

vorhanden. Der Messfehler für die Bestimmung der  $pK_{DMF}^*$ -Werte in dem in Tab. 6 eingerahmten Bereiche für Titrationsgeschwindigkeit und Einwaage ist ungefähr doppelt so gross wie der entsprechende Fehler für die  $pK_{MCS}^*$ -Werte (Teil I)<sup>1)</sup> und ist grösser als allgemein angenommen wird.

Herrn *P. M. Gäjgen* und Herrn *E. Strasser* danken wir für ihre Hilfe bei der Ausführung der Messungen. Der eine von uns (*E. H.*) dankt der *Rockefeller Foundation* in New York für die Unterstützung der vorliegenden Arbeit. Die C-H-Bestimmungen wurden in unserer mikroanalytischen Abteilung (Leitung *W. Manser*) ausgeführt.

#### SUMMARY.

Apparent  $pK$ -values have been determined for benzoic acid, *trans*-cinnamic acid, picric acid, *o*-chloro-benzoic acid, *p*-nitro-phenol, quinine, brucine, sym-diphenyl-guanidine, 1, 2, 3-triphenyl-guanidine and (–)-ephedrine in the solvent systems methylcellosolve/water and dimethylformamide/water as a function of the relative composition of these systems. The reproducibility of these values for a given range of the most important variables has been determined.

Organisch-chemisches Laboratorium  
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich.

---

## 62. Die Fraktionierung von Serumproteinen durch Verteilung in flüssigen kritischen Phasenpaaren

von **P. von Tavel.**

(25. I. 55.)

### Einleitung.

Die Isolierung reiner Proteine ist verschiedentlich mit der multiplikativen Gegenstromverteilung zwischen zwei flüssigen Phasen gelungen. *E. J. Harfenist & L. C. Craig*<sup>2)</sup> haben Insulin rein isoliert. *R. Signer & H. O. Walter*<sup>3)</sup> haben Casein (nach *Hammarsten*) durch Verteilung in kritischen Phasenpaaren aus Phenol, Alkohol und Wasser in wenigen Verteilungsschritten in  $\alpha$ - und  $\beta$ -Casein zerlegt. Mittels Verteilungschromatographie, einem prinzipiell ähnlichen Verfahren, bei dem die eine Phase in einem porösen Körper festgehalten wird,

---

<sup>1)</sup> Der Fehler für die Bestimmung der  $pK_{MCS}^*$ -Werte beträgt  $\pm 0,08$   $pK_{MCS}^*$ -Einheiten.

<sup>2)</sup> *E. J. Harfenist & L. C. Craig*, J. Amer. chem. Soc. **73**, 877 (1951); **74**, 3083 (1952).

<sup>3)</sup> *H. O. Walter*, Untersuchungen über die Fraktionierung von Casein mit zwei flüssigen, nicht mischbaren Phasen, Diss. Bern 1952; *R. Signer & H. O. Walter*, erscheint demnächst in Helv.

haben *R. R. Porter*<sup>1)</sup> Insulin und *A. J. P. Martin & R. R. Porter*<sup>2)</sup> aktive Ribonuclease rein dargestellt. Alle mit diesen Methoden gereinigten Proteine hatten entweder ein verhältnismässig niederes Molekulargewicht oder waren gegen Denaturierung sehr widerstandsfähig, wie die Ribonuclease oder das Casein.

Zur Trennung von Proteingemischen hat die Gegenstromverteilung den Vorteil, bei Temperaturen um 0° ausgeführt werden zu können und schon bei kleinen Löslichkeitsunterschieden der Gemischkomponenten eine weitgehende Trennung zu ermöglichen. Die Gegenstromverteilung vermeidet Adsorptionseffekte an festen Oberflächen, wie sie bei der Verteilungschromatographie von Proteinen leicht auftreten können. Die Verwendung zweiphasiger Lösungsmittelsysteme birgt den Nachteil, dass organische Lösungsmittel benötigt werden, welche empfindliche Proteine leicht denaturieren. Wir haben uns zur Aufgabe gestellt, geeignete zweiphasige Lösungsmittelgemische zu suchen, welche auch leicht denaturierbare Proteine, wie z. B. die Serumproteine, zu trennen gestatten.

#### Die Wahl zweiphasiger Lösungsmittelgemische.

Bei der Auswahl zweiphasiger Lösungsmittel für die Verteilung der Serumproteine waren folgende theoretische Überlegungen massgebend:

1. Nach *Brönsted*<sup>3)</sup> ist die Verteilung eines Stoffes in den beiden Phasen eines beschränkt mischbaren Lösungsmittelpaares um so einseitiger, je höher sein Molekulargewicht bei gleichbleibendem chemischem Charakter ist. Während die ungleiche Affinität zu den beiden Lösungsmitteln eine einseitige Verteilung zur Folge hat, bewirkt die Diffusion an sich eine gleichmässige Verteilung über das ganze System. Je höher das Molekulargewicht ansteigt, um so mehr tritt der Diffusionseffekt gegenüber den andern zurück. Eine annähernd gleiche Verteilung auf beide Phasen ist deshalb bei grossen Teilchen erst zu erwarten, wenn die Verbindung in beiden Phasen fast dieselbe Löslichkeit hat, oder dann, wenn die Phasen sehr ähnliche Zusammensetzung aufweisen, wie z. B. nahe beim kritischen Punkt.

