

Determann · Gelchromatographie



Helmut Determann

Gelchromatographie

Gelfiltration Gelpermeation Molekülsiebe

Ein Laboratoriumsbuch

Mit 40 Abbildungen

Springer-Verlag

Berlin · Heidelberg · New York 1967

Dr. phil. nat. HELMUT DETERMANN, Privatdozent

Institut für Organische Chemie der Universität Frankfurt am Main

ISBN 978-3-642-49613-4
DOI 10.1007/978-3-642-49905-0

ISBN 978-3-642-49905-0 (eBook)

Alle Rechte, insbesondere das der Übersetzung in fremde Sprachen, vorbehalten. Ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages ist es auch nicht gestattet, dieses Buch oder Teile daraus auf fotomechanischem Wege (Fotokopie, Mikrokopie) oder auf andere Art zu vervielfältigen. © by Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1967. Library of Congress Catalog Card Number 67-17946.

Softcover reprint of the hardcover 1st edition 1967

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Titel-Nr. 1420

Geleitwort

Es gibt wissenschaftliche Bücher, die mit noch so vielen Worten in ihrem Arbeitsaufwand nicht gerechtfertigt werden können. Das Gegenteil trifft zu bei der Aufgabe, diesem Buch einige Worte mit auf den Weg zu schicken.

In einer selbst für die heutigen Verhältnisse kurzen Zeitspanne hat die Gelchromatographie eine Entwicklung und Verbreitung erfahren, die man bisher kaum an einer anderen Methode beobachten konnte. Die neue, originelle Stofftrennung ist schon heute in allen Laboratorien, die sich mit hochmolekularen Substanzen beschäftigen, aus Erfahrung beliebt und gepriesen, in den anderen wenigstens vom Hörensagen bekannt. Trotzdem hat sich allgemein sehr bald der Wunsch eingestellt, die geistige Entwicklung, die theoretischen Grundlagen und die experimentelle Technik der neuen Methode in übersichtlicher Weise präsentiert zu bekommen. Allen diesen Wünschen wird das Buch eines Experten vollauf gerecht. Sein Verfasser hat die Entwicklung von Anfang an persönlich mitgemacht und weitergetrieben. Er hat die Gelchromatographie, auch der Proteine, auf der Dünnschicht ermöglicht, für lipophile Substanzen den Übergang vom Wasser ins organische Lösungsmittelsystem mitbearbeitet und theoretische Vorstellungen zum Verständnis der für die Trennung maßgebenden Effekte entwickelt. Das vorliegende Buch scheint mir sogar neue Wege anzuregen. Der Leser verlangt nicht nur eine klare Schilderung der Vorgänge, sondern auch praktische Anweisungen. Beidem ist hier von der Seite des Fachmanns gedient.

Was an Anregungen für den Weiterdenkenden und an Weisungen zur Vervollständigung für den Techniker zwischen den Zeilen des knappen und klaren Textes steht, soll und kann der aufmerksame Leser selbst herausfinden. Im Zeitalter des Übergangs von der Chemie der gelösten Stoffe zu der der strukturierten Bezirke, für die die in Wasser quellenden Gele Modellsysteme zu liefern vermögen, mag dieses Buch auch ein Anfang zu neuem Denken sein.

THEODOR WIELAND

Vorwort

Die Gelchromatographie ist eine neue Methode zur Trennung, Reinigung und Analyse von Stoffgemischen. Da die Aufteilung meist durch Unterschiede im Molekulargewicht zustande kommt, kann man umgekehrt auch das Molekulargewicht durch Gelchromatographie bestimmen. Aufgrund der apparativen Einfachheit und der bequemen Arbeitsweise hat sie sich im Verlauf weniger Jahre in viele Laboratorien der Chemie und Medizin eingeführt. Man verfügt bereits über eine erhebliche Anzahl von Hilfsmitteln und Ergänzungsmöglichkeiten, sowohl was die Anwendung der Methode im Mikrobereich als auch im präparativen Maßstab betrifft. Auf dem Grenzgebiet zwischen Chemie, Biologie und Medizin hat die Gelchromatographie als technisch-fabrikatorisches Hilfsmittel Bedeutung erlangt. Was möglicherweise anfänglich als spezielle biochemische Laboratoriumstechnik gelten konnte, hat sich zu einer chromatographischen Standard-Methode entwickelt. Heute wird die Gelchromatographie überall dort angewendet, wo man Substanzen mit unterschiedlichen Molekulargewichten trennen und analysieren möchte.

In dem weiten Anwendungsbereich liegen zugleich die Chancen und die Schwierigkeiten für dieses Buch. Es sind zwar einige Zusammenfassungen und Literaturübersichten erschienen, doch sind sie entweder auf einen bestimmten Gesichtspunkt ausgerichtet oder sehr knapp gehalten. Daher schien es an der Zeit, die spezielle Technik und das umfangreiche experimentelle Material umfassender darzustellen. Der Bogen, der mit Hilfe der Gelchromatographie trennbare Stoffe, spannt sich von lebenden Viren über Proteine, Kohlenhydrate und Nucleinsäuren mit ihren Bausteinen, über Hormone, Antibiotika und Lipide, bis hin zu den synthetischen Hochpolymeren. Diese Vielfalt der Ergebnisse bringt es mit sich, daß dieses Buch nur ein Leitfaden zur Anwendung der Gelchromatographie auf die verschiedenen Probleme sein kann. Es war in dem gesteckten Rahmen nicht möglich, alle publizierten Ergebnisse zusammenzufassen. Die speziellen Eigenschaften der verschiedenen Substanzklassen erfordern besondere experimentelle Bedingungen; so stehen denn auch praktische Gesichtspunkte bei diesem Buch im Vordergrund.

