

## Eine vielseitig anwendbare Methode der zyklischen Sephadexgelfiltration durch Verwendung von Kapillarnebengleisen

Bei der zyklischen Sephadexgelfiltration<sup>1-3</sup>, die zur Auftrennung von Substanzen unterschiedlicher Molekülgrösse herangezogen wird, besteht manchmal die Notwendigkeit, einzelne Fraktionen aus dem Zyklus zu eliminieren, um ein Wiedervermischen von bereits getrennten Fraktionen durch Überholen auf der Säule zu vermeiden. Dies geschieht normalerweise dadurch, dass man die unerwünschte Fraktion in einem Fraktionensammler auffängt. Beim Auffangen auch kleiner Einzelmengen geschieht immer eine Wiedervermischung der eliminierten Fraktion im Reagenzglas.

Die hier beschriebene Methode gibt die Möglichkeit, beliebig grosse Fraktionen aus dem Zyklus herauszunehmen, indem man sie in Kapillarschläuche einlaufen lässt, die als "Nebengleise" in das System der zyklischen Sephadexgelfiltration eingeschaltet sind. Diese Kapillarschläuche kann man entweder im Nebenschluss belassen, um sie nach Belieben wieder in den Zyklus einzuschalten, oder man kann die an beiden Enden durch Quetschhähne verschlossenen Kapillarschläuche herausnehmen und im Kühlschrank beliebig lange aufbewahren. Eine Vermischung der Fraktionen im Kapillarschlauch ist praktisch nicht möglich.

Fig. 1 zeigt das Schaltschema der Methode.

Um die notwendige Anschaffung einer Vielzahl sehr teurer handelsüblicher Mikroventile zu umgehen, haben wir selbst einfache Mikroventile entworfen, die in der Werkstatt unseres Institutes angefertigt wurden. Die Fig. 2 und 3 zeigen eines der verwendeten 3-Wegeventile.

An Hand des Schaltschemas (Fig. 1) können die folgenden Schaltungen für die einzelnen Arbeitsvorgänge verfolgt werden.

### (1) Ansaugen der aufzutrennenden Probe

Weg: Messzylinder, Ventile 2, 3, Pumpe, Säule, Durchflussphotometer, Ventile 4, 5, 6, Pumpe, Fraktionensammler.

Hähne: offen: f, d, g, i, k, m, n; geschlossen: c, e, h, j, l,  $\beta$ .

### (2) Zyklisches Chromatographieren

(a) Weg: Ventile 2, 3, Pumpe, Säule, Durchflussphotometer, Ventile 4, 7, 21, 2 usw.

Hähne: offen: d, g, i, j,  $\gamma$ , e; geschlossen: f, c, h, k, o,  $\alpha$ .

Zur Kontrolle der geförderten Menge schaltet man parallel über die gleiche Pumpe folgendermassen:

(b) Weg: Vorratsgefäss, Ventile 1, 20, 6, Pumpe, Fraktionensammler.

Hähne: offen: a, b,  $\beta$ , n; geschlossen: c,  $\alpha$ , m.

### (3) Abschieben einer Fraktion in ein Kapillarnebengleis

Soll z.B. eine Fraktion von ca. 10 ml aus dem Zyklus herausgenommen werden, so wartet man, bis der Beginn der entsprechenden Fraktion vor dem Ventil 7 ist (abzulesen am Punktschreiber, der die Messung des Durchflussphotometers aufzeichnet) und schaltet folgendermassen:

Weg: Vorratsgefäss, Ventile 1, 20, 21, 2, 3, Pumpe, Säule, Durchflussphotometer, Ventile 4, 7, 8, 10, 11, 13, 15, 17, 18, 19, 5, 6, Pumpe, Fraktionensammler.

