

## Bestimmung von Polypeptiden und Aminosäuren durch Omegaphorese\*,\*\*

E. Schumacher\*\*\* und P. Ryser

Institut für Anorganische Chemie der Universität Bern

### Summary

Omegaphoresis is an electrophoretic method based on Kohlrausch's  $\omega$ -function. Detection and estimation of aminoacids and polypeptides in mixtures at the nano- to picomol-level is described. Duration of analysis is less than 5 min.

Vor Jahren zeigte der eine von uns theoretisch [1] und experimentell mit T. Studer [2], dass Kohlrauschs beharrliche Funktion  $\omega$  [3] in einem System von  $n+2$  verschiedenen Protolyten (und anderen «schwachen» Elektrolyten) im elektrischen Feld zur Ausbildung von  $n+1$  gleich schnell und gleichsinnig wandernden Phasengrenzen mit dazwischen liegenden getrennten Zonen von  $n$  Probenkomponenten führt (Omegaphorese). Die Länge jeder Zone ist der Molmenge je einer Komponente proportional, und die Reihenfolge der Zonen wird durch qualitative Merkmale der Komponenten ( $pK^H$ -Wert, Beweglichkeit) bestimmt. Unsere Experimente auf Papierstreifen mit chemischer Detektion ergaben eine gute Reproduzierbarkeit der quantitativen ( $\pm 3\%$ ) und qualitativen Analyse von Säure- und Basengemischen von bis zu 10 Komponenten im Nano- bis Picomolbereich bei Trennzeiten von wenigen Minuten. Dasselbe Prinzip wurde unabhängig von B. P. Konstantinov und O. V. Oshurkova [4] verwendet, u. a. für die Analyse von Kationen als Chlorokomplexe. Hierbei diente eine Kapillare als Trennsystem und der

Brechungsindex zur Detektion der Zonen. Schliesslich machten später A. J. P. Martin [5], F. M. Everaerts [6] und viele andere [7] diese Methode unter dem Namen Isotachophorese bekannt. Neben den von [4] vorgeschlagenen Zonnennachweisen wurde noch die UV-Absorptionszelle eingeführt. F. M. Everaerts und Nachfolger benützten Puffersysteme als Verdrängungs- und Leitelektrolyte, während unsere Anordnung pufferfrei arbeitete, womit höhere elektrische Felder, kürzere Trennzeiten, schärfere Phasengrenzen und ein besseres Auflösungsvermögen verwirklicht werden können. Die inzwischen erfolgte Entwicklung von Komponenten für die Flüssig-flüssig-Chromatographie legte es nahe, die früheren Versuche in neuer apparativer Form wiederaufzunehmen. Dazu kam als weitere Motivation die Einsicht, dass eine rasche, quantitative Spurenanalyse von Anionen und Kationen in komplexen Gemischen durch die geläufigen Analysemethoden nicht abgedeckt wird. Schliesslich vermag das  $pK^H$ - (oder  $pK^L$ -) Auflösungsvermögen der Methode von der Ordnung  $\Delta pK^H = 10^{-3}$  neue wissenschaftliche Fragestellungen zu beantworten.

Abb. 1 zeigt das Schema der Apparatur. Die Legende benennt die Bestandteile. Zwischen dem neuartigen Scheibenhahn ES und dem Detektor De befindet sich eine 15 cm lange gekühlte Teflonkapillare. Mit den Quetschpumpen P wird die Apparatur mit Elektrodenlösungen gespült. Bei S wird die Probe eingespritzt. Die Motorspritze M ermöglicht, das Trennmuster dem Detektor schneller zuzuführen oder zur Verlängerung der Trennzeit einen Gegenstrom zu erzeugen. De ist ein Elektrodenpaar, Abstand 10 bis 30  $\mu\text{m}$ , an dem der Spannungsabfall hochohmig abgegriffen wird. Die Verwendung einer füllkörper- und quer-

\* Eingegangen am 28. November 1975

\*\* Aus der geplanten Dissertation von P. Ryser

\*\*\* Prof. E. Schumacher, Institut für Anorganische Chemie der Universität Bern, Freiestrasse 3, CH-3012 Bern

konvektionsfreien Lösung erlaubt, den Trennvorgang in den wesentlichen Aspekten quantitativ zu beschreiben. Die eingehenden Parameter sind (bei  $c_{\text{tot}} < 10^{-3} \text{M}$ ) lineare Funktionen der Zonenkonzentrationen. Die Trennbedingungen können zum voraus ohne mühsame empirische Optimierung bestimmt werden [8].

