

Einige neue Trennungsmethoden und ihre Anwendung auf biochemische und organisch-chemische Probleme*

Von ARNE TISELIUS**

Trennmethode von ausgeprägter Spezifität sind von grundlegender Bedeutung für die organische und biologische Chemie – ja für die Chemie überhaupt. Schon die Definition des Begriffes «chemische Verbindung» zum Unterschied von mechanischer Mischung fusst, prinzipiell gesprochen, auf Trennungsvorgängen. Selbstverständlich denkt man in erster Linie an präparative Arbeiten, wenn man die Bedeutung und die Bewertung verschiedener Trennungsoperationen diskutiert. Bei biochemischen Problemstellungen rücken einige besonders für biologisches Material wichtige Gesichtspunkte in den Vordergrund. Erstens sind derartige Systeme meistens sehr kompliziert zusammengesetzt und enthalten eine Menge hochmolekularer Substanzen, die sich oft nur sehr schwer trennen lassen und die auch meist besonders schwierig zu charakterisieren sind, wenigstens wenn sie nicht durch sehr spezifische biochemische Reaktionen gekennzeichnet werden können. Dazu kommt ein anderes Problem. Manche biochemische Substanzen sind unter den Bedingungen gebräuchlicher chemischer Operationen instabil, und dies gilt noch mehr für viele der spezifischen Komplexe, die in der lebenden Zelle ausserordentlich wichtige Funktionen ausüben. Deshalb muss man in der Biochemie besonders auf möglichst schonende – aber doch spezifisch auswählende – Methoden Wert legen. Es kommen hier vor allem eine Reihe von Methoden in Frage, die sich im Prinzip auf einfache physikalische Erscheinungen gründen; ihre neuartige Ausführung und Anwendung möchte ich in dieser Vorlesung durch einige Beispiele, vor allem aus meinem eigenen Laboratorium, beleuchten. Es handelt sich dabei nicht nur um präparative Probleme, sondern manchmal auch um vorläufige Charakterisierungen, wie sie bisher nur schwer möglich waren, die jedoch – in Erwartung einer endgültigen chemischen Charakterisierung – oft wertvoll sind. Darüber hinaus tritt die Anwendung neuartiger Trennungsmethoden als Hilfsmittel der Strukturbestimmung, besonders von komplizierten hochmolekularen Verbindungen, mehr und mehr in den

Vordergrund. Es genügt wohl, hier auf die genaue Bestimmung der Aminosäure-Sequenz in Eiweissmolekülen durch SANGER und seine Nachfolger und auf die ausschlaggebende Rolle, die neue chromatographische und elektrophoretische Trennungsmethoden in diesen Arbeiten spielen, hinzuweisen. Die Strukturbestimmung beruht hierbei bekanntlich auf einer Auftrennung und Charakterisierung einer grossen Anzahl von verschiedenen Bruchstücken der Proteinmoleküle, wie sie in partiellen Hydrolysaten vorkommen – ein Problem, dessen Lösung noch vor 15 Jahren fast hoffnungslos erschien.

Es ist dies gleichzeitig eine sehr schöne Illustration, wie biochemische Problemstellungen – auch rein methodisch – allmählich infolge ihrer vertieften Betrachtungsweise in die reine organische Strukturchemie gelangen. Weitere Beispiele findet man jetzt fast täglich in den chemischen und biochemischen Zeitschriften.

Das Prinzip der Ableitung einer komplizierten Struktur durch Analyse von Mischungen ihrer Strukturfragmente ist aber nicht nur für die Chemie der hochmolekularen Körper, wie sie in der Natur vorkommen, von Bedeutung, sondern auch für biologische und biochemische Strukturprobleme im allgemeinen, wo sich jetzt sehr verlockende Perspektiven öffnen. Ich denke dabei an Strukturen, die oft teilweise durch direkte Beobachtung im Mikroskop oder Elektronenmikroskop bestimmt werden können. Als Beispiel zeigt Figur 1 eine elektronenmikroskopische Aufnahme der einzelnen Moleküle des Hämocyanins von *Helix pomatia* (Molekulargewicht ca. 8 Millionen). Man erkennt hier eine gewisse Struktur der Moleküle, die ja aus Submolekülen bestehen. Die chemischen und funktionellen Einzelheiten derartiger Strukturen sind noch ungenügend bekannt. Zu ihrer Kenntnis genügt meistens die direkte Beobachtung nicht, vielmehr sollte man mög-

* Dritte PAUL-KARRER-Vorlesung gehalten an der Universität Zürich am 5. Juli 1961.

** Biochemisches Institut der Universität Uppsala (Schweden).

lichst auch mit den Strukturelementen gewisse Manipulationen ausführen können, besonders in funktioneller Hinsicht. Ausserdem liegen hier prinzipiell ähnliche Möglichkeiten einer Strukturbestimmung vor wie bei der Sequenzbestimmung der Aminosäurereste in den Polypeptidketten der Proteine. Eine Analyse von Strukturfragmenten sollte nämlich auch hier grundsätzlich wichtige Schlussfolgerungen erlauben, gerade auch über die Organisation der lebenden Zelle oder biologische Strukturen überhaupt. Dabei sollte eine vollständigere Information über die chemischen Affinitäten und Strukturbedingungen, die hier eine Rolle spielen, möglich sein, als man sie durch mikroskopische Studien allein erlangen kann. Wir bewegen uns da in einem Gebiet, das in chemischer Hinsicht grösstenteils eine *Terra incognita* ist, in dem Chemie und Biologie in auffallender Weise ineinandergreifen und dessen Bearbeitung auch für den Chemiker vielversprechend erscheint. Fortschritte auf diesem Gebiet müssen sehr eng mit der Entwicklung von Methoden zur Trennung von submikroskopischen und mikroskopischen Teilen zusammenhängen.

Die Methoden, die ich hier näher diskutieren möchte, sind: Elektrophorese, Chromatographie, Verteilungsmethoden und teilweise auch Ultrazentrifugierung. Von diesen Methoden sind Elektrophorese und Ultrazentrifugierung bekanntlich ganz besonders schonend, da die Trennung einfach durch Wanderung der verschiedenen Komponenten einer Mischung in einem konstanten Medium zustande kommt. Diese beiden Verfahren wurden ja ursprünglich für kolloidale und hochmolekulare Körper benutzt, aber besonders die Elektrophorese kann jetzt unter gewissen technischen Voraussetzungen auch für niedrigmolekulare Substanzen angewandt werden. Die chromatographischen und Verteilungsmethoden sind oft weniger schonend, da sie besondere Affinitäten oder Löslichkeitsverhältnisse voraussetzen, was die Verwendung von etwas aggressiveren Lösungsmitteln notwendig machen kann. In der jüngsten Entwicklung auf diesen Gebieten ist deshalb im Hinblick auf die Trennung von instabilen hochmolekularen Substanzen die Verwendung von möglichst schonenden Säulenmaterialien, Lösungs- und Elutionsmitteln von ausschlaggebender Bedeutung.

