bei pH 3,6 abgebildet ist. Hier ist die Zahl der neutralen und basischen Peptide so groß, daß im kathodischen Teil des Pherogramms nur noch ein breiter tiefgefärbter Teppich von Substanzen, die sich nicht weiter differenzieren lassen, nachweisbar ist. Bemerkenswert ist aber, daß die sauren, zum Teil cysteinsäurehaltigen Peptide noch in etwa 19 verschiedene Fraktionen zerlegt werden können. Bei pH 6,1 sind die neutralen Peptide stärker zusammengefaßt (Abb. 13) und man erhält etwa 30 Banden. Der Vorteil der hier angewandten papierelektrophoretischen Methode zur Trennung kleinerer Peptidgemische ist evident, beispielsweise zur schnellen Prüfung der Wirksamkeit chemischer und physikalischer Fraktionierungsmethoden (Gegenstromverteilung, Chromatographie usw.).

⁴⁸ J. P. Dowmont u. J. S. Fruton, J. biol. Chemistry **197**, 271 [1952].

⁴⁹ A. R. Battersby u. L. C. Craig, J. Amer. chem. Soc. **74**, 4019 [1952]; L. C. Craig, Structural Studies with Tyrocidine and Bacitracine, Vortrag Chem. Ges. Basel, 23. Okt. 1952.

Bei sehr komplexen Gemischen wird sich nur durch Heranziehung mehrerer Verfahren, z. B. Fraktionierung am Austausch⁴⁸, Papierelektrophorese, Papierchromatographie und Gegenstromverteilung⁴⁹ ein Erfolg erzielen lassen. Mit der weiteren Prüfung der Wirksamkeit der Methode sind wir beschäftigt⁵⁰.

Auf eine einfache Kombination von Papierelektrophorese und Papierchromatographie wird in einer folgenden Mitteilung hingewiesen⁵¹.

Für die Überlassung von synthetischen Peptiden und anregende Diskussion sind wir Herrn Prof. Dr. Th. Wieland zu besonderem Dank verpflichtet. Herrn Rudolf Warth danken wir für tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung zahlreicher Elektrophorese-Versuche. Der von uns verwendete Hochspannungsgleichrichter wurde von Herrn cand. el. Erwin Schäuble gebaut.

⁵⁰ B. Kickhöfen, O. Westphal u. Th. Wieland, in Vorbereitung.

⁵¹ B. Kickhöfen u. O. Westphal, Z. Naturforsch. **7b**, 659 [1952].

Über eine einfache Kombination von Papierelektrophorese und Papierchromatographie*

VON BOTHO KICKHÖFEN UND OTTO WESTPHAL

Aus den Dr. A. Wander-Laboratorien Säckingen (Baden)

(Z. Naturforschg. **7b**, 659—660 [1952]; eingegangen am 25. Oktober 1952)

Es wird eine allgemein anwendbare zweidimensionale Technik angegeben, nach der ein papierelektrophoretisch getrenntes Stoffgemisch in der zweiten Dimension papierchromatographisch weiter aufgeteilt werden kann.

Die erste Angabe über eine Kombination von Papierchromatographie und Papierelektrophorese im Sinne einer zweidimensionalen Trennung ist in einer Arbeit von Haugeard und Kroner: „Partition Chromatography of Amino Acids with Applied Voltage“¹ enthalten. Die Verfasser legen parallel zur papierchromatographischen Wanderungsrichtung der Aminosäuren an den Rändern des mit Phosphatpuffer von pH 6,2 getränkten und getrockneten Papierblattes Elektroden an und lassen die Papierchromatographie in Phenol unter gleichzeitiger Elektrophorese, letztere senkrecht zur papierchromatographischen Wanderung, vor sich gehen. Nach Beendigung des Versuches befinden sich die neutralen Aminosäuren an der zu erwartenden Stelle, die

basischen sind kathodenwärts, die sauren zur Anode hin verschoben. Indessen scheint die Methode keine Verbreitung gefunden zu haben, was deshalb begreiflich ist, weil die Gleichzeitigkeit der beiden Trennverfahren umständlich ist und sicher zu Störungen Anlaß gibt.