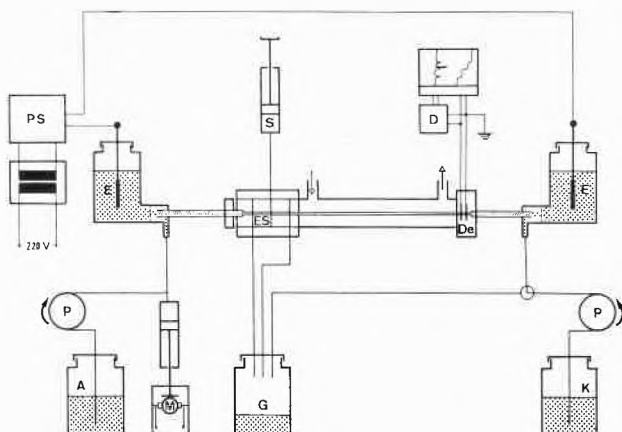


Abb. 1: Schema der Omegaphorese-Apparatur: PS Netzteil stromstabilisiert; E Elektroden; ES Einlasssystem; S Probenspritze; A, K, G Gefäße für Lösungsvorräte und Spüllösungen; De Detektor; M Motorspritze; P Quetschpumpe; D Differentiator. Zwischen ES und De 15 cm lange Teflonkapillare in Liebigkühler

Im folgenden beschreiben wir die Lösung einer Aufgabe [9], die sich bei der Kontrolle von Peptidsyntheseschritten stellt: In möglichst kurzer Zeit soll die quantitative Bestimmung eines Polypeptids neben Vorstufen und Aminosäuren ausgeführt werden, wobei der Substanzbedarf  $\sim 10$  bis  $20 \mu\text{g}$  nicht übersteigen darf. Basische (und neutrale) Peptide werden als Kationen bestimmt: Die Läufer elektrolytlösung hat ein  $\text{pH} < \text{pI}_{\text{max}}$  des Gemischs ( $\text{pI}$  = Isoelektrischer pH-Wert), vom Anoden- zum Kathodenraum steigt das pH. Saure (und neutrale) Peptide analysiert man als Anionen: vom Kathoden- (Verdränger) zum Anodenraum (Läufer  $\text{pH} > \text{pI}_{\text{max}}$ ) sinkt das pH.

Wir hatten ein Peptid A ( $M \sim 1900$ , 6 bas. AS), ein Peptid B ( $M \sim 3300$ , 8 bas. AS), allfällige Verunreinigungen, arg und his nebeneinander zu bestimmen. Der Läufer elektrolyt ist eine 0,0025-M-K-acetat ( $\text{pH} 8$ ), der Verdrängerelektrolyt eine 0,05-M-Hala<sup>®</sup>-Cl<sup>-</sup>-Lösung ( $\text{pH} 1,82$ ).

Abb. 2 zeigt vier Analysen. Die Legende beschreibt die Pherogramme. Die beiden Polypeptide erscheinen bei 2b als Zonen (2,3) (A) und (3,4) (B) vor arg (4,5) und his (5,6). Der auch in 2c sichtbare Doppel-Peak (1,2) des differenzierten Signals erweist sich als Verunreinigung von  $0,006 \mu\text{g}$  Na<sup>+</sup> im Gemisch von insgesamt  $12 \mu\text{g}$  Peptiden. Die im Original besser erkenntliche Schulterhöhe und der Vergleich von 2c/2d mit Wiederholung der Analyse (ohne arg und his), jedoch unter Zugabe von  $0,05 \mu\text{g}$  Na<sup>+</sup> bei 2d belegen diesen Befund (Elimination des Doppel-Peaks). Zonen (2,3) in 2c/2d zeigen ein durch Hydrolyse entstandenes kleineres Peptid, das noch stärker basisch als A, B ist.

Die Analysendauer beträgt 3 bis 5 min. Zonenlängen sind auf  $\pm 1$  bis 3% reproduzierbar; die Signalstärke

und das S/N-Verhältnis erlauben noch 100 mal kleinere Probenmengen zu analysieren.

Eine analoge Bestimmung saurer (und neutraler) Peptide erfolgt mit Cl<sup>-</sup> als Läufer (NH<sub>4</sub>Cl  $\text{pH} \sim 7$ ) und K<sup>®</sup> leu<sup>o</sup> als Verdränger (z. B. asp, glu, cyt-SS-cyt).

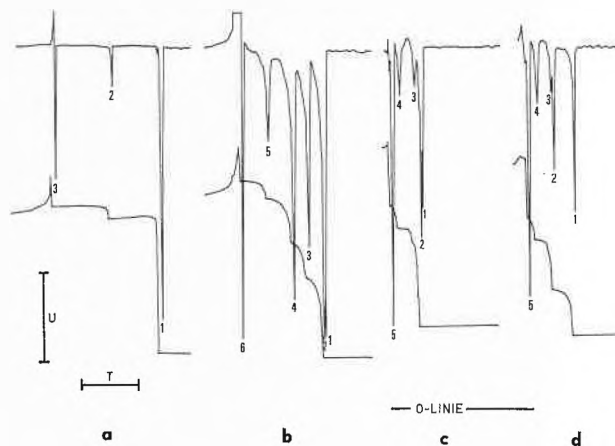


Abb. 2: Vier Pherogramme (mit Digitizer ab Originalkurven auf Schreiber übertragen); untere Kurven: direkte Aufzeichnung der Detektorspannung als Funktion der Zeit; obere Kurve: elektronisch differenziertes Signal. Läufer elektrolyt (Anode) rechts, Verdränger links. Dauer vor Beginn der Trennsignale: etwa 2 min. Probenmenge  $5 \mu\text{l}$ . Verschiebungsgeschwindigkeit (mit M, Abb. 1)  $0,5 \text{ cm/min}$ . Signaleichmarke:  $U = 1 \text{ Volt}$

