

of 5-hydroxylysine¹¹. The ratio between the initial rates of decarboxylation of the two diastereoisomers of 3-hydroxyglutamic acid was of the same order of magnitude as that reported by other authors^{6,8,9}, and the material in peak I (Fig. 1) may therefore be designated as *threo*-3-hydroxy-DL-glutamic acid, and that in peak II as *erythro*-3-hydroxy-DL-glutamic acid.

This study was supported by a grant from the Swedish Medical Research Council (project No. B69-13X-585-05).

Department of Physiological Chemistry,
Kemikentrum, University of Lund,
S 220 07 Lund (Sweden)

GÖRAN LINDSTEDT

- 1 J. P. GREENSTEIN AND M. WINITZ, *Chemistry of the amino acids*, Wiley, New York, 1961.
- 2 L. BENOITON, M. WINITZ, S. M. BIRNBAUM AND J. P. GREENSTEIN, *J. Am. Chem. Soc.*, 79 (1957) 6192.
- 3 M. L. KORNGUTH AND H. J. SALLACH, *Arch. Biochem.*, 91 (1960) 39.
- 4 C. HEDGCOth AND C. G. SKINNER (checked by G. LINDSTEDT AND G. LINDAHL), *Biochem. Prep.*, 10 (1963) 67.
- 5 S. MOORE AND W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.*, 211 (1954) 907.
- 6 W. W. UMBREIT AND P. HENEAGE, *J. Biol. Chem.*, 20 (1953) 15.
- 7 W. J. LEANZA AND K. PFISTER, III, *J. Biol. Chem.*, 201 (1953) 377.
- 8 S. AKABORI, T. KANEKO, S. SAKURAI AND Y. IZUMI, *J. Chem. Soc. Japan*, 75 (1954) 942.
- 9 T. KANEKO, R. YOSHIDA AND H. KATSURA, *J. Chem. Soc. Japan*, 80 (1959) 316.
- 10 T. KANEKO AND R. YOSHIDA, *Bull. Chem. Soc. Japan*, 35 (1962) 1153.
- 11 S. LINDSTEDT AND G. LINDSTEDT, *Arkiv Kemi*, 19 (1962) 447.

Received January 6th, 1969

J. Chromatog., 40 (1969) 316-318

CHROM. 3925

Reproduzierbare Gradientenchromatographie an Kolonnen mit schrumpfenden Austauschern

Die Methoden der chromatographischen Fraktionierung von Proteingemischen oder solchen anderer hochmolekularer Naturstoffe haben seit Einführung passend substituierter Materialien mit Cellulose¹ oder Dextrangerüst als Ionenaustauscher eine weltweite Anwendung gefunden. Die technische Weiterentwicklung derartiger Austauscher führte zu Produkten, welche auch ohne Anwendung von Druck befriedigende Durchflusssgeschwindigkeiten während der Chromatographie liefern.

Bei steigender Ionenstärke des Elutionsmittels zeigen diese Austauscher in dessen eine mehr oder minder ausgeprägte Schrumpfung ihres Volumens, die bei starkem Anstieg der Ionenstärke während eines Chromatographieprozesses 40-60% des ursprünglichen Bettvolumens ausmachen kann. Während Fraktionierungen mit stufenweiser Elution durch ein derartiges Verhalten des Gel-Bettes nicht wesentlich beeinträchtigt werden, muss eine Gradientenchromatographie durch eine solche Volumenverminderung des Austauschers empfindlich gestört werden: Oberhalb des

J. Chromatog., 40 (1969) 318-321

sich kontrahierenden Gel-Bettes bildet sich eine zusätzliche "Mischkammer", in welcher das Eluens, bevor es in die Kolonne einsinkt, verdünnt wird, was zu einer unkontrollierbaren Verflachung des Gradienten Anlass gibt. Da bei Verwendung von Kolonnen unterschiedlicher Dimensionen oder solchen mit verschiedener Füllhöhe die "Mischkammer" auch verschiedenes Volumen besitzt, lassen sich vergleichende Untersuchungen über das chromatographische Verhalten von Substanzgemischen trotz Verwendung desselben Gradienten nicht reproduzierbar durchführen.

Die erwähnten Schwierigkeiten würden entfallen, wenn man das sich in seiner Konzentration ständig ändernde Elutionsmittel direkt auf die Oberfläche des schrumpfenden Gels in kleinen Volumenfraktionen so aufbringen könnte, dass es nicht zu einem störenden Überstand von Puffer auf dem Austauscherbett kommen kann.

Eine Anordnung, welche diese Anforderungen erfüllt und sich seit mehr als zwei Jahren in unserem Laboratorium besonders beim Arbeiten mit DEAE-Sephadex A 50* bewährt hat, wird nachstehend beschrieben.

