

CHROM. 9072

## Note

### Neuartige Anwendung von Celluloseacetat-Folien als Trennschicht für die Chromatographie

E. VON ARX und M. FAUPEL

*Forschungslaboratorien der Division Pharma der Ciba-Geigy AG, Basel (Schweiz)*

(Eingegangen am 3. Februar 1976)

Bei elektrophoretischen Trennungen von Peptiden auf Celluloseacetat-Folien machten wir die Beobachtung, dass Verbindungen trotz gleicher Ladung und Molekülgrösse unterschiedliche Laufstrecken aufweisen können. Dieses Verhalten deuteten wir als Verteilungseffekt zwischen dem wässrigen Fliessmittel und der relativ lipophilen Trennschicht. Es wurde deshalb versucht, die gleichen Peptide auf Acetatfolien zu chromatographieren. Als Fliessmittel dienten die bei der Elektrophorese verwendeten Pufferlösungen. Bei diesen Chromatogrammen konnten ähnliche Unterschiede in den Wanderungsgeschwindigkeiten wie bei der Elektrophorese beobachtet werden.

Für weitere Versuche zur Optimierung der Methode wurde eine einfache Trennkammer für die aufsteigende Chromatographie entwickelt. Die Celluloseacetat-Chromatographie (CAC) erwies sich inzwischen für die Differenzierung von Peptiden als äusserst nützlich.

### MATERIAL UND METHODEN

#### *Peptide*

Als Testsubstanzen diente eine Anzahl verschiedenartiger Polypeptid-Hormone (s. Text zu Fig. 3). Mit Ausnahme des käuflichen extraktiven Schweine-Insulins waren diese in unseren Peptidlaboratorien synthetisiert worden.

#### *Trennschichten*

Celluloseacetat-Folien Cellogel (Chemetron, Mailand, Italien),  $8 \times 17$  cm. Die Folien sind 250–300  $\mu\text{m}$  dick; die Porenweite ist mit *ca.* 0.4  $\mu\text{m}$  angegeben. Das Material ist beständig in wässrigen Lösungen, verdünnten Säuren und Alkali und teilweise in organischen Lösungsmitteln (s. Tabelle I, nach Chin<sup>1</sup>). Die Cellogelfolien werden nass verpackt in Methanol-Wasser (40:60) geliefert.

Ausser Cellogel wurden folgende Acetatfolien geprüft und als gleichwertig befunden: Sepraphore III,  $2.5 \times 17$  cm (Gelman, Ann Arbor, Mich., U.S.A.; Cat. No. 62038) und Sartorius,  $8 \times 17$  cm (Sartorius-Membranfilter, Göttingen, B.R.D.).

#### *Fliessmittel*

(A) 0.1 M Kaliumhydrogenphthalat + 0.05 M NaOH (pH 5.0).

TABELLE I

## LÖSUNGSMITTEL-BESTÄNDIGKEIT VON CELLULOSEACETAT-FOLIEN

<i>Beständig in Alkoholen</i>	<i>Beständig in Kohlenwasserstoffen</i>	<i>Löslich in</i>
Methanol	Benzol	Aceton
Äthanol	Xylo	Eisessig
Propanol	Toluol	Chloroform
Buzanol	Petroläther	Dioxan
		Essigester
		Methylenchlorid

(B) 0.043 M Dinatriumtetraborat + 0.017 M Kaliumdihydrogenphosphat (pH 9.0).

(C) 0.09 M Kaliumchlorid + 0.01 M HCl (pH 2.06).

(D) 0.1 M Essigsäure + 0.1 M Natriumacetat (pH 4.65)–Pyridin (90:10).

(E) 0.03 M NH<sub>3</sub>.

(F) 0.1 N HCl.

*Nachweisreagenzien*

(1) Modifikation des Reagens nach Barton *et al.*<sup>2</sup>: 2 g Kaliumhexacyanoferrat(III) (K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]) und 1.7 g Eisen(III)-chlorid werden in 100 ml Wasser gelöst. Waschlösung: 5% wässrige Phosphorsäure.

(2) Modifikation von Sulfanilsäure diazotiert (Paulys Reagens) für kupplungsfähige Amine<sup>3</sup>.

(3) TDM-Reagens<sup>4</sup>; Modifikation der Chlor-*o*-Tolidin Farbreaktion für die Dünnschichtchromatographie.

(4) Indikatoren die bei der Elektrophorese auf Acetatfolien angewendet werden<sup>1</sup>.

*Trennkammer*

Die Kammer aus Plexiglas, *ca.* 18 × 12 × 6 cm (Fig. 1 und 2), wird durch einen Deckel mit Nuten verschlossen. Am Deckel ist ein Plexiglas Block mit zwei rostfreien Schrauben befestigt. Mit diesen Schrauben wird ein Andrückplättchen gehalten und durch zwei Rändelmuttern angedrückt. Zum Einführen der zwischen zwei dicken Filterpapieren (Whatman 17; 4 × 8 cm) eingeklemmten Acetatfolie (8 × 17 cm), werden die Rändelmuttern gelöst. Durch Federn wird das Andrückplättchen vom Block weggedrückt, so dass die Folie leicht eingeschoben werden kann. Nach dem Fixieren der Folie kann der Deckel aufgesetzt werden. Wenn der obere Rand der Folie am Deckel anstösst, ist der untere *ca.* 2 mm vom Boden der Kammer entfernt. Der Fliessmittelbedarf beträgt dann 30–50 ml.

