Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.
7. Jg., S. 239—240, Mai 1969

Präparative Darstellung von reinen zur Anfärbung von Elektropherogrammen geeigneten Farbstoffen mittels Sephadex¹⁾

II. Mitteilung zur Methodik der Serum-Elektrophorese

Von V. BUSSE

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie der Freien Universität Berlin (Direktor: Prof. Dr. H. J. Dulce)

(Eingegangen am 13. September 1968)²⁾

Es wird ein einfaches Verfahren beschrieben, Azofarbstoffe an Sephadex G 25 zu reinigen. Neucoccin und Amidoschwarz 10 B lassen sich in jeweils 5 verschiedene Farbstoffe auftrennen, während Ponceau S selbst nach mehrmaliger Chromatographie als einheitlicher Farbstoff eluiert wurde.

The preparation of pure dyes suitable for staining electrophoretograms

A simple method is described for the purification of azo dyes on Sephadex G 25. Neucoccin and amido black 10 B are each separated into 5 different dyes, while Ponceau S remains homogeneous after repeated chromatography.

Auf der Suche nach einem geeigneten Verfahren, Farbstoffe säulenchromatographisch zu reinigen, wurden Versuche mit Cellulosepulver, Ionenaustauscher und Dextran-Gel durchgeführt. Dabei erwies sich das Dextran-Gel Sephadex in Handhabung und Trenndauer als sehr einfach und günstig gegenüber den umständlicheren anderen Verfahren.

Nach DETERMANN (1) beruht das Prinzip der Gelchromatographie mit Sephadex auf der Stofftrennung auf Grund von Molekulargewichtsunterschieden, d. h. große Moleküle penetrieren normalerweise nicht wie die kleinen in die Gelmatrix und können deshalb vor den kleinen Molekülen eluiert werden.

Da es sich hier aber um die Fraktionierung von Stoffen etwa gleichen Molekulargewichts handelt, müssen zusätzliche Mechanismen bestehen, die die Trennung etwa gleich großer Moleküle in einem Gel bewirken, in das sämtliche Moleküle penetrieren können. Wechselwirkungen zwischen den gelösten Ionen und der Gelmatrix können bei der Verwendung ionenfreien Elutionsmittels entstehen, da in der Sephadexmatrix eine geringe Zahl von Carboxylgruppen verankert ist (2), etwa 0,1 bis 0,2 $\mu\text{Val/g}$ trockenes Sephadex (1). Zum anderen zeigen aromatische, homozyklische wie heterozyklische Verbindungen ein abweichendes Elutionsverhalten, wie verschiedene Experimente aufgezeigt haben (3, 4, 5, 6). Inwieweit bei der Trennung gleich großer Moleküle der Effekt durch das Gelgerüst selbst durch das Einwirken Coulombscher Kräfte und Dispersionskräfte erreicht wird oder eine irgendwie anders geartete Adsorption an das hochmolekulare Gel stattfindet, bleibt bislang noch unklar. Nach neuesten Untersuchungen von DETERMANN und WALTHER (7) sollen Äthergruppen im Sephadexgerüst für die starke Adsorption von aromatischen Substanzen verantwortlich sein. Auf Grund dieser Beobachtungen, vor allem auch an Azoverbindungen, empfehlen BÄTZ (8) und PARRISH (9) die Benutzung von Sephadex zur Reinigung von Azofarbstoffen.

In der Forderung, zur Anfärbung von Elektropherogrammen nur chemisch einheitliche Farbstoffe zu verwenden, sind sich die meisten Autoren einig (10, 11, 12). Die Beschaffung solcher Farbstoffe mit hohem Reinheitsgrad bereitet aber z. T. große Schwierigkeiten. Durch das Dextran-Gel Sephadex bietet sich eine einfache und elegante Möglichkeit für jedes klinische Labor, käufliche Farbstoffe ohne apparativen und wirtschaftlichen Aufwand zu reinigen.