Der Apparat besteht aus zwei Teilen, einem Adapter (Fig. 1), welcher direkt auf dem Austauscherbett aufsitzt und einer Steuereinheit (Fig. 2), die für den passenden Zufluss von Elutionsmittel sorgt. Die Funktion des Gerätes lässt sich folgendermassen beschreiben: Eine Pumpe fördert Elutionsmittel, welches über den Adapter der Austauscheroberfläche (Fig. 1b) zugeführt wird. Der ansteigende Flüssigkeitsspiegel (Fig. 1c) komprimiert das in der Luftkammer des Adapters eingeschlossene Luft-

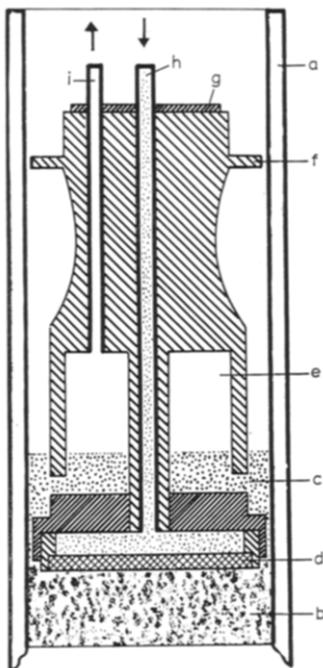


Fig. 1. Adapter. (a) Chromatographiekolonne; (b) Austauscher; (c) Elutionsflüssigkeit; (d) Fritte; (e) Luftkammer; (f) Abstandshalter; (g) Bleischeibe zur Gewichtskorrektur; (h) Zuführungsrohr für die Elutionsflüssigkeit; (i) Luftkammerrohr.

* Deutsche Pharmacia GmbH, Frankfurt/M.

volumen. Diese Drucksteigerung wird über einen feinen Schlauch einem Druckwellenschalter zugeleitet, der beim Ansprechen seiner Membran die Pumpe abschaltet und damit den Flüssigkeitszufluss unterbricht. Nach Ablauf einer an einem Relais einstellbaren und von der Chromatographiergeschwindigkeit abhängigen Zeit, während welcher das Eluens in das Gel-Bett eingesunken ist, wird die Pumpe wieder in Betrieb gesetzt und der Prozess wiederholt. Es gelingt auf diese Weise, das Elutionsmittel in kleinen Anteilen von *ca.* 1–2% des Gesamtvolumens des Gradienten der Kolonne zuzuführen.

Der Adapter (Fig. 1) ist aus Plexiglas hergestellt und besitzt an seiner breitesten Stelle einen um *ca.* 1 mm kleineren Durchmesser als das verwendete Chromatographierrohr (Fig. 1a). Der Boden des Adapters enthält eine Vylon-1-fritte (Fig. 1d), durch welche das Elutionsmittel (Fig. 1c) auf das Gel-Bett gelangt. Das Gewicht des Adapters ist so bemessen, dass er dem schrumpfenden Gel folgen kann ohne jedoch in es einzusinken. Für Kolonnen mit 33 mm Durchmesser hat sich ein Gewicht von *ca.* 20 g bewährt, für solche mit 16 mm eines von *ca.* 11 g. Durch Auflegen von flachen Bleischeiben (Fig. 1g) kann man das Gewicht des Adapters variieren und den geforderten Verhältnissen anpassen. Ein Abstandshalter (Fig. 1f) verhindert ein Verkanten oder Festklemmen des Adapters im Chromatographierrohr. Ausser dem Zuführungsrohr für den Puffer (Fig. 1h) (I.D. 1 mm) befindet sich exzentrisch dazu ein ebenfalls aus PVC bestehendes Rohr (Fig. 1i), welches die Luftkammer (Fig. 1e) über einen dünnen Silikonschlauch (I.D. 0.8 mm) mit dem Druckwellenschalter der Steuereinheit verbindet. Die Kompression des in der Kammer befindlichen Luftvolumens führt bereits bei einem Druck von 2–4 mm Wassersäule zum Ansprechen des hochempfindlichen Druckwellenschalters.

