

Fig. 1. Die Schwankungen des Gehaltes an Kuhmilchantikörpern in der Milch der stillenden Mutter (Haemagglutinationstest).
Fall 1 HE. — Fall 2 BR. - - - Fall 3 SC.

nehmen, dass die Ergebnisse der in der Tabelle zusammengestellten Milchproben je nach der Zeit der Entnahme anders ausfallen wären.

Es war wahrscheinlich, dass die in der Milch der stillenden Mütter vorkommenden Antikörper auch im Bluts serum nachweisbar sind. Dass dies der Fall ist, zeigt Figur 2 am Beispiel von drei Müttern, bei denen sowohl Blut wie auch Milch auf Vorhandensein von Kuhmilch-antikörpern geprüft wurden.

Wir haben also begründeten Anlass zu der Annahme, dass ein grosser Teil der Antikörper aus dem Blut stammt.

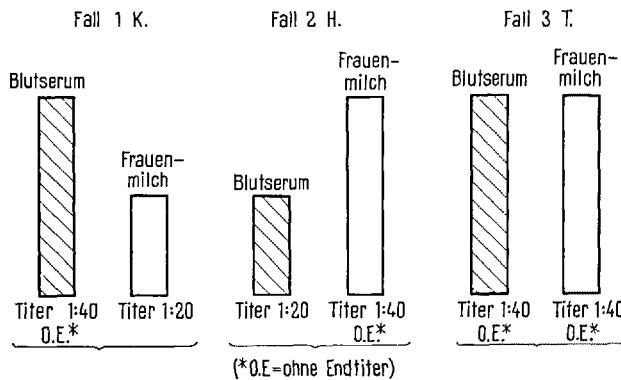


Fig. 2. Antikörper gegen Kuhmilch im Bluts serum und in der sezernierten Milch stillender Frauen

Es besteht aber auch die Möglichkeit, dass in der Brustdrüse lokal Antikörper gebildet werden, eine Annahme, die wir aber bis jetzt nicht zu beweisen vermochten.

Die Befunde über das Auftreten von freien Antikörpern gegen Kuhmilch in der Milch stillender Mütter haben möglicherweise eine praktische Bedeutung für die Pathogenese der Ablactationsdyspepsie, deren Ursache bisher unbekannt ist. Auf Grund unserer Versuche ist anzunehmen, dass bei der Zufuhr von Brustmilch mit Antikörpern gegen Kuhmilch bei Säuglingen klinische Störungen auftreten können, wenn man von der Ernährung mit reiner Brustmilch auf Kuhmilch übergeht. Unter diesen Umständen könnte es zu einer Kuhmilch-Antigen-Antikörperreaktion im Magen-Darm-Tractus kommen, die sich klinisch als Ablactationsdyspepsie manifestiert.

Summary. In a high percentage of lactating mothers the presence of antibodies against cow's milk could be shown in breast milk by means of the hemagglutination test. This passage does not appear to be continuous. Possible implications of these findings with respect to the pathogenesis of 'Ablactation-Dyspepsia' are discussed.

E. BERGER und ANNEMARIE BÜRGIN-WOLFF*

Virologisches Laboratorium des Basler Kinderspitals, Basel (Schweiz), 24. Juli 1962.

* Für die technische Hilfe bei den Untersuchungen sind wir Fräulein A. SAUER sehr zu Dank verpflichtet.

Oligopeptide und Proteine lassen sich z. B. auf diese Weise voneinander trennen.

Da die Elutionsvolumina sehr gut reproduzierbar sind, liegt es nahe, die «Gelfiltration» umgekehrt zur Abschätzung des Molekulargewichts unbekannter Substanzen heranzuziehen. In einer polymerhomologen Reihe werden Unsicherheiten durch unerwünschte Nebeneffekte^{2,3} weitgehend ausgeschaltet. Bei Verwendung von Sephadex als Dünnschicht lassen sich Unterschiede der Wanderungsgeschwindigkeiten im Gel und damit Unter-

¹ J. PORATH und P. FLÖDIN, Nature 183, 1657 (1959).