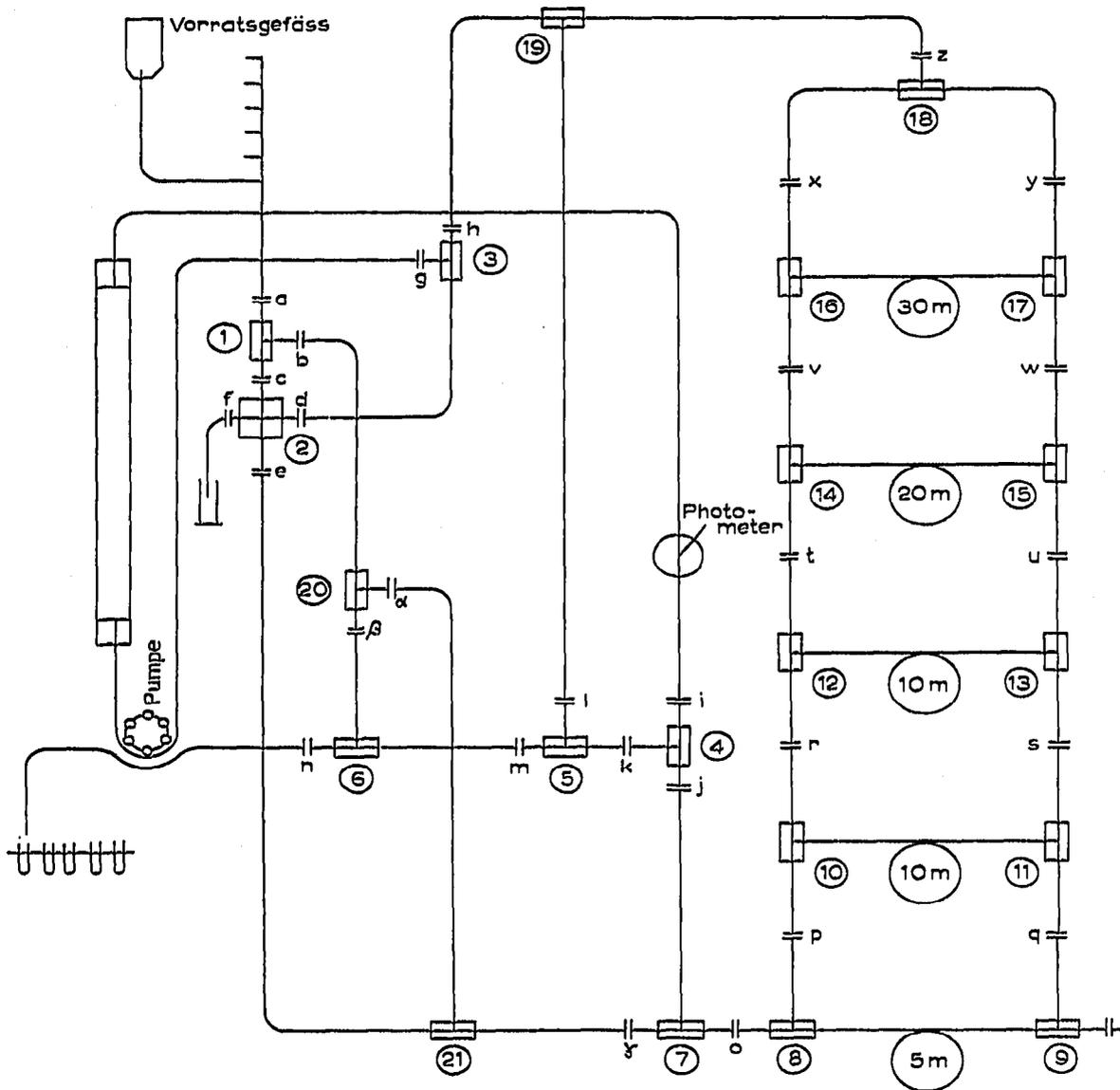
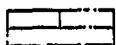
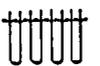
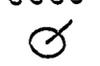
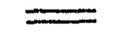
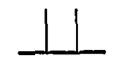


Fig. 1. Schaltschema. Als Vorratsgefäße wurden normale Infusionsflaschen verwendet, die mit handelsüblichen Infusionsbestecken an das Sammelrohr angeschlossen wurden.