2. Proteine sind in organischen Lösungsmitteln mit wenigen Ausnahmen wie Phenol, Formamid und Harnstofflösungen, unlöslich. Alkohole fällen Serumproteine aus wässrigen Lösungen schon bei Konzentrationen um 20 %. Hoher Salzgehalt beeinträchtigt die Löslichkeit namentlich der Globuline.

<sup>1)</sup> *R. R. Porter*, Biochem. J. **53**, 320 (1953).

<sup>2)</sup> *A. J. P. Martin & R. R. Porter*, Biochem. J. **49**, 215 (1951).

<sup>3)</sup> *J. N. Brönsted* und Mitarbeiter, Z. physikal. Chem., Bodenstein-Festband, 257 (1931); Z. physikal. Chem. A **155**, 343 (1931); **168**, 381 (1934); C. R. Trav. Lab. Carlsberg Sec. chim. **22**, 99 (1938); Trans. Farad. Soc. **36**, 619 (1940).

3. Proteine in wässriger Lösung werden durch organische Lösungsmittel leicht denaturiert. Es ist bis heute nicht bekannt, worauf die Denaturierung beruht und welche Veränderungen eine Proteinmolekel dabei erleidet. Doch führen die Beobachtungen zur Vorstellung, dass sie eine meist irreversible strukturelle Umgestaltung der Proteinmolekel zur Folge hat, wobei deren Atombestand unverändert bleibt. Die denaturierenden Verbindungen lassen sich nach *Putnam*<sup>1)</sup> in zwei Gruppen einteilen: Die erste umfasst die meisten organischen Lösungsmittel wie Alkohole, Ketone, Äther usw. Zu wässrigen Proteinlösungen zugesetzt, fallen sie in der Regel denaturierte Proteine, die in Wasser nicht wieder löslich sind. Ihre denaturierende Wirkung ist sehr temperaturabhängig und in der Kälte stark vermindert. Die zweite Gruppe enthält die proteinlösenden Stoffe, z. B. Phenol und dgl. Sie lösen die Denaturierungsprodukte, welche erst nach Entfernung des Denaturierungsmittels ausfallen. Ihre Wirkung ist wenig temperaturabhängig.

Diese Gesichtspunkte legen es nahe, für die Verteilung leicht denaturierbarer Proteine in zwei Phasen kritische Phasenpaare bei tiefen Temperaturen zu verwenden. Der kritische Punkt von Gemischen aus zwei beschränkt mischbaren Lösungsmitteln liegt bei einer bestimmten Temperatur. Um kritische Systeme bei beliebigen Temperaturen herzustellen, ist eine dritte Komponente erforderlich, welche die gegenseitige Löslichkeit der andern Gemischpartner fördert. Gemische mit geringem Gehalt an organischen Lösungsmitteln und Salzen sind vorzuziehen. Die organischen Proteinlöser sind wegen ihrer denaturierenden Wirkung zu vermeiden.

Kritische zweiphasige Lösungsmittelsysteme mit niederen Alkoholen. Aus einer grossen Zahl kritischer Gemische, die ermittelt wurden, seien lediglich diejenigen angeführt, die sich aus einem niederen Alkohol, Wasser und einem Zusatz zusammensetzen, der die Lösung in zwei Phasen scheidet. Als solche Scheidemittel dienen Salze, welche beim kritischen Punkt in beiden Phasen noch ausreichend löslich sind, oder Glucose. Die nebenstehende Tab. zeigt die Zusammensetzung einiger der annähernd kritischen zweiphasigen Gemische, die hergestellt wurden, um die Verteilung der Serumproteine in ihnen zu prüfen. Ihr Salzgehalt ist um so höher, je niedriger der Alkohol ist. Der Gehalt an organischer Komponente hängt von der Natur des zugesetzten Salzes ab. So enthalten die Systeme mit Natriumchlorid oder Glucose 30–40% Alkohol, mit Phosphat dagegen nur 12–20%.

Die annähernd kritische Zusammensetzung wurde empirisch ermittelt, indem zu verschiedenen Alkohol-Wasser-Mischungen Salzlösungen zugefügt wurden, bis sich die Gemische gerade in zwei Phasen schieden. Diejenige Zusammensetzung, die sich in zwei gleich grosse Phasen trennt, entspricht der kritischen, wie aus dem *Gibbs's*chen Zustandsdiagramm und dem Hebelgesetz hervorgeht.

Alle diese Mischungen erwiesen sich aber für die Verteilung der Serumproteine als ungeeignet, indem sie wegen ihres hohen Salzgehaltes Globulin nicht lösten. Bei 20° denaturierten alle Systeme. Die Denaturierung war am Ausfallen des Proteins beim Verdünnen festzustellen. Bei 1° wurden die wasserreichen Gemische untersucht, wobei aber keine Denaturierung beobachtet wurde.

