

Tabelle 3. Homolytische Spaltung von Disulfiden durch Cyanisopropyl-Radikale oder durch Makroradikale beider Styrol-Polymerisation.

Disulfid	Spaltung [%] durch Cyanisopropyl-Radikale [53] [a]	K (°C) [b] bei der Styrol-Polymerisation [17, 18]
(C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> —S—) <sub>2</sub>	11,8	0,14(99) 0,06(50)
(CH <sub>3</sub> O—C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> —S—) <sub>2</sub>	16,8	0,33(99) [c]
((CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> N—C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> —S—) <sub>2</sub>	31	
(ROOC—C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> —S—) <sub>2</sub>	13,3	0,11(50)
(C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> —CH <sub>2</sub> —S—) <sub>2</sub>	5,8	0,01(99)
(n-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> —S—) <sub>2</sub>	1,2	0,005(99) [d]
	5,5	
	12	

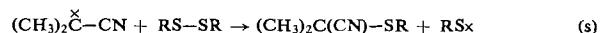
[a] Man ließ die Disulfide unter standardisierten Bedingungen mit einem zehnfachen Überschuß Azo-iso-butyronitril in Dioxan bis zur völligen Zersetzung der Azoverbindung reagieren und bestimmte anschließend den Umsetzungsgrad aus der Konzentration des nicht umgesetzten Disulfids.

[b] Zur Definition und Bestimmung der Kettenübertragungskonstante K vgl. S. 634, Fußnote [\*].

[c] Übertragungskonstante des Di-(p-äthoxyphenyl)-disulfids.

[d] Übertragungskonstante des Diäthyl-disulfids.

leichteren elektronen-liefernde Gruppen in p-Stellung die radikalische Verdrängungsreaktion am Schwefel der S—S-Bindung. In Übereinstimmung damit ist die Kettenübertragungskonstante des Dianisyldisulfids größer als die des Diphenyldisulfids. Von den aliphatischen Disulfiden reagieren allein die mit gespanntem Fünf- und Sechsring mit dem trügen Cyanisopropyl-Radikal [54]; die stärkere Spannung beim Fünfring äußert sich dabei deutlich in der höheren Reaktionsgeschwindigkeit bei radikalischem Angriff. Bemerkenswerterweise wird Di-benzyldisulfid wesentlich leichter radikalisch geöffnet als die rein aliphatischen Disulfide; auch die Kettenübertragungskonstante ist etwas größer als bei aliphatischen Disulfiden.



Eingegangen am 21. Januar 1964 [A 366]

[54] Kürzlich haben W. A. Pryor u. P. K. Platt [J. Amer. chem. Soc. 85, 1496 (1963)] die Reaktion zwischen Phenyl-Radikalen und aliphatischen Disulfiden untersucht. Mit steigender sterischer Hinderung der Disulfidgruppe tritt die radikalische Verdrängungsreaktion am Schwefel zurück, zugunsten einer Dehydrierung durch das Phenyl-Radikal. Die Wirkung der sterischen Hinderung aliphatischer Disulfide bei einer radikalischen Verdrängungsreaktion am Schwefel kommt auch in den kleineren Kettenübertragungskonstanten verzweigter Disulfide zum Ausdruck.

## Stofftrennung durch Chromatographie an porösen Gelen [\*]

VON DR. H. DETERMANN

INSTITUT FÜR ORGANISCHE CHEMIE DER UNIVERSITÄT FRANKFURT (MAIN)

*Die Fraktionierung von Substanzgemischen auf Grund von Molekulargewichtsunterschieden ist seit einigen Jahren in Chemie und Biochemie zu einer besonders wichtigen Methode geworden. Es wird ein Überblick über Theorie und Praxis solcher Trennoperationen mit Hilfe poröser Gele gegeben und auf die mannigfaltigen Anwendungsmöglichkeiten der Gele hingewiesen. Im vorliegenden Referat ist die Literatur bis Mitte 1963 berücksichtigt.*

### 1. Einleitung

Bei den modernen Stofftrennungsmethoden, z. B. der Verteilungschromatographie, der Gegenstromverteilung und der Adsorptionschromatographie oder der Ionen-austauscher-Chromatographie und der Elektrophorese nutzt man unterschiedliche Lösungseigenschaften oder Ladungszustände aus. Unterschiede in den Molekülgrößen [\*\*] macht man sich hier erst seit vergleichsweise kurzer Zeit zunutze [1]. Immerhin stellen die Zeolithe [2]

[\*] Erweiterte Fassung von Vorträgen: Farbwerke Hoechst, Frankfurt(Main)-Höchst, Dezember 1962; Österreichische Gesellschaft für Physiologische Chemie, Wien, Februar 1963; Kolloid-Gesellschaft, Bad Oeynhausen, Oktober 1963.

[\*\*] In dieser Arbeit werden Molekülgrößen und -größen als proportional angenommen.

[1] Zusammenfassungen über Teilgebiete: P. Flodin, Dissertation, Universität Uppsala (Schweden), 1962 [zu erhalten bei A. B. Pharmacia, Uppsala (Schweden)]; J. Porath, Advances Protein

schon länger bekannte Molekularsiebe dar, in denen durch die Raumnetz-Struktur der SiO<sub>4</sub>- und AlO<sub>4</sub>-Tetraeder Hohlräume (etwa 50 % des Volumens) bestehen, die durch Poren verbunden sind. Solche heute synthetisch hergestellte Zeolithe werden z. B. bei der Gastroknung oder der Abscheidung von Olefinen aus Gasgemischen verwendet, sie haben auch bei extremen Temperaturen eine spezifische Affinität zu polaren Stoffen.

Die erste allgemeiner anwendbare Methode zur Trennung großer Moleküle von kleinen Molekülen, die Di-

Chem. 17, 209 (1962); B. Gelotte: New Biochemical Separations. D. van Nostrand, London 1963; A. Tiselius, J. Porath u. P. A. Albertsson, Science (Washington) 141, 13 (1963).

[2] Zusammenfassung bei: E. A. Scheuermann, Chemiker-Ztg. 20, 767 (1961).

alyse durch poröse Häute, wurde nun von der makroskopischen Filtration her erschlossen. Mittlerweile ist die Dialysetechnik durch die Entwicklung von Membranen mit abgestuften, wohldefinierten Porengrößen sehr verfeinert worden. Die „Ultrafilter“ oder „Membranfilter“ [\*\*\*] bestehen aus Schäumen von Cellulose-Derivaten oder -Regeneraten und werden in der Biochemie vorwiegend zur Anreicherung und Entsalzung von Proteinen, oder auch bei der Elektrodialyse verwendet. Hier sind – anders als bei den Zeolithen – Poren und Hohlräume identisch und machen ca. 80 % des Filter-Volumens aus.

An besonders kunstvollen Membranen aus Agar wurde kürzlich durch Diffusion von Proteinen und Viren verschiedenen Partikelgewichts die Porengröße bestimmt [3]. *Craig* benutzte vorbehandelte Cellulose-Membranen, um aus der Diffusionsgeschwindigkeit auf die Form von Peptid- und Proteinmolekülen in Lösung schließen zu können [4]. *Syngle* berichtet über Versuche zur Trennung von Cytochrom c, Insulin, Gramicidin S und Valin durch mehrstufige Elektrodialyse [5], wobei die Ionen während ihrer Wanderung im elektrischen Feld Membranen zunehmender Dichte passieren müssen und dadurch je nach Größe mehr oder weniger aufgehalten werden. Diese Technik ist mit vielstufigen Dialyseverfahren von *Signer* [6] und *Craig* [7] zu vergleichen, bei denen das Dialysat der ersten Einheit zur Dialysierflüssigkeit der zweiten gemacht wird, usw. Die Trennleistungen der Dialyse-Methoden sind, was Qualität und Quantität anbelangt, am Aufwand gemessen gering.

Ein wesentlich besserer Trenneffekt läßt sich mit dem einfachen chromatographischen Verfahren der Gelfiltration erreichen. Dazu quillt man polymere Materialien mit Lösungsmitteln; die Poren [a] füllen sich dabei mit Lösungsmittel. Steht der Durchmesser dieser Poren im richtigen Verhältnis zur Molekülgröße der zu trennenden Substanzmischung, dann diffundieren beim Beladen des Gels die Moleküle, je nach ihrer Größe mehr oder weniger oder gar nicht, in die Poren. Den größten Teilchen steht nur das Lösungsmittel außerhalb des Gels zur Verfügung; sie verlassen daher die Gelpackung (z. B. senkrecht montierte Säule) beim Eluieren zuerst, während die kleineren Moleküle verschiedene große Bereiche der Innenphase durchdringen. Die Stoffe erscheinen daher im Eluat der Chromatographie-Säule in der Reihenfolge abnehmender Molekulargewichte. Man kann die Gelfiltration daher als multiplikative Dialyse auffassen, wobei die Gelkörner gleichzeitig Dialysemembran und Behälter für das Dialysat darstellen. Durch die zahlreichen sich über die

[\*\*\*] Hersteller und Literaturnachweis: Membranfilter-Gesellschaft GmbH., Göttingen.

[3] G. K. Ackers u. R. L. Steere, *Biochim. biophysica Acta* 59, 137 (1962).

[4] L. C. Craig u. E. Harfenist, vorgetragen auf dem 6. Europäischen Peptid-Symposium, Athen 1963; vgl. *Angew. Chem.* 75, 63 (1964).

[5] R. L. M. Syngle u. M. A. Youngson, *Biochem. J.* 78, 31 P (1961).

[6] R. Signer, H. Hänni, W. Koestler, W. Rottenburg u. P. v. Tavel, *Helv. chim. Acta* 29, 1894 (1946); P. v. Tavel, *ibid.* 30, 334 (1947).

