

assay is desired the methyl esters of the PGF compounds may be quantitatively hydrolyzed in weak alkali. The other biologically active prostaglandins, however, are labile in alkali. A useful application of the described separations seems to be in the isolation of prostaglandins prior to analysis by GLC and/or mass spectrometry.

This study was supported by grant No B69-14X-2211 from the Swedish Medical Research Council. We are indebted to Dr. B. SAMUELSSON for supplying labeled prostaglandins E₂ and to Dr. J. PIKE of The Upjohn Company for unlabeled prostaglandins E₁, E₂ and F_{1α}.

Department of Pharmacology, Karolinska Institutet,
104 01 Stockholm 60 (Sweden)

E. ÄNGGÅRD
H. BERGKVIST

- 1 S. BERGSTRÖM, L. A. CARLSSON AND J. R. WEEKS, *Pharmacol. Rev.*, 20 (1968) 1.
- 2 P. W. RAMWELL AND E. G. DANIELS, in G. V. MARINETTI (Editor), *Lipid Chromatographic Analysis*, Vol. II, Marcel Decker, New York, 1969, pp. 313-344.
- 3 J. E. SHAW AND P. W. RAMWELL, *Methods Biochem. Anal.*, 17 (1969) 325.
- 4 B. SAMUELSSON, *J. Biol. Chem.*, 238 (1963) 3329.
- 5 M. BYGDAMAN AND B. SAMUELSSON, *Clin. Chim. Acta*, 13 (1966) 465.
- 6 K. GREEN AND B. SAMUELSSON, *J. Lipid Res.*, 5 (1964) 117.
- 7 A. NORMAN AND J. SJÖVALL, *J. Biol. Chem.*, 233 (1958) 872.
- 8 S. BERGSTRÖM, L. KRABISCH AND J. SJÖVALL, *Acta Chem. Scand.*, 14 (1960) 1706.
- 9 S. BERGSTRÖM AND J. SJÖVALL, *Acta Chem. Scand.*, 14 (1960) 1693.
- 10 M. HAMBERG AND B. SAMUELSSON, *J. Biol. Chem.*, 241 (1966) 257.
- 11 E. G. DANIELS AND J. E. PIKE, in P. RAMWELL AND J. E. SHAW (Editors), *Prostaglandin Symposium of the Worcester Foundation Experimental Biology*, October 1967, Interscience, London, New York, 1968, pp. 379-387.
- 12 N. H. ANDERSEN, *J. Lipid Res.*, 10 (1969) 316.
- 13 J. SJÖVALL, E. NYSTRÖM AND E. HAAHTI, *Advan. Chromatog.*, 6 (1968) 119.

Received January 19th, 1970

J. Chromatog., 48 (1970) 542-544

CHROM. 465I

Gelchromatographie von strukturisomeren Phenylalanin-Peptiden an Sephadex G-15

Über die unterschiedlich starke Retardation von aromatischen und heterocyclischen Verbindungen an Dextrangelen berichteten schon PORATH¹ und GELOTTE². Der Mechanismus dieses in der Gelchromatographie als "reversible Adsorption" bezeichneten Effekts scheint ziemlich komplizierte Wechselwirkungen zwischen Netzwerk^{3,4}, Substanz^{5,6} und Elutionsmittel^{3,5} einzubeziehen. Dieser Adsorptionseffekt kann sich bei der Siebanalyse von Proteinhydrolysaten wie den Peptonen nachteilig auswirken, da hochmolekulare Peptide, die aromatische Aminosäuren enthalten, gemeinsam mit anderen niedermolekularen Peptiden von der Säule eluiert werden. Aus der Literatur sind aber auch Beispiele bekannt, wo dieser Adsorptionseffekt zur Lösung spezieller Probleme ausgenutzt wurde wie z.B. zur Trennung von homologen

J. Chromatog., 48 (1970) 544-546

Phenylalanin-Peptiden⁷ oder von Tyrocidinen⁸. In Fortsetzung unserer Versuche über die Gelchromatographie von Peptonen⁹ wollten wir anhand von strukturisomeren Phenylalanin-Peptiden die Eigenschaften von Sephadex G-15 studieren und damit die Verwendbarkeit des Gels für die Siebanalyse von Peptonen prüfen. Zu Vergleichszwecken wurden auch einige Peptide von nichtaromatischen Aminosäuren mit herangezogen.

