

Kombination von Hochspannungselektrophorese und Rundfilterchromatographie

Für komplexe Gemische gestattet die von KICKHÖFEN UND WESTPHAL¹ beschriebene Methode der Kombination von Hochspannungselektrophorese und Papierchromatographie, die später durch INGRAM'S² "finger prints" besonders bekannt wurde, nicht immer eine sichere Trennung von Aminosäuren und Peptiden. Unter gewissen Umständen wird keine übersichtliche Abgrenzung der Komponenten erreicht, insbesondere ist dies nach der chromatographischen Trennung zu beobachten. Eine unzulängliche Trennung der Banden wird entweder durch Diffusionserscheinungen bei sehr langer Versuchsdauer bedingt, oder aber die Substanzen besitzen in dem verwendeten Fließmittel sehr ähnliche R_F -Werte. Zu ungenügender Abgrenzung der Flecken kann es auch kommen, wenn Fraktionen geringerer Konzentration in unmittelbarer Nachbarschaft von solchen mit hoher Konzentration liegen. Durch derartige Probleme wurde die Untersuchung von Fleischextrakten und tryptisch gespaltenem Protein erschwert, die der eine von uns (K.) zur Herstellung bakterieller Nährböden gewonnen hatte.

Durch den Einsatz der Rundfilterchromatographie anstelle der auf- oder absteigenden Chromatographie konnten wir jedoch auch in diesen Fällen auf Grund der radial wachsenden Entwicklungsfläche eine scharfe Bandenbildung erzielen. Diese Trennung lässt sich in bekannter Weise durch zweimaligen Lauf des Fließmittels verbessern³.

Die Rundchromatographie erlaubt wegen der radialen Entwicklung und der dadurch bedingten Ausbreitung der Banden in Kreissektoren normalerweise keine Kombination mit einem zweiten Trennverfahren. Wenn aber durch die Hochspannungselektrophorese in der ersten Laufrichtung eine wenigstens teilweise Auftrennung erfolgt ist, so lassen sich die guten Trenneffekte der Radiärchromatographie zur weiteren Differenzierung schwieriger Stoffgemische ausnutzen.

Zur Trennung eines Gemisches von Peptiden und Aminosäuren mit sauren, basischen und neutralen Komponenten wurde die zu untersuchende Substanz als 5 mm breiter Startstrich in einem Abstand von 10 mm von der Mitte eines Papierbogens (400 × 300 mm) für die Hochspannungselektrophorese aufgetragen und parallel dazu ein Gemisch von Vergleichssubstanzen.

Die Hochspannungselektrophorese erfolgte bei pH 6.0 [Pufferlösung: Pyridin-Eisessig-Wasser (100:10:890, v/v)], 50 V/cm, etwa 2 mA/cm, Temperatur in der Kühlkammer zwischen -1 und $+2^\circ$, Versuchsdauer 40 Min. Als geeignete Papiersorte erwies sich das FN 4-Papier der VEB Spezialpapierfabrik Niederschlag/Erzgeb. Nach Beendigung des Versuches werden die Elektropherogramme getrocknet. In der Mitte zwischen den beiden Startlinien markiert man das Zentrum der Radialentwicklung (vgl. Fig. 1).

Als Fließmittel für die Chromatographie diente ein Gemisch aus Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:1, v/v). Die Chromatographie erforderte im Durchlaufverfahren etwa 12 St. Die weitere Behandlung und Anfärbung des Chromatogramms erfolgte mit den bekannten Methoden.

Auf diesem Wege ist die einwandfreie Trennung der sauren, basischen und fast aller neutralen Aminosäuren möglich. Zur intensiveren Auftrennung der Gruppe

von neutralen Aminosäuren und Peptiden wird diese Fraktion nach der Hochspannungselektrophorese isoliert und durch die "strip transfer method"⁴ erneut aufgetragen. Zur Elektrophorese verwendet man nun eine Pufferlösung vom pH 1.1 [Ameisensäure-Eisessig-Wasser (15:10:75, v/v)]. Da die Substanzen in dieser Pufferlösung ausschliesslich kathodisch wandern, wird der Startpunkt 100 mm von der Anodenseite gewählt. Zur Festlegung des Zentrums für die Radialentwicklung, das etwa in

