

Reinigung synthetischer Peptide mit der trägerfreien präparativen Durchfluss-Elektrophorese

Neben einer analytischen elektrophoretischen Auftrennung von polaren Substanzgemischen haben in den letzten Jahren die verschiedensten präparativen Techniken praktische Bedeutung erlangt. Im wesentlichen wird nach zwei prinzipiell unterschiedlichen Methoden gearbeitet: der diskontinuierlichen Zonen-Elektrophorese und der kontinuierlichen Durchfluss-Elektrophorese. Bei beiden Verfahren werden Trägersubstanzen wie Papierblätter, Papierkarton, Glaspulver, Stärkegel, Cellulose, Sephadex® etc. verwendet. Eine wesentliche Verbesserung für präparative Trennungen bietet das Prinzip der trägerfreien präparativen Durchfluss-Elektrophorese wie sie von BARROLIER *et al.*¹ und HANNIG² beschrieben wurde. Das Problem einer exakten Temperaturregelung wurde durch Wasserkühlung^{1*}, bzw. Luftkühlung^{2,**} gelöst. Über eine Verwendung des von BARROLIER *et al.*¹ entwickelten und in der Zwischenzeit verbesserten Gerätes (vgl. Zit. 3-6), zur Trennung von Serum-eiweiss ist mehrfach berichtet worden^{4,5,7}.

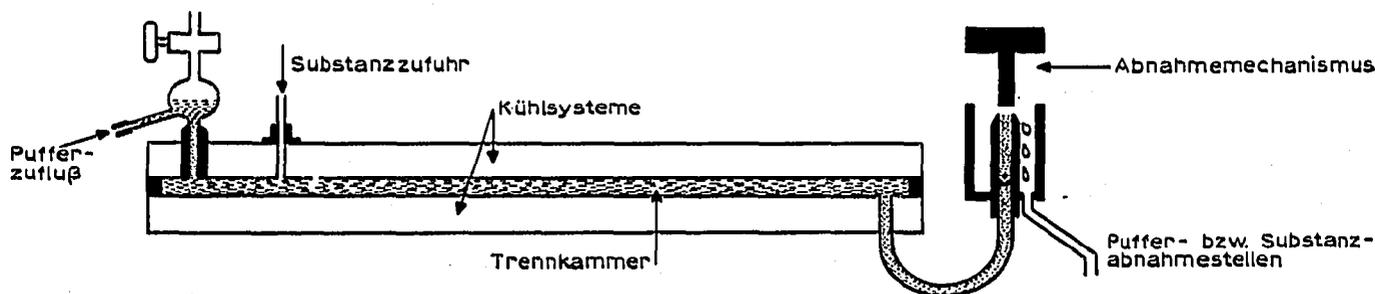


Fig. 1. Schematische Skizze des "Pheroplan". Die auf der oberen Kühlplatte parallel zum Pufferstrom angeordneten Elektrodenröhrchen mit in die Trennkammer ragenden Diaphragmen sind nicht eingezeichnet.

Seit längerer Zeit hat sich die trägerfreie Durchfluss-Elektrophorese ("Pheroplan"®), vgl. schematische Skizze, Fig. 1) in unserem Laboratorium auch zur kontinuierlichen präparativen Reinigung von synthetischen Peptiden hervorragend bewährt. Die Erfahrungen, die besonders an Peptiden von Angiotensin-^{8,9}, Bradykinin-¹⁰⁻¹⁴ und Kallidin-Typ¹⁵, sowie auch an anderen basischen und neutralen Peptiden gesammelt wurden, sollen im folgenden an einigen Beispielen demonstriert werden.

Bedingungen für präparative Trennung eines Peptidgemisches

(1) Flüchtiger Puffer für die Trennkammer: z.B. 0.033 M Pyridiniumacetat, pH 5 ($\sim 600 \Omega/\text{cm}$).