- |  |   |   |   |
|--|---|---|---|
|  | 3-Wegmikroventil;   |  | Fraktionensammler;                                      |
|  | 4-Wegmikroventil;   |  | Durchflussphotometer mit Punkt-schreiber;               |
|  | Quetschhahn (a, b,....);  |  | Kapillarschlauch, aufgerollt, in der angegebenen Länge; |
|  | Messzylinder, aus dem die aufzutrennende Substanz angesaugt wird; |  | Sammelrohr zum Anschluss weiterer Vorratsgefäße.        |

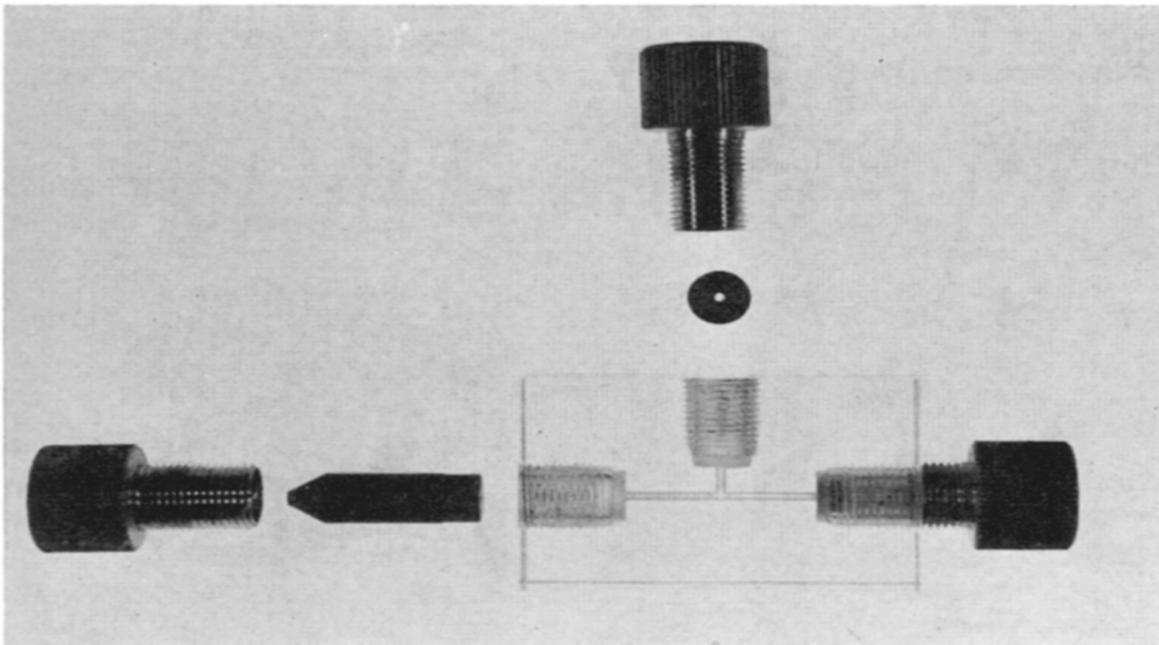


Fig. 2. Abbildung eines Mikroventils.

