

ist von uns mehrfach beobachtet worden¹⁾. Als Beleg für eine solche Wirkung sei ein Versuch mit 1-Pyrrolo-(2,3-h)-chinolin-2-carbonsäure ohne und mit Co⁺⁺-Zusatz hier angeführt.

Tabelle 3.Tbc-Stamm *Vallee*, *Kirchner*-Nährlösung.

	m/20000	m/50000	m/100000	m/200000
1-Pyrrolo-(2,3-h)-chinolin-2-carbonsäure, ohne Zusatz	++	++	++	++
1-Pyrrolo-(2,3-h)-chinolin-2-carbonsäure + Co ⁺⁺ m/5000	–	–	–	–

Zusammenfassung.

Benzhydrazid schwächt die Wirkung von INH auf Tbc H₃₇R_v deutlich ab. Zusatz von Cu⁺⁺ zu diesem System hebt diese Abschwächung wieder auf; darüber hinaus wird das nach dem 10. Tag mit INH allein zu beobachtende Wachstum stark zurückgedrängt. Ein ähnlicher Effekt ist auch durch Zusatz von Co⁺⁺ zu INH zu erreichen.

Universität Basel, Hygienische Anstalt und
Anstalt für anorganische Chemie.

II. Über die Verwendung von Cellulose als Adsorbens für Blutplasma-Proteine aus wässriger Lösung

von Hans Brandenberger.

(10. X. 53.)

In den letzten Jahren wurden wiederholt Versuche unternommen, Proteine an Filterpapier oder an pulverisierter Zellulose chromatographisch zu trennen. Während Arbeiten mit oft durch grössere Stabilität ausgezeichneten Ferment- oder Hormon-Proteinen sowohl an Cellulose- oder Papierpulver-Kolonnen²⁾, an Rundfilter-Kolonnen („chromatopile“³⁾), wie auch auf Filterpapier⁴⁾ beachtenswerte Erfolge gezeitigt haben, sind die Resultate der papierchromatographischen Trennungsversuche von Plasma-Proteinen und anderen Eiweiss-

¹⁾ H. Erlenmeyer, J. Bäumler & W. Roth, *Helv.* **36**, 941 (1953).

²⁾ R. O. Hurst & G. C. Butler, *J. Biol. Chem.* **193**, 91 (1951); I. I. Geschwind et al., *Am. Soc.* **74**, 2121 (1952).

³⁾ H. K. Mitchell et al., *J. Biol. Chem.* **180**, 1071 (1949).

⁴⁾ Siehe besonders: W. W. Reid, *Nature* **166**, 569 (1950); K. V. Giri et al., *ibid.* **167**, 859 (1951); *Biochem. J.* **51**, 123 (1952).

stoffen¹⁾ uneindeutig und sehr umstritten²⁾. Die bei diesen letzteren Arbeiten verwendeten kleinen Substanzmengen verunmöglichen eine nähere Untersuchung der Fraktionen, so dass es oft schwer zu sagen ist, wie weit die wirklichen Verhältnisse durch Denaturierungsvorgänge verdeckt werden²⁾.

Wir haben das Adsorptionsvermögen von Cellulose für die Blutplasma-Proteine genauer untersuchen wollen, wobei wir, um für physikalische Charakterisierungen die notwendigen Substanzmengen zur Verfügung zu haben, mit Cellulosepulver-Kolonnen arbeiteten. Dies hat gegenüber der Papierechromatographie den weiteren Vorteil, dass Denaturierung weniger zu befürchten ist, da diese vorwiegend an der flüssig-gasförmigen und weniger an der flüssig-festen Zwischenphase eintreten scheint³⁾.

Wir haben mit Plasma, mit Serum sowie mit nach der Alkohol-Salz-Methode von *Cohn* und Mitarbeitern⁴⁾ erhaltenen Plasma-Frak-tionen und Unterfraktionen⁵⁻⁸⁾ – in den meisten Fällen aus menschlichem Blute – gearbeitet, und zwar bei möglichst physiologischen Bedingungen (pH 7,2 ± 0,2, 0,15-m. wässriges Natriumchlorid). Die meisten Versuche nahmen wir zwischen 0 und 2° vor; später stellten wir in einzelnen Fällen fest, dass bei Zimmertemperatur genau gleich-lautende Resultate erhalten werden. Um das Bild nicht zu komplizieren, wurde vom Zusatz organischer Lösungsmittel vorläufig abgesehen.