Material und Methodik

Verwandt wurden die Azofarbstoffe Neucoccin (Agfa, Leverkusen, Colour Index Nr. 16255), Ponceau S (Serva, Heidelberg, Colour Index Nr. 27195) und Amidoschwarz 10 B (Merck, Darmstadt, Colour Index Nr. 20470). Weitere Angaben s. I. Mitteilung (13).

Als Gelmatrix diente Sephadex G 25 fine.

Die Chromatographie erfolgte in Säulen 2,5 × 45 cm und 5,0 × 100 cm der Fa. Pharmacia. Die silikonisierten Rohre wurden in üblicher Weise gepackt und am oberen Ende mit einem feinmaschigen Perlonnetz abgedeckt. Die Elutionsgeschwindigkeit wurde so eingestellt, daß sie deutlich unter der bei freiem Fluß der Säule maximal erreichbaren lag. Gestartet wurde, indem die 2- oder 5proz. Farblösung mit einer Pipette in einem Guß vorsichtig auf die Gelpackung gegeben wurde. Der Ausgangsfarbstoff und die jeweilige Hauptfraktion wurden an einer 5,0 × 100 cm Säule, die Nebenfraktionen anschließend an einer 2,5 × 45 cm Säule chromatographiert. Als Elutionsmittel diente entionisiertes Wasser, das über eine Schlauchpumpe auf die Säule gegeben wurde. Da sich die Fraktionen nicht sofort scharf voneinander trennen ließen, mußte jede einzelne Fraktion nach vorangegangenem Einengen im Rotationsverdampfer mehrmals chromatographiert werden.

Der Nachweis unterschiedlicher Farbfraktionen wurde erbracht durch Aufzeichnen der Absorptionsmaxima im registrierenden Spektralphotometer (C. Zeiss DMR 21) und durch Papierchromatographie wie in der ersten Mitteilung beschrieben (13). Die wäßr. Farblösung wurde dann gefriergetrocknet und der Farbstoff gewogen.

Ergebnisse

Mit der Säulenchromatographie an Sephadex G 25 ließen sich Farblösungen weit besser auftrennen, als es mit der Papierchromatographie möglich gewesen war. Dieser Trenneffekt ließ sich noch erhöhen, wenn als

¹⁾ Deutsches Bundespatent angemeldet am 29. April 1969.

²⁾ Auf Wunsch des Autors erst jetzt veröffentlicht.

Elutionsflüssigkeit 1proz. NaCl-Lösung gewählt wurde. Die einzelnen Zonen traten dann wesentlich schärfer und markierter hervor; allerdings war dann die Adsorption an die Gelmatrix um ein vielfaches höher, so daß die Fraktionen erst nach Tagen von einer $2,5 \times 45$ cm Säule eluiert werden konnten. Auffällig war, daß eine nach mehreren Läufen mit dest. Wasser gereinigte Fraktion regelmäßig mit einem langen Schwanz („tailing“) eluiert wurde.

Neucoccin als 5proz. Lösung aufgetragen, wurde in insgesamt 5 verschiedene Farbstoffe aufgetrennt. Jede dieser Fraktionen wurde 4mal chromatographiert, ehe sie sich als farblich einheitlich darstellte. Als letzte 6. Fraktion wurde ein Rot eluiert, das der Hauptfraktion in allen Kriterien glich, aber ganz besonders fest adsorbiert wurde (s. Tab. 1).

Tab. 1

Absorptionsmaxima und R_F -Werte von Neucoccin und seinen Komponenten in der Reihenfolge ihrer Elution von einer Sephadex G 25 (fine)-Säule

Fraktion	Absorptionsmaxima (nm)		R_F -Wert Essigester/ Pyridin/ H ₂ O 35:25:20 (v/v)	ungefährer Gewichtsanteil in %
Neucoccin	504	330	0,34	100
1. ocker	436,2	330	0,18	3,55
2. rot	504	330	0,37	89,5
3. violett	489		0,48	0,3
4. gelb	424,3		0,31	0,22
5. orange	474	386	0,63	6,45

Amidoschwarz 10 B in 2proz. Lösung ließ sich ebenfalls in 5 verschiedene Fraktionen auftrennen, wovon jede einzelne Fraktion wiederum 3- oder 4mal bis zur endgültigen Einheitlichkeit chromatographiert wurde. Das Perlonnetz mußte nach dem ersten Lauf erneuert werden, da schwer lösliche, schwarz-braune Substanzen aus dem Amidoschwarz dort festgehalten wurden (Tab. 2).