² J. PORATH, Biochim. biophys. Acta 39, 193 (1960).

³ B. GELLOTTE, J. Chromatography 3, 330 (1960).

PRO EXPERIMENTIS

Neue Anwendungen der Dünnschichtchromatographie

I. Chromatographie an Dextransel

Sephadex¹, ein Gel aus quervernetztem Dextran, hat sich in den vergangenen drei Jahren als Säulenfüllung zur Aufteilung von Stoffgemischen nach dem Molekulargewicht sehr bewährt. Große Moleküle verlassen – bei geeignetem Vernetzungsgrad – die Säule eher als die kleinen, da sie – im Gegensatz zu letzteren – die Gelkörner nicht durchdringen können und daher nur einen Teil des Säulenvolumens zu durchlaufen brauchen. Aminosäuren,

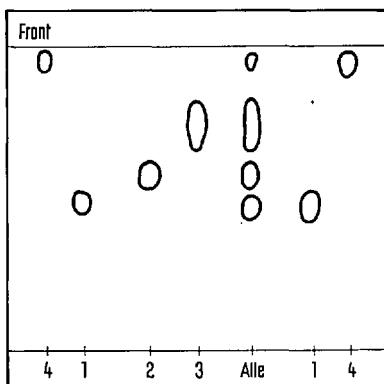


Fig. 1. Wiedergabe eines Dünnschichtchromatogramms an Sephadex G 25 (Erläuterungen im Text).

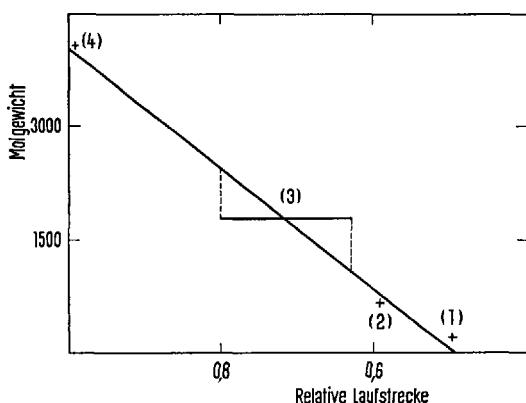


Fig. 2. Zusammenhang zwischen Molekulargewicht (Protein = 4000) und Wanderungstrecke (Protein = 1) bei den nach Figur 1 getrennten Substanzen.

schiede im Molgewicht besonders schnell und einfach erkennen.

Material und Methoden. 7 g Sephadex G 25, fine (200 bis 400 mesh) (Deutsche Pharmacia GmbH, Frankfurt a. M.) werden in 300 ml Wasser suspendiert und zweimal durch Dekantieren mit der gleichen Wassermenge gewaschen. In Form eines eben gut giessbaren Breis wird das Gel in das Dünnschichtstreichgerät⁴ (C. Desaga, Heidelberg) eingeschüttet und auf fünf sorgfältig entfetteten Glasplatten (20 × 20 cm), 0,2 mm dick verstrichen. An der Luft verlieren die Platten nach einiger Zeit ihren feuchten Glanz. Sie werden nur soweit getrocknet, bis die Gelkörper gerade sichtbar sind. (Bei stärkerer Trocknung wandert die Lösungsmittelfront nur noch langsam und unregelmäßig. Durch Besprühen mit Wasser und Abtrocknen mit dem Föhn lassen sich trockene Platten jederzeit wieder verwendungsfähig machen.) Genau wie bei der Dünnschichtchromatographie an Kieselgelschichten⁴ wird ein Tropfen einer 0,01 molaren Lösung am Start aufgebracht und die Platte in das Fliessmittel (Wasser oder Puffer) eingestellt. Je nach Trocknungsgrad erreicht die Front das obere Plattenende in 30 bis 90 min.

