

amphoterer Celluloseaustauscher sowohl ein Einfluss der pK-Werte der ionischen Gruppen als auch ein Einfluss der Molekülgröße und des nichtionischen Teils der Moleküle bemerkbar machten.

*Institut für Organische Chemie, Freie Universität Berlin,
Berlin-Dahlem (Deutschland)*

G. MANECKE
P. GERGS

- 1 G. MANECKE UND P. GERGS, *Naturwiss.*, 50 (1963) 329.
- 2 H. BESTIAN, *Liebigs Ann. Chem.*, 566 (1950) 210.
- 3 J. D. GUTHRIE UND A. L. BULLOCK, *Ind. Eng. Chem.*, 52 (1960) 935.
- 4 G. MANECKE UND H. HELLER, *Makromol. Chem.*, 55 (1962) 51.
- 5 G. MANECKE UND A. GROHMANN, *Makromol. Chem.*, 82 (1965) 146.
- 6 G. MANECKE, P. GERGS UND H. P. AURICH, unveröffentlicht.
- 7 S. MOORE UND W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.*, 176 (1948) 367.
- 8 S. MOORE UND W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.*, 211 (1954) 907.
- 9 S. M. PARTRIDGE UND R. C. BRIMLEY, *Biochem. J.*, 49 (1951) 153.
- 10 C. S. CLEAVER UND H. G. CASSIDY, *J. Am. Chem. Soc.*, 72 (1950) 1147.
- 11 C. S. KNIGHT, *J. Chromatog.*, 8 (1962) 205.

Eingegangen den 9. Oktober 1967; modifiziert den 24. November 1967

J. Chromatog., 34 (1968) 125-128

CHROM. 3334

Kontinuierliches Elutionssystem für die Ionenaustausch-Chromatographie unter Verwendung linearer Gradienten

Die von COHN^{1,2} für die Auftrennung der Nucleotide eingeführte Ionenaustausch-Chromatographie wurde von HURLBERT *et al.*³ zu einem System weiterentwickelt, in dem für diese Auftrennung die Konzentration des Elutionsmittels kontinuierlich ansteigt. Nachteilig sind dabei aber der oftmalige Wechsel der Elutionsmittelvorratsflaschen, die schlechte Konstanz des Flüssigkeitsvolumens in der Mischflasche und die nach kurzer Zeit eintretende starke Verflachung des Gradienten. Dem letzten Nachteil begegneten GILBERT UND YEMM⁴ später durch schrittweises Reduzieren des Mischungsvolumens.

Der einfachste Gradient wird durch Verbindung zweier gleicher zylindrischer Behälter an der Basis erreicht. Durch das Hintereinanderschalten solcher Systeme kann der Gradient steiler gelegt bzw. ein zweites Elutionsmittel eingeführt werden.

Für die Auftrennung der freien Nucleotide und Zuckerphosphate an Dowex 1 × 10 (Formiatform) wurde das in Fig. 1 schematisch dargestellte Mischflaschensystem verwendet, wobei die Verbindungen aus Silikonschläuchen und die Unterbrechungen als Schlauchquetschhähne ausgeführt waren. Für die Inbetriebnahme wurden bei den geschlossenen Schlauchquetschhähnen a, b, c und den offenen d, f, g die einzelnen Flaschen mit folgenden Elutionsmitteln gefüllt.

- A_I = H₂O (400 ml)
- B_I = 0.3 N HCOOH (400 ml)
- A_{II} = 0.3 N HCOOH (500 ml)
- B_{II} = 4.0 N HCOOH (500 ml)
- A_{III} = 4.0 N HCOOH (500 ml)
- B_{III} = 1.0 M HCOONH₄ in 4.0 N HCOOH (500 ml).

In den Glaskapillaren S_I, S_{II} und S_{III} steigt dabei das Flüssigkeitsniveau