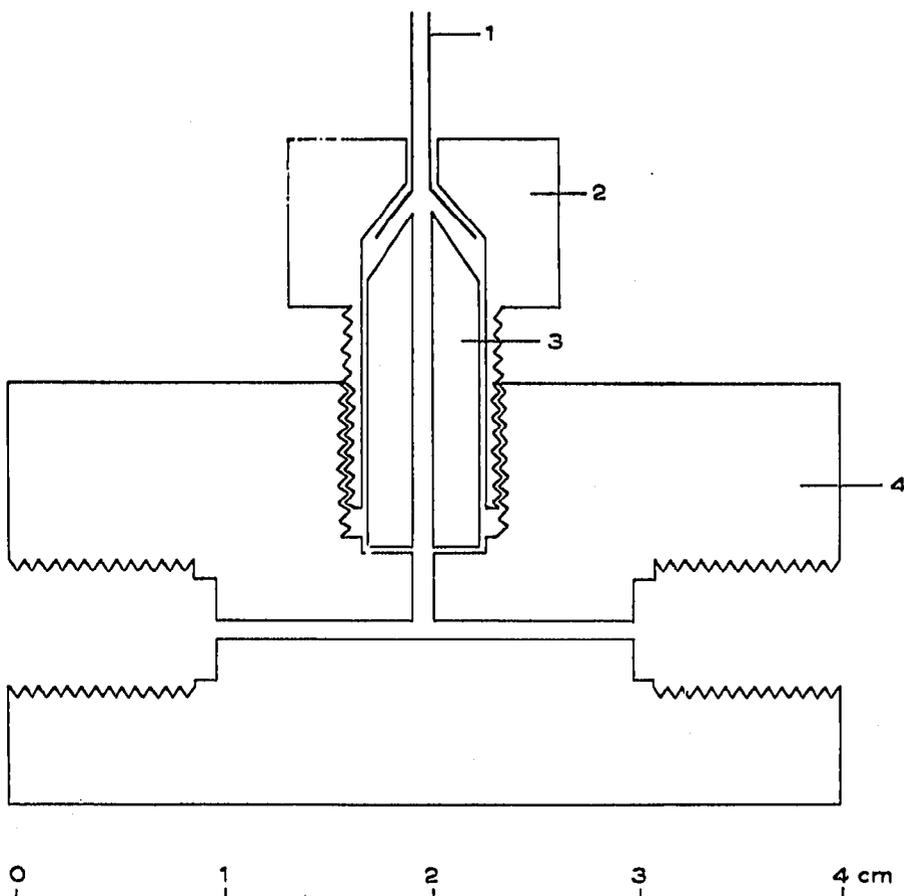


Fig. 3. Schnittzeichnung des in Fig. 2 gezeigten Mikroventils. 1 = Kapillarschlauch; 2 = Überfallmutter aus Messing; 3 = Konus aus Plastik; 4 = 3-Wegehahn mit Kapillarbohrungen aus Plexiglas.

*Hähne*: offen: a, b,  $\alpha$ , e, d, g, i, j, o, p, s, u, w, y, z, l, m, n; geschlossen: c,  $\beta$ ,  $\gamma$ , f, h, k, q, r, t, v; x.

(4) *Einschleusen der abgestellten Fraktion zur weiteren zyklischen Chromatographie*  
 Weg: Vorratsgefäß, Ventile 1, 2, 21, 7, 8, 10, 11, 13, 15, 17, 18, 19, 3, Pumpe, Säule, Durchflussphotometer, Ventile 4, 5, 6, Pumpe, Fraktionensammler.

*Hähne*: offen: a, c, e,  $\gamma$ , o, p, s, u, w, y, z, h, g, i, k, m, n; geschlossen: b, d, f,  $\alpha$ , j, q, r, t, v, x, l,  $\beta$ .

Sowie die Fraktion in der Säule ist, weiter chromatographieren wie unter (2).

Hygiene-Institut der Universität Tübingen\*,  
 Tübingen (Deutschland)

HANS-JÜRGEN GERMANN\*\*

1 P. FLODIN UND J. KILLANDER, *Biochim. Biophys. Acta*, 63 (1962) 403.

2 J. KILLANDER, *Biochim. Biophys. Acta*, 93 (1964) 1.

3 J. PORATH UND H. BENNICH, *Arch. Biochem. Biophys.*, Suppl. 1 (1962) 152.

Eingegangen den 28. Oktober 1966

\* Direktor: Prof. Dr. R.-E. BADER.

\*\* Anschrift des Verfassers: Medizinische Universitäts-Poliklinik, 355 Marburg, Deutschland.

*J. Chromatog.*, 28 (1967) 143-146

## Separation of myoglobin and hemoglobin on Sephadex thin layers

Sephadex gels have proved very convenient for the separation of substances differing in molecular weight. In chemical pathology it is sometimes necessary to differentiate Mb from Hb\* by a simple method.

Although we have succeeded by using conventional paper electrophoretic separation<sup>1,2</sup> we decided to try also Sephadex thin layers (TLC) for this purpose.

TLC was performed on glass plates 18 cm  $\times$  4 cm. A suspension of Sephadex was prepared by shaking swollen Sephadex beads by means of an agitator in an 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, or in a mixture of this buffer with the same volume of 0.9% NaCl. Sephadex G-50 Superfine, G-75 Superfine and G-200 Superfine were used. The volume ratio of gel solution was chosen according to the instructions of the manufacturer<sup>3</sup>. Layers 0.9 mm thick were spread by means of a glass rod provided with cuffs of adhesive tape (Isolepa). Descending chromatography was performed on glass plates inclined at an angle of 12°, connected with the solvent trough by a bridge of Whatman 3 paper and placed in a closed glass tank. Detection was performed either by the use of reactions specific for the heme groups of Hb and Mb, with benzidine<sup>4</sup> or *o*-dianisidine<sup>5</sup>, respectively; or by staining for proteins with bromphenol blue<sup>6</sup>.

Fig. 1 shows the separation of Hb from Mb on Sephadex G-50 Superfine in

\* Abbreviations: Mb = myoglobin; Hb = hemoglobin.