

Die zweite Annahme besitzt eine grössere Wahrscheinlichkeit, da nach DOCTOR⁶ bei männlichen Ratten nach Verabreichung von Ascorbinsäure *in vivo* keine Förderung der Umwandlung von Folsäure in Citrovorumfaktor stattfindet; hingegen schützt die im Urin mitausgeschiedene Ascorbinsäure eine labile Vorstufe des Citrovorumfaktors vor Zerstörung durch Luftzutritt und Hitze. Die Untersuchungen von IWAI und NAKAGAWA⁷ zeigen ferner, dass auch im pflanzlichen Gewebe labile Derivate der Pteroylglutaminsäure angenommen werden müssen.

K. ERISMANN und W. H. SCHOPFER

Botanisches Institut und botanischer Garten der Universität Bern, 31. Juli 1959.

Résumé

Des plantules de *Pisum* sont cultivées aseptiquement en milieu synthétique. A la lumière, elles synthétisent plus de facteurs du groupe de l'acide folique, déterminés par voie microbiologique, et plus d'acide ascorbique qu'à l'obscurité. L'adjonction d'acide ascorbique au milieu des plantes cultivées à l'obscurité compense partiellement l'absence de lumière.

⁶ V. M. DOCTOR, J. biol. Chem. 233, 982 (1958).

⁷ K. IWAI und S. NAKAGAWA, Mem. Res. Inst. Food Sci., Kyoto Univ. 15, 48 (1958).

Die Anwendung der wiederholten Entwicklung zur Trennung der Steroide auf dem Papier

Bei der wiederholten Chromatographie entwickeln wir das Chromatogramm zuerst mit einem Lösungsmittel, trocknen und wiederholen nochmals die Entwicklung mit demselben oder einem anderen Lösungsmittel in derselben Richtung; jeder Fleck des ersten Chromatogramms bildet den Start für die zweite Chromatographie. Diese Methode wurde zur Trennung von Gemischen benützt, welche in den einzelnen Lösungsmittelsystemen durchzuführen unmöglich wäre. Mit dieser Methode wurden zum Beispiel Aminosäuren und Peptide^{1,2}, Zucker³ und Porphyrine⁴ getrennt. NEHER und WETTSTEIN⁵ trennten auf diese Weise schwach polare Steroide. In allen diesen Fällen wurde das Chromatogramm immer in derselben Distanz vom Start entwickelt. Beim Vergleich mit der zweidimensionalen Chromatographie bietet diese Methode Vorteile bei der Serienbestimmung oder bei der Trennung einer grösseren Zahl von Proben. Die Flecken der Substanzen werden sehr scharf.

Wir benützen zur Trennung der Steroide, vorzugsweise der Östrogene, die Entwicklung mit zwei verschiedenen Lösungsmitteln auf einem mit Formamid imprägnierten Papier. Die Distanz der Lösungsmittelfront vom Start wurde gewechselt und immer von vorneherein bestimmt. Aus den R_f -Werten der Steroide in den einzelnen abgeteilten Systemen wurde die Beziehung für die Distanz

der Substanz vom Start nach wiederholter Entwicklung bestimmt:

$$D = a \cdot R_{f1} \cdot (1 - R_{f2}) + b \cdot R_{f2}, \quad \text{wo}$$

R_{f1} = R_f der Substanz im 1. Lösungsmittelsystem;

R_{f2} = R_f der Substanz im 2. Lösungsmittelsystem;

a = Distanz der Lösungsmittelfront vom Start nach der 1. Entwicklung;

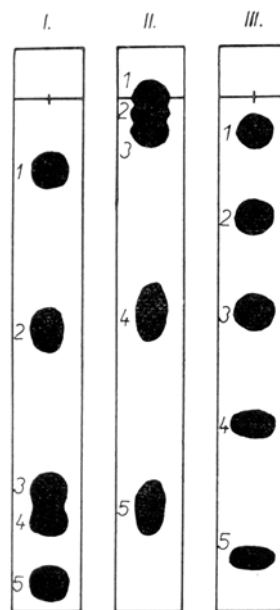
b = Distanz der Lösungsmittelfront vom Start nach der 2. Entwicklung.

