

molekulare Stoffe eignet sich besser die IR- oder UV-Spektroskopie dünner Filme. Damit diese beim Kontakt mit Aromastoffen nicht zerstört werden, ist es vorteilhaft, sie auf ein Schutzgitter, z.B. Perlonfüll, aufzubringen. Mit Hilfe dieser Methode gelingt es, viele Aromastoffe an Lebensmittel und hochmolekulare Naturstoffe, insbesondere an Kohlenhydrate, durch Inclusion zu binden. Diese Art der Bindung wurde durch STAUDINGER [2] an Cellulose im Zusammenhang mit deren Acetylierung erforscht. In feuchtem (gequollenem) Zustand dringt hierbei eine Flüssigkeit in das Innere der aus dem Polymeren gebildeten Aggregate ein und wird beim Trocknen darin festgehalten. Erst erneuter Wasserzusatz kann sie wieder freisetzen. Es wurde nun gefunden, daß Aromastoffdämpfe sich ähnlich verhalten. Die IR-Spektren gestatten außerdem in einzelnen Fällen den Nachweis von Wasserstoffbrückenbindungen bei der Inclusion, insbesondere bei derjenigen von Alkoholen und Carbonylverbindungen. Zwischen Kohlenhydraten und flüchtigen Aminen wurde eine besonders starke reversible Bindung beobachtet. Daneben traten in geringem Maß bei Mono- und Disacchariden Maillard-Reaktionen ein. Auch andere chemische, unter geeigneten Bedingungen reversible Bindungen (Bildung von Salzen und Estern) können gelegentlich gefunden werden. Aus allen Versuchen folgt, daß der Wassergehalt der Lebensmittel bei der Sorption von Aromastoffen ausschlaggebend ist.

Eingegangen am 22. Januar 1968

[1] KNÖZINGER, H., u. H. SPANNHEIMER: J. Chromatogr. 16, 1 (1964). — [2] STAUDINGER, H., K. H. IN DEN BIRKEN u. M. STAUDINGER: Makromol. Chemie 9, 148 (1953).

Quantitative elektrophoretische Trennung von Insulin und Glukagon

M. ZIEGLER und H. G. LIPPMANN

Institut für Diabetes, „Gerhardt Katsch“,
Karlsburg (Greifswald),
Bereich experimentelle Diabetesforschung

Professor Dr. GERHARD MOHNIKE in memoriam zum 50. Geburtstag

Obwohl es gelungen ist, Insulin und Glukagon mittels Stärke-Gel-Elektrophorese [1] sowie Ionenaustauscherchromatographie [2] zu trennen, ist eine Methode zur präparativen Darstellung beider Hormone bisher nicht bekannt, vielmehr wird

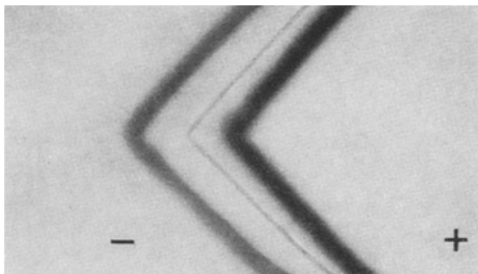


Fig. 1. Agarose-Elektrophorese eines Insulin-Glukagon-Gemisches (1% I./0,1% G. in wäßriger alkalischer Lösung). Zentrale Linie (Graben) Auftragsort, Kathodenbande Glukagon, Anodenbande Insulin

durch wiederholte Kristallisation in der Nähe des IEP das Erreichen eines Minimums der Verunreinigung angestrebt [3]. Ein quantitatives Trennverfahren, das die präparative Reindarstellung beider Peptide gestattet, wurde von uns unter Einsatz der Agarose-Elektrophorese entwickelt: als Trägermedium dient Agarose 1,2% in Triäthanolamin-HCl/NaOH pH 7,4/ $\mu = 0,05$ nach [4]. In den ausgestanzten Gräben wird ein Insulin-Glukagon-Gemisch eingebracht und die Elektrophorese unter den üblichen Bedingungen bei einer Laufzeit von 90 min und 6,6 V/cm durchgeführt. Nach Anfärbung mit 0,05% Bromphenolblau in essigsaurer Lösung stellen sich zwei scharf abgegrenzte Banden mit unterschiedlicher Laufrichtung dar, wobei die Anodenbande dem Insulin, die Kathodenbande dem Glukagon zuordenbar ist (Fig. 1). Dieser Effekt erklärt sich aus der Lage der IEP beider Peptide. Exakte Angaben zum IEP für das Glukagon fehlen bisher, nach [5] liegt er zwischen pH 7,5 und 8,5, während er für das

