungen enthalten sind (H. Bodemann).

Trennung von Hydroxy- und allo-Hydroxyprolin. Für die Analyse dieses Diastereoisomerenpaares gibt es bis heute noch kein befriedigendes Verfahren. Die Trennung gelingt ausgezeichnet durch Papierelektrophorese bei $p_{\text{H}} 1,9$. Bei 50 V/cm wandert in 75 min die normale Verbindung 7,3 cm, die allo-Verbindung aber 8,9 cm zur Kathode (E. Groß, U. Wintermeyer).

Das vor kurzem am hiesigen Institut von H. Mohr⁶⁾ synthetisierte Diglycylimid ist nur als Dihydrochlorid oder in Lösung unterhalb $p_{\text{H}} 4$ beständig. Die Base erleidet eine momentane Umlagerung zum Glycinamid, die sich in kleinen Mengen schwer messend verfolgen läßt:



Zur Stabilitätsprüfung des Salzes ließ man kleine Mengen in Wasser von definiertem p_{H} 20 min bei Zimmertemperatur stehen und analysierte dann durch Papierelektrophorese im sauren Puffer. Hierbei wandert das Kation des Diamins doppelt so weit zur Kathode wie sein Umlagerungsprodukt. Die Analysen ergaben, daß die Substanz bei $p_{\text{H}} 4$ nicht umgelagert wurde, während bei $p_{\text{H}} 5$ ein Drittel, bei $p_{\text{H}} 6$ die Hälfte und bei $p_{\text{H}} 7$ alles ins Dipeptidamid umgewandelt war. Die Abwesenheit von Glycin und Glycinamid in den Ansätzen bewies eindeutig, daß es sich hierbei um eine intramolekulare Umwandlung handelt.

Die scharfe elektrophoretische Trennbarkeit der aliphatischen Amine untereinander⁷⁾ läßt sich natürlich auch mit dem hier verwendeten Gerät analytisch und mikropräparativ ausnützen. So konnten mit H. Peil⁸⁾ einige Umsetzungsprodukte des Diazomethans mit Ammoniak aufgeklärt werden. Die quaternierende Wirkung des Diazomethans auf Salze verschiedener Amine mit anorganischen Säuren, die durch dieses Reagens nicht verestert werden, wird zur Zeit von H. Wiegandt mit Hilfe der leistungsfähigen Analysenmethode eingehend untersucht.

2.) Phenole und Phenolcarbonsäuren

Die elektrophoretische Trennung der einfachen Polypheophole (Hydrochinon, Brenzcatechin, Resorcin und Pyrogallol) wurde auf zweierlei Weise versucht (G. Griss):

a) Man konnte verschiedene Wanderungsgeschwindigkeiten der Substanzen in Borat-Lösung erwarten, da die verschiedenartige Anordnung ihrer Hydroxyl-Gruppen die Bildung mehr oder weniger starker Komplexe verursacht. Die Pherogramme wurden zum Sichtbarmachen

⁴⁾ B. Kickhöfen u. O. Westphal, Z. Naturforsch. 7b, 655 [1953].

⁵⁾ Th. Wieland u. H. Mohr, Liebigs Ann. Chem. 599, 222 [1956].

⁷⁾ R. Weber, Helv. chim. Acta 34, 2031 [1951].

⁸⁾ Th. Wieland u. H. Peil, Chem. Ber. 89, 2408 [1956].

mit 2%iger Eisen(III)-chlorid-Lösung besprüht und ließen deutlich erkennen, daß Brenzcatechin etwas rascher als Pyrogallol zur Anode wandert. Beide setzen sich weit vom Resorcin ab, das sich jedoch im Gegensatz zum Hydrochinon noch anionisch verhält (Bild 4). Phenol konnte

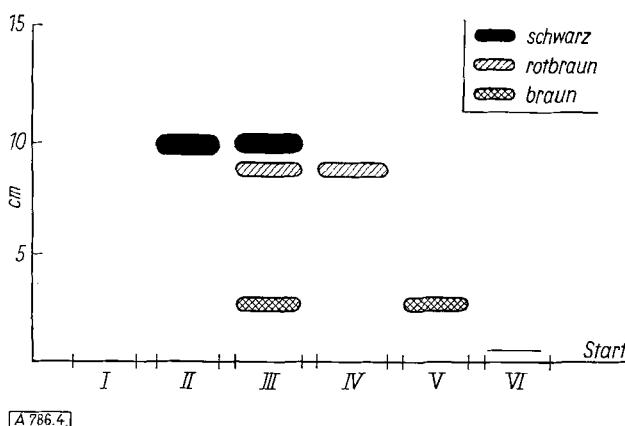


Bild 4

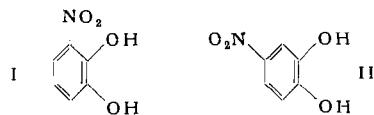
Pherogramm einfacher Phenole. I = Phenol; II = Brenzcatechin; III = Gemisch von Phenol, Brenzcatechin, Pyrogallol und Resorcin; IV = Pyrogallol; V = Resorcin; VI = Hydrochinon. 90 min; 55 mAmp; Borat-Puffer p_{H} 8,7 (0,08 m); Schleicher u. Schüll 2043 b