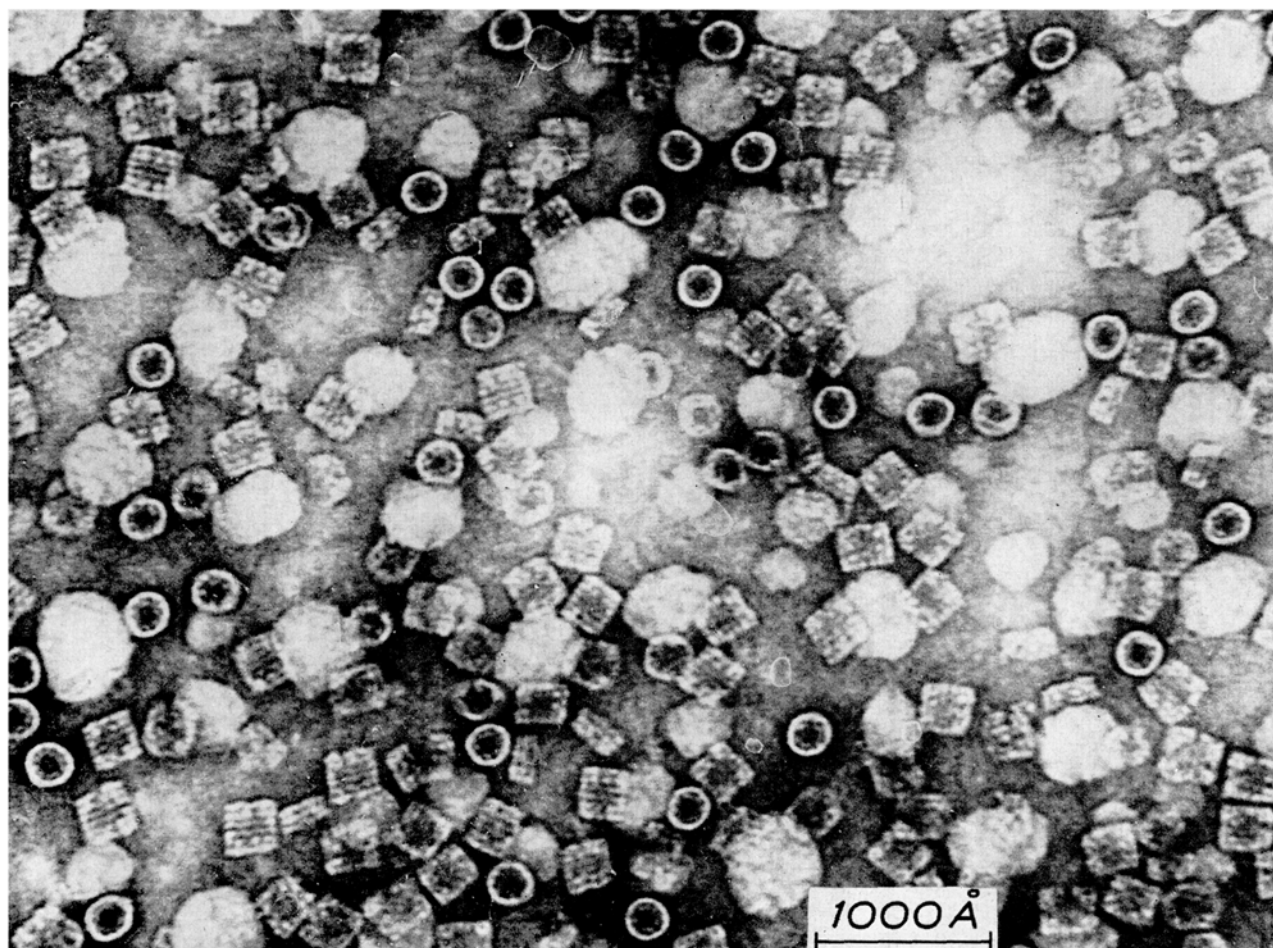


Fig. 1. Elektronenmikroskopische Aufnahme von Hämoglobin-Molekülen (*Helix pomatia*). Siemens Elektronenmikroskop. (LEVIN, Biochem. Institut, Uppsala. Siehe auch E. F. J. VAN BRUGGEN, E. H. WIEBENGA und M. GRUBER, Biochim. biophys. Acta 42, 171 (1960)).

Man hat hier jetzt ziemlich grosse Fortschritte gemacht, und es ist sehr befriedigend, feststellen zu können, dass die ausgeprägte Spezifität der chromatographischen und Verteilungsmethoden auch für hochmolekulare Substanzen charakteristisch zu sein scheint.

Elektrophorese. Die ursprüngliche Methodik der Elektrophorese, bei der die Wanderung der Grenzflächen in einem U-Rohr optisch verfolgt wird, bewährt sich noch gut für exakte quantitative Messungen, wobei die Komponenten eines Gemisches durch Bestimmung der Beweglichkeit charakterisiert werden. Für reine Trennungszwecke, bei denen quantitative Gesichtspunkte weniger wichtig sind, und auch im Mikromaßstab ist diese Ausführungsform weniger anwendbar, hier sind die sogenannten zonenelektrophoretischen Methoden weit überlegen. Die Grenzflächen in einem U-Rohr stabilisieren sich selbst, die Zonen dagegen müssen durch besondere Trägermittel wie Zellulosepulver, Stärke, verschiedene gelartige Substanzen und dergleichen stabilisiert werden, oder aber man führt die Versuche in Filtrierpapierstreifen aus (Papierelektrophorese).

Der Vorteil dieser Verfahren besteht nicht nur darin, dass man vollständige Trennungen auch kleinster Substanzmengen erreichen kann; die stabilisierende Wirkung des Trägermittels ermöglicht auch die Verwendung sehr geringer Konzentrationen, und nur unter diesen Voraussetzungen ist das Studium von niedrigmolekularen Substanzen möglich. Bei der Grenzflächenmethode kann man derartig verdünnte Lösungen kaum verwenden; entsprechende Versuche hatten wenig Erfolg. Eine Voraussetzung ungestörter elektrophoretischer Wanderung ist nämlich, dass die zu unterscheidenden Substanzen selbst sehr wenig zur Leitfähigkeit des Mediums (Pufferlösung) beitragen, wie es ja bei hochmolekularen Substanzen der Fall ist. Andernfalls und besonders mit niedrigmolekularen Elektrolyten, entstehen leicht sogenannte «Grenzflächenanomalien», die sich unter anderem durch eine ausgeprägte Asymmetrie der Wanderung (Unterschiede zwischen den beiden Schenkeln des U-Rohrs) bemerkbar machen. Dabei kann die Trennung ganz verwischt werden. Die Vorteile der «Trägerelektrophorese» erkaufte man indessen zu einem gewissen Preis, da die Wechselwirkung zwischen den wandernden Substanzen und dem Träger, besonders bei hochmolekularen Stoffen, oft Störungen verursacht («Schwängung» durch Adsorption). Solche Effekte beobachtet man zum Beispiel bei der Papierelektrophorese, die sich im übrigen ausserordentlich bequem und einfach durchführen lässt. Deshalb ist es, besonders für quantitative Zwecke und auch für präparative Arbeiten mit grösseren Substanzmengen besser, Kolonnen oder Tröge zu verwenden, die bei der Auswahl eines geeigneten Füllmaterials grössere Freiheit gestatten. Diese Feststellung erscheint eigentlich recht trivial, aber der Erfolg dieser Verfahren hängt tatsäch-

lich zum grössten Teil von der Wahl des Trägers ab. Zellulosepulver, das durch passende Vorbehandlung inaktiviert wurde (Äthanolyse, Formaldehydbehandlung), wird in meinen Laboratorien viel verwendet (FLODIN und KUPKE¹, LEVIN²). Auch «Pevikon» (ein Polyvinylacetat-Polyvinylchlorid-Copolymerisat) zeigt wenig Adsorption, besitzt aber eine wesentlich geringere Flüssigkeitskapazität als Zellulose. Auch gewisse Gele können mit Vorteil benutzt werden – ich komme noch darauf zurück.

Als Beispiel einer einfachen Apparatur für Zonenelektrophorese in Säulen gilt die Ausführung von PORATH, LINDNER und JERSTEDT³ (Figur 2). Figur 3 stellt das Versuchsergebnis mit einem Hypophysenextrakt dar – die Zonen wurden während des Versuches kontinuierlich eluiert. Diese Methode lässt sich auch im Mikromaßstab entwickeln; wegen ihrer schnellen Durchführbarkeit kann sie als analytische Mikromethode mit einer Kapazität, die ungefähr derjenigen der Papierelektrophorese entspricht, angewendet werden. Überhaupt scheint die Entwicklung der elektrophoretischen Methoden jetzt so weit fortgeschritten zu sein, dass sie eine allgemeinere Verwendung auch in der analytischen Chemie verdienen. Und zwar kommen nicht nur elektrisch geladene Substanzen in Frage, vielmehr können auch ungeladene Stoffe durch Komplexbildung elektrophoretisch «mobilisiert» werden, zum Beispiel Zucker und Oligosaccharide in Boratpufferlösungen.

Auch verschiedenartige Gele haben eine allgemeine Verbreitung als Trägersubstanzen bei verschiedenen Typen der Zonenelektrophorese gefunden. Stärkegele hoher Konzentration ermöglichen in gewissen Fällen eine sehr gute Auflösung (SMITHIES⁴), wodurch der Nachweis neuer, von genetischen Gesichtspunkten her besonders interessanter Globuline im Blutserum möglich gemacht wurde. Allerdings sind die Wanderungsbedingungen in derartigen Gelen ziemlich kompliziert. Wahrscheinlich handelt es sich um eine Kombination von elektrophoretischer Wanderung und Ultrafiltrierung durch die engen Poren der Gelstruktur. Ähnliche Effekte herrschen wohl auch bei Gelen aus Polyacrylamid vor, die in mancher Hinsicht als besonders vielversprechendes Medium für Elektrophoreseversuche erscheinen (RAYMOND und WEINTRAUB⁵, HJERTÉN⁶). Die sogenannte «Immunelektrophorese» von GRABAR und WILLIAMS, die eine Kombination der Gelelektrophorese mit dem bekannten serologischen Präzipita-

¹ P. FLODIN und D. W. KUPKE, *Biochim. biophys. Acta* 21, 368 (1956).

² Ö. LEVIN, unveröffentlicht. Siehe auch E. F. J. VAN BRUGGEN, E. H. WIEBENGA und M. GRUBER, *Biochim. biophys. Acta* 42, 171 (1960).

³ J. PORATH, E. B. LINDNER und S. JERSTEDT, *Nature* 182, 744 (1958).

⁴ O. SMITHIES, *Biochem. J.* 61, 629 (1955).