(2) Puffer für die Elektrodenröhrerspülung: 0.1 M Pyridiniumacetat, pH 5 (die höhere Konzentration verhindert Ionenverarmung und pH-Wert Änderungen). Die Spülung ($\sim 1-2$ l/Std.) erfolgt in der Weise, dass der ablaufende Spülpuffer keine wesentliche Änderung des pH-Wertes und der Leitfähigkeit zeigt.

* "Pheroplan"® der Firma K. Marggraf o.H.G., Grolmannstr. 44-45, Berlin-Charlottenburg.

** "Elphor VAP Apparatur"® für Trennungen im reinen Pufferfilm, Firma Dr. Bender und Dr. Hobein, Lindwurmstr. 71-73, München.

(3) Kühlung: der Kühlsoleumlauf wird so eingestellt, dass die Sole nach Passieren des Pheroplan-Kühlsystems $\sim 0^\circ$ bis $+1^\circ$ hat.

(4) Spannung: 2000–3000 V.

(5) Stromstärke: 120–190 mA.

(6) Konzentration der zu trennenden Substanz: 1 ml/Std. einer 5%igen Lösung des Peptidgemisches.

(7) Verweilzeit: die von dem Flüssigkeitsstand in den Überlaufgefäßen und der Pufferabnahme abhängige Zeit, in der die Substanz in der Trennkammer unter Spannung verbleibt, beträgt 60–90 Min. Bei zu hoher Verweilzeit kann eine Wanderung der Substanz in die Elektrodenröge erfolgen.

(8) Dosierstelle (Einpumpstutzen für die Substanz): erste Stelle ab Anode zwecks Erzielung einer möglichst grossen Trennstrecke.

Die angegebenen Daten stellen Standardbedingungen dar. Abhängig von der Ladung des Peptids sowie der Lage der Verunreinigungen im Vergleich zur Hauptzone (analytisches Elektrophoresebild) können die Trennbedingungen variiert werden. Für eine optimale Trennung eines Peptidgemisches und eine gute Ausnutzung der Trennmöglichkeit mit dem Pheroplan muss gegebenenfalls ein Vorversuch (50 mg Substanz) durchgeführt werden. Für die angeführten Peptide erwies sich die Verwendung des Pyridiniumacetatpuffers pH 5 als besonders geeignet. In einigen Fällen wurden auch mit Essigsäure–Ameisensäure-Puffer pH 1.7 gute Trennergebnisse erzielt.

Die Fig. 2–5 demonstrieren die äusserst scharfen Trennungen der Hauptkomponenten von geringer bzw. stärker basischen Begleitpeptiden, die am Anfang bzw. Ende der aufgefängenen Fraktionen konzentriert sind (z.B. Abb. 2: Fraktion 32–38 reine Hauptfraktion; Fraktion 19–31 Hauptfraktion + schwächer basische Verunreinigung; Fraktion 39–48 stärker basische Verunreinigungen. Die am Startpunkt eingekreisten Markierungen sind nicht wandernde Farbstoffflecke zur Kenn-

