

**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

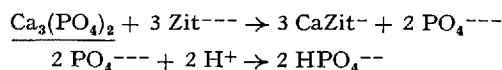
Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. – Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. – Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. – The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their 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 dissoziierten 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  $\text{HPO}_4^{--}$  bis zur Stufe des  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  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 (RAAFLAUB<sup>1</sup>). 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

<sup>1</sup> J. RAAFLAUB, Schweiz. Med. Wschr., im Druck.

zung dieses Regulationsmechanismus, das heisst der Beziehungen zwischen Knochensystem, Nebenschilddrüsenfunktion und Säure-Base-Haushalt wird an anderer Stelle erfolgen<sup>1</sup>. Hier sollen lediglich zwei mehr chemische Aspekte der Versuchsergebnisse hervorgehoben werden.

Bemerkenswert ist zunächst die grosse Menge der im Knochensystem eines Vertebraten vorhandenen Base. Man kann schätzen, dass eine generalisierte Demineralisation von etwa 30% noch mit einer ungestörten Funktion der Skelettmechanik vereinbar ist<sup>2</sup>. Ausgehend von dieser Annahme lässt sich berechnen, dass in den Knochen eines normalen menschlichen Organismus eine Basenreserve von ungefähr 8 Äquivalentgewichten verfügbar ist. Vergleicht man dagegen die Gesamtmenge der in Blut und Extrazellulärflüssigkeit gelösten Alkalireserve, die ungefähr 0,3 Äquivalentgewichte beträgt, tritt die rein mengenmässige Bedeutung der Knochenbase besonders klar hervor.

Bemerkenswert ist weiterhin, dass der Base-Calcium-Quotient des nativen Knochens gut mit den Sollwerten des tertiären Phosphates und des Carbonatapatits übereinstimmt, bzw. deutlich unter dem Sollwert des Hydroxylapatits liegt (Tabelle II). Dies widerspricht der üblichen, Auffassung, wonach das anorganische Material des Knochens zur Hauptsache aus Hydroxylapatit bestehen soll<sup>3,4</sup>. Gegen Carbonatapatit und eher für tertiäres Phosphat spricht die gute Zitratlöslichkeit des Knochenkalks. Die Zitratunlöslichkeit der Apatite wird ja geradezu zur Unterscheidung dieser Phosphate von anderen schwerlöslichen Calciumphosphaten verwendet<sup>5</sup>. Es soll und kann jedoch auf Grund unserer Versuchsergebnisse auf die noch offenen Fragen nach der kristall-chemischen Struktur der nativen Knochenmineralien nicht weiter eingegangen werden.

Tab. II. Berechnete Base-Calcium-Quotienten (B/Ca) verschiedener schwerlöslicher Calciumsalze, bezogen auf pH 7,40.

	B/Ca
$\text{CaC}_2\text{O}_4$ , $\text{CaF}_2$ u. a.	0
$\text{CaHPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,20
$\text{Ca}_4\text{H}(\text{PO}_4)_3 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,65
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	0,80
$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{CO}_3$	0,82
$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	0,92
$\text{CaCO}_3$	1,05

### Beobachtung eines reversiblen Komproportionierungseffektes unter Lichteinwirkung bei Chrom-tris-2,2'-dipyridyl-Komplexen

Bei der Arbeitsweise des von HERZOG<sup>1</sup> für die Darstellung von Chrom(0)-tris-2,2'-dipyridyl gewählten Verfahrens entstehen in der wässrigen Lösung bei pH 7 suspendiertes  $(\text{CrDipy}_3)^0$ , gelöstes  $(\text{CrDipy}_3)^{2+}$ , gelöstes  $(\text{CrDipy}_3)^{3+}$  und Acetationen.

Wie wir fanden, verfärbten sich die an der Gefässwand haftenden roten Tropfen unter Lichteinwirkung (Sonnenlicht oder UV) blau. Die blaue Farbe geht in der Dunkelheit wieder in die ursprüngliche rote über.