⁵ S. RAYMOND und L. WEINTRAUB, *Science* 130, 711 (1959).

⁶ S. HJERTÉN, *Arkiv f. Kemi* 13, 151 (1958).

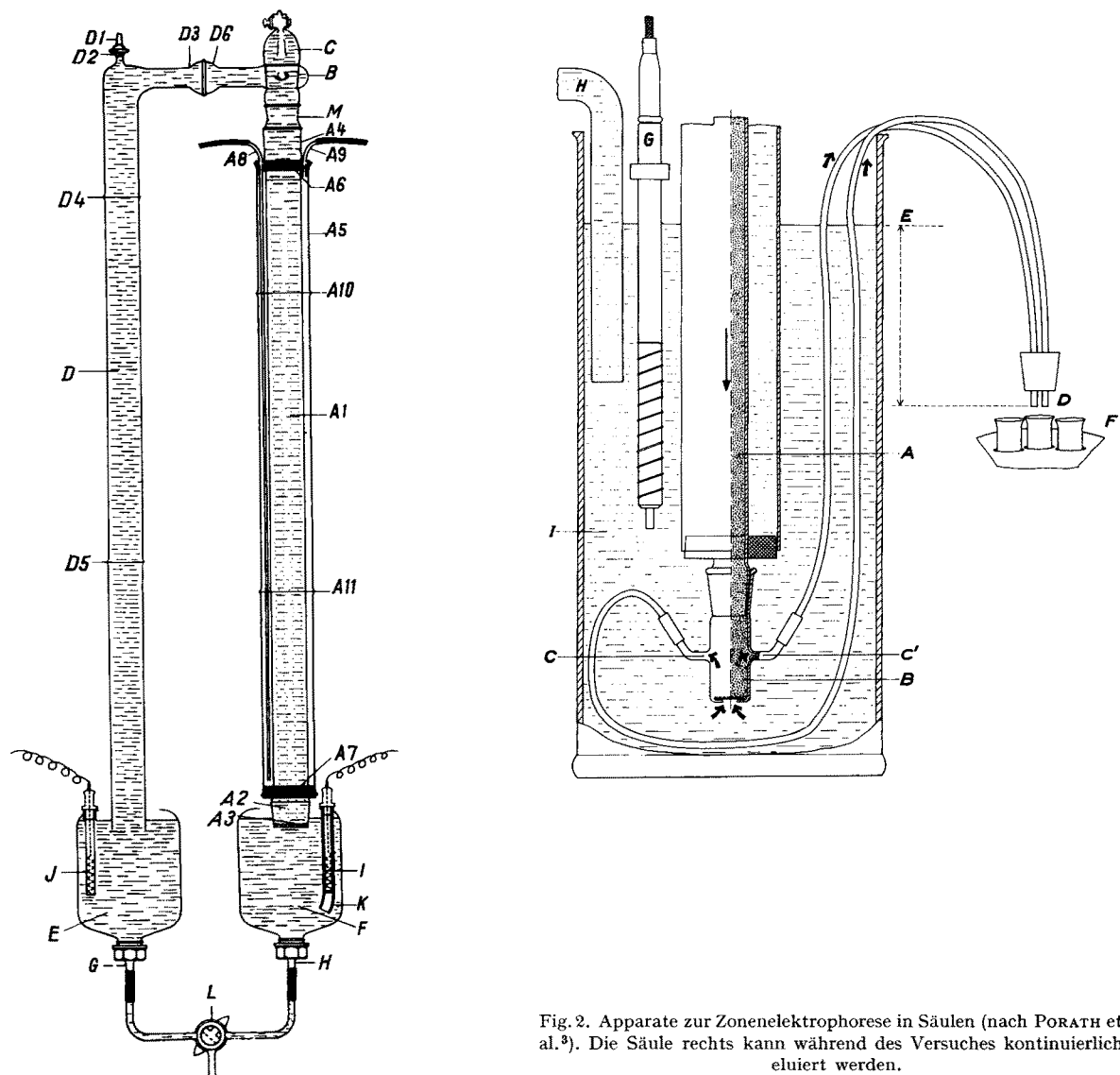


Fig. 2. Apparate zur Zonenelektrophorese in Säulen (nach PORATH et al.⁹). Die Säule rechts kann während des Versuches kontinuierlich eluiert werden.

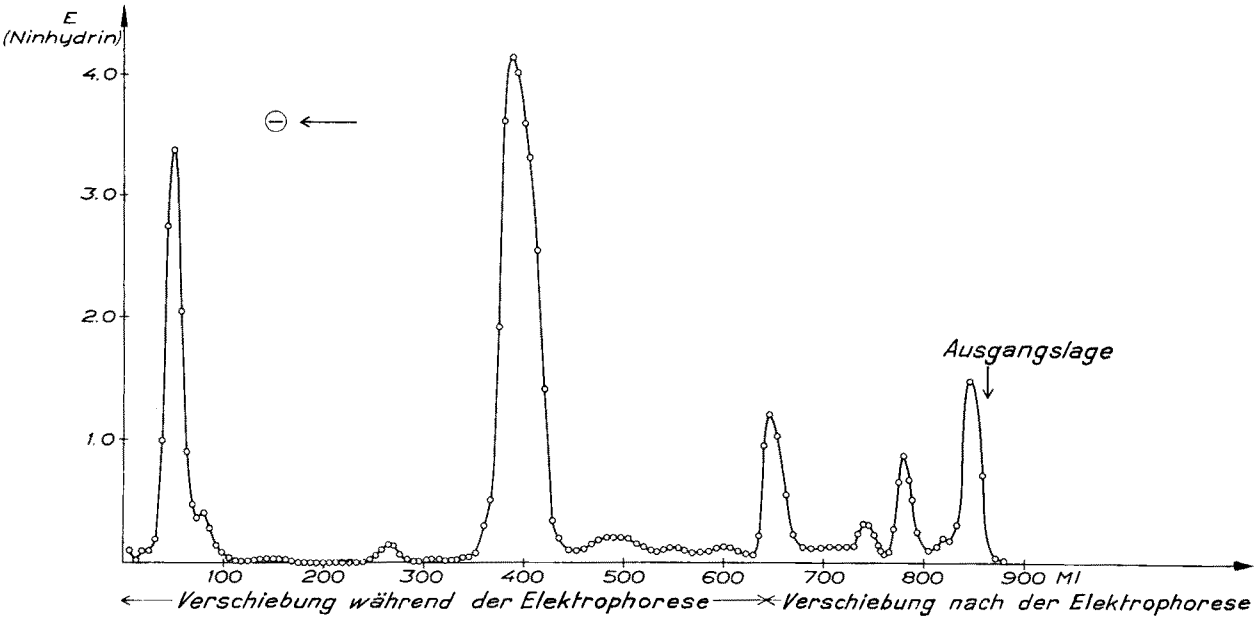


Fig. 3. Elutionsdiagramm eines Elektrophoreseversuches mit dem Apparat Fig. 2., rechts (Hypophysenextrakt).

tionsverfahren von OUDIN und OUCHTERLONY darstellt, hat grosse Bedeutung für die Identifizierung verschiedener Proteine in kompliziert zusammengesetzten Gemischen erlangt. Diese Versuche werden meistens in Agar-Gelen durchgeführt. Nach HJERTÉN⁷ ist es vorteilhafter, aus dem Agar zuerst das Agaropektin zu entfernen und nur die reine Agarose zu benutzen, die weniger stark adsorbiert und sehr geringe Elektrosomoseeffekte aufweist (siehe auch BRISHAMMAR, HJERTÉN und v. HOFSTEN⁸). Es wäre natürlich sehr wertvoll, wenn man die Vorteile der freien Grenzflächenelektrophorese (ungestörte Wanderung, quantitative Beweglichkeitsmessungen) mit denen der Zonenelektrophorese (vollständige Trennung, geringerer Materialverbrauch) irgendwie vereinigen könnte. HJERTÉN hat einige Versuche in dieser Richtung gemacht. Figur 4 zeigt seinen Apparat für «freie Zonenelektrophorese». Das horizontale Elektrophoreserohr ist beweglich mit den Elektrodengefässen (links und rechts in der Figur) verbunden, so dass es langsam um seine Längsachse rotieren kann. Die Konvektion der Zonen im Elektrophoreserohr, die im ruhenden Rohr schnell einsetzt, wird durch die Rotation verhindert – es besteht ja offenbar keine bevorzugte Richtung für die konvektive Bewegung der schwereren Zonen. Wesentlich für den Erfolg beim Arbeiten mit diesem Apparat ist eine Vorbehandlung des Rohres mit einer Lösung von Methylzellulose. Dadurch eliminiert man die elektroosmotische Flüssigkeitsbewegung im Rohr, die sonst Anlass zu unübersehbaren Störungen gibt. Die Bewegung der Zonen kann man entweder optisch (im sichtbaren oder ultravioletten Bereich) beobachten oder registrieren, oder man kann die Flüssigkeitssäule nach erfolgter Trennung fraktionsweise sammeln und analysieren. Tatsächlich lassen sich mit diesem Apparat ebenso genaue Beweglichkeitsmessungen ausführen wie bei der freien Grenzflächenelektrophorese, aber mit viel kleineren Substanzmengen. In einem anderen Verfahren der freien Zonenelektrophorese benutzt man zur Stabilisierung der Zonen ein Dichtegradient von zum Beispiel konzentrierter Zuckerlösung (siehe SVENSSON und VALMET⁹, SVENSSON¹⁰).