wegen seiner Flüchtigkeit in den Pherogrammen nicht aufgefunden werden. Um es ebenfalls zu erfassen, versuchten wir, das Gemisch der Phenole vor der Analyse in weniger flüchtige, gefärbte Derivate zu verwandeln.

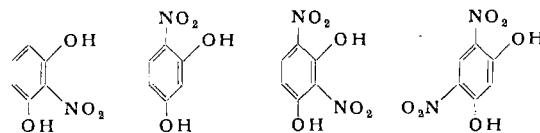
b) Nitrierung und Analyse der Nitrophenole. Je 1–3 mg der Phenole wurden in 1 cm³ Äther mit 1 Tropfen rauchender Salpetersäure nitriert und die Nitrierungsprodukte der Papierelektrophorese unterworfen. Die Nitrophenole werden im UV-Licht deutlich als dunkle Banden sichtbar. Da die Nitrierung natürlich nicht einheitlich verläuft, mußte mit dem Auftreten mehrerer Derivate gerechnet werden.

Bei den Nitrierungsprodukten des Phenols fanden wir, daß p-Nitrophenol, 2,4-Dinitrophenol und Pikrinsäure in Borat-Puffer vom p_{H} 8,7 praktisch gleich weit zur Anode wandern, o-Nitrophenol läuft infolge des stärkeren induktiven Effekts der benachbarten NO₂-Gruppe als stärkere Säure deutlich rascher und läßt sich so abtrennen.

Die zu erwartenden Nitrierungsprodukte des Brenzcatechins, 3-Nitro- und 4-Nitro-brenzcatechin lassen sich im Borat-Puffer nicht voneinander, aber von denen des Phenols trennen. In Veronal-Puffer (p_{H} 8,5) gelingt auch die Trennung dieser Isomeren, da die 3-Nitro-Verbindung (I) rascher als das 4-Nitroisomere (II) wandert.



Resorcin gibt nach der Nitrierung vier in Borat elektrophoretisch sehr deutlich verschiedene gelbe Produkte, wohl die beiden Mono- und die beiden Di-Nitro-Verbindungen, die wir im einzelnen nicht zugeordnet haben.



Da sich nur eine von ihnen mit dem o-Nitrophenol im Pherogramm überdeckt, ist es nach der Nitrierung möglich, Phenol, Brenzcatechin und Resorcin nebeneinander zu erkennen (Bild 5).

Hydrochinon liefert unter weitgehender Oxydation nur eine Mononitro-Verbindung, die allerdings wegen ihres ähnlichen Laufwerts neben o-Nitrophenol nicht erkannt werden kann.

c) β -Naphthol-carbonsäuren (H. Bodemann). Die Reaktionsprodukte der Kolbeschen Synthese des β -Naphthols, β -Naphthol-1- und 3-carbonsäure sind in kleinsten Mengen mit den üblichen analytischen Hilfsmitteln, inklusive Papierchromatographie, nicht zu trennen. Unterwirft man jedoch das Gemisch, das günstigerweise 0,01 m an jeder Komponente sein soll, der Hochspannungselektrophorese auf Whatman 1 Papier bei p_{H} 6,5 (Pyridin, Eisessig, Wasser), so wandert in 3 h bei 45 V/cm⁻¹ die 1-Carbonsäure 10 cm, die 3-Carbonsäure nur 8 cm zur Anode