[7] L. C. Craig u. T. P. King, *J. Amer. chem. Soc.* 77, 6620 (1955); 78, 4170 (1956).

Länge einer Säule wiederholenden Trennvorgänge steht die Gelfiltration zu den Dialyseverfahren bezüglich der Wirksamkeit im gleichen Verhältnis wie die Verteilungschromatographie zum Ausschütteln im Scheidetrichter (vgl. [8]).

## 2. Gel-Bildner

In Form der Kunstharz-Ionenaustrauscher werden schon länger poröse Materialien zur Chromatographie verwendet, und in einzelnen Fällen sind tatsächlich Gelfiltrations-Effekte beobachtet worden. So wurde bald bekannt, daß nicht nur die Quellung, sondern auch die Kapazität für große Gegenionen vom Vernetzungsgrad abhängig ist [9, 10]. Die Ionen der Makromoleküle werden daher rascher als gleichgeladene niedermolekulare Ionen eluiert [11–13]. So gelang schon 1952 *Partridge* an sulfonierte Polystyrolharz eine Trennung zwischen Aminosäuren, Peptiden und Proteinen [14]. Selbst für ungeladene Polyalkohole besteht an Ionenaustauscher-Harzen ein qualitativer Zusammenhang zwischen Elutionsvolumen [b] und Molekulargewicht [15, 16]. Nach diesen mehr zufälligen Beobachtungen begann man bald, systematisch nach porösen Gelen für die Molekulargewichts-Chromatographie zu suchen, wobei etwa die folgenden Forderungen gestellt werden:

Das Material muß in den gewünschten Lösungsmitteln unlöslich, aber quellbar sein; die Durchmesser der hierbei geschaffenen Poren müssen vergleichbar mit der Größe (einschließlich Solvathülle) der zu trennenden Stoffe sein. Diese Eigenschaften haben Partikel aus Makromolekülen, die durch Vernetzung ihre Löslichkeit verloren und eine Porenstruktur erhalten haben. Für eine optimale Anpassung an das Trennproblem muß man die Porengröße exakt variieren können. Partikel aus stark vernetzten Gelen sind schon für relativ kleine Moleküle nicht mehr zugänglich. Das Gelbett [c] sollte keine adsorptiven Eigenschaften haben, damit sich die zu trennenden Stoffe ihren Größenverhältnissen gemäß frei bewegen können. Die Form und Größe der Gel-Partikel in der Säule ist ausschlaggebend für die Durchflußgeschwindigkeit. Kugelförmige Teilchen sind unregelmäßig begrenzt vorzuziehen, da sie auch bei hoher Durchflußgeschwindigkeit eine feine Körnung und damit eine rasche Gleichgewichtseinstellung gestatten.

Bei einigen natürlichen Materialien, an denen Gelfiltrationsphänomene beobachtet wurden, ist die Bindung zwischen den Makromolekülen gelegentlich nur

[a] Das trockene Material ist nicht porös; die gewissermaßen „verklebten“ Poren sind aber durch die Vernetzung der Polymeren vorgebildet.

[8] R. L. Kisliuk, *Biochim. biophysica Acta* 40, 531 (1960).

[9] R. Kunin u. R. J. Meyers, *Discuss. Faraday Soc.* 7, 114 (1949).

[10] D. K. Hale, D. J. Packham u. K. W. Pepper, *J. chem. Soc. (London)* 1953, 844.

[11] H. Deuel, J. Solms u. L. Anyas-Weisz, *Helv. chim. Acta* 33, 2171 (1950).

[12] R. W. Richardson, *J. chem. Soc. (London)* 1951, 910.

[13] T. R. Kressmann, *J. physic. Chem.* 56, 118 (1952).

[14] S. M. Partridge, *Nature (London)* 169, 496 (1952).

[b] Unter dem Elutionsvolumen  $V_e$  versteht man die Eluatmenge, die vom Beginn der Elution bis zum Erscheinen der halben Maximalkonzentration des zu eluierenden Stoffes abgenommen wird (vgl. Abb. 1).

[15] R. M. Wheaton u. W. C. Baumann, *Ann. New York Acad. Sci.* 57, 159 (1953).

[16] R. T. Clark, *Analytic. Chem.* 30, 1676 (1958).

[c] „Gelbett“ nennt man das im Lösungsmittel gequollene Polymere in der Chromatographiesäule.

durch Wasserstoffbrücken bedingt. Suspensionen von Agargel [17, 18] und aus ihm bereiteter Agarose [19] dienen zur Fraktionierung von Makromolekülen nach dem Molekulargewicht. Hierbei scheint namentlich die Agarose, die keine polaren Gruppen besitzt, besonders bei sehr hohen Molekular- und Partikelgewichten [d] das geeignete großporige Material zu sein, zumal *Hjertén* [20] ein Verfahren zur Herstellung gleichmäßiger, kugelförmiger Partikeln beschrieben hat.

Bei Gelen aus Naturprodukten, für die der Vernetzungsgrad vorgegeben ist, kann man die Porengröße dem Trennproblem anpassen, indem man bei Bereitung des Gels aus der Trockenmasse die Menge des Quellungsmittels variiert. In Suspensionen aus steifen Gelen haben die Gele einen hohen Vernetzungsgrad, während die Poren weniger steifer Gele (geringeres Trockengewicht) auch für große Moleküle zugänglich sind [e]. Man erkennt diesen Zusammenhang auch an homogenem Stärkegel bei der elektrophoretischen Trennung von Proteinen nach *Smithies* [21]. Tabelle 1 lässt erkennen, wie sehr die Raumnetzstruktur des Trägers die Wanderung von Makromolekülen im elektrischen Feld beeinflusst [22]. Stärkekörner sind ebenfalls zu chromatographischen Trennungen zwischen Aminosäuren und Peptiden [23] sowie zwischen Oligo- und Polysacchariden [24] herangezogen worden.

Tabelle 1. Molekulargewicht und relative Wanderungsgeschwindigkeit von Proteinen in einem Stärkegel im elektrischen Feld.

Protein	Molekulargewicht	Relat. Wanderungsgeschw. auf Papier	im Stärkegel
β-Lipoprotein	1 300 000	1,0	0,14
Transferrin	90 000	1,0	0,88
Hämoglobin	60 000	1,0	1,0

Im Prinzip kann man aus jedem polymerisierbaren Monomeren durch Mischpolymerisation mit einem bifunktionellen Monomeren vernetzte Makromoleküle erhalten. Unter diesen vollsynthetischen Materialien gibt es nicht nur in Wasser quellbare Gele wie Polyacrylamid [25–27], sondern auch in organischen Lösungsmitteln quellende, z. B. vernetztes Polystyrol [28] [\*]. Ein rein aliphatisches Netzwerk bildet Poly-methyl-

[17] A. Polson, *Biochim. biophysica Acta* 50, 565 (1961).

[18] P. Andrews, *Nature (London)* 196, 36 (1962).

[19] S. Hjertén, *Arch. Biochem. Biophysics* 99, 466 (1962).

[d] Es werden auch Zellen und Zellbestandteile chromatographiert.

[20] S. Hjertén, *Biochim. biophysica Acta*, im Druck.

[e] Trockenes Agar-Agar wird durch Kochen mit Wasser gequollen und anschließend abgekühlt. Dabei entsteht eine puddingartige Masse, die mechanisch zerkleinert wird und in kaltem Wasser nicht mehr weiter quillt. Je steifer das Gel ist, desto kleiner sind die resultierenden Poren.

[21] O. Smithies, *Biochem. J.* 61, 629 (1955).

[22] O. Smithies, *Advances Protein Chem.* 14, 65 (1959).

[23] B. Lindqvist u. T. Storgårds, *Nature (London)* 175, 511 (1955).

[24] G. H. Lathe u. C. R. J. Ruthven, *Biochem. J.* 62, 665 (1956).

[25] D. J. Lea u. A. H. Sehon, *Canad. J. Chem.* 40, 159 (1962).

[26] S. Hjertén u. R. Mosbach, *Analytic. Biochem.* 3, 109 (1962).

[27] S. Hjertén, *Arch. Biochem. Biophysics Suppl.* 1, 147 (1962).

[28] M. F. Vaughan, *Nature (London)* 188, 55 (1960).

[\*] Polystyrol neigt allerdings stark zur Adsorption von Aromaten, ist also für die Gelfiltration nicht ideal.

methacrylat, das mit Glykoldimethacrylat vernetzt ist und auch in Perlenform hergestellt werden kann [29]. Bei den vollsynthetischen Gelen wird die Porengröße entweder durch Variation des Verhältnisses von Monomerem zu Vernetzer, oder durch Variation der Menge und Art [30] des bei der Polymerisation anwesenden Lösungsmittels erreicht.

Als dritte Gruppe gibt es noch „teilsynthetische“ Gele, bei denen natürliche Makromoleküle durch Vernetzungsmittel ihre „Raumstruktur“ erhalten, beispielsweise Latex, die mit Schwefel durch Vulkanisieren vernetzt wird. Kleine Gummistücke (gemahlene Chirurgenhandschuhe) quellen in organischen Lösungsmitteln und wirken als Molekularsieb [31]. *Deuel* und *Neukom* berichteten 1954 als erste über ein modifiziertes pflanzliches Polysaccharid, mit dem sich, in Wasser gequollen, eine Proteinlösung entsalzen ließ [32].