Methoden zur Trennung von mikroskopisch oder submikroskopisch kleinen Teilchen habe ich schon weiter oben als besonders wichtig bezeichnet. Von den bisher beschriebenen elektrophoretischen Verfahren eignet sich die freie Zonenelektrophorese nach HJERTÉN⁶ besonders gut für solche Zwecke. Tatsächlich kann man in diesem Apparat Zellen, Bakterien und Zellfragmente elektrophoretisch sehr bequem trennen.

Bei den üblichen zonenelektrophoretischen Verfahren taucht oft die Schwierigkeit auf, dass die Wanderung grösserer Teilchen durch das Trägermedium (Pulver, Gel) mechanisch behindert wird. Wie HJERTÉN⁶ gezeigt hat, kann man indessen in diesem Fall Säulen aus locker gepackten Gelsuspensionen, zum Beispiel Agar-Gel, verwenden, die hinreichend stabili-

sierend wirken, aber auch für grössere Partikel durchlässig sind. Diese Säulen zeigen beim Herauspressen der Suspension aus dem Elektrophoreserohr die interessante Eigenschaft des «plug flow», das heisst, das ganze Zonensystem bewegt sich ohne irgendwelche Verzerrung aus dem Rohr heraus, fast wie ein Festkörper. Dieser Umstand macht die Isolierung der getrennten Komponenten besonders bequem. Man kann derartige Säulen mit Vorteil allgemein bei elektrophoretischen Trennungen benutzen.

Es würde zu weit führen, in dieser hauptsächlich methodologischen Übersicht auf die mannigfaltigen Anwendungsmöglichkeiten elektrophoretischer Methoden einzugehen. Ich möchte nur kurz auf die überaus bedeutsamen Resultate hinweisen, die man neuerdings durch gut auflösende elektrophoretische Analyse besonders interessanter Systeme aus genetischer Sicht erhalten hat. Ich denke dabei vor allem an die zahlreichen Formen menschlicher Hämoglobine, die seit der Entdeckung des Sichelzellenhämoglobins durch PAULING, ITANO, SINGER und WELLS¹¹ aufgefunden wurden, und an die sehr interessanten Möglichkeiten, aus verwandten Hämoglobinen durch Dissoziation und Rekombination der Bruchstücke neue Hämoglobine herzustellen (siehe zum Beispiel ITANO und ROBINSON¹²).

Auch bei anderen Eiweisskörpern hat man neuerdings «Familien» verwandter Proteine beobachtet, die in einigen Fällen genetisch bedingt zu sein scheinen, in anderen offenbar Präparationsartefakte sind. Die schönen Elektrophoresediagramme aus Mikrosomenmaterial, die neulich WALLER und HARRIS¹³ aus dem Laboratorium von TISSIÈRES veröffentlichten, geben

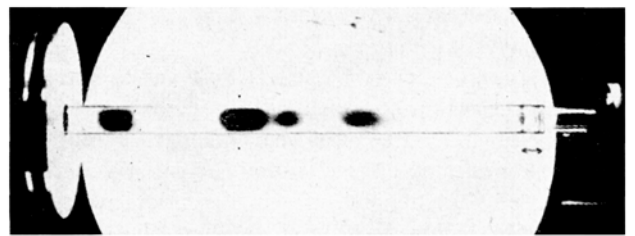


Fig. 4. Apparat zur freien Zonenelektrophorese nach HJERTÉN.

⁷ S. HJERTÉN, erscheint demnächst. – S. HJERTÉN, erscheint demnächst (Biochim. Biophys. Acta). – S. HJERTÉN, erscheint demnächst.

⁸ S. BRISHAMMAR, S. HJERTÉN und B. v. HOFSTEN, erscheint demnächst (Biochim. biophys. Acta).

⁹ H. SVENSSON und E. VALMET, Science Tools 2, 11 (1955) (LKB Produkter Ed., Stockholm).

¹⁰ H. SVENSSON, in *A Laboratory Manual of Analytical Methods in Protein Chemistry, Including Polypeptides* (Ed. P. ALEXANDER and R. J. BLOCK, Pergamon Press, London 1960), vol. 1, p. 193.

¹¹ L. PAULING, H. A. ITANO, S. J. SINGER und I. C. WELLS, Science 110, 543 (1949).

¹² H. A. ITANO und E. ROBINSON, Nature 183, 1799 (1959).

¹³ J. P. WALLER und J. I. HARRIS, Proc. Nat. Acad. Sci. (Washington) 47, 18 (1961).

wichtige Auskünfte über die Zustände am Ort der Eiweissbiosynthese (Figur 5). Für die nächste Zeit erscheint die präparative Gestaltung dieser stark auflösenden elektrophoretischen Verfahren als eine besonders wesentliche Aufgabe mit dem Ziel, greifbare Mengen dieser Komponenten für ihre genauere chemische Untersuchung zu gewinnen.

Ich habe hier schon mehrmals auf die Wichtigkeit möglichst spezifischer und schonender Methoden zur Trennung biologischer Partikel hingewiesen und möchte jetzt auf einige Neuerungen in dieser Hinsicht näher eingehen.

Ultrazentrifugierung. Die Ultrazentrifugierung ist die eigentlich klassische Methode der Partikelfraktionierung; auch hier sind, wie bei der Elektrophorese, im Laufe der Zeit Zonenmethoden eingeführt worden, und zwar mit grossem Erfolg. Zur Stabilisierung benutzt man Gradienten, zum Beispiel Zuckerlösungen. Eine andere Möglichkeit wurde kürzlich von LEVIN¹⁴ in meinem Laboratorium studiert. Es handelt sich dabei um die schon lange bekannten Schichtungsercheinungen, die man am Boden von Zentrifugenrohren manchmal beobachten kann (siehe auch CHAUVEAU et al.¹⁵). Diese Schichtung (Stratifikation) scheint nach LEVIN hauptsächlich auf einer gegenseitigen Verdrängung von Teilchenmaterial verschiedener Dichte zu beruhen. Unter dem Einfluss starker Schwerfelder werden die Dichteunterschiede vervielfacht, so dass die «archimedischen» Kräfte genügen, um auch in ziemlich zähen Materialien eine «Rangierung» entsprechend der Dichte herbeizuführen. Man erhält dadurch oft recht reine Zonen, und da die Methode auch bei beträchtlichen Materialmengen benutzt werden kann, dürfte sie für die preliminäre Aufarbeitung partikulärer biologischer Materialien, zum Beispiel Zellkomponenten, besonders nützlich sein. Figur 6 zeigt das Prinzip für eine solche Trennung.

Verteilungsmethoden. Die Verteilung von Substanzen zwischen zwei Phasen ist wohl die im Prinzip und in der Praxis einfachste Trennungsmethode der Chemie. Ihre Vervollkommenung als vielstufige Gegenstrommethode nach CRAIG hat der Chemie ein besonders wertvolles und empfindliches Verfahren gegeben, das eine vielseitige Anwendung in der Biochemie und organischen Chemie gefunden hat. Sonst sehr schwierige Analysen von Peptid- und Polypeptidgemischen lassen sich bekanntlich nach dem Craigschen Verfahren oft erfolgreich durchführen. Bei der Anwendung von Verteilungsmethoden auf hochmolekulare Substanzen – und noch mehr auf biologische Teilchen – stösst man indessen auf gewisse prinzipielle Schwierigkeiten. Selbstverständlich würde bei Eiweisskörpern zum Beispiel ein System Benzol/Wasser eine ganz einseitige Verteilung zugunsten der Wasserphase ergeben. Ausserdem würde wahrscheinlich an der Phasengrenze ein Teil des Eiweisses denaturiert werden. Offenbar setzt die erfolgreiche Anwendung der Verteilungsmethode in

solchen Fällen einander ähnliche Phasen voraus: es lässt sich theoretisch ableiten (siehe zum Beispiel BRÖNSTED¹⁶), dass mit der Grösse der Moleküle oder Teilchen die Tendenz einer einseitigen Verteilung zunimmt und für eine wirksame Trennung die beiden Phasen bezüglich ihrer Zusammensetzung und Eigenschaften ähnlicher werden müssen.