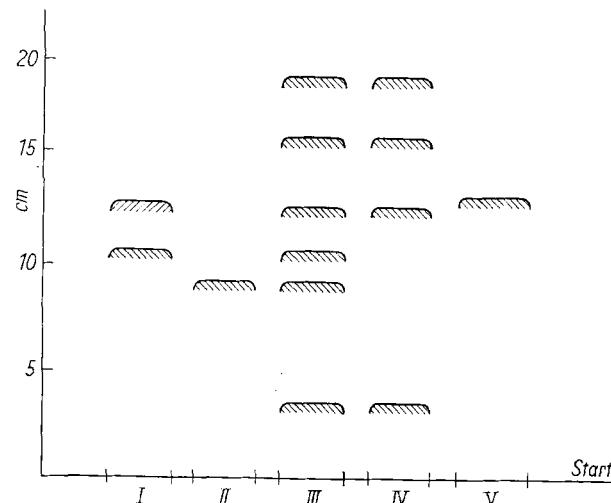


Bild 5

Pherogramm nitrierter Phenole. I = Phenol; II = Brenzcatechin; III = Gemisch Phenol, Brenzcatechin und Resorcin; IV = Resorcin; V = Hydrochinon. 90 min; 50–60 mAmp; Borat-Puffer, p_{H} ~ 8,7 (0,08 m); Schleicher und Schüll 2043 b. Alle Substanzflecken sind gelb

(Bild 6). Beide werden im UV-Licht erkannt, denn die 1-Carbonsäure zeigt blauviolette, die 3-Carbonsäure gelbgrüne Fluoreszenz.

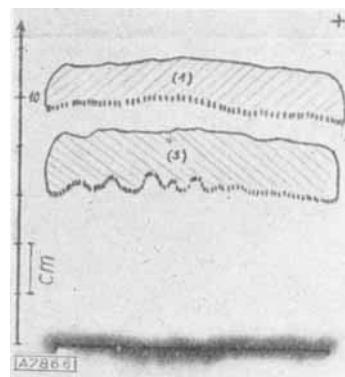


Bild 6

Trennung von β -Naphthol-1- und -3-carbonsäure. Am Startstreifen zur Erkennung der Kataphorese Glucose aufgetragen und mit Anilin-Phthalat sichtbar gemacht. 3 h; 45 V/cm; p_{H} ~ 6; Whatman 1

3.) Derivate der Phosphorsäure, radioaktive Substanzen

Die für viele chemische und biologische Untersuchungen äußerst wertvolle ³²P-haltige Phosphorsäure wird als ortho-Phosphat geliefert. Solche Präparate enthalten zahlreiche

radioaktive Beimengungen^{9). Bild 7 zeigt die Radio-graphie eines Papierphero gramm s, in dem im ganzen}

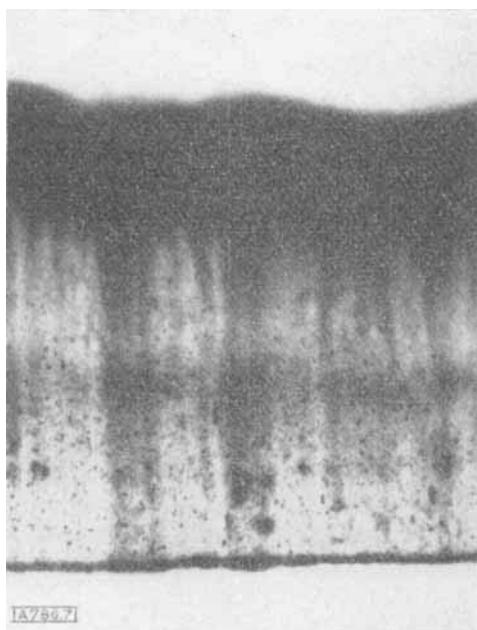
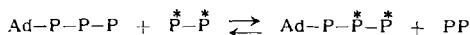


Bild 7. Pherogramm von käuflichem ^{32}P -Ortho-phosphat. Autoradiographie

$\frac{1}{2}$ mC aufgetragen war. Durch die Elution der oberen Zone gelingt es einfach und rasch ein reines Phosphat in die Hand zu bekommen. Ähnlich lassen sich ^{32}P -Pyrophosphat-Präparate reinigen.

Als Anwendungsbeispiel der Hochspannungselektrophorese von Phosphor-Derivaten sei eines aus der modernen Biochemie beschrieben. Nach Hoagland¹⁰⁾ wird in Gegenwart von Proteinen des Leberzellplasmas der Pyrophosphat-Anteil des Adenosintriphosphats (ATP) gegen anorganisches Pyrophosphat (PP) ausgetauscht, wenn Aminosäuren zugegen sind.



Das Ausmaß der Reaktion läßt sich sehr rasch im Pherogramm erkennen, da sich ohne vorherige Anreicherung in den Inkubationsansätzen das radioaktive Adenosintriphosphat neben dem radioaktiven Pyrophosphat finden und quantitativ bestimmen läßt (Dr. M. Ritter).