*Arbeitsvorschrift*

Die Folie wird während 10 min in einer Schale in Fliessmittel eingelegt und anschliessend zwischen Filterpapier abgetrocknet. Sie wird nun sofort an einem Ende zwischen zwei Filterpapieren (4 × 8 cm) in der Klemmvorrichtung am Deckel fixiert. Die Substanzlösung (1–2 µl = 1–40 µg) wird dann 2 cm vom unteren Rand aufge-

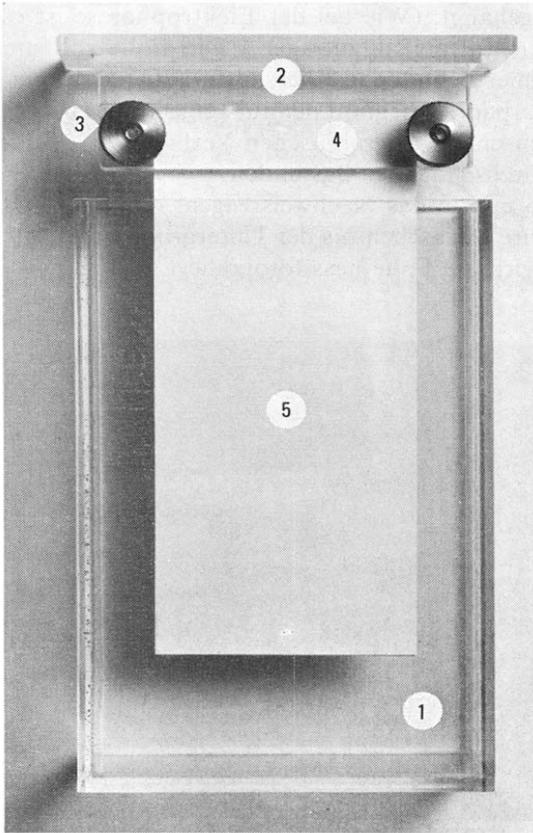


Fig. 1. Trennkammer. 1, Kammer; 2, Deckel; 3, Block mit rostfreien Schrauben, Andrückplättchen und Rändelmuttern; 4, Filterpapiere; 5, Folie.

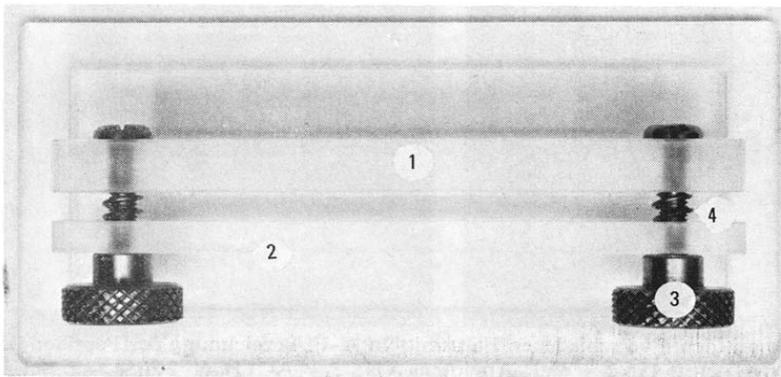


Fig. 2. Deckel. 1, Block mit zwei rostfreien Schrauben; 2, Andrückplättchen; 3, Rändelmuttern; 4, Federn.

tragen und die Folie in das Gefäss eingehängt. (Wie bei der Elektrophorese ist es möglich, grössere Mengen Substanz strichförmig aufzutragen.) Die Folie soll um *ca.* 5 mm in das unten in der Trennkammer befindliche Fliessmittel (30–50 ml) eintauchen; durch die Saugwirkung der Filterpapiere beginnt der aufsteigende Transport des Fliessmittels. Die Laufzeit muss dem chromatographischen Verhalten der Substanzen angepasst werden. Sie beträgt durchschnittlich 3 Stunden.

Nach dem Lauf wird die Folie 15 min in das Nachweisreagens eingelegt und anschliessend in verdünnter Phosphorsäure gewaschen bis der Untergrund möglichst weiss erscheint. Nach kurzem Wässern wird die Folie nass fotografiert.