Tab. 2

Absorptionsmaxima und R_F -Werte von Amidoschwarz 10 B und seinen Komponenten in der Reihenfolge ihrer Elution von einer Sephadex G 25 (fine)-Säule

Fraktion	Absorptionsmaxima (nm)				R_F -Wert Butanol/ Pyridin/ H ₂ O 1:1:1 (v/v)	ungefährer Gewichtsanteil in %
Amidoschwarz						
10 B	614	443	397	235	0,63	100
1. hellviolett	514				0,65	8,6
2. dunkelviolett	528				0,57	9,2
3. blau	614	443	397	325	0,63	77,94
4. rosa		504		325	0,45	0,23
5. gelb				280	0,11	3,9

Ponceau S bleibt selbst nach mehrmaligem Chromatographieren ein einheitlicher Farbstoff. Von der Hauptfraktion löste sich allerdings eine schneller wandernde

Zone, die aber das gleiche Absorptionsmaximum und den gleichen R_F -Wert besaß wie die Hauptfraktion, so daß es sich hier möglicherweise um die schneller wandernde Farbstoffsäure handelt.

Besprechung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit sollte ein einfaches Verfahren beschrieben werden, Azofarbstoffe präparativ zu reinigen. Es kam also weniger auf die Klärung der eigenartigen Besonderheiten bei der Trennung von aromatischen Substanzen mit Sephadex an, sondern vielmehr auf die präparative Darstellung unter den Bedingungen eines klinischen Laboratoriums. Da die einzelnen Fraktionen bis zur Gewinnung von einheitlichen Farbstoffen mehrmals chromatographiert werden mußten, war eine genaue quantitative Zuordnung der Fraktionen sowie die Berechnung der K_A -Werte nicht mehr exakt möglich. Die Angabe der relativen Verteilung der Einzelfraktionen sollte lediglich einen ungefähren Einblick über die Größenordnung der Nebendarbstoffe geben, die z. T. nicht unerheblich sind, von Charge zu Charge wechseln können und das quantitative Arbeiten mit solchen verunreinigten Farbstoffen erschweren.

Es kann angenommen werden, daß es sich bei den an Sephadex gewonnenen Einzelfraktionen um unterschiedliche Farbstoffe handelt, da sowohl die Absorptionsmaxima wie auch die papierchromatographisch ermittelten R_F -Werte der einzelnen Fraktionen in allen Fällen deutlich voneinander abweichen. Als Reinheitskriterien bei käuflichen Azofarbstoffen können die Messungen von Absorptionsmaxima und R_F -Werten nicht herangezogen werden, weil die Absorptionsmaxima der Nebendarbstoffe, obwohl sie in annähernd gleicher Konzentration vorlagen, in der Spektralkurve des Ausgangsfarbstoffes nicht in Erscheinung traten, zum anderen die Papierchromatographie in der Auftrennung von Azofarbstoffen dem Sephadex weit unterlegen war (13). Zur Reinheitsprüfung muß die Chromatographie an einer Sephadex-Säule durchgeführt werden. Man chromatographiert so lange, bis bei langsamer Elutionsgeschwindigkeit die jeweilige Fraktion sichtbar einheitlich erscheint.

PARRISH (9) benutzte als erster Sephadex G 25 für Dünnschicht- und Säulenchromatographie zur Trennung von Lebensmittelfarbstoffen. Unerklärlicherweise gibt er aber für Neucoccin einen einheitlichen R_F -Wert an. Möglicherweise waren hier Elutionsdauer oder Trennstrecke zu kurz, so daß deshalb Neucoccin als homogener Farbstoff beschrieben wurde.