Ergebnisse. Die Figur 1 zeigt das Schema eines Dünnschichtchromatogramms auf Sephadex G 25 von Tyrosin (1), Tyrosyl-leucyl-glycyl-glutamyl-phenylalanin (2), dessen Kondensationsprodukt «Plastein»⁵ (3) und von Rinderserumalbumin (4). Die Schicht war in Wasser gequollen, als Fliessmittel wurde 0,05 molares Ammoniak verwendet. Die Entwicklung erfolgte nach dem Trocknen durch Besprühen mit Pauly's Reagenz. (Die Ninhydrinreaktion gelingt ebenfalls, wenn die Platte beim Erhitzen

feuchtgehalten wird.) In der Figur 2 sind die aus zehn Versuchen ermittelten relativen Wanderungsstrecken der genannten Stoffe (Protein-Makromolekül = 1) gegen das Molgewicht aufgetragen. Wegen der Ausschlussgrenze des verwendeten Dextrans kann für das Rinderserumalbumin als «reduziertes Molekulargewicht» etwa 4000 angenommen werden. Der sich aus der graphischen Darstellung ergebende Molgewichtsbereich für das Plastein stimmt mit dem Ergebnis an Sephadex-Säulen und mit der chemischen Endgruppenanalyse gut überein.

Summary. On glass plates, covered with thin layers of Sephadex G 25, amino acids, peptides and proteins can be separated with water or diluted ammonia as developing solvent.

H. DETERMANN

II. Gradientenchromatographie an DEAE-Sephadex

Nachdem gezeigt werden konnte, dass das Dextrans auf Glasplatten haftet und dass daran chromatographiert werden kann, lag es nahe, die gegenüber den Cellulose-Austauschern⁶ wesentlich höhere Austauschkapazität und die bessere Haftung von DEAE-Sephadex für die Dünnschichtchromatographie auszunutzen. Verbunden mit einer Gradientelution ist das hier geschilderte Verfahren neben der analytischen Anwendung bestens geeignet, mit äußerst geringem Substanzverbrauch die richtigen Bedingungen für eine Säulentrennung ausfindig zu machen.

Material und Methoden. 7 g DEAE-Sephadex A 25, fine (200–400 mesh) werden mit 0,5 n HCl, Wasser, 0,5 n NaOH und wieder mit Wasser, am besten auf der Zentrifuge, behandelt und dann mit der Säure des später zu verwendenden Puffers an der Glaselektrode auf den gewünschten pH-Wert eingestellt. Der Austauscher wird nun sorgfältig mit Wasser ausgewaschen und, wie voranstehend beschrieben, auf 15 Glasplatten 5 × 20 cm aufgebracht.

Von einem Glaszyylinder von 6 cm Durchmesser und 30 cm Höhe ist durch eine herausnehmbare Filterplatte (1) unten eine ca. 1 cm hohe Kammer abgeteilt, in der sich ein Rührmagnet (2) befindet und in deren Außenwand eine kapillare Zuleitung (3) eingeschmolzen ist (siehe Figur 3). Ein Überlauf (4) ist 1 cm über der Siebplattenoberkante angebracht. Die Dünnschichtplatte (5 × 20 cm) wird auf die Siebplatte gestellt und taucht dann etwa 1 cm in die Pufferlösung ein. Damit beim Rühren die Schicht nicht mechanisch abgelöst wird, befestigt man mit Hilfe eines Gummiringes (6) einen 1,5 × 5 cm Filtrierpapierstreifen (7) am eintauchenden Ende, 2,5 cm vom unteren Rand entfernt kann man bequem 3 Proben nebeneinander auftragen.

Der Gradient für die Chromatographie wird erzeugt, indem aus einer Bürette oder aus einer Dosierpumpe die zweite Salzlösung in die Mischkammer fließt und dort durch den Magnetrührer mit der ersten gemischt wird. Durch den Überlauf wird das Volumen konstant gehalten. Naturgemäß muss die Zugabegeschwindigkeit von der Wanderung der Pufferfront abhängig gemacht werden. Hält man die Dichte und Feuchtigkeit der Schicht immer konstant wie hier beschrieben, so kann man mit 40 bis 60 min für die Dauer des Experiments rechnen.