<sup>1)</sup> *F. W. Putnam*, in *H. Neurath & K. Bailey*, The Proteins, Vol. I B, S. 821, Academic Press, New York 1953.

Tabelle.

Nahezu kritische zweiphasige Mischungen aus Alkoholen und Wasser mit Salzen oder Glucose als Entmischer. („Phosphat“ = Phosphat-Puffer pH 7,7 aus 9 Mol  $K_2HPO_4$  und 1 Mol  $NaH_2PO_4$ , als konz. Lösung verwendet und auf wasserfreies Salzgemisch berechnet.)

| Alkohol  | Entmischer                              | Temp. | Zusammensetzung des Gemisches<br>in Gew.-% |                          |        |
|--|---|-------|--|--------------------------|--------|
|  |   |       | Alkohol                                    | Entmischer<br>wasserfrei | Wasser |
| Methylalkohol . . . . .                              | Phosphat                                | 20°   | 19   | 31                       | 50     |
| Äthylalkohol . . . . .                               | Phosphat                                | 20°   | 12   | 26                       | 62     |
| Isopropylalkohol . . . . .                           | NaCl                                    | 20°   | 37   | 9                        | 54     |
| Isopropylalkohol . . . . .                           | NaCl                                    | 1°    | 38   | 10                       | 52     |
| Isopropylalkohol . . . . .                           | Phosphat                                | 20°   | 15   | 16                       | 69     |
| Isopropylalkohol . . . . .                           | Phosphat                                | 1°    | 12   | 15                       | 73     |
| n-Propylalkohol . . . . .                            | NaCl                                    | 20°   | 37   | 5,4                      | 57     |
| n-Propylalkohol . . . . .                            | Glucose                                 | 20°   | 34   | 21                       | 45     |
| tert. Butylalkohol . . . . .                         | NaCl                                    | 20°   | 40   | 4                        | 56     |
| tert. Butylalkohol . . . . .                         | NaCl                                    | 1°    | 36   | 6                        | 58     |
| tert. Butylalkohol . . . . .                         | Phosphat                                | 20°   | 31   | 4,3                      | 65     |
| sec. Butylalkohol . . . . .                          | Äthylalkohol<br>zum Homo-<br>genisieren | 20°   | 38   | 3,4                      | 58     |
| Äthylenglykolmonobutyl-<br>äther (Butylcellosolve) . | NaCl                                    | 20°   | 29   | 3,3                      | 68     |
| Äthylenglykolmonobutyl-<br>äther (Butylcellosolve) . | NaCl                                    | 1°    | 34   | 5,6                      | 60     |
| Äthylenglykolmonobutyl-<br>äther (Butylcellosolve) . | $Na_2SO_4$                              | 20°   | 29   | 1,6                      | 69     |
| Äthylenglykolmonobutyl-<br>äther (Butylcellosolve) . | Phosphat                                | 20°   | 29   | 2                        | 69     |
| Äthylenglykolmonobutyl-<br>äther (Butylcellosolve) . | Phosphat                                | 1°    | 28   | 4,4                      | 68     |
| Äthylenglykolmonobutyl-<br>äther (Butylcellosolve) . | Glucose                                 | 20°   | 30   | 12                       | 58     |
| Aceton . . . . .                                     | Phosphat                                | 20°   | 14   | 20                       | 66     |

Das kritische Gemisch von Diäthylcarbitol, Magnesiumsulfat und Wasser.

*R. R. Porter*<sup>1)</sup> weist in seiner Arbeit über die Isolierung des Insulins mittels Verteilungschromatographie darauf hin, dass ein Gemisch aus Diäthylenglykoldiäthyläther (= Diäthylcarbitol, DAC), Magnesiumsulfat und Wasser  $\gamma$ -Globulin ohne Denaturierung löse und sich für die Verteilungschromatographie eigne. Der Verteilungskoeffizient sei davon abhängig, wie nahe die Zusammensetzung des Gemisches an die kritische herankomme. Wir haben bei diesem 3-Komponenten-System festgestellt, dass sich das nahezu kritische zweiphasige Ge-

<sup>1)</sup> *R. R. Porter*, Biochem. J. **53**, 320 (1953).

misch bei  $+1^{\circ}$  für die Verteilung der wichtigsten Serumproteine eignet und diese nicht nennenswert denaturiert.

Das Diäthylcarbitol des Handels enthält Peroxyde und saure Bestandteile. Es wurde durch Destillation über etwas konzentrierter Natronlauge gereinigt. (Sdp.  $74^{\circ}/13$  mm).

*Porter* gibt das Zustandsdiagramm des Systems an. In Übereinstimmung damit fanden wir folgende gerade noch zweiphasigen kritischen Zusammensetzungen (in Gew.-%).

bei  $20^{\circ}$ : 14,2% DAC, 8,7%  $\text{MgSO}_4$  (wasserfrei), 77,1% Wasser;

bei  $+1^{\circ}$ : 12,4% DAC, 10,5%  $\text{MgSO}_4$  (wasserfrei), 77,1% Wasser.