Literatur

1. DETERMANN, H., Gelchromatographie, Springer-Verlag Berlin (1967). — 2. Sephadex-Gelfiltration in Theorie und Praxis, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala (1967). — 3. JANSON, J. CH., J. Chromat. 28, 12 (1967). — 4. GELOTTE, B., J. Chromat. 3, 330 (1960). — 5. PORATH, J., Biochim. biophysica Acta Amsterdam 39, 193 (1960). — 6. FLODIN, P., Diss., Uppsala (1962). — 7. DETERMANN, H. und I. WALTHER, Nature London 219, 604 (1968).

8. BAETZ, A. L. und H. DIEHL, J. Chromat. 34, 534 (1968). — 9. PARRISH, J. R., J. Chromat. 33, 542 (1968). — 10. KOHN, J., Ärtzl. Lab., 10, 233 und 269 (1964). — 11. ODEBRECHT, W., Arzn. Standard. 4, 271 (1963). — 12. PRZOLD, F. A. und U. PEISER, Klin. Wschr. 31, 982 (1953). — 13. BUSSE, V., diese Z. 6, 273 (1968).

Dr. Volker Busse

1 Berlin 19, Spandauer Damm 130

BEHRINGWERKE AG
MARBURG-LAHN

S. Behring

Calcium- Thromboplastin

Behringwerke

Für die Bestimmung der Einphasen-
Gerinnungszeit nach Quick

Eine Calcium-haltige
Thrombokinase
zur sicheren Überwachung
der Antikoagulantien-
therapie

B30129

Jetzt von SIGMA selbst hergestellt

6-Phosphogluconsäure-Dehydrogenase

aus Hefe

Kristallsuspensionen in Ammoniumsulfat

Eine Einheit oxydiert ein μMol 6-Phosphogluconat pro Minute bei pH 7,4 und 37°

Typ VI, kristallin

Aktivität: etwa 50 Einheiten pro mg. Keine Fremdaktivitäten an Hexokinase, Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase und Phosphoriboisomerase.

	25 Einheiten \$ 13,50	
100 Einheiten	\$ 45,00	500 Einheiten \$ 150,00
250 Einheiten	\$ 90,00	1000 Einheiten \$ 250,00

Typ V, kristallin

Aktivität: etwa 50 Einheiten pro mg
Fremdaktivitäten: Hexokinase < 0,1%
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase < 0,1%

	25 Einheiten \$ 12,00	
100 Einheiten	\$ 40,50	500 Einheiten \$ 135,00
250 Einheiten	\$ 81,00	1000 Einheiten \$ 225,00

Typ IV, kristallin

Aktivität: etwa 20 Einheiten pro mg
Fremdaktivitäten: Hexokinase < 2%
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase < 0,1%

25 Einheiten	\$ 10,00	100 Einheiten \$ 32,00
	500 Einheiten	\$ 108,00

Wie bereits angekündigt, stellen wir jetzt auch her:

Enolase	Kreatin-Phosphokinase
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	Lactat-Dehydrogenase
Glutathion-Reduktase	Phosphoglucomutase
Glyoxalase	Phosphohexose-Isomerase
Hexokinase	Phosphoriboisomerase
Katalase	Phosphoribulokinase
	Pyruvat-Kinase

Sigma-Reagenzien sind in der ganzen Welt durch den Fachhandel oder direkt aus St. Louis beziehbar.

Telegramme: SIGMACHEM, St. Louis, Missouri

Die Forschungslaboratorien von

SIGMA CHEMICAL COMPANY

3500 DE KALB ST. • ST. LOUIS 63118, MO. • U.S.A.

MANUFACTURERS OF THE FINEST BIOCHEMICALS AVAILABLE

ANLEITUNGEN KOSTENLOS ERHÄLTLICH

Die nachstehenden Verfahren, die ursprünglich für Bestimmungen im Serum oder Urin veröffentlicht wurden, eignen sich hervorragend auch für Forschungsarbeiten.