Durch Veräthern wasserlöslicher Dextransmoleküle mit Epichlorhydrin erhielten *Porath* und *Flodin* ein in Wasser nur noch quellbares Gel [33], das jetzt unter dem Handelsnamen „Sephadex“ [\*\*] bekannt ist. Je mehr Hydroxylgruppen im Dextran durch Ätherbrücken ersetzt werden, desto kleiner werden die Poren des Gels. Die intensive Prüfung der Porenverhältnisse solcher Dextransgele und die erste theoretisch fundierte Anwendung der Gelfiltration durch *Porath*, *Flodin*, *Gelotte* und *Bennich* [33–39] hatten zusammen mit der Tatsache, daß Sephadex in mehreren wohldefinierten Vernetzungsgraden (neuerdings in Perlenform) käuflich ist [\*\*], zu der seit 1959 stürmischen Entwicklung der Gelfiltration zu einer weit verbreiteten Laboratoriumsmethode beigetragen. In mehr als 95 % aller Arbeiten über Chromatographie an Gelen benutzte man Dextransgele. Daher wird in dieser Übersicht auch vorwiegend auf dieses Material Bezug genommen.

### 3. Theorie der Gelfiltration

Wir hatten die Gelfiltration als multiplikative Dialyse aufgefaßt, können sie aber ebenso gut als Verteilungchromatographie bezeichnen. Das Gel ist Träger der stationären Lösungsmittelphase und verleiht dieser gleichzeitig die Eigenschaft, für Moleküle ab einer gewissen Größe nur teilweise zugänglich zu sein. So läßt sich zu jedem Stoff für die Verteilung zwis-

[29] H. Determann, G. Lüben u. Th. Wieland, *Makromolekulare Chem.*, im Druck.

[30] J. C. Moore, vorgetragen bei der „Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy“, April 1963.

[31] P. J. Brewer, *Nature (London)* 188, 934 (1960); 190, 625 (1961).

[32] H. Deuel u. Neukom, *Natur. Plant Hydrocolloids* 11, 51 (1954).

[33] J. Porath u. P. Flodin, *Nature (London)* 183, 1657 (1959).

[\*\*] Hersteller: A. B. Pharmacia, Uppsala (Schweden). Erhältlich in Deutschland: Deutsche Pharmacia GmbH, Frankfurt(Main)1.

[34] J. Porath, *Clin. chim. Acta* 4, 776 (1959).

[35] P. Flodin u. K. Granath: *Symposium über Makromoleküle* in Wiesbaden. Verlag Chemie, Weinheim 1959.

[36] B. Gelotte, *J. Chromatogr.* 3, 330 (1960).

[37] J. Porath, *Biochim. biophysica Acta* 39, 193 (1960).

[38] H. Bennich, *Biochim. biophysica Acta* 51, 265 (1961).

[39] P. Flodin, *J. Chromatogr.* 5, 103 (1961).

schen den beiden Phasen („inneres“ und „äußeres“ Lösungsmittel) ein Verteilungskoeffizient  $K_d$  definieren, der hier eine Funktion der Molekülgröße ist. Dieser  $K_d$ -Wert ist aber nur dann ein echter Quotient aus zwei Konzentrationen, wenn entweder kleine Moleküle unbehindert diffundieren können (beide Konzentrationen gleich;  $K_d = 1$ ) oder wenn große Moleküle in das Lösungsmittel in den Gelpartikeln überhaupt nicht eindringen können (Innenkonzentration = 0;  $K_d = 0$ ). Nun ist aber die Porengröße in den Gelkörpern keineswegs einheitlich; so daß bei mittleren Molekülgrößen der  $K_d$ -Wert ein Maß für den einer speziellen Molekülsorte zugänglichen Teil der stationären Phase ist (in dem Lösungsmittel der Gelphase ist also die eindringende Substanz heterogen verteilt).

Diese Stoffkonstante  $K_d$  läßt sich aus dem Elutionsvolumen  $V_e$  errechnen. Für im Verhältnis zur Porengröße große Moleküle ( $K_d = 0$ ) entspricht das Elutionsvolumen dem Lösungsmittelvolumen außerhalb der Gelpartikel  $V_o$ , für kleine Moleküle ( $K_d = 1$ ), die frei diffundieren können, kommt noch das Volumen innerhalb der Gelpartikel  $V_i$  dazu. Da mittelgroßen Molekülen  $0 < K_d < 1$  jeweils nur ein Teil der Innenphase zugänglich ist, beträgt ihr Elutionsvolumen [40]

$$V_e = V_o + K_d \cdot V_i. \quad (1)$$

Für den  $K_d$ -Wert ergibt sich daraus

$$K_d = \frac{V_e - V_o}{V_i} \quad (2)$$

Das äußere Volumen  $V_o$  und das innere Volumen  $V_i$  sind die charakteristischen Volumina der Gelpackung. Man erhält  $V_o$  aus dem Elutionsvolumen einer im Verhältnis zur Porengröße hochmolekularen Substanz und  $V_i$  aus der Lösungsmittelaufnahme des Trockengels.  $V_i$  ist natürlich vom Vernetzungsgrad abhängig, und zwar bedeutet geringe Vernetzung eine hohe Lösungsmittelaufnahme, während viele Brückenbindungen ein relativ wenig quellbares Gel bedingen. Um den Quellungsgrad quantitativ zu bestimmen, wird eine gewogene Menge Trockengel im überschüssigen Lösungsmittel gequollen, welches dann mit einer Korbzentrifuge abgetrennt wird. Die hierbei gemessene, auf 1 g bezogene Lösungsmittelaufnahme wird mit Quellvermögen  $S_r$  (solvent regain) [Volumen/1 g Trockengel] bezeichnet. Bei den Dextrans, für die diese allgemein gültige Theorie entwickelt worden ist (vgl. [39]), ist Wasser das Quellmittel; ihr „water regain“  $W_r$  ist auf der Packung angegeben. Für das innere Volumen gilt dann die einfache Beziehung

$$V_i = a \cdot W_r, \quad (3)$$

wenn  $a$  die Trockeneinwaage der Säulenfüllung in Grammen ist. Falls  $a$  nicht bekannt ist, läßt sich das innere Volumen  $V_i$  auch aus dem mittleren spezifischen Gewicht  $d = (W_r + 1) a / (V_t - V_o)$  und dem Gesamtvolume  $V_t$  des Gelbetts berechnen:

$$V_i = \frac{W_r \cdot d}{W_r + 1} (V_t - V_o) \quad (4)$$

[40] P. Flodin, Dissertation, Universität Uppsala (Schweden), 1962.

Wenn zwei Stoffe mit verschiedenem Molekulargewicht an einem bestimmten Gel die  $K_d$ -Werte  $K_d'$  und  $K_d''$  haben, dann gilt für ihre Elutionsvolumina nach Gl. (1)  $V_e' = V_o + K_d' V_i$  und  $V_e'' = V_o + K_d'' V_i$ . Das Separationsvolumen  $V_s$  ist ein Maß für die Trenngüte einer Säule:

$$V_s = V_e' - V_e'' = (K_d' - K_d'') V_i \quad (5)$$

In Abbildung 1, dem Elutionsschema für drei Stoffe mit den  $K_d$ -Werten 0, 0,5 und 1, sind die interessierenden Volumen angegeben.

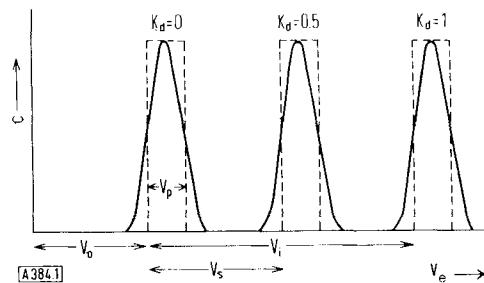


Abb. 1. Schematisches Elutionsdiagramm für drei Stoffe mit den  $K_d$ -Werten 0, 0,5 und 1.

(- - -): Theoretische Form der Banden;  
 (—): Experimentelle Gaußsche Verteilungskurven.  
 $V_o$  und  $V_i$  = Lösungsmittelvolumen außerhalb bzw. innerhalb des Gels;  
 $V_p$  = Probevolumen;  $V_s$  = Separationsvolumen.

Jedes Gelbett kann durch verschiedene Parameter charakterisiert werden. So ist es zweckmäßig, die Größe der Moleküle, die gerade nicht mehr in die Gelkörper eindringen können, d. h. die „Ausschlußgrenze“ und die Volumenverhältnisse zu kennen. Tabelle 2 gibt für die verschiedenen Sephadex-Typen die entsprechenden Zahlenwerte. Die Ausschlußgrenzen sind mit Dextran-Fraktionen ermittelt worden. Es sieht so aus, als ob die Ausschlußgrenzen für Proteine wesentlich höher und für Nucleinsäuren wesentlich niedriger anzusetzen wären.

Tabelle 2. Eigenschaften käuflicher Sephadex-Dextrangele (Quellung in Wasser; Volumen-Angaben sind auf 1 g Trockengel bezogen) [\*].

Typ	Ausschlußgrenze (Molekulargewicht)	$W_r$	$d$	$V_t$	$V_o$	$V_i$
G-25	5000	$2,5 \pm 0,2$	1,13	5	2	2,5
G-50	10000	$5,0 \pm 0,3$	1,07	10	4	5
G-75	50000	$7,5 \pm 0,5$	1,05	13	5	7
G-100	100000	$10 \pm 1,0$	1,04	17	6	10
G-200	200000	$20 \pm 2,0$	1,02	30	9	20

[\*] Über Einzelheiten der experimentellen Technik informieren die Firmenschriften des Herstellers sowie [39, 41].

Direkt als gequollene Gels bereitete Polyacrylamid- und Agarosegele werden durch das chromatographische Verhalten von Standardsubstanzen charakterisiert. In Abbildung 2 ist der Zusammenhang zwischen dem „ $R_f$ -Wert“ ( $V_o/V_e$ ) verschiedener Stoffe und der absoluten Konzentration an Gelbildner (die ein Maß für die mittlere Porengröße ist) für die Agarosegele [12] graphisch dargestellt. An Hand eines solchen Diagramms kann man, ähnlich wie nach Tabelle 2, für ein Trennproblem das Gel mit optimaler Verteilung der Porengröße auswählen.