Beachtenswert ist gegenüber den oben erwähnten Gemischen der hohe Wassergehalt. Dies ist wohl der Grund, weshalb sich die Mischung zum Lösen der Serumproteine eignet und nicht denaturiert.

Bei  $0^{\circ}$  ist die Sättigungsgrenze des Magnesiumsulfates überschritten, bevor das System kritisch wird. Beim Abkühlen werden die Gemische homogener. Durch Verschieben der Temperatur lässt sich der kritische Punkt oft bequemer und genauer erreichen als durch Verändern des Mengenverhältnisses der Komponenten. Fast kritische Gemische sind gegen Temperaturschwankungen viel empfindlicher als solche, die weit ab von der kritischen Zusammensetzung liegen. Es empfiehlt sich deshalb, sie beim Arbeiten in einem Thermostaten bei einer Temperaturkonstanz von  $\pm 0,1^{\circ}$  zu halten.

Wie *Porter* beobachtet hat, ist der Verteilungskoeffizient der Proteine im zweiphasigen System  $\text{DAC-MgSO}_4\text{-H}_2\text{O}$  davon abhängig, wie nahe dessen Zusammensetzung beim kritischen Punkte liegt. Um eine Beziehung zwischen Verteilungskoeffizient und der Abweichung des Mengenverhältnisses der drei Komponenten von der kritischen Zusammensetzung zu ermitteln, musste für diese Abweichung ein einfaches Mass gefunden werden. Am naheliegendsten wäre es, den Wassergehalt des Gemisches zu verwenden. Dieser ist jedoch nicht leicht genau experimentell zu bestimmen. Der kritische Punkt der Systeme verändert sich ausserdem durch gelöste Proteine und Puffersubstanzen und müsste deshalb in jedem Fall besonders ermittelt werden. Es hat sich als zweckmässig erwiesen, den Dichteunterschied der Phasen zur Charakterisierung der Abweichung vom kritischen Zustand heranzuziehen. An Stelle der Dichte kann jede beliebige Eigenschaft verwendet werden, in welcher sich die Phasen unterscheiden und die sich leicht experimentell bestimmen lässt, wie z. B. die Lichtbrechung.

Wie aus Fig. 1 hervorgeht, zerfallen alle Gemische in der Mischungslücke in zwei Phasen, wobei die Zusammensetzung der einen auf dem Kurvenstück A—K der Löslichkeitslinie liegt, während das Mischungsverhältnis der andern sich auf dem Abschnitt B—K befindet. Alle Gemische, deren Gesamtzusammensetzung auf der Verbindungsgeraden der beiden Phasenpunkte  $P_1$  und  $P_2$ , der Konnode, liegen, müssen sich in Phasenpaare gleicher Zusammensetzung scheiden. Der Dichteunterschied ist deshalb für alle Gemische derselben Konnode gleich. Ihre Phasenpaare unterscheiden sich aber durch ein verschiedenes Verhältnis der Phasenmengen. Diese verhalten sich nach dem Hebelgesetz umgekehrt proportional wie die Konnodenabschnitte (im Beispiel, Menge der Phase  $P_1$ : Menge der Phase  $P_2 = \overline{P_2P} : \overline{PP_1}$ ).

Experimentell kann der Dichteunterschied genau mittels eines Tauchkörpers bestimmt werden, der in die Phasen gehängt wird, ohne dass diese getrennt werden müssen.

Sein Gewicht bestimmt man am besten mit einer Torsionswaage. Während der Messung muss für Temperaturkonstanz gesorgt sein.

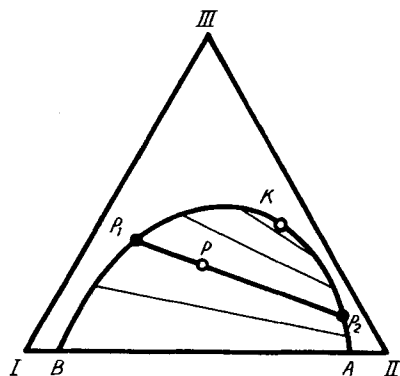


Fig. 1.

Stellt man die kritische Zusammensetzung dadurch her, dass einem geeigneten Gemisch Wasser zugefügt wird, so fällt der Dichteunterschied gegen den kritischen Punkt immer schneller ab, wie an einem Beispiel in Fig. 2 gezeigt wird. Um fast kritische Zusammensetzungen mit bestimmtem Dichteunterschied einzustellen, müssen die Komponenten sehr genau dosiert werden. Bei einem Dichteunterschied von 0,03, wie er etwa für eine Serumfraktionierung in Frage kommt, entspricht einer Korrektur von 0,1 % Wasser, bezogen auf das ganze System, ein Dichteunterschied von 0,005. Die Einstellung definierter, nahezu kritischer Gemische ist deshalb eine mühsame Arbeit.