Eine zeitliche Trennung beider Verfahren wird bei der Anordnung von Durum² angestrebt, der einen schmalen Papierstreifen, auf dem die papierchromatographische Trennung bereits vor sich gegangen ist, entsprechend seiner „strip transfer method“² auf ein mit Pufferlösung angefeuchtetes Blatt überträgt und nach Durchführung der Papierelektrophorese auf diese Weise eine zweidimensionale Trennung erreicht.

* Teil eines Vortrages, gehalten auf der Tagung der Deutschen Gesellschaft für Physiologische Chemie, Hamburg am 25. Sept. 1952.

¹ G. Haugeard u. Th. D. Kroner, J. Amer. chem. Soc. **70**, 2135 [1948].

² E. L. Durum, J. Colloid. Sci. **6**, 274 [1951].

Wir waren daran interessiert, ein Verfahren zu finden, mit dessen Hilfe *papierelektrophoretisch*^{3,4} vorgetrennte Fraktionen auf ihre *papierchromatographische* Einheitlichkeit geprüft werden können.

Wenn man ein Blatt von der aus Abb. 1 ersichtlichen Form, nach Befeuchten des schmalen Teiles mit Elektrolytlösung und Behandlung wie bei der normalen Papierelektrophorese (vergl.³) in der in Abb. 1 rechts angegebenen Art zu einem Zylinder rollt, so läßt sich diese Rolle leicht an Stelle des normalen Streifens in die von Michl⁴ (vgl. auch³) beschriebene Apparatur einhängen und die Elektro-

Abb. 1.

phorese in der üblichen Weise durchführen. Nach Trocknen des Blattes werden die herausstehenden Papierteile abgeschnitten und nachfolgend senkrecht zur elektrophoretischen Trennrichtung, eine auf- oder absteigende Papierchromatographie angeschlossen. Voraussetzung für eine wirksame Papierchromatographie ist jedoch die Benutzung von flüchtigen Agenzien (vgl. auch^{2,4}) in der Elektrolytlösung, also von Essigsäure, Ameisensäure, Pyridin usw. oder Kombinationen dieser Substanzen. Um Unregelmäßigkeiten auch bei Verwendung flüchtiger Elektrolyte zu vermeiden, empfiehlt es sich, nach dem Trocknen des papierelektrophoretisch behandelten Blattes, diejenigen Teile des Papiers, die bislang nicht mit Elektrolyt in Berührung gekommen waren, durch Eintauchen in die vorher benutzte Elektrolytlösung

³ B. Kickhöfen u. O. Westphal, Z. Naturforsch. 7b, 655 [1952].

⁴ H. Michl, Mh. Chem. 82, 489 [1951].

⁵ Th. Wieland, Privatmitteilung, die wir bestätigen können.

zu tränken und nochmals im Trockenschrank abzutrocknen.

An Stelle des besonders zugeschnittenen Papierbogens (Abb. 1) kann man auch, praktisch mit gleichem Ergebnis, einen genügend breiten üblichen Elektrophorese-Streifen mit Hilfe einer Nähmaschine an einen größeren Filterbogen zur Chromatographie annähen⁵.

Als Beispiel geben wir das Ergebnis einer zweidimensionalen Trennung von 17 neutralen und sauren Aminosäuren* (Abb. 2**). Die erhaltenen R_F -Werte erwiesen sich als hinreichend reproduzierbar, stimmen aber nicht immer mit den in der Literatur angegebenen Werten⁶ überein, was sicher auf die Vorbehandlung des Papiers zurückzuführen ist.

Die Methode ist allgemein anwendbar.