Aus Gleichung (5) und Abbildung 1 erkennt man, daß bei kleinem  $\Delta K_d$  das innere Volumen  $V_i$  groß und das

[41] H. Determann u. B. Gelotte in H. M. Rauen: Biochemisches Taschenbuch. 2. Aufl., Springer, Berlin 1964, Bd. 2.

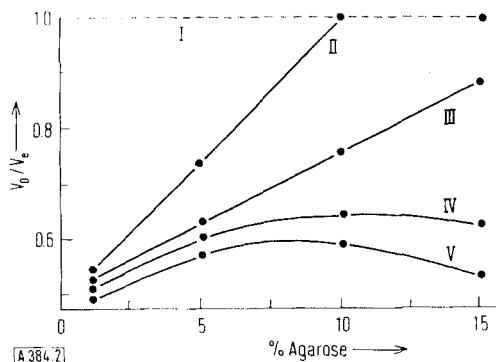


Abb. 2. Abhängigkeit des „Rf-Werts“ ( $V_0/V_0$ ) von der Agarose-Konzentration (bezogen auf Trockengel) im Gel [19]. I: Tusche; II: R-Phycoerythrin; III: Hämoglobin; IV: Cytochrom c; V: Kaliumbichromat.

Probenvolumen  $V_p$  (Lösungsvolumen, in dem das Stoffgemisch auf die Säule aufgegeben wird) möglichst klein sein muß, um eine befriedigende Trennung zu erzielen. Es gelten also hier die Regeln der Säulenchromatographie: Lange Säulen und scharfe Startzonen verbessern die Trennung.

Diese Anwendungen des Molekülsiebeffekts werden nachstehend unter dem Stichwort *Gelchromatographie* beschrieben. Falls bei der Trennung niedermolekularer Substanzen in Gl. (5) die Differenz ( $K_d - K_d'$ ) ihren oberen Grenzwert (eins) erreicht, entspricht das Separationsvolumen theoretisch dem inneren Volumen. Wenn es nicht zu einer diffusionsbedingten Verbreiterung der Banden käme, könnte man das Probenvolumen so groß wie  $V_i$  wählen. Immerhin erzielt man voll befriedigende Ergebnisse, wenn das Probenvolumen 20–30 % vom gesamten Säulen-Volumen  $V_t$  beträgt. Solche Trennungen werden hier als *Gelfiltration* im engeren Sinne bezeichnet.

Bei der Gelfiltration kommt man mit relativ kurzen Säulen aus und vermeidet dadurch eine Verdünnung der getrennten Stoffe. Die Konzentration der zu trennenden Substanzen hat, im Gegensatz zu allen anderen chromatographischen Trennverfahren, keinen Einfluß auf die Gelfiltration. Lediglich bei hoher Viscosität ( $< 5 \text{ cP}$ ) wird die Diffusion eingeschränkt, was zu unscharfen Trennungen führt [39].

#### 4. Sorptionserscheinungen [36]

Vorwiegend bei niedermolekularen Substanzen beobachtet man an Packungen aus stark vernetztem Dextrangel ein von der Theorie der Gelfiltration abweichendes Verhalten. Diese sekundären Effekte lassen sich in zwei Gruppen einteilen:

a) Einige Substanzen werden – durch ihre Struktur bedingt, und weitgehend unabhängig vom Elutionsmittel – auf der Säule retardiert ( $K_d$  ist größer als aus der Theorie erwartet). So werden vor allem Borat- und Hydroxyd-Ionen durch Komplexbildung zurückgehalten, des weiteren sehr viele aromatische und heterocyclische Verbindungen. Da die Adsorption völlig reversibel ist, können so z. B. Phenol [42, 43], Nucleinsäure-Bau-

[42] A. Nilsson, Acta chem. scand. 16, 31 (1962).

[43] J. B. Woof, Nature (London) 195, 184 (1962).

steine [44, 44a], tryptophan-haltige Peptide [45], Aminosäuren [36, 37, 46] oder Extraktstoffe des Röstkaffees [47] fraktioniert werden.

b) Beim Eluieren mit reinem Wasser kann man – wegen des sehr geringen Carboxylgruppen-Gehaltes der Dextrangele – einen Ionenaustausch beobachten: Basen werden adsorbiert und Säuren finden sich früher als erwartet im Eluat, wenn sie in sehr kleiner Menge aufgebracht werden. Schon geringe Elektrolyt-Zusätze zum Elutionsmittel oder auch zur Probelösung beseitigen diese Erscheinung. Auch diese Salzeffekte lassen sich zur Trennung von Proteinen [48–50], Peptiden [51] oder Phosphorsäure-Derivaten [52] etwa gleichen Molekulargewichts heranziehen.

Beim Arbeiten mit radioaktiv markierten Anionen wie Jodid [53] oder Phosphat [54] ist besondere Vorsicht geboten. Wenn die Ionengesamtkonzentration nicht hoch ist, kann ein sehr kleiner, überhaupt nur radiochemisch feststellbarer Teil dieser Anionen durch die Carboxylgruppen an der freien Diffusion behindert sein und im äußeren Volumen  $V_0$  bleiben. Es wird dann zusammen mit dem Makromolekülen eine geringe Radioaktivität eluiert, welche eine radiochemische Markierung der Makromoleküle vortäuscht.

#### 5. Gelfiltration

Zur quantitativen Trennung großer Moleküle von niedermolekularen Begleitern sind stark vernetzte Gele (mit relativ kleinen Poren) notwendig. Hierfür werden vorwiegend die Dextrangele Sephadex G-25 und G-50 (vgl. Tabelle 2) verwendet. Am häufigsten wird die Gelfiltration bei der Entsalzung von Kolloid-(vielfach Protein)-Lösungen angewendet. Die Lösungen werden dabei kaum merklich verdünnt, wenn die oben diskutierten Volumenverhältnisse berücksichtigt werden. So zeigt Abbildung 3 die Elutionskurven zweier Versuche mit der gleichen Säule, wobei sich die Probenvolumen um den Faktor 40 unterscheiden. Auch unter den extremen Bedingungen des Versuchs B ist das Protein praktisch völlig entsalzt, obwohl seine Lösung nur um 25 % verdünnt worden ist, während im Fall A eine zehnfache Verdünnung in Kauf genommen werden mußte [39] (vgl. [55]).

Eluiert man statt mit Wasser mit einer anderen Salzlösung, so werden Ionen der Pufferlösung ausgetauscht

- [44] B. Gelotte, Naturwissenschaften 48, 554 (1961).
- [44a] Th. Hohn u. W. Pollmann, Z. Naturforsch. 18b, 919 (1963).
- [45] Th. Wieland et al., unveröffentlichte Versuche.
- [46] O. Zipp, Diplomarbeit, Universität Frankfurt (Main), 1960.
- [47] H. Streuli, Chimia 16, 371 (1962).
- [48] C. Liébeg u. M.-J. Degueldre-Guillaume, J. Chromatogr. 7, 130 (1962).
- [49] F. Miranda, H. Rochat u. S. Lissitzky, J. Chromatogr. 7, 142 (1962).
- [50] A. N. Glazer u. D. Wellner, Nature (London) 194, 862 (1962).
- [51] J. V. Pierce u. M. E. Webster, Biochem. biophysic. Res. Commun. 5, 353 (1961).
- [52] B. N. Ames, R. G. Martin u. B. J. Garry, J. biol. Chemistry 236, 2019 (1961).
- [53] H. Spitzky, H. Skrube u. K. Müller, Mikrochim. Acta 1961, 296.
- [54] W. Gruber, persönliche Mitteilung.
- [55] G. E. Connell u. R. W. Shaw, Canad. J. Biochem. Physiol. 39, 1013 (1960).

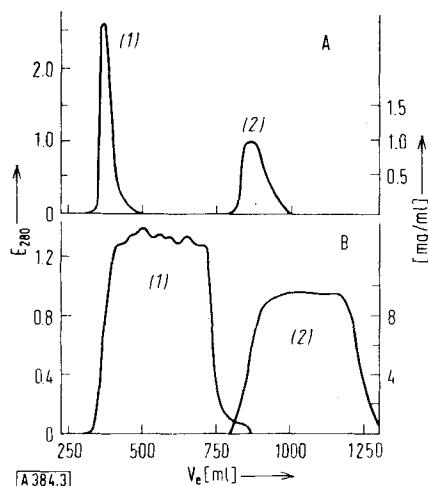


Abb. 3. Trennung von Hämoglobin (1) und Kochsalz (2) an einer 1070 ml Sephadex G-25 enthaltenden Säule. A: mit 100 mg Hämoglobin und 100 mg Kochsalz in 10 ml Wasser; B: mit 400 mg Hämoglobin und 4 g Kochsalz in 400 ml Wasser [39].  
linke Ordinate: Extinktion des Hämoglobins bei 280 m $\mu$ ;  
rechte Ordinate: mg Kochsalz/ml Lösung.

[39]. Dies ist für die Entsalzung solcher Proteine wichtig, die nur durch Elektrolyte in Lösung gehalten werden. Hat man so eine Lösung in einem vollständig flüchtigen Puffer hergestellt, dann können die Proteine durch anschließende Gefriertrocknung salzfrei gewonnen werden.