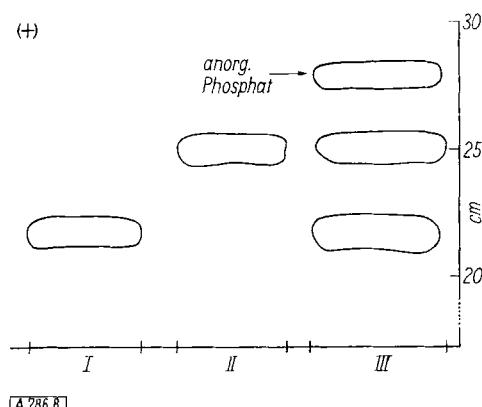


Bild 8

III = Pherogramm einer Mischung von Phosphat, 3-Phosphoglycerinaldehyd und Dioxy-acetonphosphat, durch die Molybdat-Reaktion nachgewiesen. I = Phosphoglycerinaldehyd; II = Dioxy-acetonphosphat. 3 h; 50 V/cm; p_{H} 6,5

⁹⁾ T. R. Sato, W. E. Kiesielak, W. P. Norris u. H. H. Strain, Analytic. Chem. 25, 438 [1953].

¹⁰⁾ M. B. Hoagland, Biochim. Biophys. Acta 16, 288 [1955].

Weitere Anwendungen der Papierelektrophorese auf dem Gebiet der Phosphorsäureester bestehen z. B. in der Trennung der isomeren Triosephosphate (J. Speck, Bild 8) und der Analyse zahlreicher Phosphoryl-Verbindungen wie Bild 9 zeigt¹¹⁾.

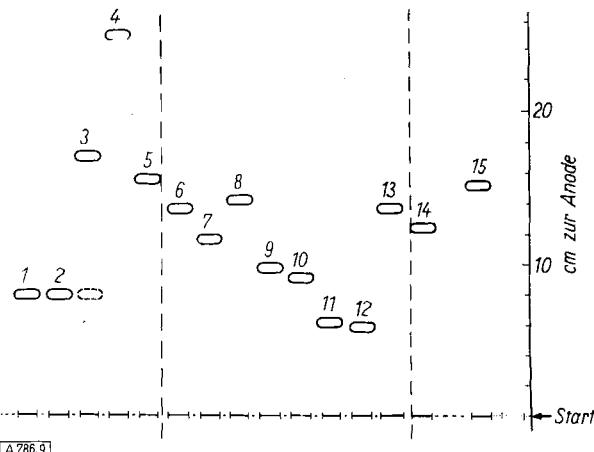


Bild 9
Hochspannungspherogramm verschiedener Phosphat-Verbindungen bei p_{H} 1,9; 50 V/cm, 90 min; 1. H_3PO_4 ; 2. $\text{H}_3\text{PO}_3\text{S}$; 3. $\text{H}_4\text{P}_2\text{O}_7$; 4. $\text{H}_5(\text{PO}_4)_2$; 5. H_3PO_4 ; 6. Methylphosphat; 7. Athylphosphat; 8. Diäthylphosphat; 9. n-Butylphosphat; 10. sek.-Butylphosphat; 11. tert.-Butylphosphat; 12. Octylphosphat; 13. Phenylphosphat; 14. S-n-Butyl-thiophosphat; 15. Acetylphosphat

Adenosintriphosphat mit γ -ständigem ^{32}P -Phosphat-Rest wurde enzymatisch aus Adenosindiphosphat (ADP) und ^{32}P -Phosphat dadurch bereitet, daß man Phosphoglycerinaldehyd in Gegenwart von Diphosphopyridinucleotid und Phosphoglycerinaldehyd-Dehydrogenase intermediär in 1,3-Diphosphoglycerinsäure überführte und deren energiereich gebundenen Phosphat-Rest mit Hilfe der Phos-



Bild 10
Enzymatische Synthese von ^{32}P -haltigem Adenosintriphosphat (unten) und seine Abtrennung vom Phosphat (oben). Autoradiographie

phoglycerat-kinase auf Adenosinphosphat übertrug. Dieses radioaktive Endprodukt ließ sich bei p_{H} 6,5 leicht elektrophoretisch rein erhalten und eluieren (Bild 10).

Als Beispiel für die Trennung radioaktiver Metall-Ionen sei das Pherogramm von Yttrium (^{90}Y) und Strontium (^{89}Sr) gezeigt (Bild 11 s. S. 203), das schon in 30 min erhalten werden kann (H. Bodemann).