Derartige Phasensysteme kann man zum Beispiel durch Aussalzen von Glycol-Wassermischungen herstellen, wobei sich eventuell die Verschiedenheiten zwischen den beiden Phasen durch andere Zusätze noch weiter ausgleichen lassen. Solche Systeme sind zur Trennung von Eiweissmischungen durch Gegenstromverteilung (s. TAVEL¹⁷) oder durch Verteilungschromatographie, zum Beispiel von MARTIN und PORTER¹⁸, CRAIG und KING, YPHANTIS und CRAIG¹⁹ benutzt worden, bieten aber doch gewisse Schwierigkeiten, die einer allgemeineren Verwendung im Wege stehen. Die Salzkonzentrationen sind hoch und die Systeme sehr temperaturempfindlich; die notwendigen Zusätze (zum Beispiel Trichloressigsäure) greifen unter Umständen empfindliche Substanzen an. Für biologische Partikel lassen sich diese Systeme nicht benutzen.

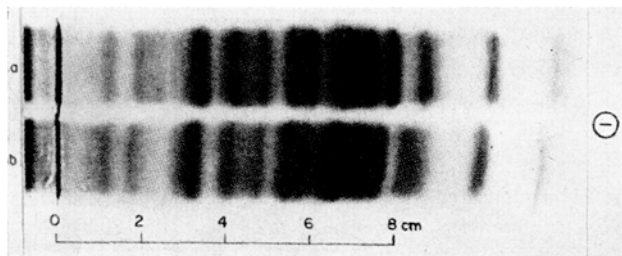


Fig. 5. Stärke-Gel-Elektrophorese von Eiweiss aus *E.-coli*-Mikrosomen in Gegenwart von 6 M Harnstoff. (a) ist Essigsäure-lösliches Eiweiss, (b) Ribosomenteilchen in 6 M Harnstoff gelöst. (Nach WALLER und HARRIS¹³.)

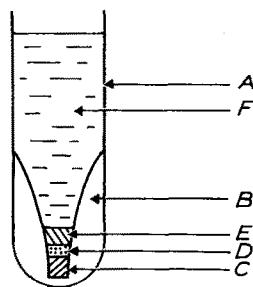


Fig. 6. Teilchentrennung durch Stratifikation in einem Ultrazentrifugesediment (LEVIN²).

¹⁴ Ö. LEVIN, erscheint demnächst.

¹⁵ J. CHAUVEAU, Y. MOULÉ und CH. ROUILLER, *Exp. Cell Res.* **11**, 317 (1956); *Bull. Soc. Chim. biol.* **39**, 1521 (1957).

¹⁶ J. N. BRÖNSTED, *Z. physiol. Chemie, Bodenst.-Festband*, p. 257 (1931).

¹⁷ P. TAVEL, *Helv. chim. Acta* **38**, 520 (1955).

¹⁸ A. J. P. MARTIN und R. R. PORTER, *Biochem. J.* **49**, 215 (1951).

¹⁹ T. P. KING, D. A. YPHANTIS und L. C. CRAIG, *J. Amer. chem. Soc.* **82**, 3350, 3355 (1960), und frühere Arbeiten.

Es ist das Verdienst P. Å. ALBERTSSONS in Uppsala (Schweden), Phasensysteme mit hochmolekularen Substanzen als phasenerzeugende Komponenten als wertvolle Hilfsmittel bei der Trennung von Teilchen verschiedener Art und Grösse sowie von Makromolekülen, besonders Eiweisskörpern, eingeführt zu haben. Er hat die optimalen Versuchsbedingungen für verschiedene derartige Phasensysteme und Substanzen festgestellt, unter anderem durch eingehendes Studium von Phasendiagrammen. In diesen Systemen stehen verschiedene Parameter zur Verfügung, durch deren Veränderung man die Trennungsbedingungen systematisch variieren kann, zum Beispiel die Art und Konzentration der vorhandenen Elektrolyte und das Molekulargewicht der phasenbildenden Substanzen. Die Salzkonzentration kann man gut im physiologischen Bereich halten; die Temperaturempfindlichkeit ist nicht gross, und – vor allem – greifen phasenerzeugende Komponenten wie Dextran, Methylzellulose, Polyäthylenglycol oder Polyvinylalkohol die meisten biologischen Systeme kaum an. Es gibt auf diesem Gebiet ausserordentlich vielseitige Anwendungsmöglichkeiten, die bisher das Hauptthema der Untersuchungen von ALBERTSSON et al.²⁰ bildeten. Auch lassen sich wohl in nicht-wässrigen Lösungen, für die ähnliche hochpolymere phasenbildende Substanzen bekannt sind, verschiedene hochmolekulare Stoffe gut verteilen.

Ich möchte nun an Hand einiger Beispiele die Anwendungsmöglichkeiten dieses Verfahrens beleuchten.

In dem bereits erwähnten Dextran-Methylzellulose-Wassersystem verteilen sich niedrigmolekulare Substanzen, wie zum Beispiel gewöhnliche Salze, mit einem Verteilungskoeffizienten von 1,0. Das gleiche Verhalten zeigen annäherungsweise kleinere Eiweissmoleküle. Grössere Eiweissmoleküle, Nucleinsäuren, Viruskörper und Zellpartikel sammeln sich meist in der schwereren Phase (Dextran) an, wobei im allgemeinen gilt: Je grösser das Teilchengewicht, desto kleiner der Verteilungskoeffizient – wie aus der Tabelle hervorgeht.

Ähnliche Ergebnisse wurden mit dem System Dextran-Polyäthylenglycol-Wasser erhalten; dabei findet in manchen Fällen aber auch eine gut reproduzierbare und wohldefinierte Anreicherung an der Phasengrenzfläche statt, die ebenfalls für Trennungszwecke ausgenutzt werden kann. Sehr charakteristisch ist ausserdem bei diesen Systemen der starke Einfluss von Elektrolyten auf die Verteilung. Eine Substanz kann oft durch einfache Änderung der Salzkonzentration vollständig aus der einen Phase in die andere überführt werden, was für viele Trennungsoperationen von ausschlaggebender Bedeutung ist.

Ähnliche Erscheinungen beobachtet man in Dextran-sulfat-Polyäthylenglycol-Wassersystemen, die besonders bei der Reinigung von Viruskörpern benutzt wurden. Bei niedriger Konzentration an NaCl zum Beispiel sammeln sich die meisten Viren in der Boden-

phase an, bei höherer in der oberen Phase. Tatsächlich kann man durch derartige Operationen auch aus sehr grossen Volumina eines Kulturmediums ohne Hilfe von Ultrazentrifugen verschiedene Viren konzentrieren und reinigen. Hierbei wählt man die Zusammensetzung des Phasensystems so, dass das Volumen der Phase dort, wo sich das Virus ansammelt, möglichst klein wird (etwa 1% des Gesamtvolumens).

Die Verwendung vielstufiger Operationen mit Hilfe der Craig-Technik liegt nahe, wenn man das Auflösungsvermögen steigern will, und ist tatsächlich auch bei biologischen Partikeln möglich. Allerdings benötigt man für eine vollständige Phasentrennung bei der Gegenstromverteilung bedeutend mehr Zeit als mit gewöhnlichen Systemen; man muss deshalb die Zahl der Überführungen einschränken, wenn nicht unbegrenzt Zeit zur Verfügung steht. Als Beispiel neuerer Untersuchungen auf diesem Gebiet siehe Figur 7 und 8 aus einer noch nicht veröffentlichten Arbeit von ALBERTSSON, BAIRD und VON HOFSTEN²¹ über die Trennung von Bakterien durch Gegenstromextraktion in einem Zweiphasensystem aus 5% Dextran und 4% Polyäthylenglycol in Wasser.

Figur 7 zeigt die Verteilung (in % der Gesamtbakterienmenge) als Funktion der NaCl-Konzentration (in Mol) in einem einstufigen Versuch. Man erkennt zum Beispiel, dass die Verteilung von *E. coli* ML 3081 fast unabhängig von der Salzkonzentration ist, während der verwandte Coli-Stamm K 12 C (Hfr)²² sich ganz anders verhält, ähnlich wie K 12 58/161 (Hfr). Die grösste Empfindlichkeit gegenüber Änderungen der Salzkonzentration liegt offenbar bei 0–0,02 M NaCl. Es sei aber hervorgehoben, dass sich in manchen Fällen ganz verschiedene Bakterien verteilungsmässig gleich-

Verteilungskoeffizient K und Teilchenoberfläche einiger Proteine und Viruskörper im System Dextran-Methylcellulose D 68–MC 4000.