Das der Abbildung 3 zugrundeliegende Schema kann zur Illustration vieler hier zu besprechender Trennoperationen dienen, z. B. der Strontium-Bestimmung in Milch [56] und der Entsalzung von Virus-Suspensionen (auch unter sterilen Bedingungen) [57]. Die Trennung niedermolekularer Begleitstoffe, die keine Salze sind, von Makromolekülen kann man als *Gruppentrennung* bezeichnen. So lassen sich z. B. Viren natürlich auch von Farbstoffen, Aminosäuren und Zuckern [58], Nucleinsäuren von Nucleotiden [44, 59–61] und Phenol [62], sowie niedermolekulare Antigene von Antikörpern [63] trennen. Vorwiegend von medizinischem Interesse sind z. B. rasche Bestimmungen von Polysacchariden neben Zuckern [64, 65], von Östrogenen im Harn von Schwangeren [66] und von freiem Jodid neben protein-gebundenem Jod [67–70a]. Um ein modifiziertes Protein vom Überschuss des niedermolekularen Agens zu befreien, ist die Gelfiltration

- [56] W. H. S. George, Nature (London) 195, 155 (1962).
- [57] H. D. Matheka u. G. Wittmann, Zbl. Bakteriol., Parasitenkunde Infektionskrankh. I. Abt. 182, 169 (1961).
- [58] U. Beiss u. R. Marx, Naturwissenschaften 49, 95 (1962).
- [59] S. Žadrazil, Z. Šormová u. F. Šorm, Collect. czechoslov. chem. Commun. 26, 2643 (1961).
- [60] S. E. Bresler, Kh. M. Rubina, R. A. Graevskaya u. N. N. Vasileva, Biochemie (russ.) 26, 745 (1961).
- [61] H. G. Boman u. S. Hjertén, Arch. Biochem. Biophysics, Suppl. 1, 276 (1962).
- [62] G. R. Shepherd u. D. F. Petersen, J. Chromatogr. 9, 445 (1962).
- [63] D. Givol, S. Fuchs u. M. Sela, Biochim. biophysica Acta 63, 222 (1962).
- [64] G. Östling, Acta Soc. med. Upsaliensis 64, 222 (1960).
- [65] L. Jacobsson, Clin. chim. Acta 7, 180 (1962).
- [66] C. G. Beling, Nature (London) 192, 326 (1961).
- [67] S. Lissitzky, J. Bismuth u. M. Rolland, Clin. chim. Acta 7, 183 (1962).
- [68] W. M. Hunter u. F. C. Greenwood, Nature (London) 194, 495 (1962).
- [69] L. Jacobsson u. G. Widström, Scand. J. clin. Lab. Invest. 14, 285 (1962).
- [70] B. Shapiro u. J. L. Rabinowitz, J. nuclear Med. 3, 417 (1962).
- [70a] E. H. Mougey u. J. W. Mason, Analytic. Biochem. 6, 223 (1963).

die Methode der Wahl, so z. B. beim Anfärben mit Fluoreszenzfarbstoffen [71–79] oder bei der reversiblen Reduktion von Disulfidbrücken [80, 80a].

Die *Komplexbildung* zwischen Molekülen verschiedener Molekulargewichte ergibt bei der Gelfiltration besondere Trenneffekte. Vasopressin und Oxytocin bilden mit dem im Gewebeextrakt enthaltenen Protein einen Komplex und werden an einer Sephadex-G-25-Packung von den niedermolekularen Begleitern abgetrennt. Beim Ansäuern zerfällt der Komplex, und eine erneute Gruppentrennung liefert die Hormone, vielfach angereichert in der langsam wandernden Zone [81].

Ähnlich verläuft die Anreicherung von Vitamin B<sub>12</sub> aus Seewasser, wobei man zur Komplexbildung ein saures Polysaccharid zusetzt [82]; aus menschlichem Magensaft kann Vitamin B<sub>12</sub> als Protein-Komplex isoliert werden [83]. Die Verbindungen, die verschiedene Pharmaca [84–86c], Metalle [87–89] oder Lipide [90] mit Proteinen eingehen, wurden an Gelpackungen studiert. Der Komplex „Radiobiuret“ mit radioaktivem Kupfer lässt sich mit Hilfe der Gelfiltration zu einer kontinuierlichen Mikrobestimmung von Proteinen in Säulenelutaten ausnutzen [91]. Auch immunochemische Untersuchungen wurden an Gelpackungen vorgenommen [63, 92–95].

Besonders vielversprechend ist eine Methode zur Bestimmung der Affinität von Enzymen zu Coenzymen,

- [71] J. Zwaan u. A. F. van Dam, Acta histochem. 11, 306 (1961).
- [72] J. Killander, J. Pontén u. L. Rodén, Nature (London) 192, 182 (1961).
- [73] W. Lipp, J. Histochem. Cytochem. 9, 458 (1961).
- [74] C. C. Curtain, J. Histochem. Cytochem. 9, 484 (1961).
- [75] J. E. Fothergill u. R. C. Nairn, Nature (London) 192, 1073 (1961).
- [76] W. George u. K. W. Walton, Nature (London) 192, 1188 (1961).
- [77] H. Rinderknecht, Nature (London) 193, 167 (1962).
- [78] M. A. Gordon, M. R. Edwards u. V. N. Tompkins, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 109, 96 (1962).
- [79] M. Wagner, Zbl. Bakteriol., Parasitenkunde Infektionskrankh. I. Abt. 185, 124 (1962).
- [80] Ch. B. Anfinsen u. E. Haber, J. biol. Chemistry 236, 1361 (1961).
- [80a] S. W. Englander, Biochemistry 2, 798 (1963).
- [81] E. B. Lindner, A. Elmquist u. J. Porath, Nature (London) 184, 1565 (1959).
- [82] K. W. Daisley, Nature (London) 191, 868 (1969).
- [83] M. Kakei u. C. B. J. Glass, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 111, 270 (1962).
- [84] P. de Moor, K. Heirwegh, J. F. Heremans u. M. Declerck-Raskin, J. clin. Invest. 41, 816 (1962).
- [85] T. L. Hardy u. K. R. L. Mansford, Biochem. J. 83, 34P (1962).
- [86] C. F. Barlow, H. Firemark u. L. J. Roth, J. Pharmacy Pharmacol. 14, 550 (1962).
- [86a] P. Acred, D. M. Brown, T. L. Hardy u. K. R. L. Mansford, Nature (London) 199, 758 (1963).
- [86b] G. Bambynék u. W. Scholtan, Arzneimittel-Forsch. 14, 142 (1964).
- [86c] W. Scholtan, Arzneimittel-Forsch. 14, 146 (1964).
- [87] P. E. Wilcox u. J. Lisowski, Federat. Proc. 19, 333 (1960).
- [88] L. Eckman, E. Valmet u. B. Åberg, Int. J. appl. Radiat. Isotopes 12, 32 (1961).
- [89] A. A. Barber, C. Dempster u. N. G. Anderson, Clin. chim. Acta 8, 143 (1963).
- [90] E. Thureborn, Nature (London) 197, 1301 (1963).
- [91] R. Gräsbeck u. R. Karlsson, Acta chem. scand. 16, 782 (1962); 17, 1 (1963).
- [92] E. Bassett, S. M. Beiser u. S. W. Tanenbaum, Science (Washington) 133, 1475 (1961).
- [93] R. B. Morrison, Lancet 1961, 1288.
- [94] W. V. Epstein u. M. Tan, J. Lab. clin. Med. 60, 125 (1962).
- [95] J. C. Bennet u. E. Haber, J. biol. Chemistry 238, 1362 (1963).

Substraten oder Inhibitoren, wie sie erstmals bei der Wechselwirkung zwischen Ribonuclease und 2-Cytidylsäure beschrieben wurde [96]. Man äquilibriert das Gelbett mit einer das Substrat in einheitlicher Konzentration enthaltenden Pufferlösung, gibt dann das Protein im gleichen Lösungsmittel auf und eluiert ebenso: der Protein-Bande folgt dann eine Zone geringer Substratkonzentration (Abb. 4). Bei der Milchsäure-Dehydrogenase kann man mit dieser Technik durch DPNH die

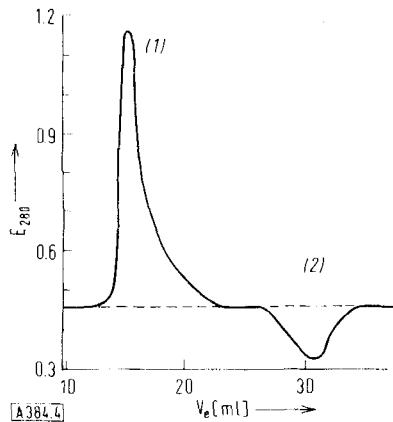


Abb. 4. Elutionsdiagramm von 2 mg Ribonuclease, die in  $9 \cdot 10^{-5}$  M Cytidylsäure enthaltendem 0,1 M Acetatpuffer (pH = 5,3) an Sephadex G-25 chromatographiert wurde. Bei (1) tritt der Enzym-Inhibitor-Komplex aus und bei (2) folgt der Inhibitor-Defekt [96]. (Ordinate: Extinktion bei 280 m $\mu$ )

Zahl der aktiven Stellen am Protein ermitteln [97]. Nach einem anderen Beispiel wird bei Fehlen von Zn-Ionen das Peptid-Substrat an Carboxypeptidase so fest gebunden, daß es zum Inhibitor wird und zusammen mit dem Protein wandert [98]. Auch der Komplex aus Cytochrome c und Cytochromoxydase läßt sich durch Gelfiltration isolieren [99].