Experimentelles

Ein Stück Whatmanpapier Nr. 1 in etwa der in Abb. 1 angegebenen Form wurde in Richtung der papierelektrophoretischen Trennung geknickt und mit dem Falz nach unten kurz in eine Rinne gehalten, die eine Mischung von 2-n. Essigsäure und 0,6-n. Ameisensäure (1:1) enthielt. Man ließ die Lösung etwa 2 cm hoch aufsteigen und legte das Blatt auf eine Glasplatte. Es wurde durch Überdecken von Filterpapier unter Zuhilfenahme eines photographischen Rollers abgetrocknet und der Auftragspunkt nochmals nachgetrocknet. Mit einer Platinöse wurde eine wäßr. Lösung des Gemisches folgender Aminosäuren (je 1–5 γ) aufgetragen: Glycin, Alanin, α -Aminobuttersäure, Valin, Leucin, Serin, Threonin, Methionin, Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan, Oxyprolin, Glutaminsäure, Prolin, Cystin, Asparaginsäure und Taurin. Das Blatt wurde, wie in Abb. 1 ersichtlich, zusammengerollt und durch kleine Gardinenklammern in dieser Form gehalten. Nach dem Einhängen in die Apparatur, deren Elektrodenräume, wie in der vorhergehenden Mitteilung³ beschrieben, mit elektrolytfeuchtem Filterpapier ausgekleidet waren, wurde die Rolle mit Hilfe eines Fadens in der Senkrechten gehalten, die in die Elektrodenräume reichenden Papierlaschen festgedrückt und die Trennung bei 2800 Volt 200 Min. lang durchgeführt. Nach der anschließenden Trocknung im Schrank bei 60° C wurden die Papierlaschen abgeschnitten und die bislang noch nicht mit Elektrolyt befeuchteten Papierteile durch Eintauchen benetzt und die Trocknung wiederholt. Die anschließende Papierchromatographie erfolgte aufsteigend, 17 Std. in Pyridin-Eisessig-Wasser (50:35:15). Anfärbung wie üblich mit 0,2-proz. butanolscher Ninhydrinlösung und Farbenentwicklung bei 80° C.

Bei der Durchführung der Versuche wurden wir in dankenswerter Weise von Herrn Rudolf Warth unterstützt.

⁶ P. Decker u. W. Riffart, Chem. Ztg. 74, 261 [1950].

* Die basischen Aminosäuren sind in der zur Differenzierung der neutralen Aminosäuren nötigen Zeit längst aus dem Streifen herausgewandert.

** Abb. 2, s. Tafel S. 660 d.

Abb. 2. Papierelektrophoretisches Verhalten einzelner Aminosäuren, p_H 2,3 (1-n. Essigsäure), 70 Volt/cm (2800 V), 0,5 mAmp/cm Streifenbreite, 180 Min.

(1) Glycin (16,3, 16,4, 16,5 cm); (2) Alanin (15,1, 14,9, 15,0); (3) α -Aminobuttersäure (13,1); (4) Valin (12,5, 12,9, 12,9); (5) Leucin (12,6, 12,9); (6) Serin (11,8, 11,9, 12,0); (7) Threonin (11,2, 11,3, 11,2); (8) Methionin (10,9); (9) Phenylalanin (10,1); (10) Prolin (9,6); (11) Tyrosin (9,3, 9,3, 9,4); (12) Cystin (etwa 8,5); (13) Oxyprolin (8,0); (14) Taurin (5,7, 5,8); (15) Glutaminsäure (3,8); (16) Asparaginsäure (6,8).

Abb. 3. Papierelektrophoretisches Verhalten einzelner Aminosäuren, p_H 1,9 (2-n. Essigsäure, 0,6-n. Ameisensäure, 1:1), 70 Volt/cm (2800 Volt), 0,8 mAmp/cm, 200 Min. (1) Glycin (27,5, 26,8, 26,3 cm); (2) Alanin (24,6, 23,9, 24,0); (3) α -Aminobuttersäure (21,5, 21,9); (4) Valin (21,1, 21,2); (5) Leucin (21,3, 20,4); (6) Serin (20,2, 19,8, 19,2); (7) Threonin (18,4, 17,9, 18,3); (8) Methionin (17,6); (9) Phenylalanin (16,5, 16,8, 16,4); (10) Tyrosin (16,4, 16,1); (11) Tryptophan (15,2, 15,5, 15,7); (12) Prolin (15,5, 15,2); (13) Glutaminsäure (15,5); (14) Cystin (14,2, 14,3, 14,4); (15) Oxyprolin (13,0); (16) Asparaginsäure (7,7, 8,4, 7,8); (17) Taurin (6,0, 6,7).

Abb. 4. Papierelektrophoretisches Verhalten einzelner Peptide, p_H 1,9, 70 Volt/cm (2800 Volt), 1,1 mAmp/cm, 60 Min.