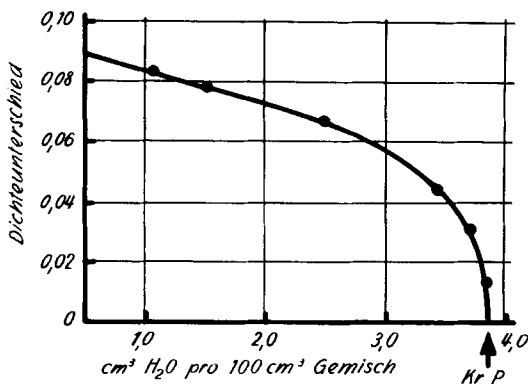


Fig. 2.

Abfall des Dichteunterschiedes bei Annäherung an den kritischen Punkt im Gemisch DAC-MgSO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O bei +1°.

Die Trennung der beiden Phasen benötigt bei kleinen Dichteunterschieden von 0,02–0,04 etwa 8–12 Std. Versuche, die Phasen durch Zentrifugieren zu trennen, führten wegen mangelnder Temperaturkonstanz in der Zentrifuge nicht zum Ziel.

Bei der Zerlegung von Proteingemischen mittels Gegenstromverteilung ist es wesentlich, definierte pH-Werte einzuhalten und die Lösungen zu puffern. Wegen des Magnesiumgehaltes kann im System DAC-MgSO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O im pH-Gebiet oberhalb pH 5,5 bei + 1° kein Phosphatpuffer verwendet werden, weil sonst Magnesiumphosphat ausfällt. Für höherliegende pH-Werte haben wir uns mit Glycylglycin als Puffer beholfen, das freilich im Bereich 5,8–6,5 eine geringe Pufferkapazität aufweist.

Der pH-Wert, wie er in diesem Gemisch mit der Glaselektrode gemessen wird, ist wegen des Gehaltes an organischen Lösungsmitteln nicht genau. Der Fehler erreicht aber höchstens 0,2 pH-Einheiten und wurde vernachlässigt. Da die Konzentration an DAC stets dieselbe ist, sind die Messungen trotzdem eindeutig.

### Das Verhalten von Albumin und $\gamma$ -Globulin im kritischen zweiphasigen Gemisch von DAC-MgSO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O.

Diese Versuche wurden mit Rinderalbumin (*Poviet*, für Rh-Teste) und  $\gamma$ -Globulin durchgeführt, das teils aus Pferdeserum durch Ausfällen mit Ammonsulfat (30–50% Sättigung), teils nach *P. Kistler & H. Nitschmann*<sup>1)</sup> aus Rinderserum hergestellt worden war.

Denaturierung. Proben der beiden Proteine wurden 3 Wochen in zweiphasigen kritischen Gemischen im Thermostaten bei +20° und +1° aufbewahrt. Jede Woche wurde der Gehalt an gelöstem Protein in jeder Phase an Hand der Extinktion bei 280  $\mu$  spektrophotometrisch in zentrifugierten Proben bestimmt. Bei Albumin blieb das Protein bei 20° und 1° unverändert, während bei Globulin bei 20° etwa die Hälfte im Laufe des Versuches denaturiert ausfiel; bei + 1° dagegen war keine nennenswerte Fällung und Denaturierung zu verzeichnen.

Verteilungskoeffizient und Dichteunterschied. Der Verteilungskoeffizient, das Verhältnis der Konzentration der oberen zu derjenigen der unteren Phase, liegt bei den Serumproteinen zwischen 0, bei grossen Dichteunterschieden, und 1, im kritischen Punkt. Die Abhängigkeit des Verteilungskoeffizienten vom Dichteunterschied wurde bei Albumin und Globulin experimentell untersucht. Dabei änderte sich die Proteinkonzentration in den Phasen linear mit dem Dichteunterschied, solange dieser 0,04 nicht überschritt (vgl. Fig. 3). Der Verteilungskoeffizient lässt sich deshalb über den ganzen Bereich berechnen, wenn er für einen Dichteunterschied ermittelt wurde, und die Proteinkonzentration bezogen auf das ganze System bekannt ist.

Vergleicht man in Fig. 4 die Kurven für Albumin und  $\gamma$ -Globulin bei pH 5,8, so erkennt man, dass die Verteilungskoeffizienten des Globulins stets höher liegen als die des Albumins. D. h., dass mehr Globulin in die obere Phase geht als Albumin. Mit zunehmendem Dichteunterschied wird der Unterschied ausgeprägter, weil der Verteilungskoeffizient des Albumins stärker absinkt. Vermutlich wird Globulin durch den hohen Salzgehalt der unteren wässrigen Phase stärker in die organische, obere, Phase gedrängt.

Verteilungskoeffizient und pH. Der Vergleich der Verteilungskoeffizienten bei verschiedenen pH-Werten muss bei gleichen

<sup>1)</sup> *P. Kistler, H. Nitschmann & W. Lergier, Helv. 37, 866 (1954).*

Dichteunterschieden erfolgen. Fig. 4 zeigt die Koeffizienten der beiden Proteine bei pH 4,5–5,8 beim Albumin und bei 5,8 bis 7,8 bei Globulin. Während die Koeffizienten des Albumins im gemessenen pH-Bereich, der den isoelektrischen Punkt umfasst, konstant sind, nehmen die Koeffizienten beim Globulin mit wachsendem pH zu.