Bei der Aufarbeitung von Naturstoffgemischen hat die Gelfiltration hervorragende Dienste geleistet, ebenso häufig zur Rohfraktionierung wie zur Feinreinigung der isolierten Stoffe. Die sonst nur schwierig zu bewerkstelligende Abtrennung der Aminosäuren aus Peptidgemischen gelingt ebenso leicht und quantitativ [37,100] wie die Trennung der durch enzymatische [101–108]

- [96] J. P. Hummel u. W. F. Dreyer, Biochim. biophysica Acta 63, 530 (1962).
- [97] G. Pfleiderer: Mosbacher Kolloquium 1963. Springer, Berlin - Göttingen - Heidelberg, 1964; vgl. Angew. Chem. 75, 797 (1963); Angew. Chem. internat. Edit. 2, 628 (1963).
- [98] J. E. Coleman u. B. L. Vallee, J. biol. Chemistry 237, 3430 (1962).
- [99] M. Kuboyama, S. Takemori u. T. E. King, Biochem. biophys. Res. Commun. 9, 534 (1962).
- [100] H. Determann u. O. Zipp, Liebigs Ann. Chem. 649, 203 (1961).
- [101] R. J. Hill u. W. Konigsberg, J. biol. Chem. 235, 21P (1960).
- [102] G. Guidotti, R. J. Hill u. W. Konigsberg, J. biol. Chemistry 237, 2184 (1962).
- [103] L. Å. Hanson u. B. G. Johansson, Nature (London) 187, 599 (1960).
- [104] A. W. Phillips u. P. A. Gibbs, Biochem. J. 81, 551 (1961).
- [105] V. Stepanow, D. Handschuh u. F. A. Anderer, Z. Naturforsch. 16b, 626 (1961).
- [106] E. M. Press u. R. R. Porter, Biochem. J. 83, 172 (1962).
- [107] C. Bengtsson, L. Å. Hanson u. B. G. Johansson, Acta chem. scand. 16, 127 (1962).
- [108] J. H. Glick jr., Arch. Biochem. Biophysics 100, 192 (1963).

und chemische [109,110] Partialhydrolyse erhaltenen Gemische von Peptiden und Glykopeptiden [111–113]. Ebenso lassen sich Partialhydrolysate von Nucleinsäuren [114–117] fraktionieren und Hormone anreichern [118–122]. Namentlich für Einbauversuche mit radioaktiven Aminosäuren ist es sehr angenehm, daß man Insulin jetzt aus kleinsten Mengen von Pankreas-Rohextrakt einfach isolieren kann [123,124].

An nur wenig vernetzten Gelen kann man die Enzymaktivitäten von Schlangengiften trennen [125–127], sowie Proteasen [128–132a] und viele andere Proteine mit und ohne Enzymaktivität [25,133–140] reinigen. Die Plasmaproteine lassen sich in drei Fraktionen teilen [141–142b]; Abbildung 5 zeigt, in welchem Maße die

- [109] E. Gross u. B. Wirkop, J. biol. Chemistry 237, 1856 (1962).
- [110] A. B. Edmundson, Nature (London) 198, 354 (1963).
- [111] L. Colobert u. G. Dirheimer, Biochim. biophysica Acta 54, 455 (1961).
- [112] Y. Ch. Lee u. R. Montgomery, Arch. Biochem. Biophysics 97, 9 (1962).
- [113] G. S. Marks, R. D. Marshall, A. Neuberger u. H. Papkoff, Biochim. biophysica Acta 63, 340 (1962).
- [114] L. Bosch, G. von der Wende, M. Sluyser u. H. Blomendal, Biochim. biophysica Acta 53, 44 (1961).
- [115] H. Ishikura, Biochim. biophysica Acta 51, 189 (1961).
- [116] V. M. Ingram u. J. G. Pierce, Biochemistry 1, 580 (1962).
- [117] H. Ishikura, J. Biochemistry (Tokyo) 52, 324 (1962).
- [118] H. Rasmussen u. L. C. Craig, J. biol. Chemistry 236, 759 (1961).
- [119] H. Rasmussen u. L. C. Craig, Biochim. biophysica Acta 56, 332 (1962).
- [120] H. Papkoff, C. H. Li u. W.-K. Liu, Arch. Biochem. Biophysics 96, 216 (1962).
- [121] H. Zuber u. R. Jaques, Angew. Chem. 74, 216 (1962); Angew. Chem. internat. Edit. 1, 160 (1962).
- [122] R. A. Reisfeld et al., Nature (London) 197, 1206 (1963).
- [123] P. R. Davoren, Biochim. biophysica Acta 63, 150 (1962).
- [124] C. J. Epstein u. C. B. Anfinsen, Biochemistry 2, 461 (1963).
- [125] W. Björk u. J. Porath, Acta chem. scand. 13, 1256 (1959).
- [126] F. Miranda u. S. Lissitzky, Nature (London) 190, 443 (1961).
- [127] W. Björk, Biochim. biophysica Acta 49, 195 (1961).
- [128] B. Gelotte u. A. B. Krantz, Acta chem. scand. 13, 2127 (1959).
- [129] M. Murray u. M. Chadwick, Biochim. biophysica Acta 58, 338 (1962).
- [130] D. van Hoang, M. Rovery u. P. Desnuelle, Biochim. biophysica Acta 58, 613 (1962).
- [131] C. Lapresle u. T. Webb, Biochem. J. 84, 455 (1962).
- [132] S. Keller u. I. Mandl, Arch. Biochem. Biophysics 101, 81 (1963).
- [132a] E. V. Vlasova u. N. I. Solov'eva, Federat. Proc. 22, 915 (1963).
- [133] H. J. Cruft, Biochim. biophysica Acta 54, 611 (1961).
- [134] B. v. Hofsten u. J. Porath, Acta chem. scand. 15, 1791 (1961).
- [135] L. Håna u. B. Styk, Acta virol. 6, 479 (1962).
- [136] H. G. van Eijk, C. H. Monfoort, J. J. Witte u. H. G. K. Westenbrink, Biochim. biophysica Acta 63, 537 (1962).
- [137] B. v. Hofsten u. J. Porath, Biochim. biophysica Acta 64, 1 (1962).
- [138] M. Friedkin, E. J. Crawford, E. Donovan u. E. J. Pastore, J. biol. Chemistry 237, 3811 (1962).
- [139] G. Petterson, E. B. Cowling u. J. Porath, Biochim. biophysica Acta 67, 1 (1963).
- [140] K. Hasegawa, T. Kusano u. H. Mitsuda, Agric. biol. Chem. 27, 878 (1963).
- [141] P. Flodin u. J. Killander, Biochim. biophysica Acta 63, 403 (1962).
- [142] B. Gelotte, P. Flodin u. J. Killander, Arch. Biochem. Biophysics, Suppl. 1, 319 (1962).
- [142a] S. D. Roskes u. T. E. Thompson, Clin. chim. Acta 8, 489 (1963).
- [142b] J. Killander u. C. F. Höglman, Scand. J. clin. Lab. Invest. 15, 130 (1963).

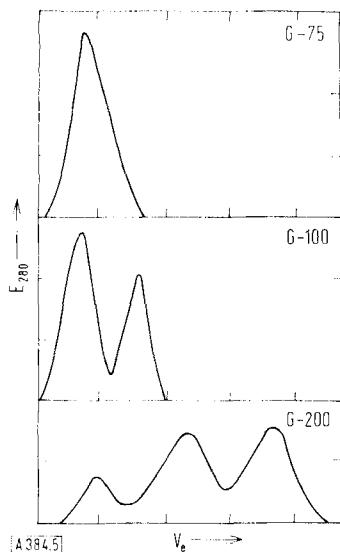


Abb. 5. Trennung von etwa 15 ml Rinder-Plasma an verschiedenen stark quellbaren Sephadex-Dextrangelen unter vergleichbaren Bedingungen in 0,1 M Tris-Puffer (pH = 8,0; 1 M NaCl). Die Säulenvolumina  $V_t$  waren so gewählt, daß die äußeren Volumina  $V_0$  gleich waren (vgl. Tabelle 2). Bei dem Versuch mit Sephadex G-200 ( $V_t = 1600$  ml) wurden etwa in der ersten Bande die Makroglobuline, in der zweiten die Globuline und in der dritten die Albumine gefunden [143]. (Ordinate: Extinktion bei 280  $\mu\mu$ ).

Trennwirkung vom Vernetzungsgrad des Gels abhängt [143]. Fragmente der  $\gamma$ -Globuline werden an porösen Gelen getrennt [144, 145]. An Agarosegel wurde ein künstliches Gemisch von Desoxyribonucleinsäure und Ribonucleinsäure [61] zerlegt.

## 6. Gelchromatographie

Die zuletzt zitierten Anwendungen der Gelfiltration leiten über zu Trennverfahren mit höheren Ansprüchen an die experimentelle Technik.

Mit langen Säulen, kleinen Probevolumina, geringer Korngröße und langsamem Durchfluß gelingt die Fraktionierung von Polymeren, wie zuerst für Dextran-Fraktionen [35, 146, 147] und Oligosaccharide [148] gezeigt wurde. Abbildung 6 läßt erkennen, wie scharf die Fraktionierung der Oligosaccharide von Glucose bis zum Hexameren ist. Bei Chromoproteid-Mischungen kann man den Fortgang der Trennung direkt an den Zonen auf der Säule erkennen; die Trennfähigkeit von Dextrangel Sephadex G-75 [149], Polyacrylamidgel [26], Agargel [17] und Agarosegel [19] wurde so bewiesen.

Wenn die Trennung eines Substanzgemisches nur unvollkommen ist, muß die Probe ein längeres Gelbett durchlaufen, z. B. durch Hintereinanderschalten mehrerer Säulen [150].