Die geprüften Proteine oder Protein-Frak-tionen lassen sich auf Grund ihres adsorptiven Verhaltens (s. Tab.) in drei Gruppen gliedern:

I. Fibrinogen⁵⁾ wird schon bei Verwendung von kleinen Kolonnen quantitativ zurückgehalten. Es konnte weder durch Zusatz von Fremdstoffen (siehe exper. Teil) zur physiologischen Kochsalz-lösung noch durch deren Ersatz durch verschiedene Puffergemische vom pH 4,7 bis 8,5, teilweise unter Erhöhung der Ionenstärke (siehe exper. Teil), eluiert werden. Wir nehmen an, dass dieses mechanischen Einflüssen gegenüber besonders un-stabile Protein an der Cellulose-Kolonnen denaturiert und unlöslich gemacht wird.

¹⁾ Siehe besonders: *A. Tiselius & C. Shepard*, Disc. Farad. Soc. **7**, 275 (1949); *J. I. M. Jones & S. E. Michael*, Nature **165**, 685 (1950); *A. E. Franklin et al.*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **74**, 803 (1950); **77**, 783 (1951); *S. C. Papastamatis & J. F. Wilkinson*, Nature **167**, 724 (1951); *E. Cabib*, Biochem. et Biophys. Acta **7**, 604 (1951); **8**, 607 (1952); *H. G. Boman*, Nature **170**, 703 (1952); *J. H. Quastel & S. F. Van Straten*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **81**, 6 (1952); *H. Tauber et al.*, ibid. **80**, 143 (1952); Am. Soc. **74**, 2865 (1952); Abstracts, Am. Soc., Los Angeles, März 1953, 7C.

²⁾ *S. M. Swingle & A. Tiselius*, Biochem. J. **48**, 171 (1951); *D. A. Hall & F. We-walka*, Nature **168**, 685 (1951); *A. E. Franklin et al.*, ibid. **168**, 687 (1951).

³⁾ *R. R. Porter*, Biochem. J. **53**, 320 (1953).

⁴⁾ *E. J. Cohn et al.*, Am. Soc. **68**, 459 (1946).

⁵⁾ *P. R. Morrison et al.*, Am. Soc. **70**, 3103 (1948).

⁶⁾ *J. L. Oncley et al.*, Am. Soc. **71**, 541 (1949).

⁷⁾ *D. M. Surgenor et al.*, Am. Soc. **71**, 1223 (1949).

⁸⁾ *K. Schmid*, Am. Soc. **75**, 60 (1953).

II. Serumalbumin sowie das „ α_1 -acid glycoprotein“¹⁾ laufen mit der Lösungsmittelfront quantitativ und ohne jede Verzögerung durch. Am Beispiel des Serumalbumins wurde gezeigt, dass sich dieser Durchlauf elektrophoretisch und sedimentativ gleich verhält wie die Proteinlösung vor dem Versuch. Frisches Serum zeigt keinerlei Adsorption; aus Plasma wird lediglich ein Anteil zurückgehalten, welcher der Menge nach dem Fibrinogen-Gehalt entspricht. Cellulose adsorbiert demnach von den in grösseren Mengen im nativen Plasma auftretenden Proteinen lediglich das Fibrinogen.

III. Nach dem Alkohol-Salz-Verfahren gewonnene γ -Globulin-Fractionen²⁾³⁾⁴⁾ sind bezüglich Adsorption an Cellulose nicht homogen. Ein Anteil, dessen Grösse je nach dem Alter und der Herkunft der Fraktion verschieden, jedoch für eine gegebene Fraktion konstant und charakteristisch ist, läuft wie die unter II erwähnten Proteine in das Effluat, der Rest hingegen konnte auch bei Verwendung der im exper. Teil angeführten Zusätze und Pufferlösungen nicht eluiert werden. Die durchgelaufenen Anteile, die wir „e- γ -Globuline“ benennen, verhalten sich bezüglich elektrophoretischer Beweglichkeit und Sedimentation in der Ultrazentrifuge wie das Ausgangsmaterial, welches ausser ihnen noch die adsorbierte Fraktion, die „a- γ -Globuline“, enthält. Chromatographische Adsorption ergibt demnach scharfe Trennung in einem Falle, wo sowohl Elektrophorese wie auch Ultrazentrifuge nicht aufzuspalten vermögen. Das Verhältnis der a- zu den e- γ -Globulinen bleibt innerhalb einer Fraktion auch dann konstant, wenn die Kolonnengrösse variiert wird. Allerdings darf eine gewisse minimale Adsorbensmenge nicht unterschritten werden. Diese ist bedeutend grösser als im Falle des Fibrinogens. Zusatz von Serumalbumin zur Ausgangslösung ergibt ebenfalls keine Erhöhung des e- γ -Globulin-Gehaltes.