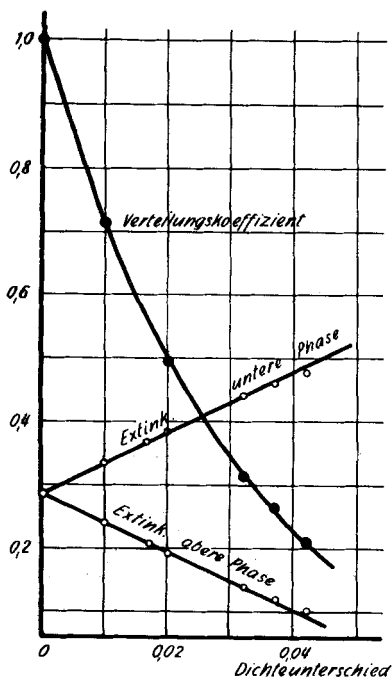


Fig. 3.

Verteilungskoeffizient  $C_0/C_u$  von Albumin in Abhängigkeit des Dichteunterschiedes in DAC-MgSO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O bei +1° (Albuminkonzentration ca. 0,5%). (Die Extinktionswerte sind mit 10<sup>-1</sup> multipliziert.)

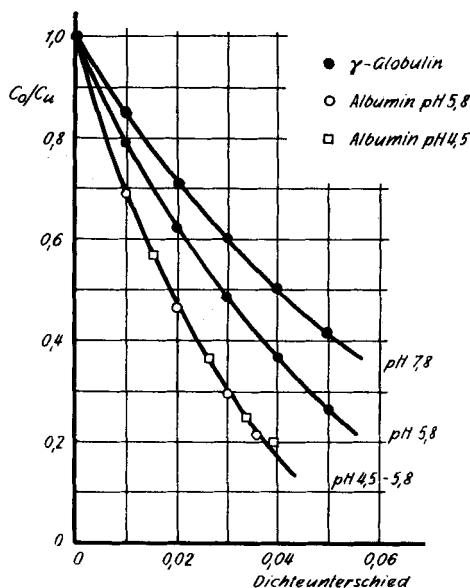


Fig. 4.

Verteilungskoeffizienten  $C_0/C_u$  von Albumin und  $\gamma$ -Globulin in Abhängigkeit von pH und Dichteunterschied in DAC-MgSO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O bei +1°. Albumin ca. 0,5%.  $\gamma$ -Globulin ca. 0,06%. Glycylglycin-HCl-Puffer 0,1-m.

## Die Verteilung von Serum im System DAC-MgSO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O.

Pferdeserum löst sich weitgehend im nahezu kritischen System von DAC-MgSO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O. Die untere Phase bleibt getrübt, vermutlich durch Lipoproteine, die nicht gelöst oder aber denaturiert werden. Um die Proteine aus der oberen und unteren Phase elektrophoretisch zu untersuchen, wurde ein kritisches Gemisch von 100 cm<sup>3</sup>, enthaltend ca. 1% Serumprotein, wie folgt hergestellt: Die Mischung von 34 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O, 15 cm<sup>3</sup> Diäthylcarbitol und 35 cm<sup>3</sup> MgSO<sub>4</sub>-Lösung (30 g/100 cm<sup>3</sup>) wurde auf +1° gekühlt und mit 15 cm<sup>3</sup> Serum versetzt, dann mit Citronensäure auf pH 5,8 eingestellt und durch kleine Portionen von Wasser, Diäthylcarbitol und Magnesiumsulfatlösung bis nahe an die kritische Zusammensetzung gebracht. Der Dichteunterschied wurde bei diesem Versuch noch nicht gemessen. Zur Beurteilung des kritischen Zustandes dienten das erste Auftreten einer zweiten Phase und die Scheidung in zwei gleiche Phasenvolumen. Nach dieser mühsamen, mehrere Tage dauernden Operation, während der die Lösung ständig im +1°-Thermostaten gehalten wurde, betrug die Zusammensetzung des Gemisches:



|                                |                         |                   |
|--------------------------------|-------------------------|-------------------|
| Diäthylcarbitol                | 12,3 Gew.-%             |                   |
| MgSO <sub>4</sub> (wasserfrei) | 10,25                   |                   |
| Wasser                         | 64,1                    |                   |
| Serum (Dichte 1,03)            | 13,25 (rund 1% Protein) | } zusammen 77,45% |
|                                | 100%                    |                   |

Vergleicht man diese Zusammensetzung mit derjenigen des serumfreien Gemisches Seite 524, so sieht man, dass 1 Volumen Serum praktisch 1 Volumen Wasser ersetzt. Nachdem sich die Phasen geschieden hatten (ca. 12 Std.), wurden sie getrennt und bei +1° erst gegen Wasser, dann gegen 0,8-proz. Kochsalzlösung dialysiert, bis kein Sulfat mehr nachzuweisen war, und schliesslich gefriergetrocknet. Um einen Anhaltspunkt über die Verteilungskoeffizienten zu erhalten, wurden die Extinktionen der Phasen bei 280 m $\mu$  vor der Dialyse gemessen.