Die ausführliche Abhandlung der Versuchstechnik folgt einer kurzen Einführung mit geschichtlichem Überblick. Die theoretischen Grundlagen der Gelchromatographie sind noch nicht sehr gefestigt, entsprechend wird ihrer Behandlung wenig Platz eingeräumt. Anschließend werden anhand ausgewählter Beispiele die verschiedenen Techniken und ihre Anwendungs-

möglichkeiten ausführlich besprochen. Von den vielfältigen Anwendungen in der biologischen Chemie konnten nur wenige Versuchsbeispiele genauer beschrieben werden. Weitere Ergebnisse aus diesem Bereich werden, nach Problemkreisen aufgegliedert, am Schluß des Buches zusammengefaßt.

Es ist die Absicht dieses Buches, den Leser mit den Methoden, Möglichkeiten und Grenzen der Gelchromatographie bekannt zu machen und ihn zu entsprechenden Versuchen auf seinem Fachgebiet anzuregen.

H. DETERMANN

Frankfurt am Main, im Frühjahr 1967

Inhaltsverzeichnis

Erstes Kapitel

Einführung

Stofftrennung aufgrund von Molekulargewichtsunterschieden	1
Dialyse	2
Homogene Gele	3
Chromatographie an granulierten Gelen	4
Versuchsbeispiel	6
Diskussion des Namens	8
Historischer Überblick	9
Ionenaustauscher	9
Neutrale Gele	10
Literatur	12

Zweites Kapitel

Praxis der Gelchromatographie

Materialien	14
Herstellung von hydrophilen Gelen	16
Dextrangele	16
Polyacrylamidgele	19
Agargele, Agarosegele	21
Herstellung von organophilen Gelen	23
Sephadex-Derivate	23
Acrylgele	24
Polystyrolgele	25
Aerogegele	27
Handelsübliche Gele	28
Sephadex	28
Sephadex LH-20	30
Bio-Gel	31
Agarose	32
Styrigel	33
Geräte	34
Kolonnen	35
Pumpen	36
Schlauchverbindungen	38
Detektoren	39
Fraktionensammler	42
Integrierte Einheiten	42
Versuchstechnik mit Kolonnen	45
Packen des Gelbetts	45
Chromatographie	47
Starten	47

Eluieren	49
Analysieren	51
Verlängerung des Gelbetts	51
Umlauf-Chromatographie	52
Dünnschicht-Gelchromatographie	55
Vorbereitung	55
Ausführung	56
Ergebnisse	58
Zentrifugentechnik	59
Geräte	60
Versuchsbeispiele	62
Entsalzung in der Korb-Zentrifuge	62
Konzentrierung	62
Literatur	64

Drittes Kapitel

Theorie

Zahlenmäßige Auswertung der Versuchsergebnisse	68
Volumenverhältnisse in der Gelpackung	68
Elutionsparameter	70
Trennleistung einer Gelpackung	73
Versuche zur Deutung des Trenneffekts	76
Das Ausschluß-Konzept	77
Einfache geometrische Modelle	78
Das Ogston-Laurent'sche Gelmodell	79
Das Konzept der Diffusionsbehinderung	81
Vergleichende Diskussion der Konzepte	82
Das Verteilungs-Konzept	83
Affinität gelöster Stoffe zur Gelphase	85
Verteilung und Adsorption	85
Hydrophile Gele	87
Literatur	89

Viertes Kapitel

Anwendungsprinzipien

Gelfiltration	93
Entsalzung	94
Gruppentrennung	97
Modifizierung von Makromolekülen	99
Komplexbildung	102
Gelchromatographie	106
Molekulargewichtsbestimmung	112
Eichung	113
Technik	118
Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen	120
Theorie	120
Ergebnisse	122
Assoziationsgleichgewichte	125

Untersuchung polydisperser Systeme	127
Allgemeine Grundlagen	128
Gelchromatographie	129
Auswertung von Gel-Permeations-Chromatogrammen	131
Ergebnisse	134
Trennung ohne Größenunterschiede	137
Chromatographie mit wäßrigen Elutionsmitteln	138
Chromatographie mit organischen Lösungsmitteln	141
Fraktionierte Fällung	144
Literatur	145

Fünftes Kapitel

Ergebnisse

Enzymologie	151
Isolierung von Enzymen	151
Enzymatische Reaktionen	153
Endokrinologie	154
Chemie der Plasmaproteine	157
Strukturermittlung von Proteinen	161
Nucleinsäure-Chemie	164
Nucleinsäuren	164
Oligonucleotide	166
Virustrennung	167
Kohlenhydrate	167
Klinische Chemie	169
Verschiedene Anwendungsgebiete	171
Literatur	175

Bibliographie	179
Namenverzeichnis	180
Sachverzeichnis	197