Partikel	Oberfläche (m μ) ² $\times 10^{-3}$	K (M-Phase) (D-Phase)
Phycoerythrin	0,3	0,95
Hemocyanin, 1/8 Moleküle	0,86	0,65
Hemocyanin, 1/1 Moleküle	3,5	0,25
ECHO Virus	2,3	0,2
Polio-Virus	1,3	0,3
* Southern bean * mosaic Virus		0,41
Phage OX 174		0,34
Phage T3	8,7	$2,1 \times 10^{-2}$
Tabakmosaik-Virus	14,4	$(1-2) \times 10^{-2}$
Phage T2	25,5	$(6-10) \times 10^{-4}$
Phage T4	25,5	$(3-5) \times 10^{-4}$
Vaccin-Virus	220	$(4-12) \times 10^{-5}$

²⁰ P. Å. ALBERTSSON und E. NYNS, *Nature* 184, 1465 (1959). – P. Å. ALBERTSSON, *Partition of Cell Particles and Macromolecules*, Diss. (John Wiley and Sons, New York 1960).

²¹ P. Å. ALBERTSSON, G. D. BAIRD und B. v. HOFSTEN, erscheint demnächst (*Nature*).

²² Hfr: männliche Typen mit hoher Rekombinationsfähigkeit.

artig verhalten. So ergeben zum Beispiel *E. coli* K 12-Stämme, 58/161 (Hfr), C 600 (F⁻)²³ und auch *Bacillus megatherium* in diesem System Verteilungen, die sich nur wenig von *E. coli* K 12 C (Hfr) unterscheiden. Jedenfalls sind die Unterschiede oft genügend gross, um eine mehrstufige Gegenstromtrennung in der Craig-Apparatur durchführen zu können. Allerdings ist zu beachten, dass eigentlich drei Phasen vorliegen, da die Phasengrenzfläche als solche aktiv ist (Figur 7). Man muss deshalb dicht über oder unter dieser Grenzfläche «abschneiden», was ja leicht realisierbar ist. Ein besonders interessantes Beispiel einer solchen Verteilung gibt Figur 8, die die Trennung von (+)-Lactose- und (-)-Lactose-Kolonien von *E. coli* K 12 den Stämmen W 1177 (F⁻) und 58/161 (Hfr) nach 45 Überführungen in einer Craig-Apparatur zeigt. In diesem Falle lassen sich also weibliche von männlichen Typen trennen, was bisher kaum möglich war.

Jedenfalls beweisen diese Versuche ebenso wie die erfolgreiche Anwendung der Verteilungsmethode auf Viren, dass wir hier ein sehr gut auswählendes Verfahren besitzen, um biologische Teilchen verschiedener Art trennen zu können. Dass die Methode ausserdem auch schonend ist, geht aus mehreren Versuchen hervor, in denen gezeigt wurde, dass nach der Behandlung Bakterien, Viren und auch zum Beispiel Zellen von *Chlorella* offenbar unbeschädigt fortleben und sich reproduzieren können.

Die Methode ist auch auf Eiweisskörper anwendbar. Bei mittleren und niedrigen Molekulargewichten sind die Unterschiede in den Verteilungskoeffizienten manchmal nicht sehr gross; sie genügen jedoch, um bei einer mehrstufigen Verteilung in der Craig-Apparatur gute Trennungen zu erreichen. Als Beispiel zeige ich Ihnen eine Trennung der beiden Algenproteine Phykoerytrin und Phykozyan (aus *Ceramium rubrum*, Figur 9). Bei ähnlichen Versuchen mit Enzymen blieb deren Aktivität erhalten. Diese Systeme verursachen also im allgemeinen keine Denaturierung. Es ist jedoch zweckmässig, alle Operationen im Kühlraum auszuführen.

Chromatographie. Die Chromatographie ist ebenfalls eine Methode, die ursprünglich vor allem für Substanzen niedrigen oder mittleren Molekulargewichts entwickelt wurde. Auch war früher die Anwendung hauptsächlich auf nicht-wässrige Lösungen beschränkt. Die heute so erfolgreiche Verwendung wässriger Lösungen bei Verteilungschromatographie (besonders auf Papier) und Ionenaustausch gelangte erst in der Zeit zwischen 1940 und 1950 zur vollen Entwicklung. Die Trennung auch hochmolekularer Substanzen mit Hilfe dieser einfachen und sehr spezifischen Methode erschien natürlich sehr verlockend, begegnete aber gewissen Schwierigkeiten, die erst in den letzten zehn Jahren teilweise überwunden wurden, zum Beispiel irreversible Adsorption am Säulenmaterial, langsame Gleichgewichtseinstellung und die Notwendig-

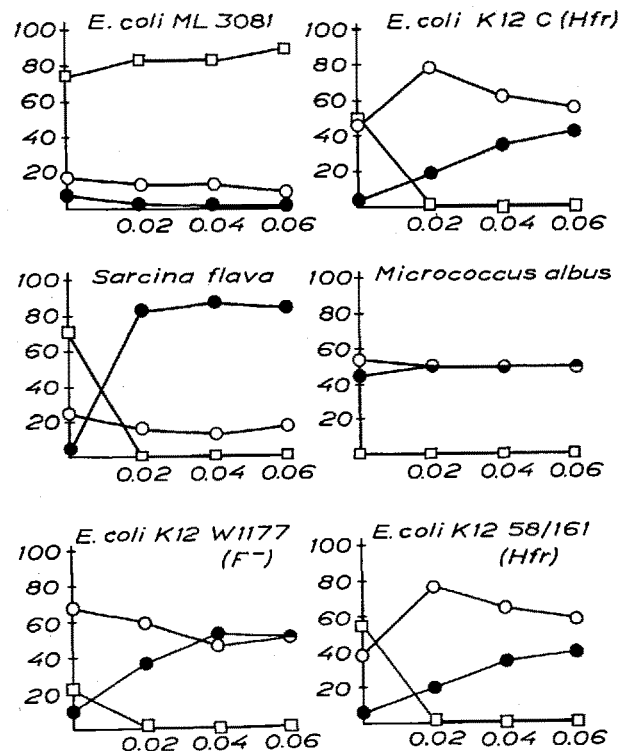


Fig. 7. Verteilungskurven für verschiedene Bakterientypen in einem Dextran-Polyethylenglykol-Wassersystem als Funktion der NaCl-Konzentration (M). ●—● Untere Phase. ○—○ Mittlere Phase (Phasengrenze). □—□ Obere Phase. (ALBERTSSON, BAIRD und v. HOFSTEN²¹.)

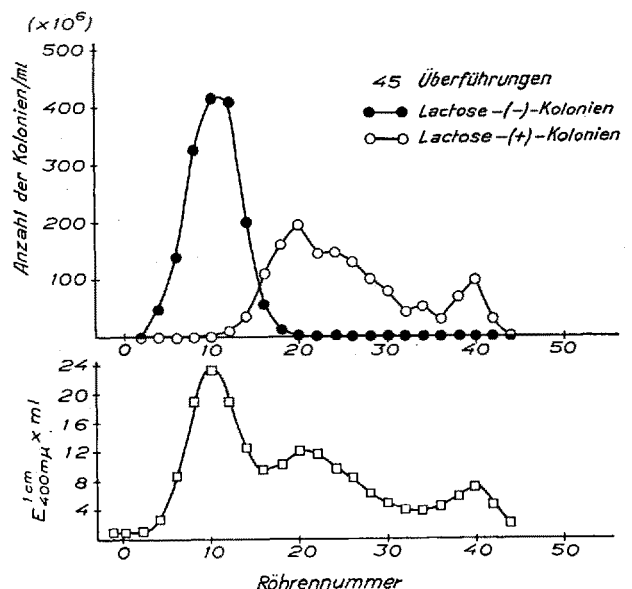


Fig. 8. Gegenstromverteilung nach 45 Überführungen von einer Mischung von *E. coli* K 12 Stämmen W 1177 (F⁻) und 58/161 (Hfr) in einem Dextran-Polyethylenglykol-Wassersystem (ohne Salz). Das obere Diagramm zeigt die individuelle Verteilung, das untere die Verteilung der Gesamtmenge (Lichtabsorption). (ALBERTSSON, BAIRD und v. HOFSTEN²¹.)

²³ F⁻: weibliche Standardtypen.

keit, sehr milde Elutionsmittel zu benutzen. Es stehen jetzt aber einige genügend schonende und selektive Adsorptionsmittel zur Verfügung, zum Beispiel die von SOBER und PETERSON²⁴ eingeführten Ionenaustauscher aus substituierter Zellulose (DEAE-Zellulose, ECTEO-LA usw.) und die besonders von uns in Uppsala studierten Calciumphosphate 1 (Hydroxylapatite) (TISELIUS, HJERTÉN und LEVIN²⁵), die wegen ihrer ganz andersartigen Affinitätsverhältnisse die Zelluloseaustauscher ergänzen. Die Eluierung wird bei allen diesen Säulen allgemein durch sukzessive Steigerung der Pufferkonzentration ausgeführt.