4.) Trennung und Nachweis von Enzymen

(mit Dr. L. Grein und D. Jeckel)

Die Erfahrungen bei der Trennung von Proteinkomponenten des Blutserums²⁾ ließen es aussichtsreich erscheinen, auch Enzym-Gemische auf einer Stärkeschicht auf unserer Apparatur in ihre Bestandteile zu zerlegen. Die äußerst wirksame Kühlung auf der Glasplatte der Kühlkammer ließ erwarten, daß man mit großen Feldstärken, also relativ rasch zum Erfolg kommen werde, was bei der Empfindlichkeit dieser Stoffklasse wichtig ist. Diese Erwartungen haben sich in vollem Umfang erfüllt. Am besten

¹¹⁾ Th. Wieland u. R. Lambert, Chem. Ber. 89, 2476 [1956].

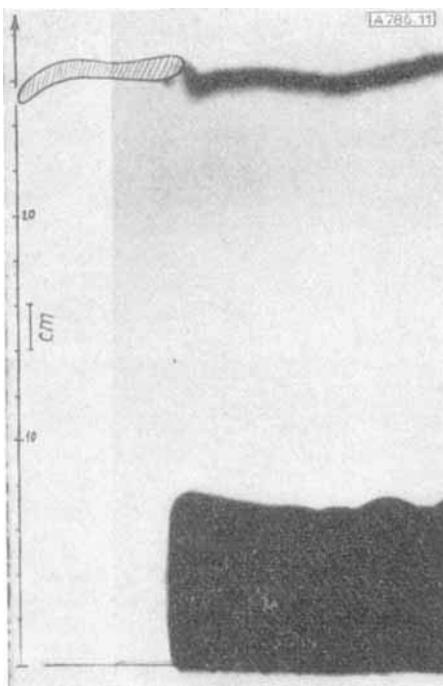


Bild 11

Trennung von $^{89}\text{Y}^{3+}$ (unten) und $^{90}\text{Sr}^{2+}$ (oben). Links daneben inaktives Sr^{2+} zum Vergleich. Autoradiographie, 1,5 h; 35 V/cm; $\text{pH} \sim 6$; Schleicher und Schüll 2043 b

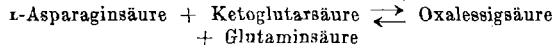
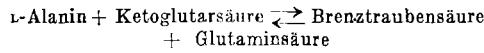
bewährte sich als Träger wieder ein Teig von löslicher Stärke, der mit Veronal-Puffer ($\text{pH} 8,6$; 0,075 M) angeführt und als 4–6 mm dicke Schicht weitgehend wasserfrei auf die Kühlplatte aufgestrichen wurde. Die zu trennende Protein-Lösung wurde, in derselben Weise angezeigt, in einen geeignet gezogenen Graben der Trägerschicht eingestrichen.

Nachweis der Enzyme: Zum Nachweis der getrennten Komponenten wird ein Abklatzsch angefertigt, indem ein Streifen von trockenem Filterpapier mehrere Minuten lang auf die ziemlich starre Stärkeschicht aufgepreßt wird. Auf solchen Abzügen können die von uns untersuchten Enzyme durch spezifische Teste sehr empfindlich sichtbar gemacht werden. Wir benutzten hierbei meist das Verschwinden der weißen Fluoreszenz von hydriertem Diphosphopyridinucleotid (DPNH) im UV-Licht, das an den enzymhaltigen Stellen in wenigen Sekunden eintritt, wenn in Gegenwart des spezifischen Substrats das hydrierte Coenzym zum nicht fluoreszierenden Diphosphopyridinucleotid dehydriert wird. So läßt sich auch die Anwesenheit von Enzymen erkennen, die nicht direkt an der Redox-Reaktion beteiligt sind, aber durch Hilfsysteme mit einem solchen Vorgang gekoppelt werden können. Es lassen sich noch unter 0,1 γ verschiedener Enzyme nachweisen.

Milchsäure-dehydrogenase: Man besprüht mit einer m/15 Phosphatpuffer-Lösung $\text{pH} 7,2$ die Pyruvat und DPNH enthält. In Gegenwart von Milchsäure-dehydrogenase wird DPNH vom Pyruvat, das in Lactat übergeht, dehydriert.

Äpfelsäure-dehydrogenase läßt sich analog mit Oxalacetat an Stelle von Pyruvat lokalisieren.