Ergebnisse. Die beiden Milchsäuredehyrogenasen aus Rinderherz waren als Gemisch kristallisiert⁷ und dann

⁴ Zusammenfassung E. STAHL, Angew. Chem. 73, 646 (1961).

⁵ H. DETERMANN, O. ZIPP und TH. WIELAND, Liebigs Ann. Chem. 651, 172 (1962), und varangehende Arbeiten.

⁶ K. RÄNDERATH, Angew. Chem. 73, 674 (1961); 74, 484 (1962).

⁷ Wir danken Herrn P. DUESBERG für die freundliche Überlassung.

durch Chromatographie an DEAE-Sephadex⁸ präparativ getrennt worden. Die beiden einheitlichen Isozyme wurden jede für sich und im nativen Gemisch an DEAE-Sephadex in der Phosphatform (pH 7,2) unter Vorlage von 60 ml m/50 Phosphatpuffer pH 7,2 und allmählicher Zugabe von 50 ml des gleichen Puffers, 1 normal an Kochsalz, chromatographiert. Die Figur 4a zeigt das Ergebnis nach dem Sprühtest mit DPNH/Brenztraubensäure. Innerhalb einer Stunde gelingt auf diese Weise die Reinheitsprüfung und Analyse von Enzymen und ihren Gemischen.

Von Nucleotiden ist es seit langem bekannt, dass man sie an DEAE-Cellulose trennen kann. Für die rasche Analyse eines Gemisches der *Adenin-Nucleotide* empfiehlt sich unser Verfahren an DEAE-Sephadex in der Formiat-Form. Als Vorlage dienen 60 ml 1 normale Ameisensäure, der Gradient besteht aus 50 ml 10 normaler Ameisensäure, 2 molar an Ammoniumformiat. Die Figur 4b zeigt das Ergebnis, das nach dem Sprühen mit einer Fluoresceinlösung in Methanol durch die Fluoreszenzlösung der untersuchten Verbindungen sichtbar gemacht wurde⁹.

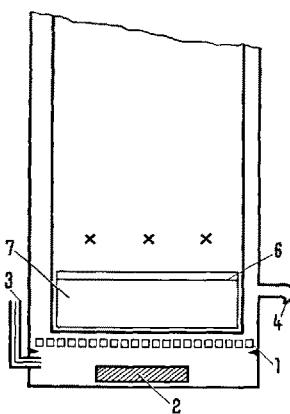


Fig. 3

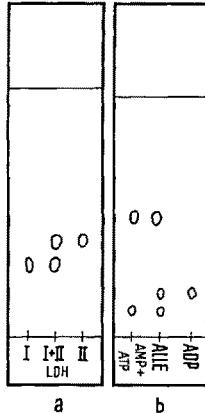


Fig. 4

Fig. 3. Schnitt durch den unteren Teil des Glaszyinders zur Erzeugung des Gradienten für die Dünnschichtchromatographie.

Fig. 4. Wiedergabe zweier Gradientenchromatogramme an DEAE-Sephadex von (a) Milchsäuredhydrogenasen und (b) Adenin-Nucleotiden.

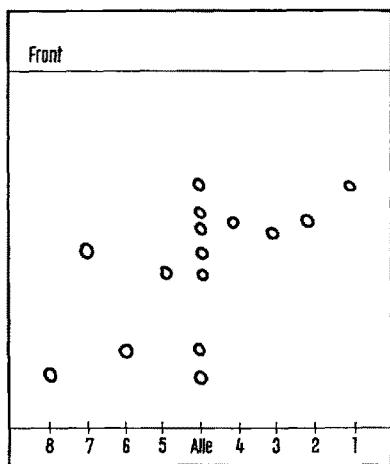


Fig. 5. Wiedergabe eines Dünnschichtchromatogramms an acetylierter Cellulose (1 = Anthracen, 2 = Phenanthren, 3 = Fluoranthen, 4 = Pyren, 5 = 1,2-Benzanthren, 6 = Chrysene, 7 = Perylen und 8 = 3,4-Benzpyren).