- a)  $0,003 \text{ M arg}$  (1,2),  $0,00303 \text{ M his}$  (2,3); Strom:  $125 \mu\text{A}$ ;  $T = 1 \text{ min}$   
 b)  $0,0004 \text{ M Peptid A}$  ( $M \sim 1900$ ) (2,3),  $0,0005 \text{ M Peptid B}$  ( $M \sim 3300$ ) (3,4),  $0,00071 \text{ M arg}$  (4,5),  $0,000735 \text{ M his}$  (5,6); Strom  $140 \mu\text{A}$ ;  $T = 30 \text{ sec}$   
 c)  $0,0004 \text{ M Peptid A}$  (3,4),  $0,0002 \text{ M Peptid B}$  (4,5); Hydrolyseprodukt (nicht identifiziert) (2,3); (1,2) entspricht  $6 \text{ ng Na}^+$ ; Strom  $160 \mu\text{A}$ ;  $T = 30 \text{ sec}$   
 d)  $0,0004 \text{ M Peptid A}$  (3,4);  $0,0002 \text{ M Peptid B}$  (4,5);  $0,0005 \text{ M NaCl}$  (1,2); (2,3) Hydrolyseprodukt; Strom  $150 \mu\text{A}$ ;  $T = 30 \text{ sec}$

Im Sinne früherer Überlegungen [1] stellt das omega-phoretische Muster von  $n + 1$  Phasengrenzen ein optimales Trennsystem für die Ionenfokussierung von einander ähnlichen Ionen dar [10]. Jede Zonengrenze enthält einen einstellbaren wandernden pH- oder pL-«Sprung», der selbstschärfend ist und an dem sich bei genügend feiner Abstufung höchstens ein Teilchen mit Hilfe einer Komplexbildungsreaktion fokussieren lässt.

Diese Arbeit wurde in dankenswerter Weise von CIBA-GEIGY AG unterstützt. Herrn E. Jutzi danken wir für apparative Ideen, ihm und M. Gyax, P. Gosteli und K. Schindler für den Aufbau der Apparaturen.

#### Literaturverzeichnis und Anmerkungen

- 1 E. Schumacher: Theory of Focusing Electrophoresis, UCRL-70624 (1963) 208.
- 2 E. Schumacher und T. Studer: Helv. Chim. Acta 47 (1964) 957; Chimia 18 (1964) 188.
- 3 F. Kohlrausch: Ann. Physik 62 (1897) 209; diese Funktion wird später in der elektrochemischen Literatur mit  $\omega$  bezeichnet, z. B. V. P. Dole: J. Amer. Chem. Soc. 67 (1945) 1119.

- 4 *B.P. Konstantinov* und *O.V. Oshurkova*: Dokl. Akad. Nauk. SSSR 148 (1963) 1110; thermometrische Detektion: Zh. Tek. Fiziki 37 (1967) 1745.
- 5 *H. Martin*: Proc. Roy. Soc. London A316 (1970) 493; Anal. Chim. Acta 38 (1967) 233 (keine Hinweise auf Vorpublikationen [2], [4] derselben Methode).
- 6 z. B. *F.M. Everaerts*: Displacement Electrophoresis in Narrow Tubes, Diss. Eindhoven, 1968. Diese Arbeit zeichnet sich dadurch aus, dass die frühere Literatur, z. B. [2], [4], nicht zitiert wird.
- 7 u. a. *P. Boček*, *M. Deml* und *J. Janak*: J. Chromatogr. 106 (1975) 283, und viele weitere Arbeiten anderer Autoren, vor allem im J. Chromatogr. 1968 ff.
- 8 Wir kommen a. a. O. auf diesen bemerkenswerten Unterschied zurück, der einen wesentlichen Vorteil gegenüber allen chromatographischen Methoden mit heterogenen Austauschgleichgewichten darstellt.
- 9 Andere untersuchte Systeme sind bereits kurz beschrieben worden: *P. Ryser*: Jahresversammlung der Schweizerischen Gesellschaft für Analytische und Angewandte Chemie, 5. September 1975 in Bulle, vgl. Mitt. Lebensmittelchemie, im Druck.
- 10 Siehe [1], ferner Diss. *T. Studer*: Universität Zürich, 1965.