Transaminasen. Die beiden bekanntesten löslichen Transaminasen des Säugetierorganismus, die die Reaktionen



katalysieren, lassen sich durch Reduktion des gebildeten Pyruvats durch DPNH und Milchsäure-dehydrogenase bzw. durch Reduk-

tion der Oxalessigsäure mit DPNH und Äpfelsäure-dehydrogenase nachweisen. Man besprüht also im ersten Falle mit einer Lösung, die L-Alanin, α-Ketoglutarat, DPNH und Milchsäure-dehydrogenase enthält, im zweiten Fall L-Aspartat, α-Ketoglutarat, DPNH und Äpfelsäure-dehydrogenase. An den Stellen der Enzyme ist das Verschwinden der weißen DPNH-Fluoreszenz im UV-Licht zu beobachten.

Hexokinase. Dieses Enzym katalysiert die Phosphorylierung von Glucose zu Glucose-6-phosphat durch Adenosintriphosphat. Das entstehende Adenosindiphosphat wird mit Phosphoenolbrenztraubensäure in Gegenwart der Pyruvatkinaise wieder zum Triphosphat phosphoryliert, wobei Brenztraubensäure entsteht. Enthält nun das Sprühreagens außer den genannten Komponenten auch noch DPNH und Milchsäure-dehydrogenase, so verschwindet in diesem gekoppelten System wieder die Fluoreszenz des DPNH an der Stelle, wo sich Hexokinase im Pherogramm befindet.

Bild 12 gibt die Skizze eines Stärkeferogramms von einer Fraktion aus einem Schweineherzmuskelextrakt wieder. Neben Milchsäure- (MDH) und Äpfelsäure-dehydrogenase (AeDH) sowie Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (TA) sind darin noch zwei gelbe Proteinkomponenten zu erkennen, deren eine beim Besprühen mit verd. Wasserstoffperoxyd starke Gasentwicklung (O_2) bewirkt, also Katalase-Aktivität hat.

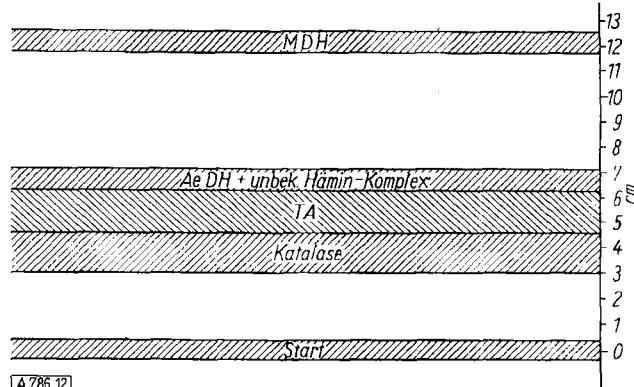


Bild 12
Auftrennung einer Fraktion eines Herzmuskelextrakts (Schwein), im ganzen 73 mg Eiweiß, in 7 h bei 25 V/cm auf 5 mm dicker Stärkeschicht. Veronalpuffer. Abkürzungen siehe Text

Mit Hilfe dieser Methoden ist auch der Vergleich mehrerer gleich wirkender, aber aus verschiedenen Quellen isolierter Enzyme leicht möglich. Dies scheint uns von besonderer Bedeutung, da sich die Anzeichen dafür mehren, daß Proteine ein und derselben Funktion nicht nur zwischen verschiedenen Arten von Lebewesen, auch Säugetieren, sondern auch in den Organen derselben Art strukturelle Unterschiede aufweisen können. Bei der Untersuchung der Milchsäure-dehydrogenasen aus verschiedenen Organen einer Ratte fanden wir außerordentlich starke elektrophoretische Unterschiede. So wandert z. B. im Veronal-Puffer ($\text{pH} 8,6$) das hoch gereinigte Enzym aus Herzmuskel bei 20 V/cm in 5 h 15 cm zur Anode, während das entspr. aus Skelettmuskel sogar schwach zur Kathode läuft. In möglichst rasch bereiteten Rohextrakten verschiedener Organe waren deutlich mehrere (in Ratteniere fünf) verschieden wandernde enzymatisch aktive Banden zu erkennen, auf denen DPNH nur in Gegenwart von Pyruvat dehydriert wurde, die also alle die Eigenschaft einer Milchsäure-dehydrogenase aufwiesen (Bild 13 s. S. 204). Auch die organeigenen Milchsäure-dehydrogenasen verschiedener Tierarten, z. B. aus den Skelettmuskeln der Ratte und des Kaninchens sind deutlich voneinander verschieden. Dies mag auch für andere, wenn nicht sogar für alle Enzyme Geltung haben. Ausgedehnte Untersuchungen dieser Fragen sind am hiesigen Institut im Gange.