Summary. Thin layers of DEAE-Sephadex on glass plates can be used in a simple gradient-chamber for chromatographic separation of LDH-isozymes by increasing the concentration of NaCl, or of AMP, ADP, and ATP by increasing the concentration of formic acid and ammonium formate.

TH. WIELAND und H. DETERMANN

III. Chromatographie polycyclischer Aromaten an acetylierter Cellulose

Acetyliertes Filtrerpapier¹⁰ hat sich früher für die chromatographische Trennung kondensierter Benzolkohlenwasserstoffe als geeignet erwiesen¹¹⁻¹³. Wir haben jetzt gefunden, dass Pulver von Acetylcellulose auf Dünnschichtplatten sich besonders gut zum selben Zweck eignen.

Acetylierung von Cellulosepulver¹⁴. 30 g Cellulosepulver (Ederol Nr. 221, quantitativ) werden 15 bis 30 min im Trockenschrank bei 110°, dann einige Stunden im Exsiccator über konz. Schwefelsäure getrocknet. Dann wird das Pulver bei 70° mit einem Gemisch von 225 cm³ Acetanhydrid, 675 cm³ Benzol und 0,9 cm³ konz. Schwefelsäure gut gerührt, wobei nach 3 h 10, nach 6 h 20 und nach 9 h 26 Gewichtsprozent Acetyl eingetreten sind. Am besten hat sich das am stärksten acetylierte Pulver bewährt. Es wird daher nach 9 h abgesaugt, mit Methanol gewaschen, einige Stunden unter Methanol aufbewahrt, abgesaugt und mit Äther gewaschen. Trockensaugen, im Trockenschrank bei 90° vollends trocknen und im Exsiccator aufbewahren.

Chromatographie. Zur Anfertigung der chromatographischen Platten führt man das Pulver mit Alkohol zu einem streichbaren Brei an, der in üblicher Weise auf Glasplatten als dünne Schicht aufgebracht wird, die man an der Luft trocknen lässt. Das zu chromatographierende Substanzgemisch wird in verdünnter methanolischer Lösung als winziger Tropfen aufgebracht. Als Fliessmittel hat sich die Mischung von Methanol-Äther-Wasser (4:4:1 Vol.) am besten bewährt. Es steigt unter unseren Bedingungen in 40 min ca. 10 cm hoch. Man trocknet die Platte nach dem ersten Durchgang an der Luft und lässt das Lösungsmittel noch zweimal in derselben Weise aufsteigen. Die im UV-Licht fluoreszierenden oder nach Besprühen mit verdünnter Fluoresceinlösung im UV-Licht dunkel erscheinenden Verbindungen der Legende zu Figur 5 haben sich dann, wie nebenstehend aufgezeichnet, voneinander getrennt.

Summary. Highly acetylated cellulose powder can be spread on glass plates from a suspension in alcohol. Such layers are very suitable for chromatographic separation of polycyclic aromatic hydrocarbons.

TH. WIELAND, G. LÜBEN und H. DETERMANN

Institut für organische Chemie der Universität Frankfurt am Main (Deutschland), 8. Juni 1962.

⁸ H. DETERMANN und F. ORTANDERL, zitiert von TH. WIELAND und G. PFLEIDERER, Angew. Chem. 74, 261 (1962).

⁹ TH. WIELAND und L. BAUER, Angew. Chem. 63, 511 (1951).

¹⁰ F. MICHEEL und H. SCHWEPPPE, Naturwissenschaften 39, 380 (1952).

¹¹ D. S. TARBELL, E. G. BROOKER, A. VANTERSPOOL, W. CONWAY, C. J. CLAUS und T. J. HALL, J. Amer. chem. Soc. 77, 767 (1955).

¹² TH. WIELAND und W. KRACHT, Angew. Chem. 69, 172 (1957).

¹³ T. M. SPOTSWOOD, J. Chromatogr. 2, 90 (1959); 3, 101 (1960).

¹⁴ Im Prinzip wie Papier nach F. MICHEEL und H. SCHWEPPPE, Michrochimica Acta 1954, 53.