Aldolase im Serum (540 nm) Bulletin 750
Amylase in Serum und Urin, visuelles Verfahren, Bulletin 700
Chlorid in Serum oder anderen biologischen Flüssigkeiten, titrimetrisch, Bulletin 830
Kreatinphosphokinase (CPK) im Serum, kolorimetrisch (500—540 nm) Bulletin 520
Kreatinphosphokinase (CPK) im Serum, unter Verwendung von Sulfhydrylgruppen, kolorimetrisch (um 660 nm) Bulletin 661
Kreatinphosphokinase (CPK) im Serum, UV-Test (340 nm) Bulletin 40-UV
Cytochromoxydase, histochemisch, Bulletin 185
Äthylalkohol in Blut und Serum, enzymatisch (340 nm) Bulletin 330-UV
Formimino-L-Glutaminsäure (FIGLU), im Harn (365 nm) Bulletin 365-UV
Galaktose-1-phosphat-Uridyl-Transferase, für die Diagnose der Galaktosämie (340 nm) Bulletin 600-UV
Glucose in Blut und Serum (540 nm) Bulletin 14
dasselbe Filtrat kann für die Bestimmung des Harnstoff-N verwendet werden
Glucose im Plasma, enzymatisch kolorimetrisch (490 bis 510 nm) Bulletin 510
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase in Erythrocyten, sehr einfache visuelle Methode, erfordert kein Instrument, Bulletin 400
 α -Hydroxybuttersäure-Dehydrogenase im Serum, kolorimetrisch (um 500 nm) Bulletin 495
 α -Hydroxybuttersäure-Dehydrogenase im Serum, UV-Test (340 nm) Bulletin 20-UV
Phosphor, anorganischer in Serum und Urin, kolorimetrisch (um 620—700 nm) Bulletin 670
Isocitrat-Dehydrogenase im Serum, kolorimetrisch (340 nm); UV-Test (340 nm) Bulletin 175/150-UV
L-(+)-Lactat im Blut, enzymatisch (340 nm) Bulletin 825-UV
Lactat-Dehydrogenase in Serum und Harn einschl. der Isoenzyme (400—550 nm) Bulletin 500
Lactat-Dehydrogenase im Serum (340 nm) Bulletin 340-UV
Leucin-Aminopeptidase im Serum (580 nm) Bulletin 250
Lipase im Serum, titrimetrisch, Bulletin 800
Malat-Dehydrogenase im Serum (340 nm) Bulletin 340-UV
Ornithin Transcarbamylase (OCT) im Serum, erfordert Ammoniakbestimmung, Bulletin 108
Phenylalanin in Serum und anderen Flüssigkeiten, fluorometrisch, Bulletin 60-F
Phosphatase, alkalische und saure in Blutausstrichen und Gewebsschnitten, histochemisch, Bulletin 85
Phosphatase im Serum, alkalische, saure und Prostata-sowie im Harn, alkalische (410 nm) Bulletin 104
Phosphohexose Isomerase im Serum (490 nm) Bulletin 650
Pyruvat in Blut, Plasma und anderen Flüssigkeiten, enzymatisch (340 nm) Bulletin 725-UV
Sorbit-Dehydrogenase (SDH) im Serum, UV-Test (340 nm) Bulletin 50-UV
Transaminasen (GOT u. GPT) im Serum (505 nm) Bulletin 505
Transaminasen (GOT u. GPT) im Serum (340 nm) Bulletin 410-UV
Harnstoff-N in Blut oder Serum (400—420 nm) Bulletin 14
dasselbe Filtrat kann für die Glucosebestimmung verwendet werden
Harnsäure im Serum, enzymatisch (650—750 nm) Bulletin 680
Vanillinmandelsäure (VMA) im Harn, kolorimetrisch (470—510 nm) Bulletin 480

Vertretung in England:

SIGMA LONDON Chem. Co. Ltd. • 12, Lattice St., London S. W. 6 ENG. • Telephone: RENown-5823 (Rückberechnung)