Da die meisten Eiweisskörper – wie die hochmolekularen Substanzen überhaupt – ziemlich kleine Elutionsintervalle besitzen, kann man sie nicht in einem konstant zusammengesetzten Medium eluieren, vielmehr muss man die Pufferkonzentration schrittweise oder kontinuierlich (in einem Gradienten) steigern. Dies hat den Nachteil, dass weniger übersichtliche Verhältnisse geschaffen werden; man kann zum Beispiel nicht die sogenannten Rf-Werte feststellen, vielmehr erfolgt die chromatographische Charakterisierung der einzelnen Komponenten durch die jeweilige Pufferkonzentration im Eluat. Es besteht die Gefahr, besonders bei der schrittweisen Eluierung, dass man «falsche Zonen» erhält, da ja eine Steigerung der Konzentration des Elutionsmittels eine Restelution teilweise zurückgehaltener Komponenten herbeiführen kann.

Wie überall in der Chromatographie kann man auch hier die Wahl optimaler Versuchsbedingungen für verschiedene Substanzen kaum rationell begründen. Bei den Zelluloseaustauschern herrscht wohl die elektrochemische Affinität vor, beim Calciumphosphat vielleicht auch die Affinität zum Calcium, in allen Fällen jedoch spielen sicher noch andere, bisher ungenügend bekannte Affinitätseffekte eine Rolle.

Durch die enge Zusammenarbeit zwischen FLODIN (Pharmacia, Uppsala) und PORATH²⁶ (in meinem Laboratorium) wurde in den letzten Jahren ein neues Säulenfüllmaterial für chromatographische Verfahren entwickelt (Sephadex), das für Trennungen von Substanzen mittleren Molekulargewichts (zum Beispiel Peptide und Polypeptide) wie auch von Eiweisskörpern nicht zu grossen Molekulargewichts besonders geeignet ist. Die vorher genannten Schwierigkeiten scheinen hierbei grösstenteils beseitigt zu sein. Der Trennungsvorgang beruht hauptsächlich auf der verschiedenen Grösse der Moleküle. Das zugrundeliegende Phänomen, zuerst von LATHE und RUTHVEN²⁷ für Trennungen benutzt, ist offenbar nicht eine Affinität zum Füllmaterial, sondern eher eine Art Ultrafiltrationseffekt, daher kann man die Methode als «Molekülsiebung» bezeichnen. Sie wird in der Literatur allgemein als Gel-Filtrierung beschrieben.

Sephadex ist ein feinkörniges Material, das durch dreidimensionale Vernetzung von Dextranmolekülen

hergestellt wird. Die Körnchen zeigen in Wasser starkes, aber räumlich begrenztes Quellungsvermögen; das Material ist also unlöslich, ausserdem sehr stabil gegenüber ziemlich stark alkalischen und sauren Lösungen. Der Trennungsvorgang in einer Sephadex-Säule ist in Figur 10 schematisch dargestellt. Beim Passieren der Säule werden die kleineren Moleküle tiefer in die Gelkörnchen hineindiffundieren als die grösseren; daher werden sie in ihrer Bewegung durch die Säule hindurch verzögert. Infolge der kleinen Abmessungen der Körnchen geschieht ein solcher Austausch sehr schnell, und im Eluat erhält man nach der Molekülgrösse getrennte Zonen. Die Filtriergeschwindigkeit ist im allgemeinen sehr viel grösser als bei der gewöhnlichen Chromatographie, und die Ausbeuten sind fast quantitativ. Da die Affinitäten meist geringfügig sind, kann man die Säule durch einfaches Waschen mit Wasser regenerieren. Die Methode eignet sich deshalb auch gut für Arbeiten in grossem Maassstab, eventuell mit mehreren unmittelbar aufeinander folgenden Einzelansätzen. Besonders wesentlich ist im Hinblick auf das vorher Gesagte, dass hierbei die Eluierung in konstant zusammengesetztem Medium erfolgt, was die Feststellung der Rf-Werte und besonders effektive Trennungen erlaubt.

Sephadex ist jetzt in drei verschiedenen Permeabilitätsklassen zugänglich (G 25, G 50, G 75), die sich für

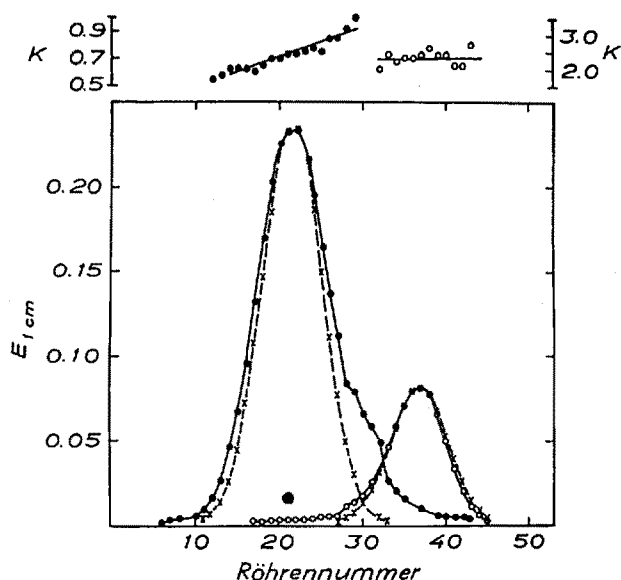


Fig. 9. Gegenstromverteilung von Phykoerythrin und Phykozyan in einem System Dextran-Polyäthylenglykol-Wasser nach 53 Überführungen. Elektrolytgehalt 0,005 M KH_2PO_4 , 0,005 M K_2HPO_4 + 0,75 M KCl. Ordinate: Extinktion in der oberen Phase. Abszisse: Rohr-Nummer. Das Diagramm ganz oben zeigt die direkt bestimmten Verteilungskoeffizienten K für das Material in den einzelnen Röhren. (Nach ALBERTSSON und NYNS²⁸.)

²⁴ H. A. SOBER und E. A. PETERSON, J. Amer. chem. Soc. 76, 1711 (1954).

²⁵ A. TISELIUS, S. HJERTÉN und Ö. LEVIN, Arch. Biochem. Biophys. 65, 131 (1956).

²⁶ J. PORATH und P. FLODIN, Nature 183, 1657 (1959).

²⁷ G. H. LATHE und C. R. J. RUTHVEN, Biochem. J. 62, 695 (1956).

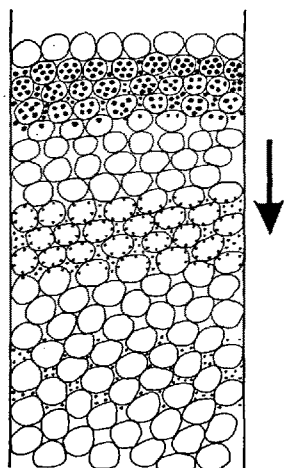


Fig. 10. Trennung durch Gel-filtrierung (schematisch).

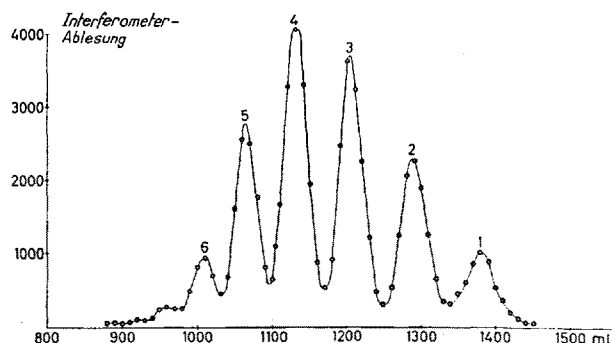


Fig. 11. Trennung eines 10%-Azetolysats von Cellulose durch Gel-filtrierung auf einer Säule von Sephadex (4,5 x 126 cm). Die Gipfel entsprechen (von links nach rechts) Cellohexaose, -pentaose, -tetraose, -triose, -biose und -glukose (nach FLODIN, unveröffentlicht).

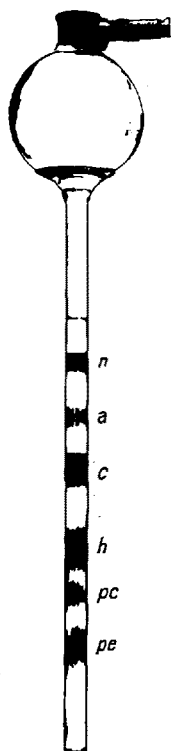


Fig. 12. Trennung durch Gelfiltrierung auf einer Säule aus vernetztem Polyacrylamid. Die Zonen sind Phykoerythrin (pe), Phykozyan (pc), Hämoglobin (h), Cytochrom C (c), DNP-Asparaginsäure (a) und Naphtholgrün (n). Die Rf-Werte sind approximativ 0,90, 0,78, 0,64, 0,40, 0,24 und 0,10 (nach HJERTÉN und MOSBACH²⁹).