Diese überraschenden Unterschiede lassen sich auch mit der Niederspannungselektrophorese in der früher angegebenen „feuchten Kammer“¹⁾ feststellen. Es sei aber doch noch einmal auf die Vorteile hingewiesen, die die gekühlte Elektrophorese auf Stärke gegenüber der auf Papier bei den Proteinen hat. Wie bei den von uns untersuchten

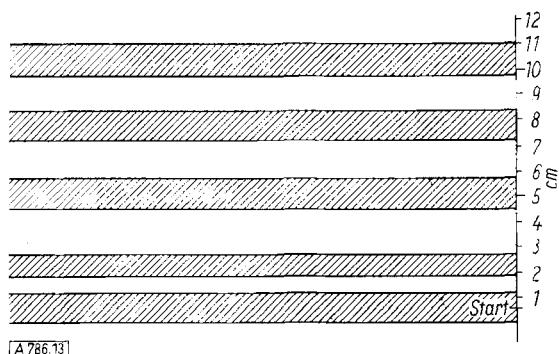


Bild 13

Auf trennung eines Rohextraktes von Ratteniere; Zonen mit Milchsäure-dehydrogenase-Aktivität sind gestrichelt. 6 h; 25 V/cm; Vero-nal-Puffer, pH 8.8

Enzymen besonders empfindlich mit dem Sprühtest zu beobachten ist, werden sie wie wohl alle Proteine, an die Papierfaser adsorbiert. Im Papierpherogramm einer einheitlichen Milchsäure-dehydrogenase aus Herzmuskel zeigt sich eine enzymatische Aktivität, die von der weitest gewanderten Front bis zum Start hin über die ganze durchlaufene Fläche kontinuierlich abnimmt. Diese Adsorption lässt sich bei viel höheren Proteinkonzentrationen auch durch die Azokarmin-Färbung nachweisen. Ihretwegen ist auch die nachträgliche Elution von Enzymen aus Papierpherogrammen oder Cellulosepulver-Schichten mit den allergrößten Verlusten verbunden oder gar unmöglich. Hingegen gelingt es uns durch Elution aus den im Abklatzsch lokalisierten Bezirken der Stärkeschicht in vielen Fällen über 90% der enzymatischen Aktivität wiederzugewinnen. Damit lässt sich die Trägerelektrophorese auf dem beschriebenen Apparat¹²⁾ natürlich auch zur Anreicherung und Reinigung von Enzymen heranziehen.

Eingegangen am 10. Dezember 1956 [A 786]

¹²⁾ Pherograph-Frankfurt, F. Hormuth, Inh. W. Vetter, Heidelberg-Wiesloch.

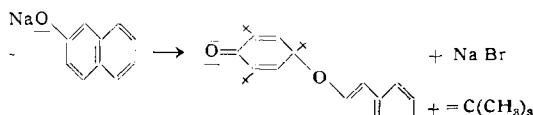
Zuschriften

Zur Dehydrierung von Phenolen

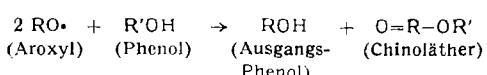
Von Prof. Dr. EUGEN MÜLLER, Dr. K. LEY
und Dipl.-Chem. G. SCHLECHTE

Institut für Angewandte Chemie der Universität Tübingen

Wir beobachteten, daß Phenol und substituierte Phenole die intensiv farbigen Lösungen von Aroxyle momentan entfärben¹⁾. Auf zwei Mole des Aroxyls wird ein Mol des Phenols verbraucht. Die Hälfte des Aroxyls läßt sich leicht quantitativ als entspr. Phenol aus der Reaktionslösung herausarbeiten, doch das weitere Reaktionsprodukt des Aroxyls war aus dem schmierigen Rückstand nicht zu isolieren. Verwendet man aber mono- oder di-tert.-butyliertes Phenol oder auch β -Naphthol als Abfangmittel, so erhält man neben den den eingesetzten Aroxylen entspr. Phenolen gut kristallisierende, gelbliche Substanzen. Sie zerfallen thermisch u. a. unter Bildung der zur Reaktion verwandten Aroxyle (Rot- oder Blaufärbung). Die Verbindungen sind dimolekular und weisen im IR-Spektrum das chinolide Bandensystem bei 6μ auf. Der aus Tri-tert.-butylphenoxy-(1) (blaues Aroxyl) und β -Naphthol entstehende gelbliche Stoff ist nach allen Eigenschaften (Fp., IR-Spektrum, chem. Verhalten) identisch mit der aus folgendem chinoliden Bro-mid und β -Naphtholnatrium hergestellten Verbindung:



Die „Titration“ der Aroxyle mit Phenolen nimmt daher folgenden Verlauf:



Das zugesetzte Phenol wird vom stabilen Aroxyl monovalent dehydriert, wobei aus letzterem das entspr. Phenol und aus ersterem ein instabiles Aroxyl entsteht. Dieses lagert sich mit einem noch unverbrauchten stabilen Aroxyl zum Chinoläther zusammen. Eine Reaktion, die im Prinzip alle Aroxyle mit freien Radikalen eingehen können.