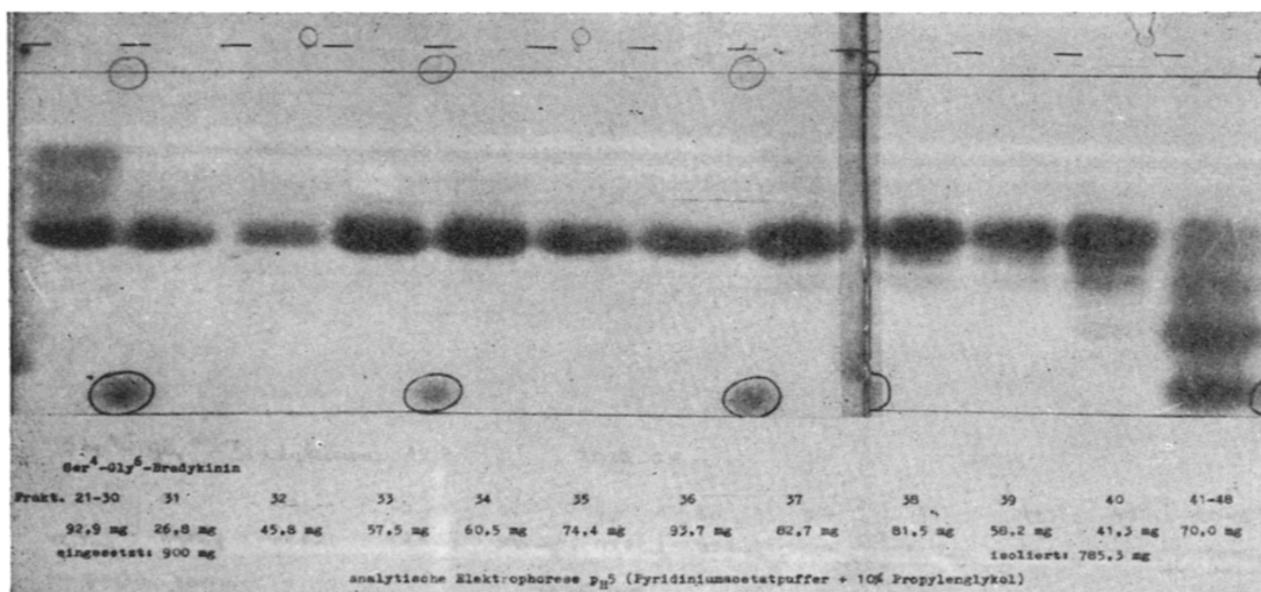


Fig. 2. "Pheroplan-gereinigtes" Ser⁴-Gly⁰-Bradykinin. Analytische Papierelektrophorese der einzelnen isolierten Fraktionen in Pyridiniumacetatpuffer pH 5 + 10% Propylenglycol (10 V/cm, 6 Std., Ninhydrinfärbung).

zeichnung der Endosmose, bei den unteren eingekreisten Flecken handelt es sich um Ornithin als Bezugssubstanz). Selbst im analytischen Bild sehr dicht neben der Hauptkomponente liegende Verunreinigungen lassen sich glatt abtrennen. Von den zur Reinigung eingesetzten Substanzmengen werden im Durchschnitt 85–95 % nach der Trennung wieder isoliert. Im kontinuierlichen Durchsatz konnten Peptide in Mengen bis zu 4–5 g getrennt werden. Die elektrophoretische Reinigungsmethode

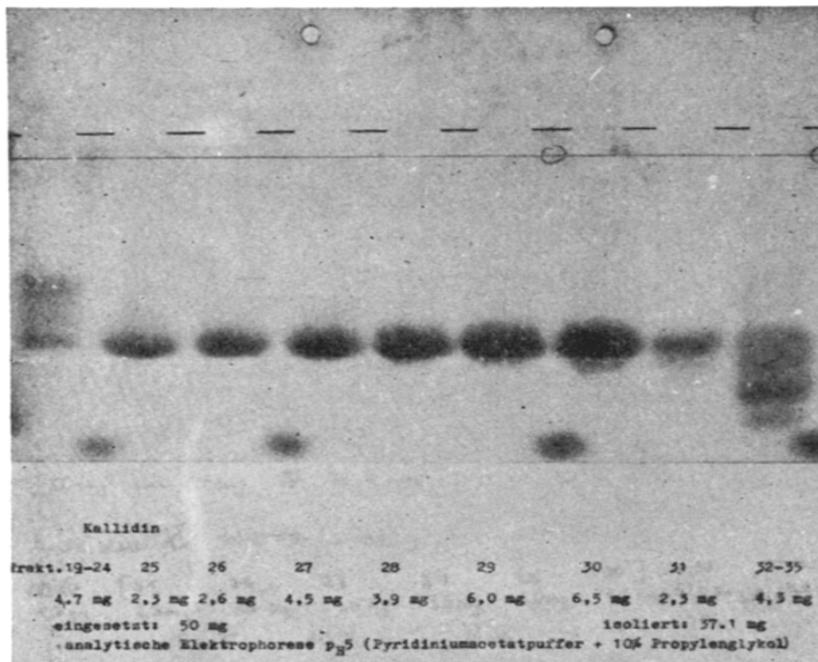


Fig. 3. "Pheroplan-gereinigtes" Kallidin. Analytische Papierelektrophorese.