Der Wirkungskreis, in welchem sich D bewegen kann, ist durch folgende Beziehung bedingt:

$$0 \leq D \leq a_{\max} \cdot (R_{f1} - R_{f1} \cdot R_{f2} + R_{f2});$$

a_{\max} = maximal mögliche Distanz der Lösungsmittelfront vom Start (abhängig von der Länge des Papiers).

In diesem Wirkungskreis besteht also die Möglichkeit, durch Festsetzung der Distanz Lösungsmittelfront/Start bei Versuchsbedingungen entsprechend der abzutrennenden Substanz zu normieren. So ist es möglich, auf einem einzigen Papier ganz gut Substanzen von sehr verschiedener Polarität zu trennen.



Trennungsschema einiger Steroide in einzelnen Lösungsmittelsystemen und nach wiederholter Entwicklung

Lösungsmittelsysteme:

I. 30% Formamid/Chloroform	40 cm vom Start
II. 30% Formamid/Toluol	40 cm vom Start
III. 30% Formamid a) Chloroform	20 cm vom Start
b) Toluol	40 cm vom Start

1 = Östriol, 2 = Cortisol, 3 = Cortison, 4 = Östradiol-17-beta, 5 = Östron.

Chromatographisches Papier Whatman 1 mit der eingetragenen Probe ziehen wir durch eine 30% Methanol-lösung von Formamid, trocknen zwischen zwei Schichten von Filterpapier und lassen noch 10 min frei unbedeckt liegen. Dann entwickeln wir das Chromatogramm absteigend bis zu der bestimmten Distanz vom Start, lassen bei Zimmertemperatur abtrocknen (nach Entwicklung mit Chloroform genügen 30 min), und ohne weitere Imprägnation setzen wir die Entwicklung mit dem zweiten Lösungsmittel fort (Toluol).

Cortisol, Cortison, Östron, Östradiol-17-beta und Östriol wurden getrennt. Die R_f -Werte und die Distanzen der

¹ S. E. SEVERIN und V. N. FJODOROVA, Dokl. Akad. Nauk SSSR. 82, 443 (1952).

² B. KEIL, Chem. Listy 48, 725 (1954).

³ A. JEANES, C. S. WISE und R. J. DIMLER, Analyt. Chem. 23, 415 (1951).

⁴ T. C. CHU, A. A. GREEN und E. J. CHU, J. biol. Chem. 190, 643 (1951).

⁵ R. NEHER und A. WETTSTEIN, Helv. chim. Acta 35, 276 (1952).

Steroide vom Start in verschiedenen Lösungsmittelsystemen – gemessen und ausgerechnet – sind in den Tabellen I und II angeführt.

Tabelle I
R_f einiger Steroide auf mit 30% Formamid imprägniertem Papier

Mobile Phase	R _f				
	Cortisol	Cortison	Östradiol	Östron	Östriol
Chloroform . . .	0,44	0,76	0,81	0,93	0,13
Tetrachlormethan	0,01	0,05	0,11	0,41	0,00
Toluen	0,02	0,05	0,41	0,78	0,00
Äthylenchlorid. .	0,24	0,54	0,75	0,88	0,07

Kleine Abweichungen werden durch alle Faktoren, welche *R_f*-Werte bei der gewöhnlichen Chromatographie-Au führung bedingen, beeinflusst (Temperaturschwankungen, ungleichmässige Imprägnierung u. a.).

Tabelle II
Distanzen der Steroide vom Start nach wiederholter Entwicklung auf dem mit 30% Formamid imprägnierten Papier
Das Chromatogramm wurde zuerst mit Chloroform bis zu der Distanz von 20 cm entwickelt.

Steroid	Distanz Steroid-Start nach der zweiten Entwicklung in cm					
	mit Äthylenchlorid 37,5 cm		mit Toluen 40 cm		mit Tetrachlormethan 29 cm	
	ber.	gef.	ber.	gef.	ber.	gef.
Cortisol . . .	15,7	16,0	9,4	9,5	9,0	9,5
Cortison . . .	27,7	25,0	16,4	15,5	15,8	15,6
Östradiol-17-β .	32,2	28,6	26,0	23,0	17,6	18,1
Östron	35,5	32,5	35,3	30,7	22,9	20,9
Östriol	5,0	4,5	2,6	2,6	2,6	2,5