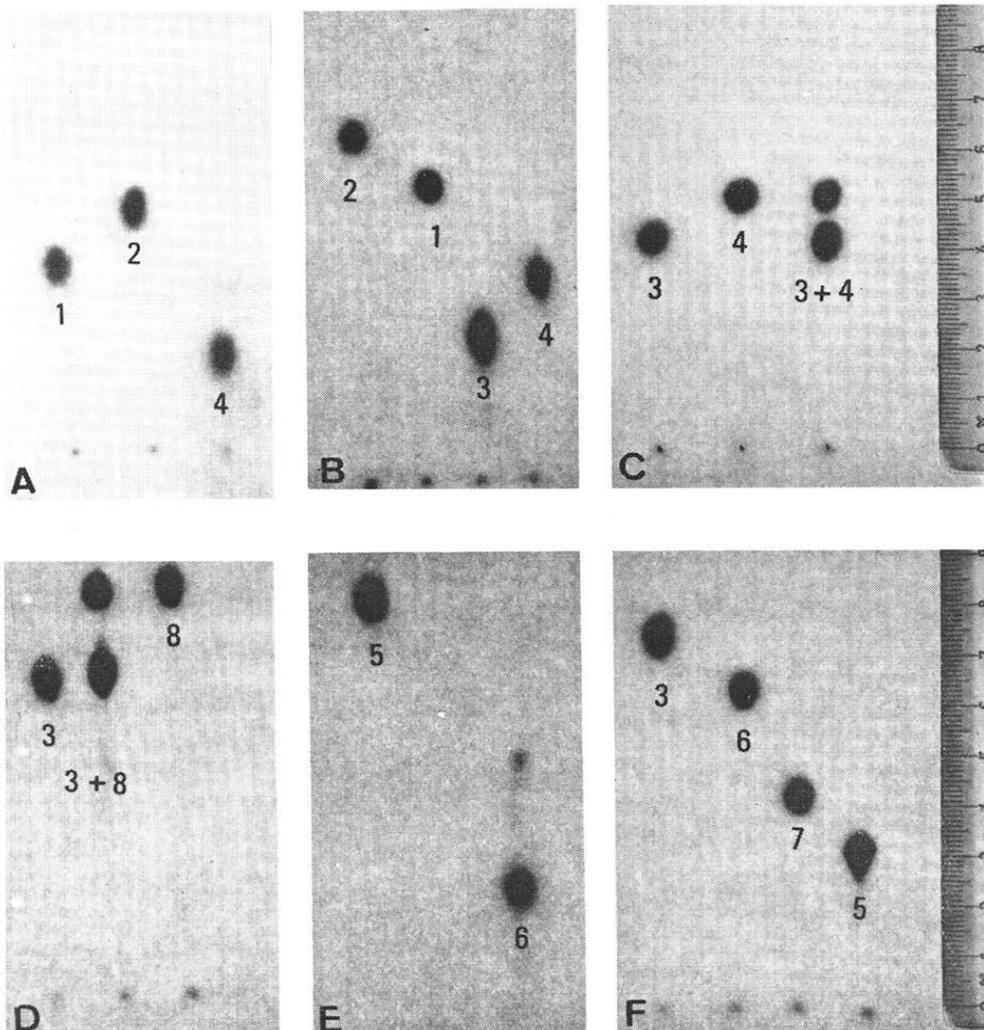


Fig. 3. Chromatogramme mit den 6 verschiedenen Fliessmitteln A-F. Bezeichnung der Peptide: (je 20  $\mu$ g) 1 = Asn<sup>1</sup>-Val<sup>2</sup>-Angiotensin II; 2 = Val<sup>2</sup>-Angiotensin II; 3 = ACTH (1-24); 4 = D-Ser<sup>1</sup>-Lys<sup>17,18</sup>-ACTH (1-18)-amid; 5 = Calcitonin M; 6 = Schweine-Insulin (Zn-frei); 7 = Somatostatin; 8 = ACTH (1-24)-Sulfoxid.

## ERGEBNISSE

In Fig. 3 sind sechs Chromatogramme von bekannten Peptiden in verschiedenen Fließmittel-Systemen als Beispiele wiedergeben. Einige dieser Trennungen konnten mit den bisher bekannten Trennsystemen auf Dünnschicht nicht mit gleicher Auflösung verwirklicht werden. Beachtenswert ist z.B. die gute Auftrennung von ACTH (1-24) (Nr. 3) und dessen Sulfoxid (Nr. 8) im System D. Allgemein kann festgestellt werden, dass mit der hier beschriebenen CAC-Methode, hydrophile Peptide weiter wandern als Lipophile.

Die Handhabung ist äusserst einfach und die Chromatogramme sind leicht reproduzierbar. Eine densitometrische Auswertung kann wie bei Elektrophogrammen erfolgen.

## DANK

Wir danken den Herren Drs. B. Riniker und W. Rittel für wertvolle Anregungen.

## LITERATUR

- 1 H. P. Chin, *Cellulose Acetate Electrophoresis*, Ann Arbor-Humphrey Science Publishers, London, Ann Arbor, Mich., 1970.
- 2 G. M. Barton, R. S. Evans und J. A. F. Gardner, *Nature (London)*, 170 (1952) 249.
- 3 E. von Arx und R. Neher, *J. Chromatogr.*, 12 (1963) 329.
- 4 E. von Arx, M. Faupel und M. Brugger, *J. Chromatogr.*, 120 (1976) 224.