Durch diese mit einer ganzen Reihe unserer Aroxyle und verschiedenen substituierten Phenolen und Naphtholen ausgeführten Abfangmethode ist der erste Schritt der von R. Pummerer ange nommenen primären Dehydrierung von Phenolen zu meist instabilen Aroxylen experimentell sichergestellt. Die Beobachtungen werfen zugleich ein Licht auf den Primärvorgang der Inhibitorwirkung von Aroxylen bei der Polymerisation und der Wirkung der diesen Aroxylen zu Grunde liegenden Phenoole als Antioxydantien.

Eingegangen am 18. Februar 1957 [Z 443]

¹⁾ Vgl. Chem. Ber. 87, 927 [1954]; Chemiker-Z. 80, 618 [1956].

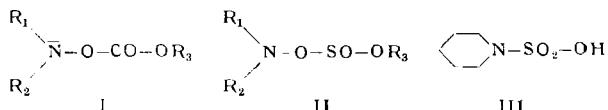
Sekundäre O-Acyl-hydroxylamine¹⁾

Van Dr. G. ZINNEN

Institut für Pharmazeutische Chemie und Lebensmittelchemie
der Universität Marburg/L.

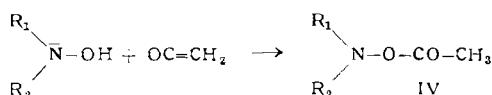
Chlorkohlensäure-ester, RO-COCl, geben in wässrigem Alkali mit N-Oxy-piperidin und anderen sek. Hydroxylaminen in guten Ausbeuten N-oxy-carbonsäure-ester (I), welche sich im Wasserstrahlvakuum destillieren lassen, bzw. kristallin sind. Bei Normaldruck erhitzt, zersetzen sie sich auch in indifferenten Lösungsmitteln vollständig. Es gelang nicht, die anfängliche De-carboxylierung zur Bildung von O- oder N-Alkyl-Derivaten auszunutzen.

Die RO-COCl analogen Chlorsulfinsäure-ester bilden²⁾ entsprechend mit aliphatischen Hydroxylaminen (jedoch unter Feuchtigkeitsausschluß und mit wasserfreiem Pyridin als Protonenfänger) Dialkylamin-N-oxy-sulfinsäure-ester (II). Diese lassen sich bei 0,01 Torr destillieren, sind aber sehr unbeständig und werden auch bei tiefen Temperaturen alsbald zersetzt. Das unterscheidet sie von den isomeren Dialkyl-N-sulfonsäure-estern; auch verbrauchen sie im Gegensatz zu diesen 2 Mole Persäure.



Schwefeldioxyd reagiert mit dem Stickstoff der Hydroxylamine. So gibt N-Oxy-piperidin Piperidin-N-sulfonsäure (III), welche sich auch bei der Einwirkung von Schiffs-Reagens auf N-Oxy-piperidin unter Regeneration des freien Fuchsins bildet³⁾ und die auch durch Verseifen von Piperidin-N-sulfochlorid erhalten wurde.

Acylierung sek. Hydroxylamine ist schließlich durch Anlagerung an Doppelbindungen möglich. So entstehen mit Keten N-Oxy-acetyl-amine (IV).



Piperidin-N-oxy-carbonsäure-methylester Kp 13 mm 98 °C
 Piperidin-N-oxy-carbonsäure-äthylester Kp 20 mm 120 °C
 Piperidin-N-oxy-carbonsäure-benzylester Fp 66 °C (aus Petroläther)
 Diäthylamin-N-oxy-carbonsäure-methylester Kp 10 mm 54–56 °C
 Piperidin-N-oxy-sulfinsäure-äthylester Kp 0,01 mm 85 °C
 Piperidin-N-sulfonsäure-methylester Kp 0,1 mm 90 °C

¹⁾ 2. Mitteilung zur Chemie des N-Oxy-piperidins. I. Mitt. in Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges. 289/61, 714 [1956].

²⁾ Vgl. hierzu auch G. Zinner, diese Ztschr. 69, 93 [1957].
³⁾ G. Zinner, Z. analyt. Chem. (ini Druck).

³⁾ G. Zinner, Z. analyt. Chem. (ini Druck).