Molekulargewichte von 0–2000, 1000–10000 oder 10000–40000 eignen. Die Methode hat schnelle Verbreitung gefunden, und die diesbezügliche Literatur ist bereits recht umfangreich²⁸. Als Beispiel diene eine Trennung von verschiedenen Oligosacchariden, die durch Abbau von Zellulose erhalten wurden (Figur 11). Bei der Fraktionierung von Polypeptiden (zum Beispiel Hypophysenhormonen), überhaupt als erster Schritt bei der Aufarbeitung biologischer Extrakte, hat sich die Methode als besonders wertvoll erwiesen. Von grosser Bedeutung ist die – vielleicht etwas trivial anmutende – Anwendung bei der Entsalzung von Polypeptidlösungen und dergleichen in Fällen, bei denen keine Dialyse in Frage kommt, die Sephadex-Säule aber in einem einfachen Filtriervorgang eine vollständige Trennung gestattet. Die Methode wird jetzt in verschiedener Hinsicht weiterentwickelt. Man stellt nun zum Beispiel auch Ionenaustauscher auf Sephadex-Basis her, die besonders schnelle Trennungen mit grosser Kapazität und guter Ausbeute ermöglichen.

Die Frage, ob auch grössere Moleküle durch Gel-filtration getrennt werden können, wird augenblicklich näher untersucht. Kürzlich haben HJERTÉN und MOSBACH²⁹ in meinem Institut Versuche in dieser Richtung mit Gelen aus Polyacrylamid erfolgversprechend durchgeführt. Diese Gele können mit verschiedenen Vernetzungsgraden hergestellt werden und eignen sich offensichtlich gut sowohl für niedrig- als auch für hochmolekulare Stoffe. Auch hier eluiert man bei konstanter Konzentration. Figur 12 zeigt eine derartige Säule aus Polyacrylamid-Gel; in diesem Versuch wurde in einem Schritt (Eluierung mit Natriumphosphat-Puffer 0,05 M, pH 7,3) eine Trennung von Naphtholgrün (n) (MG 253), DNP-Asparaginsäure (a) (MG 285), Cytochrom c (c) (MG 13000), Hämoglobin (h) (MG 68000), R-Phyko-cyan (pc) (MG 135000 bei pH 7,5) und Phykoerythrin (pe) (MG 290000) ausgeführt. Die Säule hatte die Abmessungen 1,5 x 32 cm; die Eluierung nahm 10 h in Anspruch.

In dieser Übersicht habe ich mich hauptsächlich mit methodologischen Problemstellungen aus meinen eigenen Laboratorien beschäftigt. Ich hoffe jedoch, dass nicht der Eindruck gewonnen wird, dass wir uns in Uppsala nur für Fragen der Methodik interessieren. Im Gegenteil – ich glaube, es ist ein Hauptanliegen unseres Forschungsprogramms, die fruchtbare Verknüpfung von methodologischer und eigentlicher Problemforschung, bei der die Methoden zur Anwendung gelangen und zur Erzielung von Fortschritten unentbehrlich sind, zu vertiefen. Die Lösung vieler aktueller biochemischer Probleme hängt vom methodischen Fortschritt ab, der zwar manchmal mit sehr einfachen Mitteln, aber immer nur mit viel Probieren und Experimentieren erreicht werden kann.

²⁸ Ein vollständiges Literaturverzeichnis ist bei PHARMACIA LTD., Uppsala (Schweden) erhältlich.

²⁹ S. HJERTÉN und R. MOSBACH, erscheint demnächst.

Summary. A survey is given of some recent progress, particularly in the author's own laboratory, of methods for the separation of macromolecules and particles of biological origin, as viruses, bacteriophage, microsomes, cell fragments, bacteria and whole cells. Special attention is given to recent developments in zone electrophoresis, protein chromatography, gel filtration and the new partition methods for separation of particles and macromolecules (ALBERTSSON). A number

of examples are given to illustrate the various applications. Special emphasis is laid upon the new possibilities for biochemical-genetic studies by application of high-resolution separation methods, and the significance of particle separation methods as applied to fragments of biological structures in providing a tool for structure investigations on a macromolecular level—a field which also should be of considerable interest from a chemical point of view.

Brèves communications – Kurze Mitteilungen – Brevi comunicazioni – Brief Reports

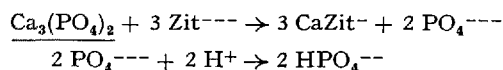
Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. – Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. – Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. – The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

Über die Basizität der Knochenmineralien

Ausgehend von Untersuchungen über die Löslichkeit der Calciumphosphate sind wir zur Feststellung gelangt, dass Knochenmineralien stark basischen Charakter haben. Dies ist bisher wohl nicht zuletzt deswegen übersehen worden, weil bei experimentellen Untersuchungen die Calciumphosphate des Knochens meistens wie andere schwerlösliche, jedoch nicht oder kaum basische Calciumsalze (zum Beispiel Calciumoxalat, Calciumphytat, Calciumfluorid) in verdünnten Mineralsäuren gelöst werden. Durch das saure Milieu wird der basische Charakter der Knochen-salze dann sozusagen überdeckt.

Man kann nun schwerlösliche Calciumsalze statt durch Säuren (Verkleinerung der Anionenkonzentration im Ionenprodukt) auch durch Chelatbildner in Lösung bringen (Verkleinerung der Kationenkonzentration im Ionenprodukt). Wird hierbei ein vollständig dissoziierter Chelatbildner verwendet, bewirkt der mehr oder weniger stark basische Charakter des in Lösung gehenden Calciumsalzes, der durch das Anion determiniert wird, dass das pH der Lösung sich mehr oder weniger stark nach alkalisch verschiebt.

Geeignet für derartige Versuche ist Zitrat. So gehen die Calciumsalze von pulverisierter, nativer Knochenkompakta in 0,01–0,05 M wässrigem Natriumzitrat praktisch vollständig in Lösung. Die gelösten Basenäquivalente können dann nach Wegzentrifugierung der in Suspension bleibenden Partikel von kollagenem Material ohne weiteres mit verdünnter Mineralsäure titriert werden. Dabei ist zu berücksichtigen, dass bei mehrstufig dissozierten Basen wie Phosphat und Carbonat das Resultat davon abhängt, bis zu welchem willkürlich festgelegten pH titriert wird. Es erscheint zweckmässig, zur Lösung der Knochen-salze von einer auf pH 7,4 eingestellten Zitratlösung auszugehen und bei der Basentitration eingestellte Säure bis zur Erreichung dieses Ausgangs-pH zuzugeben. Dadurch werden – wie bei einer Osteolyse *in vivo* – die physiologisch unmittelbar verwerteten Basenäquivalente bestimmt. Unter Verwendung von tertiärem Calciumphosphat als Beispiel eines chemisch definierten schwerlöslichen Calciumsalzes kann das experimentelle Vorgehen wie folgt formuliert werden, wobei lediglich die Tatsache, dass bei Wahl des Endpunkts bei pH 7,4 ein kleiner Teil von HPO_4^{--} bis zur Stufe des H_2PO_4^- neutralisiert wird, unberücksichtigt bleibt:



In der Tabelle I sind die Ergebnisse von Versuchen mit nativem Knochengewebe des Menschen und des Rindes wiedergegeben. Als Bezugsgrösse der Basenäquivalente wird die Totalkonzentration des gelösten Calciums verwendet (Base-Calcium-Quotient = B/Ca). Da Kontrollversuche ergeben, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen 95–100% des Knochenkalks in Lösung gehen, kann der ermittelte B/Ca-Wert als repräsentativ für die Knochenmineralien *in toto* gelten. Die Versuchsergebnisse zeigen also, dass bei der Mobilisation von 1 m M Knochen-calcium gleichzeitig 0,8 m Aeq Base frei werden.

Aus zahlreichen älteren und neueren Arbeiten über den Mineralstoffwechsel ist ersichtlich, dass bei jeder metabolischen Azidose Knochenmineralien mobilisiert werden (RAAFLAUB¹). Eine adäquate Interpretation dieser experimentell regelmässig reproduzierbaren Tatsache ist jedoch bisher nicht gegeben worden. Erst die zahlenmässige Erfassung des eminent basischen Charakters der Knochenmineralien führt nun zwanglos zu den physiologischen Zusammenhängen. Die Mobilisierbarkeit von Knochenbase stellt offensichtlich ein wesentliches Glied eines physiologischen Regulationsmechanismus zur Wahrung der pH-Konstanz des «milieu intérieur», bzw. zur Regenerierung der Alkalireserve des Blutes dar. Eine eingehende Erörte-

Tab. I. Bestimmung des Base-Calcium-Quotienten von nativem Knochenmineral, bezogen auf pH 7,40 (Interpretation siehe Text)

	Knochen-pulver pro Ansatz	Gelöste Base (mAeq/l)	Gelöstes Calcium (mM/l)	Base-Calcium-Quotient B/Ca
Rippe Mensch	4 mg	0,84	1,05	0,80
Femur Rind	4 mg	0,94	1,15	0,82

¹ J. RAAFLAUB, Schweiz. Med. Wschr., im Druck.