Ein Schaltbild der Steuereinheit ist in Fig. 2 wiedergegeben. Als Druckwellenschalter (Fig. 2a) für kleinste Drucke wurde der Typ DWK mit eingebauter Verstärkereinheit und Relais der Firma Max Bircher, Schaffhausen, Schweiz verwendet. Durch den Impuls des Druckwellenschalters wird ein Vielbereichszeitrelais (Fig. 2b) (Type 7 PN 20 (RS 120), Siemens AG) in Gang gesetzt, welches über ein Hilfsrelais (Fig. 2c) den Strom zur Pumpe (Fig. 2d) unterbricht. Gleichzeitig wird der Druckwellenschalter stromlos gemacht, um ein Osziillieren seiner Membran bei langsam abfallendem Flüssigkeitsspiegel zu verhindern. Für den Fall einer Störung im freien Ablauf des Effluents aus der Kolonne oder um die Chromatographie durch Schliessen eines Magnetventils (Fig. 2f) im Kolonnenausfluss zu beenden, wurde parallel zur Pumpe ein Sicherheitszeitrelais (Fig. 2e) (Type DZ 12/SG, Schleicher, Berlin) eingebaut. Es hat die Aufgabe, das unkontrollierte Ansteigen von Flüssigkeit im Kolonnenrohr für den Fall zu verhindern, dass die Membran des Druckwellenschalters in seiner Ruhephase nicht ausreichend entlastet wird und dieser daher nicht in der Lage war, die Pumpe über ein Hilfsrelais (Fig. 2g) abzuschalten. Man kann daher durch das Relais das gesamte Gerät nach einer vorwählbaren und die normale Laufzeit der Pumpe (wenige Minuten) um *ca.* 100% übersteigenden Zeit ausser Betrieb setzen.

Zur Herstellung des Gradienten verwenden wir im allgemeinen eine Gradientenpumpe (Beckman Instruments, München); gleich geeignet ist ein Gradientenmischer vom Typ des Varigrad² in Kombination mit einer Schlauchpumpe.

Aus der Funktionsweise der beschriebenen Apparatur folgt zwangsläufig, dass reproduzierbare Trennungen auch auf schrumpfenden Austauschern erhalten werden müssen, wie dies auch an Beispielen gezeigt werden konnte³. Das Gerät lässt sich

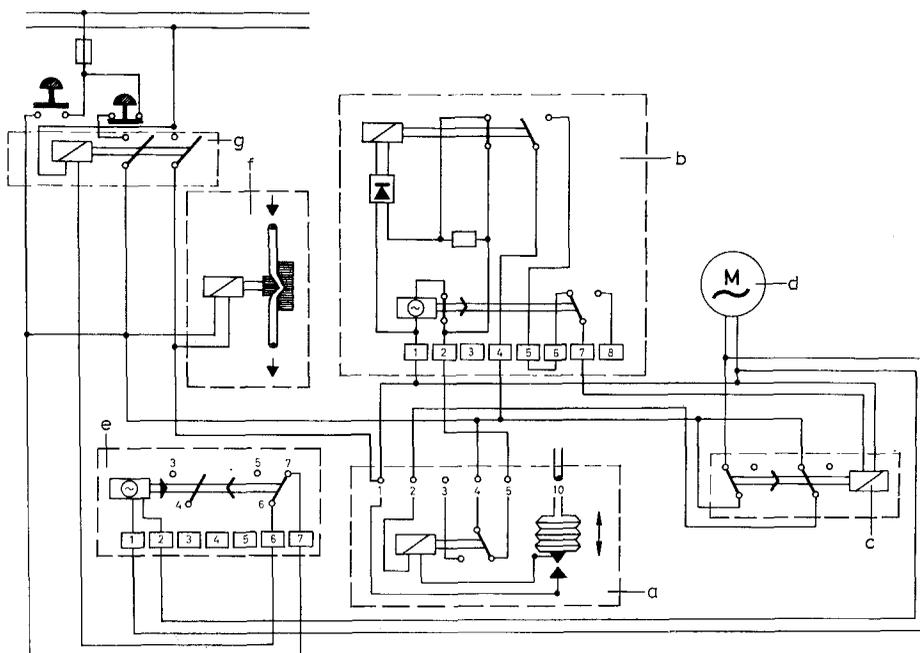


Fig. 2. Steuereinheit. (a) Druckwellenschalter; (b) Vielseitigzeitrelais; (c) Hilfsrelais; (d) Motor der Pumpe; (e) Sicherheitszeitrelais; (f) Magnetventil; (g) Hilfsrelais.

ausserdem in Kombination mit einem automatischen Pufferwechsler zur Durchführung von Chromatographien mit stufenweiser Veränderung des Elutionsmittels verwenden.

Max-Planck-Institut für Immunbiologie,
78 Freiburg/Br. (Deutschland)

B. KICKHÖFEN
A. UNGER
D. SCHEEL

1 E. A. PETERSON UND H. A. SOBER, *J. Am. Chem. Soc.*, 78 (1956) 751.

2 E. A. PETERSON UND H. A. SOBER, *Anal. Chem.*, 31 (1959) 857.

3 B. KICKHÖFEN, D. K. HAMMER UND D. SCHEEL, *Z. Physiol. Chem.*, 349 (1968) 1755.

Eingegangen am 19. Dezember 1968