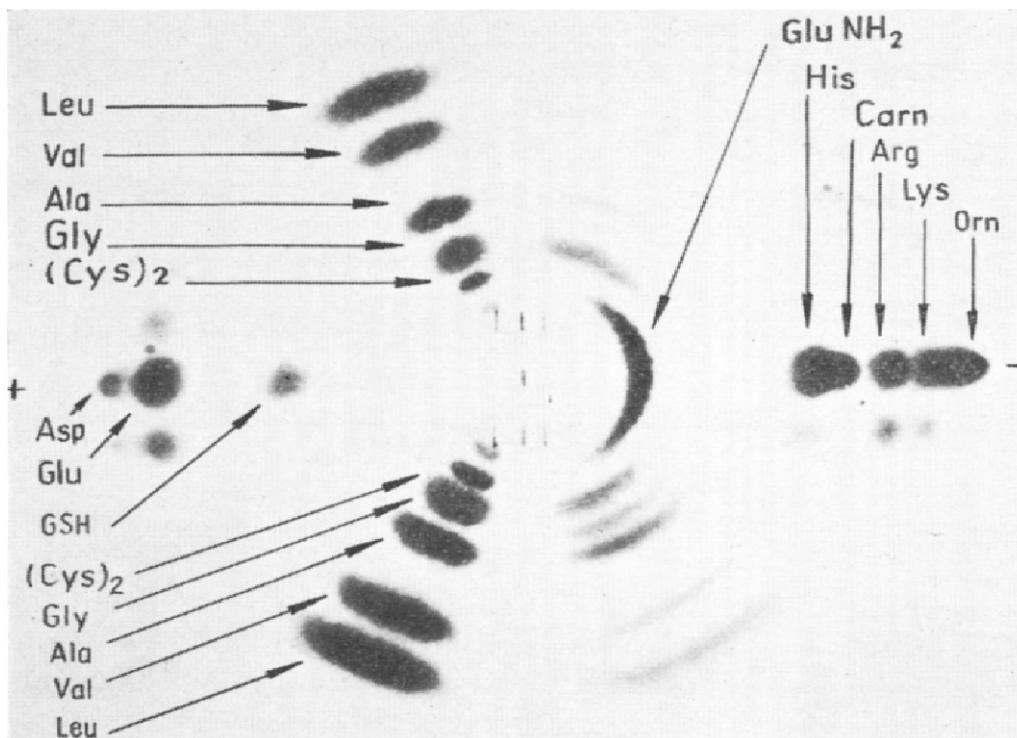


Fig. 1. Aminosäurefraktionierung in zwei Peptid-Totalhydrolysaten. Start zur hochspannungselektrophoretischen Trennung des Peptid-Totalhydrolysates in der oberen und unteren Laufreihe auf dem mittleren Startstrich (in der Mitte der Figur). Mittlere Reihe: Trennung des Modellgemisches saurer und basischer Aminosäuren.

der Mitte der getrennten Substanzen liegen soll, lässt man bei der Elektrophorese an der äusseren Kante des Bogens ein Vergleichsgemisch von Aminosäuren laufen.

Zur Auswertung dieser zweidimensionalen Chromatogramme, von uns als "radial finger prints" bezeichnet, wird der Mittelpunkt der entstandenen Kreissegmente festgelegt. Durch Projektion auf die Ausgangsposition erhält man die ideale Lage der einzelnen Komponenten. Diese "Spektren" sind für Vergleichsmessungen mit Modellgemischen besonders geeignet, da beide Substanzgemische unter streng vergleichbaren Bedingungen getrennt werden. Wie Fig. 1 zeigt, sind die sauren und basischen von den neutralen Aminosäuren in eindeutiger Weise getrennt.

Die Methode ermöglicht aber auch eine erfolgreiche Trennung innerhalb der Gruppe der neutralen Substanzen (Fig. 2). Da die sauren und basischen Aminosäuren gegenüber der neutralen Gruppe durch die Elektrophorese sehr viel weiter vom Startpunkt entfernt werden, erreicht sie bei der radialen Entwicklung das Fließmittel sehr spät, so dass sie fast keine Veränderung ihrer Lage mehr zeigen, während die neutralen Aminosäuren, mit Ausnahme des Paares Glycin-Serin, getrennt werden.