(1) Glycyl-glycin (23,9 cm); (2) Alanyl-glycin (22,8); (3) Diglycyl-glycin (21,4); (4) Glycyl-leucin (19,7); (5) Leucyl-glycin (19,4); (6) Glycyl-valyl-alanin (18,8); (7) Glycyl-leucyl-alanin (18,3); (8) Glutaminyl-glycin (18,3); (9) Leucyl-glycyl-glycin (17,9); (10) Glycyl-tyrosin (16,5); (11) Glycin (16,4); (12) Leucyl-tyrosin (15,6); (13) Glutathion (5,6).

Abb. 5. Trennung von Glycin, Glycyl-glycin und Triglycyl-glycin, p_H 1,9, 70 Volt/cm (2800 Volt), 1,1 mAmp/cm, 60 Min.

(1) Gly-gly (27,5, 27,5); (2) Digly-gly (24,6, 24,6); (3) Gly (19,4, 19,6).

Abb. 6. Trennung von a) Leucyl-glycin und Leucyl-glycyl-glycin; b) Glycyl-tyrosin und Leucyl-tyrosin, p_H 1,9, 70 Volt/cm (2800 Volt), 1,1 mAmp/cm, 105 Min. (Spuren Tyrosin als Verunreinigung des Leucyl-tyrosins.)

(1) Leu-gly (31,8); (2) Leu-gly-gly (29,8); (3) Gly-ty (28,1); (4) Leu-ty (26,5).

Abb. 7. Trennung von Glycyl-glycin und Alanyl-glycin, p_H 1,9, 50 Volt/cm (2800 Volt), 1,0 mAmp/cm, 110 Min.

(1) Gly-gly (30,2); (2) Al-gly (27,8).

Abb. 8. Trennung von a) Leucyl-glycin und Glycyl-leucyl-alanin, b) Glycyl-leucin und Glycyl-valyl-alanin, p_H 1,9, 100 Volt/cm (6000 Volt), 1,3 mAmp/cm, 80 Min.

(1) Leu-gly (37,7); Gly-leu-al (35,9); (3) Gly-leu (38,4); (4) Gly-val-al (36,6).

Abb. 9. Trennung von Alanin. β -Alanin. Di- und Tri- β -alanin. p_H 1,9. 100 Volt cm (6000 Volt), 1,3 mAmp/cm, 50 Min.

(1) β -Al (42,1. 42,0); (2) Di- β -al (39,2. 39,2); (3) Tri- β -al (28,4. 29,0); (4) Al (22,7. 23,7).

Abb. 10. Papierelektrophoretisches Verhalten von Leucyl-glycyl-glycin und seinen Spaltprodukten. p_H 1,9, 100 V/cm, (6000 Volt), 1,3 mAmp/cm. 80 Min.

(1) Gly-gly (46,9. 46,9. 46,5); (2) Gly (38,4. 38,2. 37,8); (3) Leu-gly (37,5. 37,0); (4) Leu-gly-gly (35,8. 35,4. 35,2); (5) Leu (28,8. 28,5).

Abb. 11. Papierelektrophoretisches Verhalten einer Peptid/Aminosäure-Fraktion aus Kaninchen-Urin. p_H 3,6 (Pyridin-Eisessig-Wasser, 1 : 10 : 89). 70 Volt/cm (2800 Volt), etwa 1,4 Amp/cm. Streifenbreite (14 cm), 23 Min.

Abb. 12. Papierelektrophorese eines Salzsäure-Partialhydrolysates von perameisensäure-behandeltem Eialbumin. p_H 3,6, 120 Volt/cm (6000 Volt), etwa 1,4 mAmp/cm Streifenbreite (8 cm), 25 Min.

Abb. 13. Wie Abb. 12. p_H 6,1 (Pyridin-Eisessig-Wasser, 10 : 0,4 : 89,6), 120 Volt/cm (6000 V), etwa 3,5 mAmp/cm Streifenbreite (8 cm), 23 Min.