Schon die Untersuchung der Proteinfractionen mittels Papier-electrophorese zeigte eine deutliche Anreicherung des  $\gamma$ -Globulins gegenüber dem Albumin in der oberen Phase. Noch deutlicher waren die *Philpot-Svensson*-Aufnahmen im *Tiselius*-Apparat (Fig. 5).

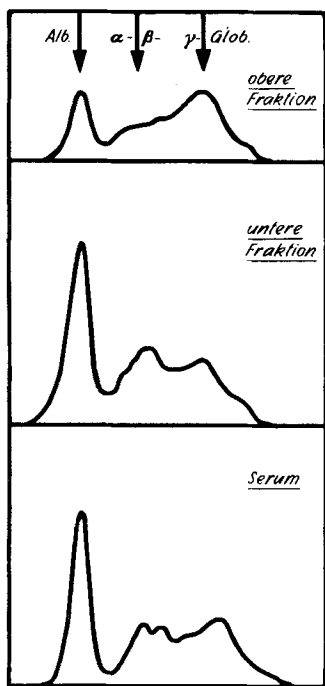


Fig. 5.

*Tiselius*-Electrophorese der 1-stufigen Verteilung von Pferdeserum in DAC-MgSO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O bei +1° (Diäthylbarbitursäure-Oxalat-Puffer, pH 8,9; 0,1  $\mu$ ; 220 V, 20 mA; absteigende Gradienten nach 70–90 Min.).

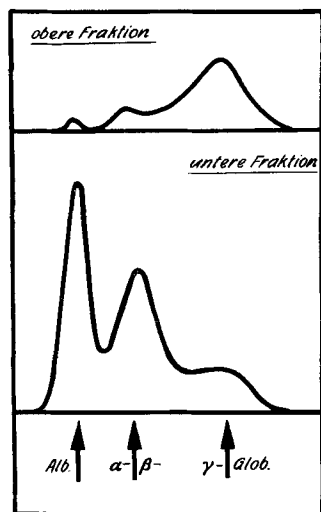


Fig. 6.

*Tiselius*-Electrophorese der 2 Fraktionen aus der 4-stufigen Verteilung von Pferdeserum in DAC-MgSO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O bei +1°. Bedingungen wie bei Fig. 5.

Die Electrophoresediagramme des Ausgangsmaterials und der beiden Fraktionen gestatteten nicht, alle wesentlichen Serumproteine

einzelnen genügend genau zu erfassen. Bei der quantitativen Auswertung wurden lediglich Albumin,  $\gamma$ -Globulin und die Summe der übrigen Proteine unterschieden und folgende Zusammensetzungen ermittelt:

|                   | Albumin | $\gamma$ -Globulin | Übrige Proteine |
|-------------------|---------|--------------------|-----------------|
| Serum . . . . .   | 37%     | $24 \pm 3\%$       | $39 \pm 3\%$    |
| Obere Fraktion .  | 25%     | $42 \pm 3\%$       | $33 \pm 3\%$    |
| Untere Fraktion . | 42%     | $16 \pm 3\%$       | $42 \pm 3\%$    |

Um die Verteilungskoeffizienten des Albumins und des  $\gamma$ -Globulins abzuschätzen, wurde die Extinktion bestimmt. Die Extinktionskoeffizienten der Serumproteine betragen nach einer Zusammenstellung von Gurd<sup>1)</sup> für Rinder-Albumin  $E_{280}^{1\%} = 6,6$  und für Human- $\gamma$ -Globulin  $E_{279}^{1\%} = 14,5$ . Aus den gemessenen Extinktionen der Phasen von oben 5,13 und unten 15,43 folgten die Proteinkonzentrationen oben zu 0,46% und unten zu 1,625%. Der Vergleich mit der eingesetzten Proteinmenge mit Berücksichtigung der Phasenvolumen zeigt, dass die Proteinsumme ca. 5% zu hoch ist, was angesichts der unsicheren Berechnungsgrundlagen innerhalb der Fehlergrenze liegen dürfte.

Aus der elektrophoretisch ermittelten Zusammensetzung der Fraktionen und ihrem Proteingehalt ergeben sich folgende Verteilungskoeffizienten:

|                            | Obere Fraktion<br>$C_o$ | Untere Fraktion<br>$C_u$ | Verteilungskoeff.<br>$k = C_o/C_u$ |
|----------------------------|-------------------------|--------------------------|------------------------------------|
| Albumin . . . . .          | 0,115%                  | 0,68%                    | 0,17                               |
| $\gamma$ -Globulin . . . . | 0,19 %                  | 0,26%                    | 0,74                               |
| „Übrige Proteine“          | 0,15 %                  | 0,68%                    | 0,22                               |

Der Verteilungskoeffizient für  $\gamma$ -Globulin ist im Vergleich zu demjenigen des Albumins sehr hoch. Bei den Versuchen über die pH-Abhängigkeit (Fig. 4, Seite 527) entsprach einem Verteilungskoeffizienten des Albumins von 0,17 ein solcher von nur 0,36 für das  $\gamma$ -Globulin. Der Anreicherungsfaktor des  $\gamma$ -Globulins zum Albumin

$$\beta = k_{\text{Globulin}}/k_{\text{Albumin}}$$

wird für den ersten Versuch, wo der Verteilungskoeffizient in Lösungen der einzelnen Proteine bestimmt war,  $\beta = 2$ , während bei der Verteilung des Serums ein viel günstigerer Wert von  $\beta = 4,3$  resultiert.