Methodik

Für die Versuche wurde ein Chromatographierrohr mit den Abmessungen 1.2×105 cm bis zu einer Höhe von 102 cm mit in dest. Wasser gequollenem Sephadex G-15 gefüllt und mit 300 ml Elutionsflüssigkeit äquilibriert. Die Versuche wurden mit den folgenden Lösungsmitteln in der angegebenen Reihenfolge durchgeführt: (A) 0.2 M Essigsäure; (B) 0.2 M Essigsäure mit 0.1 M NaCl; (C) 0.2 M Essigsäure mit 0.5 M NaCl; (D) 0.2 M Essigsäure-Dioxan (90:10); (E) 0.2 M Essigsäure, zuvor wurde die Säule mit dest. Wasser neutral gewaschen und anschliessend mit 300 ml 1 M Pyridinlösung behandelt⁵; das verbleibende Pyridin wurde mit 0.2 M Essigsäure von der Säule eluiert; (F) 0.01 M NaOH; (G) 0.01 M NaOH mit 0.5 M NaCl. Es wurden jeweils 1 μ Mol Aminosäure bzw. Peptid in 0.5 ml Lösungsmittel gelöst und auf die Säule gegeben. Das Eluat wurde mit einem automatischen Fraktionssammler in 1 ml Fraktionen aufgefangen. Die einzelnen Fraktionen wurden mit 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure bzw. Ninhydrin (Prolin und Pro-Gly) umgesetzt und die Extinktionen bei 420 nm gemessen.

Die Berechnung der K_{av} -Werte erfolgte nach der Gleichung:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_t - V_0}$$

Das mit der entsprechenden Menge Wasser ausgemessene Gesamtvolumen V_t betrug 110 ml. Das äussere Volumen V_0 wurde mittels Rinderserumalbumin zu 40 ml bestimmt.

Die für die Versuche verwendeten Peptide wurden nach bekannten Methoden synthetisiert und sind aus der Tabelle I zu ersehen.

Diskussion

Anhand der K_{av} -Werte ist zu ersehen, dass die strukturisomeren Phenylalanin-Peptide unterschiedlich stark adsorbiert werden, wobei die Peptide mit N-terminalem Glycin stärker retardiert werden als die entsprechenden Peptide mit C-terminalem Glycin. Diese unterschiedliche Affinität zur Gelphase ist auch deutlich bei den Leucin-Peptiden zu erkennen.

Bekanntlich spielt bei der Gelchromatographie das effektive hydrodynamische Volumen eines Moleküls eine bedeutende Rolle¹⁰, da durch die Hydratation ein verhältnismässig grösser wirksames Molekül vorliegt. Durch Salzzugabe zum Elutionsmittel wird die Hydratationsschicht und damit auch die effektive Molekülgrösse kleiner. Darüber hinaus werden die aromatischen Aminosäuren und Peptide stärker adsorbiert, da sich der Kontaktabstand zur Gelmatrix verringert hat. Demzufolge werden die jeweiligen Moleküle entsprechend später von der Säule eluiert. Trotzdem ist damit der von uns beobachtete Effekt, dass durch Zugabe von NaCl (Lösungs-

TABELLE I

 K_{av} -WERTE VON AMINOSÄUREN UND PEPTIDEN AN SEPHADEX G-15

Säulenparameter, 102×1.2 cm; Gesamtvolumen (V_t), 110 ml; Ausschlussvolumen (V_0), 40 ml. Elutionsmittel: (A) 0.2 M Essigsäure; (B) 0.2 M Essigsäure mit 0.1 M NaCl; (C) 0.2 M Essigsäure mit 0.5 M NaCl; (D) 0.2 M Essigsäure-Dioxan (90:10); (E) 0.2 M Essigsäure, nachdem die Säule mit 1 M Pyridin gewaschen wurde; (F) 0.01 M NaOH; (G) 0.01 M NaOH mit 0.5 M NaCl.