- [143] J. Porath u. P. Flodin, *Protides biol. Fluids* 10, 290 (1963).
- [144] P. Cornillot, R. Bourrillon, J. Michon u. R. Got, *Biochim. biophysica Acta* 71, 89 (1963).
- [145] M. Tan u. W. V. Epstein, *Science (Washington)* 139, 53 (1963).
- [146] K. A. Granath u. P. Flodin, *Makromolekulare Chem.* 48, 160 (1961).
- [147] P. Nordin, *Arch. Biochem. Biophysics* 99, 101 (1962).
- [148] P. Flodin u. K. Asperg, *Biol. Structure Function* 1, 345 (1961).
- [149] W. Nultsch, *Biochim. biophysica Acta* 59, 213 (1962).
- [150] T. P. King u. P. S. Norman, *Biochemistry* 1, 709 (1962).

An einer relativ kurzen Packung lassen sich anspruchsvolle Trennungen ausführen, wenn man das Eluat in Fraktionen erneut auf die Säule gibt und dies bis zur völligen Reinigung wiederholt. Die Trennung gelingt fast vollautomatisch, wenn man das Eluat mit einer Pumpe sofort wieder an den Start

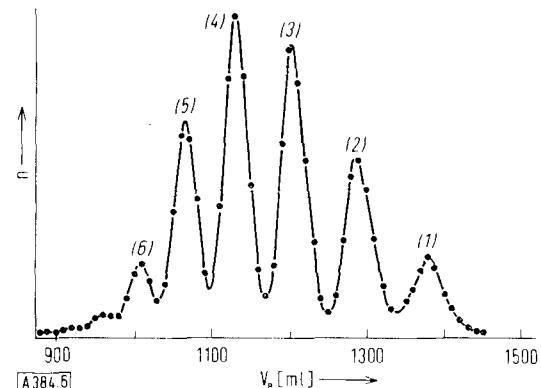


Abb. 6. Elutionsdiagramm der durch Acetylase eines Polysaccharids und anschließende alkalische Verseifung erhaltenen Oligomeren der Glucose aus einer Sephadex-G-25-Säule [148]. (1): Glucose, (2): Cellobiose, usw. bis (6): Cellohexaose. (Ordinate: Brechungsindex in linearem Maßstab).

bringt; den Fortgang der Trennung kann man an einem Durchflußphotometer beobachten und unerwünschte Mischfraktionen über ein Mehrwegeventil entfernen [151]. Abbildung 7 gibt das Schema einer solchen Anordnung.

Die Leistungsfähigkeit der Gelchromatographie wird besonders deutlich bei der Fraktionierung von Protein-Assoziaten: Die oligomeren Serum-Albumine [152] werden ebenso getrennt, wie die enzymatisch aktiven aggregierten Formen der Ribonuclease, die bei der Gefriertrocknung einer Lösung des Proteins in 50-proz. Essigsäure entstehen [153].

Die Gelchromatographie läßt sich bei sorgfältiger Registrierung der Elutionsvolumina auch zur Abschätzung von Molekulargewichten heranziehen, indem man die  $K_d$ -Werte der unbekannten Moleküle mit denen von bekannten Substanzen vergleicht. Hierbei hat sich

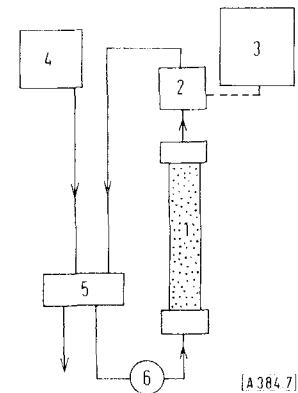


Abb. 7. Schema einer Kreislauf-Apparatur zur Gelchromatographie. 1 = Chromatographiesäule, 2 = Durchflußphotometer, 3 = Schreiber, 4 = Lösungsmittelvorrat, 5 = Ventil und 6 = Schlauchpumpe. (Damit das Gelbett nicht zusammengepreßt wird, wird es von unten nach oben durchströmt) [151].

- [151] J. Porath u. H. Bennich, *Arch. Biochem. Biophysics, Suppl. I*, 152 (1962).
- [152] K. O. Pedersen, *Arch. Biochem. Biophysics, Suppl. I*, 157 (1962).
- [153] A. M. Crestfield, W. H. Stein u. S. Moore, *Arch. Biochem. Biophysics, Suppl. I*, 217 (1962).

eine Überlegung von *Porath* [154] als sehr fruchtbar erwiesen, die von kugelförmigen Molekülen (Radius  $r$ ) und kegelförmigen Poren im Gel ausgeht. Da der  $K_d$ -Wert dem Volumen (also  $r^3$ ) und das Molekulargewicht  $r^2$  proportional sind [\*], sollte zwischen der dritten Wurzel aus dem  $K_d$ -Wert und der Quadratwurzel aus dem Molekulargewicht ein linearer Zusammenhang bestehen. Für Polysaccharide [154] trifft das ebenso zu, wie für Proteine [155]. In Abbildung 8 ist die Eichkurve für Proteine an Sephadex G-200 dargestellt. Aus dem gemessenen  $K_d$ -Wert kann daraus leicht auf das Molekulargewicht unbekannter Proteine geschlossen werden [155].

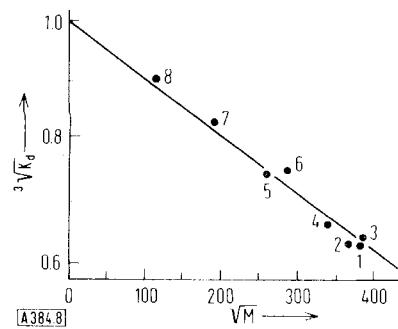


Abb. 8.  $K_d$ -Werte und Molekulargewichte von acht an Sephadex G-200 in 0,1 M Phosphatpuffer und 1 M NaCl chromatographierten Proteinen [155].

1 Human- $\gamma$ -globulin ( $M = 140000$ – $150000$ ); 2 Rinder-Serumalbumin, dimer ( $M = 134000$ ); 3 Hefehalolase ( $M = 147000$ ); 4 Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase ( $M = 117000$ ); 5 Rinder-Serumalbumin, monomer ( $M = 67000$ ); 6 Phosphokreatinkinase ( $M = 81000$ ); 7 Pepsin, monomer ( $M = 35000$ ); 8 Ribonuclease, Rind ( $M = 13000$ ).

*Andrews* hatte schon vorher die Elutionsvolumina von Proteinen aus Agargel gegen den Logarithmus des Molekulargewichts in einem Diagramm aufgetragen und dabei für einen gewissen Bereich ebenfalls eine lineare Abhängigkeit festgestellt [156–156b]; diesen Zusammenhang konnte er neuerdings auch für die verschiedenen Sephadex-Typen bestätigen [157]. Für granulierte Agar-Gele mit verschiedenen Quellungsgraden (vgl. S. 638) sind die Porendurchmesser aus dem chromatographischen Verhalten von Stoffen mit bekannten Molekül- oder Partikeldurchmessern experimentell ermittelt worden [158]. Auch in homogenen Gelen sind Molekulargewichtsbestimmungen möglich. Man lässt die zu untersuchenden Stoffe in ein Gel diffundieren und vergleicht die Geschwindigkeit der wandernden Front mit der von Testsubstanzen. Die Analyse kann man entweder immunologisch (durch Präzipitatbildung [159]) oder durch schichtenweises Aufarbeiten [160] vornehmen. Auch aus der Abhängigkeit des elektrophoretischen Verhaltens von der Gel-dicke [161] sind Aussagen über das Molekulargewicht von Proteinen möglich.

[154] *J. Porath*, Pure appl. Chem. 6, 233 (1963).

[\*] Die Proportionalität von  $M$  und  $r^2$  ergibt sich aus der statistischen Behandlung flexibler Makromoleküle mit dem effektiven Radius  $r$  und gleichen Segmenten, nach *B. H. Zimm* u. *W. H. Stockmeyer* [J. chem. Physics 17, 1301 (1949)].

[155] *Th. Wieland*, *P. Duesberg* u. *H. Determann*, Biochem. Z. 337, 303 (1963).

[156] *P. Andrews*, Nature (London) 196, 36 (1962).

[156a] *J. R. Whitaker*, Analytic. Chem. 35, 1950 (1963).

[156b] *M. Iwatsubo* u. *A. Curdel*, C. R. hebdo. Séances Acad. Sci. 256, 5224 (1963).

[157] *P. Andrews* u. *S. J. Folley*, Biochem. J. 87, 3P (1963).

[158] *R. L. Steere* u. *G. K. Ackers*, Nature (London) 196, 47 (1962).

[159] *A. C. Allison* u. *J. H. Humphrey*, Immunology 3, 95 (1960).

[160] *E. J. Schantz* u. *M. A. Lauffer*, Biochemistry 1, 658 (1962).

[161] *O. Smithies*, Arch. Biochem. Biophysics, Suppl. 1, 125 (1962).

## 7. Spezielle Anwendungen der Dextrangels

Das konfektionierte Dextrangel „Sephadex“ hat zu Anwendungen inspiriert, die nicht der allgemeinen Gel-filtration entsprechen. So bewirkt die enorme Wasseraufnahme des trockenen „G-25 coarse“ eine erhebliche Konzentrierung, wenn man dieses in eine wässrige Makromolekulare-Lösung einröhrt und dann abzentrifugiert [162, 163]; hierbei ändern sich Ionenstärke und pH-Wert nicht.

Als inerter, hydrophiler Träger dient Sephadex bei der Elektrophorese in horizontalen Schichten [164] und in vertikalen Säulen [142, 165–166a] sowie bei der Verteilungschromatographie von Peptiden [5, 167–168b], Dinitrophenylaminosäuren [169] und „löslichen“ Ribonucleinsäuren [170]. Das Dextrangel hat dabei gegenüber der bei der Papierchromatographie verwendeten Cellulose den Vorteil größerer Reinheit und Stabilität sowie höherer Kapazität und Durchflußgeschwindigkeit.