#### Vierstufige Verteilung von Serum im System DAC-MgSO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O.

In einem ähnlichen Versuch wurde Pferdeserum einer vierstufigen Verteilung bei  $+1^0$  unterworfen.

50 cm<sup>3</sup> unterer Phase, enthaltend 5 g gefriergetrocknetes Serum, wurden mit 50 cm<sup>3</sup> oberer Phase ins Gleichgewicht gesetzt, die obere Phase getrennt und weitere dreimal mit je 50 cm<sup>3</sup> frischer unterer Phase extrahiert. Die verbleibende 1. untere Phase wurde noch dreimal mit frischer oberer Phase behandelt. Nach jeder neuen Mischung eines Phasen-

<sup>1)</sup> F. R. N. Gurd, Methods of chemical analysis of protein solutions, Harvard University, Laboratory of Physical Chemistry, Boston 1950.

paares wurde auf annähernd kritische Zusammensetzung mit einem Dichteunterschied bis zu 0,06 korrigiert. Der Dichteunterschied, der durch eine ungleiche Verteilung der Proteine verursacht wird, kann vernachlässigt werden. Eine Konzentrationsdifferenz von 2% Protein bedingt einen Dichteunterschied von ca. 0,004. Am Ende des Versuches wurde die obere Phase und die untere Phase, in welche man das Protein gegeben hatte, dialysiert und gefriergetrocknet, um sie elektrophoretisch zu untersuchen.

Die obere Fraktion enthielt fast reines  $\gamma$ -Globulin. Ihr Diagramm (Fig. 6) zeigt nur kleine Albumin-,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Globulinzacken. Aus der Extinktion dieser Fraktion zu schliessen, dürfte sie etwa  $\frac{1}{10}$  des im Versuch eingesetzten  $\gamma$ -Globulins enthalten haben. In der unteren Fraktion war die  $\gamma$ -Globulinzacke stark verkleinert. Diese Phase enthielt noch ungefähr  $\frac{1}{3}$  des gesamten Albumins und der übrigen Proteine. Die Verteilungskoeffizienten der einzelnen Proteine konnten aus diesen Aufnahmen nicht ermittelt werden.

### Zusammenfassung.

Bei der Verteilung der Serumproteine in einem zweiphasigen, nahezu kritischen Gemisch von Diäthylenglykoldiäthyläther, Magnesiumsulfat und Wasser geht mehr  $\gamma$ -Globulin als Albumin in die organische Phase. Das Globulin wird durch den hohen Salzgehalt der wässrigen Phase stärker in die organische Phase gedrängt als Albumin.

Eine nennenswerte Denaturierung der wichtigsten Serumproteine durch das Lösungsmittel wurde nicht festgestellt.

Der Verteilungskoeffizient der Proteine ist weitgehend davon abhängig, wie stark die Zusammensetzung des Gemisches vom kritischen Mischungsverhältnis abweicht. Diese Abweichung wird zweckmässig am Dichteunterschied der Phasen bestimmt. Während sich im kritischen Punkt (Dichteunterschied = 0) die löslichen Proteine auf beide Phasen gleichmässig verteilen, verschiebt sich beim Abrücken von der kritischen Zusammensetzung (Zunahme des Dichteunterschiedes) die Verteilung zugunsten der wässrigen Phase und zwar je nach Protein verschieden schnell. Daraus ergibt sich die Möglichkeit, die Mischung der Proteine zu zerlegen, wenn eine geeignete Zusammensetzung des Lösungsmittelsystems gewählt wird.

Die genaue Einstellung des zweiphasigen, fast kritischen Lösungsmittelgemisches ist noch umständlich und erfordert gute Temperaturkonstanz. Die Trennung der Phasen beansprucht mehrere Stunden. Die Arbeit wird fortgesetzt mit dem Ziel, diese Nachteile zu umgehen und die Fraktionierung leicht denaturierbarer Proteine multiplikativ durchzuführen.

Diese Untersuchung wurde im Rahmen einer Arbeitsgemeinschaft mit den Herren Prof. Dr. R. Signer und Prof. Dr. H. Nitschmann ausgeführt, die vom *Schweizerischen Nationalfonds* in entgegenkommender Weise unterstützt wird, wofür hier der verbindliche Dank zum Ausdruck komme. Den Herren der Arbeitsgemeinschaft danke ich für ihr Interesse und ihre Anregungen, Herrn F. Rudin für seine zuverlässige Mithilfe bei der praktischen Arbeit.

Theodor-Kocher-Institut der Universität Bern.