B. Kickhöfen und Otto Westphal, Über eine einfache Kombination von Papierelektrophorese und Papierchromatographie (S. 659)

Abb. 2. Zweidimensionale Aminosäure-Trennung. Erste Dimension: Papierelektrophorese, p_H 1,9 (2-n. Essigsäure — 0,6-n. Ameisensäure, 1 : 1), 70 Volt/cm (2800 Volt), 0,6 mAmp/cm, 200 Min. Zweite Dimension: Papierchromatographie, 17 Stdn. aufsteigend, Pyridin-Eisessig-Wasser.

(1) Glycin, (2) Alanin, (3) α -Aminobuttersäure, (4) Valin, (5) Leucin, (6) Serin, (7) Threonin, (8) Methionin, (9) Phenylalanin, (10) Glutaminsäure, (11) Prolin, (12) Tyrosin, (13) Tryptophan, (14) Oxyprolin, (15) Cystin, (16) Asparaginsäure, (17) Taurin.

Abb. 1—4. Gewöhnliche Veronal-Acetat-Pufferstreifen p_{H} 8,6.

Abb. 1. 0,01 ccm ^{131}J -Insulinlösung, 0,11-proz.

Abb. 2. 0,02 ccm γ -Globulinlösung, 1,5-proz. + 0,01 ccm ^{131}J -Ins., 0,11-proz.

Abb. 3. 0,01 ccm Humanserum (5,9% Gesamteiweiß) + 0,01 ccm ^{131}J -Ins., 0,11-proz.

Abb. 4. 0,007 ccm Humanalbumin, 5-proz. (Behringwerke) + 0,01 ccm ^{131}J -Ins., 0,11-proz.

Abb. 5. Gelatine-Pufferstreifen (Puffer enthält 0,2 g% Gelatine) + 0,01 ccm ^{131}J -Ins., 0,11-proz.

Abb. 6. Humanalbumin-Pufferstreifen (Puffer enth. 0,2 g% Albumin) + 0,01 ccm ^{131}J -Ins., 0,11-proz.

Abb. 7. Globulin-Pufferstreifen (Puffer enth. 0,15 g% γ -Globulin) + 0,01 ccm ^{131}J -Ins., 0,11-proz.

Abb. 8. Serumpufferstreifen (Puffer enth. 0,2 g% Eiweiß) + 0,01 ccm ^{131}J -Ins., 0,11-proz.

Abb. 9—12. ^{131}J -Ins.-Pufferstreifen, 0,016% Ins. enthaltend.

Abb. 9. + 0,01 ccm Serum Ho. (6,6% Gesamteiweiß).

Abb. 10. + 0,01 ccm Humanalbumin, 5-proz. (Behringw.).

Abb. 11. + 0,02 ccm γ -Globulin (1,5% Eiweiß).

Abb. 12. + 0,01 ccm α_2 -Myelom-Globulin (1,6% Eiweiß).

Abb. 13—17: nur Autoradiographien.

Abb. 13. Serumpufferstreifen (0,15% Eiweiß enth.) + 0,0025 cm³ (= 3 γ) ^{131}J -Ins. (0,12-proz.).

Abb. 14. Ins.-Pufferstreifen (0,01% gewöhnliches Ins. enthaltend) + 0,0025 cm³ (= 3 γ) ^{131}J -Ins. (0,12-proz.) + 0,01 cm³ Humanserum. Infolge eines technischen Mangels (Spannungsabfall) verkürzte Wanderstrecke; die Ins.-Bande reicht jedoch von Albumin bis α_2 -Globulin.

Abb. 15. 0,02 cm³ Serum eines 520 g schweren Meer-schweinchens, dem 25 Min. vorher 28 E. (= 1,12 mg) ^{131}J -Ins. (72 μC) i.v. injiziert worden waren ($\approx$ 0,4 γ ^{131}J -Ins. aufgetragen).

Abb. 16. Wie Abb. 15, jedoch mit Zusatz von 0,01 cm³ ge-wöhnlicher 0,13-proz. Ins.-Lösung.

Abb. 17. Insulinpufferstreifen (0,01% gewöhnliches Ins. enthaltend) + 0,0025 cm³ ^{131}J -Ins. (0,12-proz.).

a) = Autoradiographien.

b) = Photographien der für a) benutzten Streifen, aber nach Färbung mit Amidoschwarz 10 B.

c) = Autoradiographien der ^{131}J -Insulinpuffer-Kontrollstreifen (ohne Zusatz).