| | Elutionsmittel | | | | | | |
|--------------|----------------|------|------|------|------|------|------|
| | A | B | C | D | E | F | G |
| Glycin | 0.45 | 0.49 | 0.49 | 0.48 | 0.45 | 0.18 | 0.42 |
| Phenylalanin | 0.73 | 0.79 | 0.88 | 0.71 | 0.72 | 0.28 | 0.73 |
| Gly-Phe | 0.73 | 0.96 | 1.09 | 0.71 | 0.73 | 0.24 | 0.59 |
| Phe-Gly | 0.65 | 0.81 | 0.91 | 0.63 | 0.63 | 0.24 | 0.65 |
| Gly-Gly-Phe | 0.66 | 0.86 | 0.96 | 0.65 | 0.68 | 0.21 | 0.52 |
| Phe-Gly-Gly | 0.44 | 0.49 | 0.51 | 0.48 | 0.44 | 0.18 | 0.42 |
| Alanin | 0.42 | — | 0.48 | 0.45 | 0.42 | — | — |
| Gly-Ala | 0.40 | — | 0.49 | 0.44 | 0.41 | — | — |
| Ala-Gly | 0.40 | — | 0.49 | 0.43 | 0.40 | — | — |
| Leucin | 0.45 | — | 0.53 | 0.47 | 0.44 | — | — |
| Gly-Leu | 0.48 | — | 0.66 | 0.48 | 0.46 | — | — |
| Leu-Gly | 0.41 | — | 0.58 | 0.44 | 0.41 | — | — |
| Prolin | 0.40 | — | 0.43 | 0.43 | 0.41 | — | — |
| Gly-Pro | 0.40 | — | 0.49 | 0.43 | 0.41 | — | — |
| Pro-Gly | 0.38 | — | 0.46 | 0.41 | 0.40 | — | — |

mittel B und C) die Peptide Gly-Phe, Phe-Gly, Gly-Gly-Phe, Gly-Leu und Leu-Gly später als die entsprechenden Aminosäuren Glycin, Leucin und Phenylalanin eluiert werden, nicht zu erklären. Während in 0.01 M NaOH alle untersuchten Verbindungen wie erwartet von der Gelphase ausgeschlossen werden, bewirkt die Zugabe von NaCl eine unterschiedlich starke Adsorption an die Gelmatrix. Den von EAKER UND PORATH an Sephadex G-10 beobachtete Effekt, dass nach dem Waschen des Gels mit 1 M Pyridinlösung die Aminosäuren mit 0.2 M Essigsäure früher eluiert wurden als vor der Pyridinbehandlung⁶, konnten wir an Sephadex G-15 nicht feststellen.

Staatliches Institut für Immunpräparate und Nährmedien,
112 Berlin-Weissensee (D.D.R.)

P. ZISKA

- 1 J. PORATH, *Biochim. Biophys. Acta*, 39 (1960) 193.
- 2 B. GELOTTE, *J. Chromatog.*, 3 (1960) 330.
- 3 J. JANSON, *J. Chromatog.*, 28 (1967) 12.
- 4 H. DETERMANN UND I. WALTER, *Nature*, 219 (1968) 604.
- 5 D. EAKER UND J. PORATH, *Separation Sci.*, 2 (1967) 507.
- 6 J. A. DEMETRIOU, F. M. MACIAS, M. J. McARTHUR UND J. M. BEATTIE, *J. Chromatog.*, 34 (1968) 342.
- 7 R. K. BRETTHAUER UND A. M. GOLICHOWSKI, *Biochim. Biophys. Acta*, 155 (1967) 549.
- 8 B. MACH UND E. L. TATUM, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 52 (1964) 876.
- 9 P. ZISKA, *Arch. Hyg.*, 152 (1968) 73.
- 10 J. W. PAYNE UND C. GILVARG, *J. Biol. Chem.*, 243 (1968) 6291.

Eingegangen am 3. Februar 1970

J. Chromatog., 48 (1970) 544-546