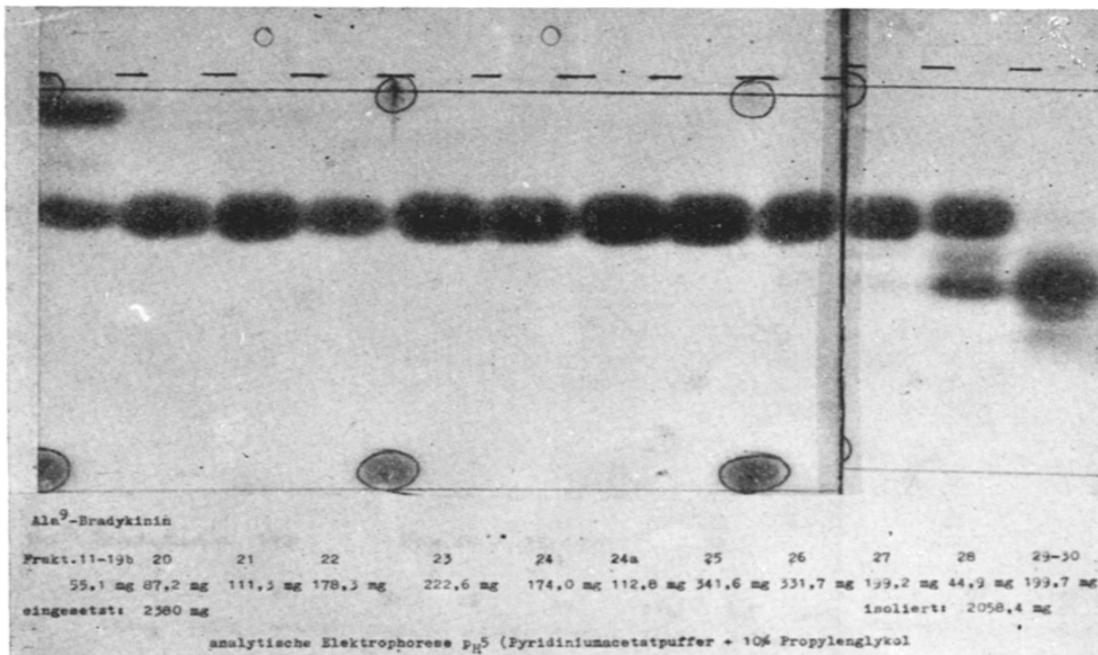


Fig. 4. "Pheroplan-gereinigtes" Ala⁹-Bradykinin. Analytische Papierelektrophorese.