Da in der Reihe der Chrom-tris-2,2'-dipyridyl-Komplexe verschiedener Wertigkeiten (0, 1, 2, 3) nur der Chrom(I)-tris-2,2'-dipyridyl-Komplex  $(\text{CrDipy}_3)^+$  blau gefärbt ist

**Methodik.** Kompaktgewebe von nativem Knochen wird mit einer Feile fein gepulvert. Je 4 mg Knochenpulver werden mit 20 cm<sup>3</sup> Na-Zitrat 0,05 M, eingestellt auf pH 7,4, während 24 h unter Luftabschluss schüttelt. Das nicht gelöste kollagene Material wird abzentrifugiert, das Überstehende weiterverarbeitet.

**Basenäquivalente:** Titration eines aliquoten Teils des Überstehenden mit 0,005 N  $\text{H}_2\text{SO}_4$  bis pH  $7,4 \pm 0,02$  (Endpunkt potentiometrisch mit Glaselektrode bestimmt).

**Calcium:** Das Totalcalcium eines aliquoten Teils des Überstehenden wird mit Sulkowitsch Reagens als Oxalat gefällt und abzentrifugiert. Nach Auflösen des Sedimentes mit verdünnter Säure wird in üblicher Weise komplexometrisch titriert<sup>6</sup>.

Die Base- und Calciumkonzentrationswerte der Tabelle I sind gemittelte Werte von je 2 Parallelanalysen, deren Einzelwerte bis  $\pm 2\%$  vom eingetragenen Mittel differieren können.

**Summary.** The inorganic salts of bone tissue are, owing mainly to their contents of tertiary phosphate, strongly basic. A quantitative evaluation of these base equivalents can be performed through simple titration with acid after solution of the bone salts in a chelating agent (e.g. citrate). Referring to an endpoint of pH 7.40, one finds that per mMol Calcium 0.82 mEq base is set free. With regard to acid-base metabolism, the results indicate that bone phosphate, which *in vivo* can be mobilised through osteoclastic resorption, forms a remarkably big base reserve in the animal organism.

J. RAAFLAUB<sup>7</sup>

Pharmakologisches Institut der Universität Bern (Schweiz), 29. Juni 1961.

<sup>2</sup> Eine 30%ige Entkalkung des Skeletts entspricht einer röntgenologisch eben erkennbaren Osteoporose. Siehe hierzu L. BABAIANTZ, Radiol. Clinica (Basel) 16, 291 (1947).

<sup>3</sup> D. CARLSTRÖM und A. ENGSTRÖM, *The Biochemistry and Physiology of Bone* (Ed. by G. BOURNE, Acad. Press Inc., New York 1956), p. 149.

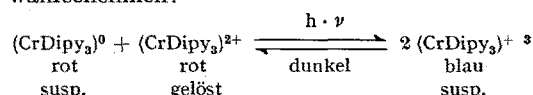
<sup>4</sup> E. SCHÜTTE, in *Chemie und Stoffwechsel von Binde- und Knochengewebe* (Springer Verlag, Berlin 1956).

<sup>5</sup> E. HAYEK und H. NEWESELY, Monatshefte für Chemie 89, 88 (1958).

<sup>6</sup> G. SCHWARZENBACH, *Komplexometrische Titration* (F. Enke Verlag, Stuttgart 1956).

<sup>7</sup> Die vorliegende Arbeit wurde mit der Unterstützung des Schweiz. Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung durchgeführt.

und zudem mit fast allen Anionen wasserunlösliche Verbindungen ergibt, scheint die folgende Deutung der Reaktion wahrscheinlich:



Diese Reaktion konnte beliebig oft mit derselben Substanz von links nach rechts und zurück ausgeführt werden.

<sup>1</sup> S. HERZOG und K. C. RENNER, Chem. Ber. 92, 872 (1959).

<sup>2</sup> G. A. BARBIERI und A. TETTMANZI, C. R. Accad. Lincei [6<sup>a</sup>], 15, 877 (1932).

<sup>3</sup> FR. HEIN und S. HERZOG, Z. anorg. allg. Chem. 267, 337 (1952).