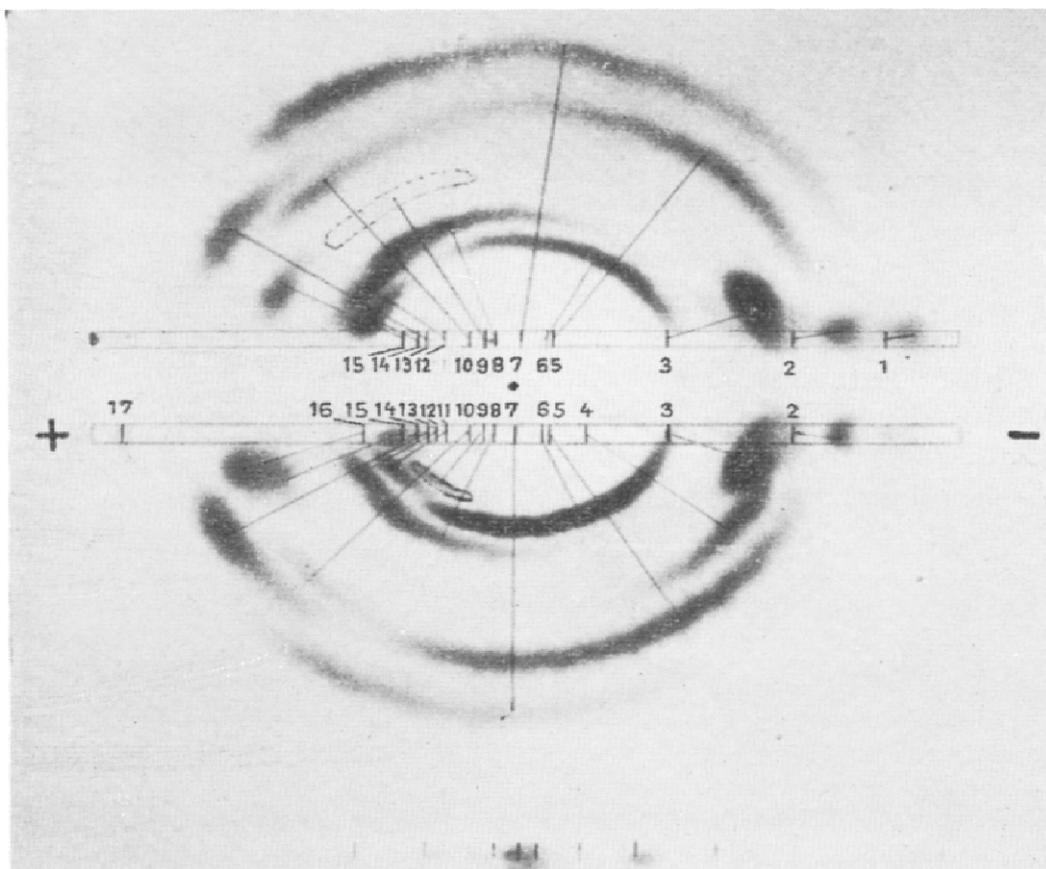


Fig. 2. Fraktionierung der neutralen Aminosäuren in einem Fleischextrakt (bakterieller Nährboden). Oberes Spektrum: Aminosäure-Vergleichsgemisch. Unteres Spektrum: Fleischextrakt. Start (HE): Kathodisch, am Ende der Doppellinie. Start (PC): Im eingezeichneten Punkt (Blattmitte). 1 = β -Ala; 2 = Gly; 3 = Ala; 4 = Peptid; 5 = Val; 6 = Ser; 7 = Leu; 8 = Thr; 9 = Pro (im Vergleichsgemisch) und Peptid (im Fleischextrakt); 10 = Met; 11 = Peptid; 12 = GluNH_2 ; 13 = Phe; 14 = (Cys)₂; 15 = Tyr; 16 = Try; 17 = Tau.

Die Leistungsfähigkeit des Verfahrens konnten wir bei der Trennung von ^{35}S -markierten Cysteinderivaten erneut erproben⁵.

Institut für Biochemie und Lebensmittelchemie*
der Technischen Universität Dresden (D.D.R.)

U. FREIMUTH
K.-H. KLUDAS

1 B. KICKHÖFEN UND O. WESTPHAL, *Z. Naturforsch.*, 7b (1952) 655.

2 V. M. INGRAM, *Nature*, 178 (1956) 792.

3 J. HEILMANN, J. BARROLLIER UND E. WATZKE, *Z. Physiol. Chem.*, 309 (1957) 219.

4. E. L. DURRUM, *J. Colloid Sci.*, 6 (1951) 274.

5 Nicht publizierte Untersuchungen mit D. DÖRR, *Diplomarbeit*, Technische Universität Dresden, 1965.

Eingegangen den 24. Dezember 1965

* Direktor: Prof. Dr. habil. U. FREIMUTH.