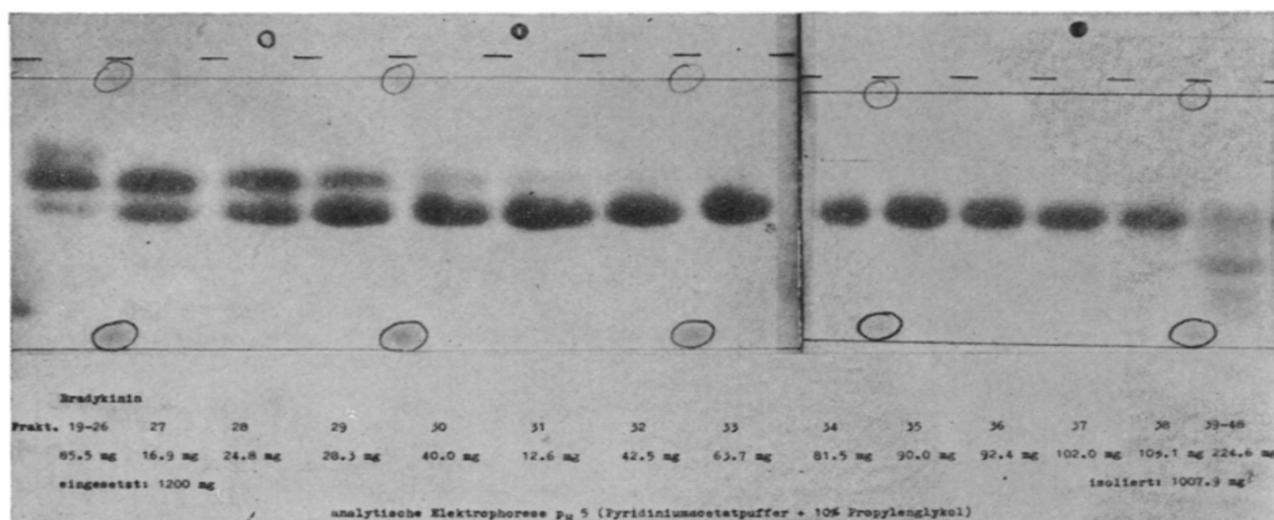


Fig. 5. "Pheroplan-gereinigtes" Bradykinin. Analytische Papierelektrophorese.

bietet eine wertvolle Ergänzung zur Säulenchromatographie an Austauschercellulosen. In Fällen, wo selbst durch Variation der Gradienten-Elution (Konzentrations- bzw. pH-Änderungen) keine vollständige Reinigung gelang, konnte direkt durch die trägerfreie Durchfluss-Elektrophorese bzw. durch Elektrophorese im Anschluss an eine Säulenvorreinigung eine Reinigung erzielt werden. Für kleine Substanzmengen (100–500 mg) d.h. Mengen, in denen hoch wirksame biologisch aktive Peptide im allgemeinen zunächst synthetisiert werden, ist die präparative Elektrophorese auch wegen eines geringeren Zeitaufwandes der Säulentrennung vorzuziehen.

Dank

Für wertvolle Diskussionen sind wir Herrn Dr. J. BARROLLIER, für eine Unterstützung bei den präparativen Versuchen Frl. RENATE GERICKE zu Dank verpflichtet.

Hauptlaboratorium der Schering A.G.,
Berlin-West (Deutschland)

EBERHARD SCHRÖDER
SIEGFRIED MATTHES

- 1 J. BARROLLIER, E. WATZKE UND H. GIBIAN, *Z. Naturforsch.*, 13b (1958) 754.
- 2 K. HANNIG, *Z. Anal. Chem.*, 181 (1961) 244.
- 3 K. WIEK, *Dissertation*, Freie Universität Berlin, 1962.
- 4 K. H. HÖLZER, B. NOACK UND K. WIEK, *Klin. Wochschr.*, 38 (1960) 502.
- 5 K. WIEK, H.-F. VON OLDERSHAUSEN UND F. KLASCHKA, *Klin. Wochschr.*, 42 (1964) 357.
- 6 K. WIEK, *J. Chromatog.*, 13 (1964) III.
- 7 W. SCHWARTZKOPF UND K. H. HÖLZER, *Clin. Chim. Acta*, 5 (1960) 845.
- 8 E. SCHRÖDER, *Ann.*, im Druck.
- 9 E. SCHRÖDER, *Ann.*, im Druck.
- 10 E. SCHRÖDER, *Ann.*, 673 (1964) 186.
- 11 E. SCHRÖDER, *Ann.*, 673 (1964) 220.
- 12 E. SCHRÖDER, *Ann.*, 679 (1964) 207.
- 13 E. SCHRÖDER, H.-S. PETRAS UND E. KLIEGER, *Ann.*, 679 (1964) 221.
- 14 E. SCHRÖDER, *Experientia*, 20 (1964) 39.
- 15 E. SCHRÖDER UND H. GIBIAN, *Ann.*, 673 (1964) 176.

Eingegangen den 16. Juni 1964