Die Unterschiede im Lösungsverhalten von Proteinen in salzhaltigen und salzfreien Lösungen lassen sich an Dextrangel-Säulen zur Protein-Trennung ausnutzen. Die ohne Salz-Zusätze unlöslichen Serum-Proteine verlassen das Gelbett erst mit der Kochsalzfront, während die anderen Proteine je nach Größe früher kommen [171]. Bei Anwendung eines Salzgradienten im Dextrangel wird durch mehrfaches Fällen und Lösen diese Technik noch verfeinert [172]. – Feines Sephadex - Pulver haftet ohne Bindemittel auf Glasplatten. Kleinste Mengen von Proteinen [173] oder Proteinbausteinen [174] lassen sich daran durch Dünnschicht-Gelchromatographie trennen.

## 8. Gelchromatographie an lipophilen Gelen

Nach dem Erfolg der Gelchromatographie an in Wasser quellbaren Materialien begann man in neuester Zeit nach geeigneten lipophilen Gelen zu suchen. Hierbei ist, noch mehr als in Wasser, auf die Adsorption besonderes

[162] *P. Flodin*, *B. Gelotte* u. *J. Porath*, Nature (London) 188, 483 (1960).

[163] *B. Deutsch*, *R. D. Levere* u. *J. Levine*, J. clin. Path. 16, 183 (1963).

[164] *K. Dose* u. *G. Krause*, Naturwissenschaften 49, 249 (1962).

[165] *S. Kuyama* u. *D. Pramer*, Biochim. biophysica Acta 56, 631 (1961).

[166] *G. Samuelsson*, Svensk farmac. Tidskr. 66, 201 (1962).

[166a] *J. Broome*, Nature (London) 199, 179 (1963).

[167] *J. Porath* u. *E. B. Lindner*, Nature (London) 191, 69 (1961).

[168] *J. Porath* u. *A. V. Schally*, Endocrinology 70, 738 (1962).

[168a] *G. Schmidt-Kastner*, Naturwissenschaften 51, 38 (1964).

[168b] *D. Yamashiro*, Nature (London) 201, 76 (1964).

[169] *H. Determann*: 6. Europäisches Peptidsymposium, Athen 1963; vgl. Angew. Chem. 75, 62 (1964).

[170] *K. Tanaka*, *H. H. Richards* u. *G. L. Cantoni*, Biochim. biophysica Acta 61, 846 (1962).

[171] *W. V. Epstein* u. *M. Tan*, J. Chromatogr. 6, 258 (1961).

[172] *J. Porath*, Nature (London) 196, 47 (1962).

[173] *B. G. Johansson* u. *L. Rymo*, Acta chem. scand. 16, 2067 (1962).

[174] *H. Determann*, Experientia 18, 430 (1962).

Augenmerk zu richten. Polystyrol in verschiedenen Vernetzungsgraden, wie es als Grundlage der Kunstharz-Ionenaustauscher verwendet wird, eignet sich daher nicht besonders, denn die Elutionsfolge ist häufig mehr durch die Struktur der Substanzen als durch ihr Molekulargewicht bestimmt [28, 175].

Im Gegensatz dazu scheinen die Trennungen an kleinen Gummistücken [31] auf dem Molekularsiebeffekt zu beruhen. Für die  $K_d$ -Werte von Polyisobuten ( $M = 18000$ ), Pentaerythrit-tetrastearat ( $M = 1200$ ), Squalan ( $M = 423$ ) und Azulen ( $M = 128$ ) besteht ein linearer Zusammenhang zum Logarithmus des Molekulargewichts. Oligomere Polystyrole verhalten sich an dem rein aliphatischen Poly-methylmethacrylat-Gel völlig nach den Gesetzmäßigkeiten, die für die in Wasser quellbaren Gele erkannt worden sind. So ergibt sich ebenfalls eine lineare Abhängigkeit zwischen der dritten Wurzel aus dem  $K_d$ -Wert und der Quadratwurzel aus dem Molekulargewicht [29]. Ähnliche Gele sollten sich hervorragend zur Ermittlung der Molekulargewichtsverteilung von Polymeren eignen, wenn es gelingt, genügend großporige, zugleich aber hinreichend starre [30] Netzwerke zu synthetisieren.

Es lag nahe, auch die bewährten Sephadex-Dextrangele in Derivate überzuführen, die in organischen Lösungsmitteln quellen [176]. Sephadex G-50, medium, wurde in Benzol aufgeschämmmt, mit überschüssigem Essigsäureanhydrid acetyliert und nach sorgfältigem Waschen der Gehalt an Acetylgruppen durch alkalische Verseifung zu 30 Gew.-% bestimmt, d. h. etwa 50 % der OH-Gruppen des Dextrans waren verestert. Das Material quillt z. B. in Methylenechlorid etwa auf das doppelte Volumen und wirkt als Molekularsieb. Abbildung 9 zeigt das Ergebnis eines Experiments mit Polystyrol-Fraktionen [177] an acetyliertem Sephadex [178]. Gegenüber den Methacrylat-Gelen fällt auf, daß trotz geringerer Quellung im Lösungsmittel die Aus-

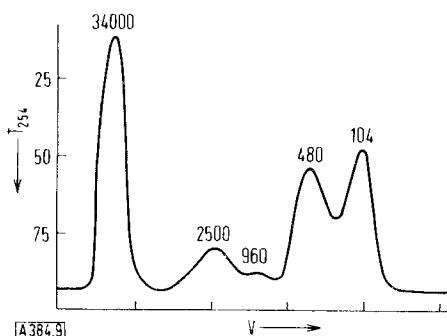


Abb. 9. Elution von fünf Polystyrol-Fraktionen (Konzentration jeder Polystyrol-Fraktion: 2 bis 5 mg/ml) in Methylenechlorid aus einem Gelbett von acetyliertem Sephadex ( $1,5 \times 120$  cm-Säule). Die Zahlen geben die osmotisch ermittelten Molekulargewichte an.  
Ordinate: Durchlässigkeit [%] bei 254 mμ.  
Abszisse: Volumen des Eluats.

[175] B. Cortis-Jones, Nature (London) 191, 272 (1961).

[176] H. Determann u. G. Lüben, unveröffentlichte Versuche.

[177] G. Lüben, Diplomarbeit, Universität Frankfurt (Main), 1963.

[178] H. Determann, unveröffentlichte Versuche.

schlußgrenze höher liegt, was möglicherweise dadurch bedingt ist, daß die Porengröße von innen nach außen zunimmt.

## 9. Schluß

Die Gelstruktur ist für eine chromatographische Trennung nach Molekulargewichten nicht unbedingt erforderlich. Pedersen beobachtete, daß größere Proteine in wässriger Pufferlösung schneller als kleinere durch ein mit Glasperlen (Durchmesser 20 bis 35  $\mu$ ) gefülltes Glasrohr wandern [152]. Ähnliches wurde von Vaughan beschrieben, der an einem Silicat-Material (Santocel A) ein Polystyrolgemisch in Benzol fraktionierte und ein Resultat erzielte, das mit konventionellen Methoden der fraktionierten Fällung vergleichbar ist [179]. Gepulverte Kunststoffe hatten keine, Cellulosepulver nur eine geringe Trennwirkung. Bei der Strömung von Blut durch kapillare Blutgefäße kommen die Blutkörperchen, die nur in der Mitte wandern, wesentlich rascher voran als die Plasmaproteine; dieser Effekt ist mit der oben geschilderten Proteinfraktionierung an Glaspulver zu vergleichen [152]. Man sollte demnach an jeder „rauhen“ Oberfläche Trennungen erzielen können, wenn die Unebenheiten in der richtigen Größenordnung liegen. Kleine Moleküle wandern sehr nahe an der Oberfläche und haben dadurch einen längeren Weg zurückzulegen als große, die, unbehindert durch Unebenheiten, – in geringem Abstand von der Oberfläche – einen geraden Weg haben.

Pedersen möchte daher für den hochmolekularen Bereich die Bezeichnung „Gelfiltration“ durch „Aus- schlußchromatographie“ ersetzen. Auch andere Autoren stoßen sich am Ausdruck „Filtration“ für dieses chromatographische Verfahren und schlagen daher „Restricted Diffusion Chromatography“ [158] oder „Gel Permeation Chromatography“ [30] vor. Tiselius setzt sich jedoch für die seither übliche Bezeichnung „Gelfiltration“ [180] ein, indem er auf den grundsätzlichen Unterschied zu anderen chromatographischen Trennoperationen hinweist, der darin liegt, daß hier die Konzentration in der stationären Phase maximal nur so groß werden kann, wie in der mobilen Phase.

Man kann einen Teil der Nomenklatur-Schwierigkeiten vermeiden, wenn man sich der in dieser Zusammenfassung – u. a. auch aus praktischen Gesichtspunkten – versuchten Einteilung in „Gelfiltration im engeren Sinn“ und „Gelchromatographie“ anschließt. Unter welcher Bezeichnung man auch immer das Verfahren anwendet, es gewährleistet jedenfalls – wie die Fülle der zitierten Anwendungen beweist – eine saubere und bequeme Trennung von Substanzen unterschiedlicher Molekülgrößen.

*Herrn Doz. Dr. B. Gelotte, A. B. Pharmacia, Uppsala (Schweden), danke ich für Informationen und anregende Diskussionen.*

Eingegangen am 22. Oktober 1963 [A 384]

[179] M. F. Vaughan, Nature (London) 195, 801 (1962).

[180] A. Tiselius, J. Porath u. P.-A. Albertsson, Science (Washington) 141, 13 (1963).