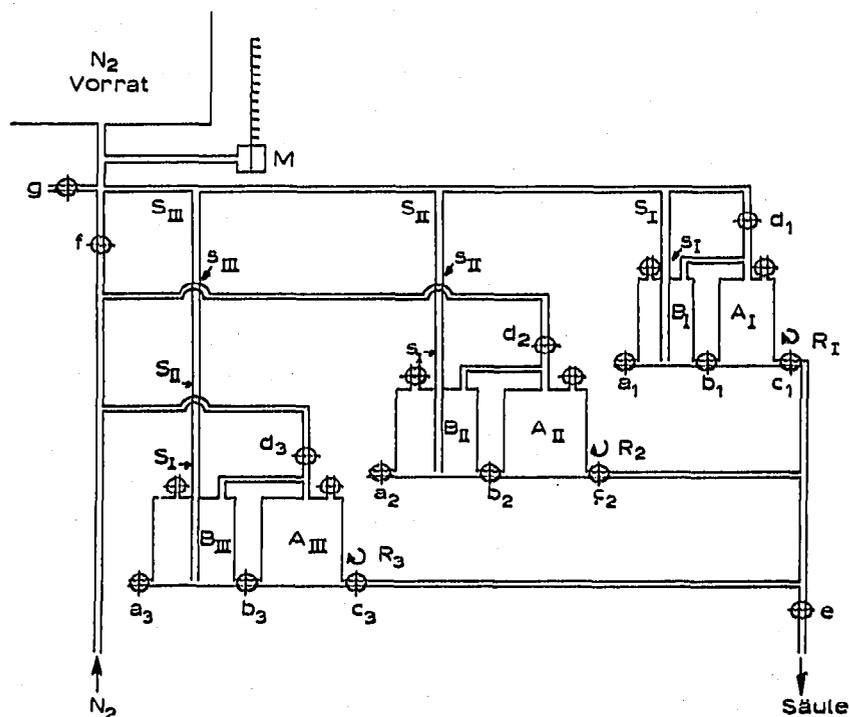


Fig. 1. Schematische Darstellung des Mischflaschensystems zur kontinuierlichen Elution unter Verwendung von drei linearen Gradienten. (Erklärung und Funktion siehe Text).

jeweils bis zum Punkt s_I . Nach Schliessen von d_1 wird mit Stickstoff ein zusätzlicher Druck an das Flaschensystem gelegt, wodurch in S_{II} und S_{III} jeweils der Punkt s_{II} erreicht wird. Nach Schliessen von d_2 wird dann in S_{III} der Flüssigkeitsspiegel bis s_{III} gedrückt. Sobald e geschlossen und die Magnetrührwerke R in Betrieb genommen sind, können in allen Mischsystemen die Verbindungen bei b und c wiederhergestellt werden. Es hat sich als vorteilhaft erwiesen, die Flaschen A_I , A_{II} und A_{III} nicht durch horizontales Rühren von unten, sondern durch vertikales von der Seite zu durchmischen. Nach Öffnen des Hahnes e , der gleichzeitig auch als "safety catcher" für Stromausfall oder Kollektorüberfüllung dient, steigt bei Ablauf des ersten Mischsystems $A_I B_I$ die Konzentration an Ameisensäure im Elutionsmittel linear von 0 bis 0.3 N . Dabei sinkt der Flüssigkeitsspiegel bis auf das Bodenniveau des obersten Flaschenpaares, wobei im Kapillarrohr S_{II} der Punkt s_I bzw. in S_{III} , der Punkt s_{II} erreicht wird. Bei weiterem Sinken des Flüssigkeitsspiegels beginnt das zweite Flaschenpaar $A_{II} B_{II}$ sich zu entleeren, wodurch die Ameisensäurekonzentration im Elutionsmittel linear auf 4.0 N weitersteigt. Das dritte Mischflaschensystem $A_{III} B_{III}$ bewirkt dann in der 4.0 N Ameisensäure einen linear verlaufenden Ammoniumformiat-Gradienten von 0 bis zu einer Endmolarität von 1.0.

Wird das in Fig. 1 wiedergegebene Mischflaschensystem zur Erreichung grösserer Auftrennungsgeschwindigkeiten unter erhöhtem Druck gefahren, so soll der Gaspolster über der Flüssigkeit in den einzelnen Flaschen möglichst klein und das Volumen des Druckbehälters im Vergleich zum Volumen der übrigen Anlage möglichst gross gehalten werden. Nach Schliessen von g wird die gesamte Anlage inklusive des Druckbehälters unter einen am Manometer M ablesbaren Überdruck gesetzt und nach Schliessen von d_1 bzw. d_2 das Flüssigkeitsniveau in den drei Kapillarrohren S_I , S_{II} und S_{III} auf gleiche Ausgangshöhe eingestellt. Dann wird, wie bereits vorher beschrieben, vorgegangen.