Die Methode wurde zur Trennung der Steroide aus Harn und zur quantitativen Bestimmung nach der Elution aus Papier verwendet. Sie hat sich besonders bei der Trennung von Östriol, Östradiol-17-beta und Östron bewährt. Östriol ist viel polarer als die zwei anderen genannten Östrogene; in den Lösungsmittelsystemen mit der mehr polaren mobilen Phase (zum Beispiel Formamid/Chloroform) wandert es weg vom Start, aber Östron und Östradiol haben sehr hohe *R_f*-Werte (Tab. I). Dagegen bleibt Östriol in den Lösungsmittelsystemen mit guter Trennung von Östron und Östradiol (Formamid/Toluen) am Start zurück. Bei der Vereinigung zweier solcher Systeme mit derselben stationären Phase erzielen wir die Trennung von allen drei Östrogenen auf einem Papier (Fig. 1).

M. PRUSÍKOVÁ

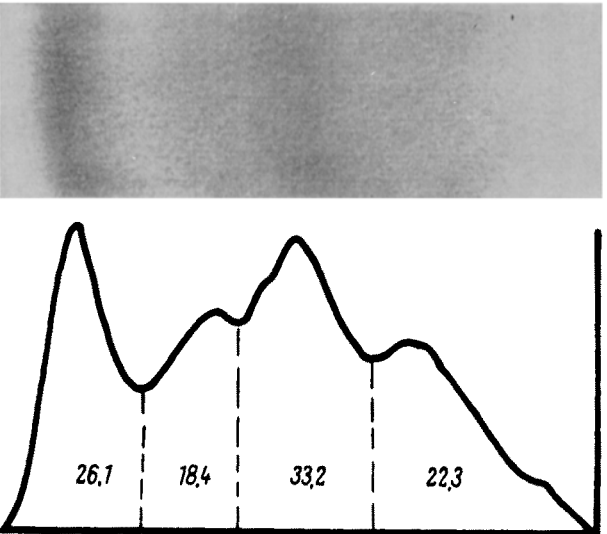
Forschungsinstitut für Endokrinologie, Prag, 18. Juni 1959.

Summary

A method of repeated development with use of different solvents on paper impregnated with formamid was used for the separation of certain steroids. Steroids of very different polarity as estrogens were well separated with one single chromatogram.

Paper Electrophoresis Separation of the Soluble Proteins of Rat Muscle Sarcosomes

The study of the soluble proteins of mitochondria may be interesting, not only to know their normal chemical composition, but also to investigate the nature of the changes occurring in pathological conditions. HOGEBOOM and SCHNEIDER¹ made an ultracentrifugal separation of the soluble proteins of liver mitochondria disrupted by sonic vibration and succeeded in separating at least 4 components. 5 components were detected by DE LAMIRANDE *et al.*² by electrophoresis in a Tiselius apparatus. Extraction of the proteins was obtained by suspending liver mitochondria in diethylbarbiturate buffer, pH 8.6 at 4°C for 3–4 days.



Pherogram of the soluble proteins of rat muscle sarcosomes

In this short communication, the results of paper electrophoretical separation of the soluble proteins of rat muscle sarcosomes are described.

Albine rats weighing 150–180 g were killed by bleeding. Weighed amounts of the leg muscles were finely minced with scissors and then homogenized with 10 volumes of 0.25 M sucrose, containing 0.02 M Tris-HCl buffer, pH 7.4, in a Potter-Elvehjem type apparatus. Tissue debris, nuclei, and myofibrils were discarded by centrifugation at 1000 g for 10 min. Sarcosomes were then sedimented at 12000 g for 30 min. 3 washings of the sediment were made by resuspending in buffered 0.25 M sucrose. The last sediment was then frozen with rapidly expanding gaseous CO₂; the frozen material was first mechanically disrupted by grinding in a mortar previously placed in the ice-box at – 20°C, then put to thaw in a thermostat at 37°C. The entire procedure was repeated 10 times. After the last thawing, the material was resuspended in 2 ml of sodium diethylbarbiturate buffer, pH 8.6, and centrifuged at 20000 g for 1 h. 0.1 ml of the supernatant fluid was then put on Whatman No. 1 paper strips and submitted to electrophoresis in a Jouan apparatus. Best conditions to obtain a good separation were encountered by applying a current of 110 Volts, with

¹ G. H. HOGEBOOM and W. C. SCHNEIDER, *Science* 113, 355 (1951).
² G. DE LAMIRANDE, C. ALLARD, and A. CANTERO, *Cancer* 6, 179 (1953).