Insulin einheitlich um pH 5,3 liegend mitgeteilt wurde [3, 6]. Wir ermittelten die IEP mittels nephelometrischer Messung wäßriger alkalischer Lösungen beider Peptide unter Titration mit $n/100$ HCl und Rücktitration mit $n/100$ NaOH und konnten ihn für das Insulin mit $\text{pH } 5,39 \pm 0,06$ reproduzieren, für das Glukagon fanden wir ihn bei

$$\text{IEP}_{\text{Glukagon}} \text{ pH } 7,07 \pm 0,03 (n = 14).$$

Über die praktische Verwertbarkeit dieser Methode zur Gewinnung höchstgereinigter Insulin/Glukagon-Präparate werden wir ausführlich a. a. O. [8] berichten.

Die Untersuchungen wurden mit Mitteln eines Forschungsauftrags des Ministeriums für Gesundheitswesen der DDR durchgeführt. — Herrn Dr. JACOBI, Novo-Industri A/S Kopenhagen, danken wir für die Bereitstellung geeigneter Insulin- und Glukagon-Präparate.

Eingegangen am 26. Februar 1968

[1] BARRETT, R. J., H. FRIESEN, and E. B. ASTWOOD: J. biol. Chem. 237, 432 (1962). — [2] COLE, R. D.: J. biol. Chem. 235, 2300 (1960). — [3] SCHICHTKRULL, J.: In: Insulin-Kristalle, Kopenhagen 1961. — [4] RAUEN, H. M.: In: Biochem. Tschr. Berlin 1964, S. 98. — [5] STAUB, A., L. SINN, and O. K. BEHRENS: J. biol. Chem. 214, 619 (1954). — [6] DECKERT, T.: In: Rep. Steno Mem. Hosp. (Kbh.) XII (1965). — [7] Acta biol. med. germ. (im Druck).

Glucagon Stimulation of Adenyl-Cyclase Activity of Cardiac Muscle

HARRY D. BROWN, S. K. CHATTOPADHYAY, and
W. S. MATTHEWS

Biochemistry Section, Cancer Research Center, Columbia,
Missouri, U.S.A.

Glucagon, known to produce an inotropic effect in isolated heart [1], has been shown, in the present study, to markedly stimulate nuclear adenyl-cyclase activity of rabbit heart.

Cell nuclei were isolated by differential centrifugation [2]. The pellet, after $20,000 \times g$ centrifugation in 0.25 M sucrose, was used as the source of enzyme activity. Cyclizing reaction was initiated by mixing 0.5 ml of the enzyme with 0.5 ml of glucagon in aqueous solution or water and 4 ml of a solution containing the substrate, activating metal, and competitive enzyme inhibitors. Concentrations of glucagon in reaction mixtures ranged from 1×10^2 to $4 \times 10^2 \mu\text{g}$. The working substrate solution contained 15.08 mg disodium ATP, 5.88 mg magnesium sulfate, 2.84 mg sodium fluoride, 8.88 mg caffeine in 4 ml of 0.05 M Tris-HCl buffer.

The reaction mixture was incubated at 37°C for 15 min and the reaction stopped by transferring the reaction vessel to a boiling-water bath for 3 min. After this, the mixture was cooled in an ice bath and then centrifuged. Clear supernatant, containing the products of the reaction, was placed upon a Dowex 1 X 4 (formate) column. Gradient elution with formic acid provided separation of cyclic 3',5'-adenylic acid from other nucleotides and components of the solution. Cyclic AMP was identified by UV absorption characteristics and by mobility (R_f) as compared with a standard sample (obtained from Sigma Chemical Company). The table indicates the relationship between cyclic AMP production in the enzyme catalyzed reaction and glucagon concentration.

Table. Relationship between the presence of glucagon in the reaction mixture and the production of cyclic AMP by the adenyl cyclase system

Glucagon [$\mu\text{g} \times 10^2$]	Cyclic AMP produced [$\mu\text{mol} \times 10^{-8}$]	% Stimulation
0	56	—
1	126	125
2	186	232
3	235	319
4	179	219

Glucagon has been reported to stimulate the accumulation of 3',5'-AMP by liver particles, though it is without effect upon muscle preparations from dog [3]. It has been widely assumed that the action of glucagon in the stimulation of phosphorylase activity is less direct than that of the catecholamines upon the adenyl-cyclase system and involves the inter-