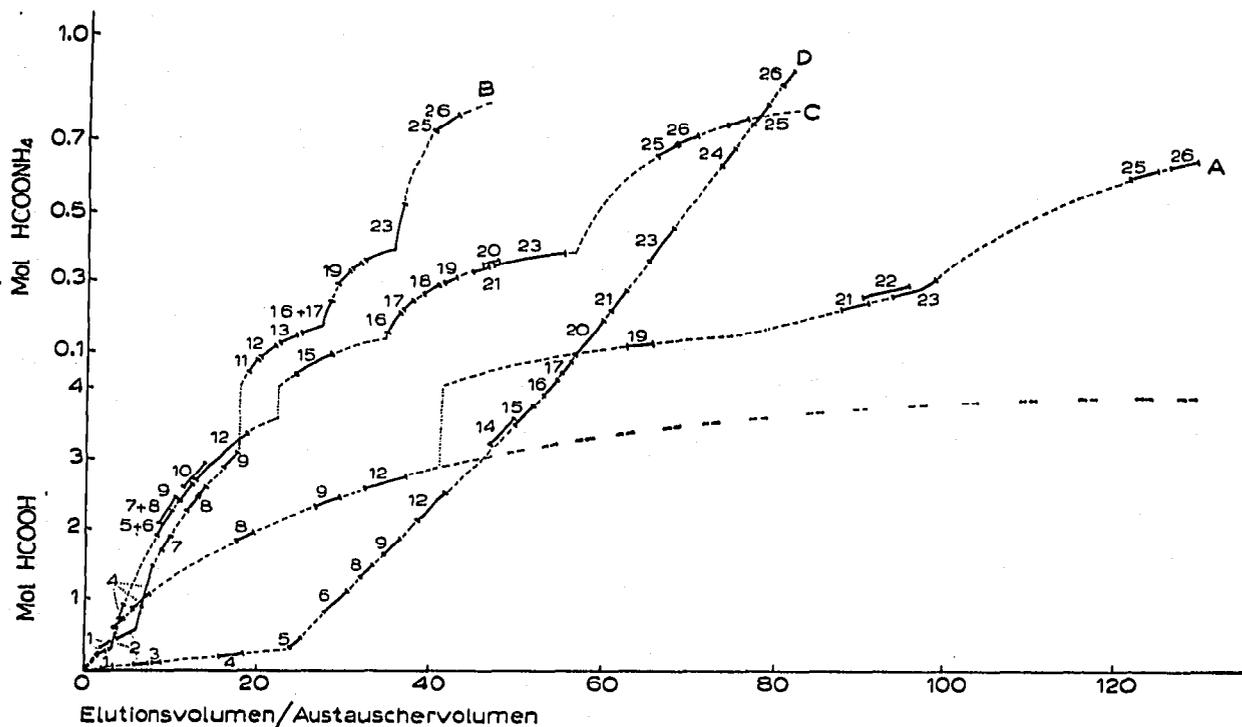


Fig. 2. Elutionsdiagramm der freien Nucleotide und Zuckerphosphate (Dowex 1 \times 10; Formiat-form). A = Auftrennung der Nucleotide nach HURLBERT *et al.*³. B = Auftrennung der Nucleotide nach der Modifikation von GILBERT AND YEMM⁴. C = Auftrennung der Nucleotide und Zuckerphosphate nach der Modifikation von STEHLIK UND ALTMANN⁵. D = Auftrennung der Nucleotide und Zuckerphosphate mit dem in Fig. 1 angegebenen Mischflaschensystem. 1 = Cytidin-5'-monophosphat; 2 = Diphosphopyridinnucleotid; 3 = Cytidin-5'-diphosphat-deriv.; 4 = Adenosin-5'-monophosphat; 5 = Hexose-monophosphat; 6 = Triose-monophosphat; 7 = Triphosphopyridinnucleotid; 8 = Guanodin-5'-monophosphat; 9 = Uridin-5'-monophosphat; 10 = Anorganisches Phosphat; 11 = Inosin-5'-monophosphat; 12 = Adenosin-5'-diphosphat; 13 = Riboflavindi-phosphat; 14 = Phosphorglycerat; 15 = Guanodin-5'-diphosphat-mannose; 16 = Uridin-5'-diphosphat-N-acetylglucosamin; 17 = Uridin-5'-diphosphat-glucose; 18 = Adenosin-2'-mono-phosphat-5'-diphosphat-ribose; 19 = Guanodin-5'-diphosphat; 20 = Fructose-1,6-diphosphat; 21 = Cytidin-5'-triphosphat; 22 = Uridin-5'-diphosphat; 23 = Adenosin-5'-triphosphat; 24 = 2,3-Diphosphoglycerat; 25 = Guanodin-5'-triphosphat; 26 = Uridin-5'-triphosphat.

Die durch dieses System erfolgende Auftrennung der freien Nucleotide und Zuckerphosphate an Dowex 1 \times 10 ist in der Fig. 2 wiedergegeben (Gradientenverlauf D). Zum Vergleich sind die ebenfalls an Dowex 1 \times 10 erzielten Auftrennungen, sowie die dafür verwendeten Gradienten an HCOOH und HCOONH₄ von HURLBERT *et al.*³ (Gradientenverlauf A) und deren Modifikationen von GILBERT UND YEMM⁴ (Gradientenverlauf B) sowie von STEHLIK UND ALTMANN⁵ (Gradientenverlauf C) eingezeichnet.

Institut für Biologie und Landwirtschaft*, Reaktorzentrum
Seibersdorf (Österreich)

G. STEHLIK

1 W. E. COHN, *J. Am. Chem. Soc.*, 72 (1950) 1471.

2 W. E. COHN UND E. VOLKIN, *J. Biol. Chem.*, 203 (1953) 319.

3 R. B. HURLBERT, H. SCHMITZ, A. F. BRUMM UND V. R. POTTER, *J. Biol. Chem.*, 209 (1954) 23.

4 D. A. GILBERT UND E. W. YEMM, *Nature*, 182 (1958) 1745.

5 G. STEHLIK UND H. ALTMANN, *Monatsh. Chem.*, in Druck.

Eingegangen den 20. November 1967

* Leiter: Prof. Dr. K. KAINDL.