Da die γ -Globulin-Fraktion des frischen Serums nicht von der Cellulose zurückgehalten wird, müssen wir annehmen, dass sie in der isolierten Form teilweise verändert vorliegt. Nicht nur die Isolierung, sondern auch die Aufbewahrung der Fraktion kann verantwortlich für die Veränderung sein. So sank z. B. der e- γ -Globulin-Gehalt eines Präparates beim einjährigen Lagern bei Raumtemperatur von ca. 50 % auf ca. 30 %. Über eventuelle biologische Wirksamkeit der a- γ -Globuline geben unsere Versuche natürlich keine Auskunft. Im Gegensatz zum Serumalbumin werden die isolierten γ -Globuline durch die Cellulose-Kolonnen zu einem geringen Teil verändert. Die e- γ -Globuline konnten nämlich bei einem zweiten Kolonnendurchtritt nur zu ca. 85 % wiedergewonnen werden.

1) K. Schmid, Am. Soc. **75**, 60 (1953).

2) E. J. Cohn et al., Am. Soc. **68**, 459 (1946).

3) J. L. Oncley et al., Am. Soc. **71**, 541 (1949).

4) Unseres Wissens werden die in USA. gegen Poliomyelitis verwendeten γ -Globuline heute noch ausschliesslich nach diesem Verfahren hergestellt.

Unsere Versuche zeigen, dass die Cellulose-Kolonnen zwar Fibrinogen zurückhalten kann, eine Trennung der frischen Serumproteine aus wässriger Lösung jedoch nicht ermöglicht. Die Tatsache, dass durch Alkohol-Salz-Fraktionierung isolierte γ -Globuline aufgespalten werden, kann zur Bestimmung der „Reinheit“ solcher Präparate, eventuell auch zu ihrer weiteren Reinigung, verwendet werden.

Die vorliegenden Resultate erklären oder berichtigen auch einige Feststellungen, welche bei papierchromatographischen Trennungsversuchen von Proteinen des menschlichen Plasmas gemacht worden sind. Wir beschränken uns hier auf eine Diskussion der Chromatogramme von *Quastel & Van Straten*¹⁾, die mit den gleichen Protein-Fractionen wie unsere Versuche durchgeführt worden sind, sowie auch der ähnlichen Bilder von *Tauber & Petit*²⁾.

Für den auf der Auftragstelle zurückbleibenden Protein-Anteil ist zum grossen Teil das Fibrinogen verantwortlich. Die Angabe, dass auch ein Teil dieses Proteins wandert, stimmt nicht.

Die betreffenden Versuche¹⁾ wurden mit Fraktion I ausgeführt, die neben Fibrinogen noch ca. 40% andere Proteine enthält (7% Albumin, 8% α -, 15% β - und 9% γ -Globulin³⁾). Nur diese wurden durch die Cellulose-Kolonnen nicht zurückgehalten (37% Protein im Durchlauf).

Sofern man ohne Zusatz organischer Lösungsmittel arbeitet, sollten nach unseren Erfahrungen die nativen Serumproteine, sowie auch 100% der Serumalbumin-Präparate mit der Lösungsmittelfront wandern. Die auf dem Papier schwanzartig zurückbleibenden Anteile werden daher wohl Denaturierungserscheinungen zuzuschreiben sein. Eine Spaltung der γ -Globulin-Präparate in einen wandernden und einen nichtwandernden Anteil ist auch auf dem Papier ersichtlich. Auf diesem zeigt sich jedoch zusätzlich eine zwischen diesen Hauptfraktionen liegende Streuung, welche je nach der Ausführung der Chromatogramme verschieden gross ist. Auch hier glauben wir, dass eine Denaturierung des ϵ - γ -Globulin-Anteiles während des Entwicklungsprozesses dafür verantwortlich ist. Das Kolonnenexperiment zeigt, dass γ -Globuline durch die Cellulose viel leichter verändert werden als z. B. das Albumin. Es ist daher leicht verständlich, dass die „Schwänze“ auf den Papierchromatogrammen im Falle der γ -Globuline viel stärker in Erscheinung treten als beim übrigen Protein.

Die sogenannten „interactions“ zwischen Serumalbumin und γ -Globulinen, die man papierchromatographisch nachzuweisen glaubte, konnten wir bei unseren Kolonnenversuchen nicht beobachten. Die verminderte Streuung bei in Gegenwart von Serumalbumin ausgeführten γ -Globulin-Chromatogrammen könnte auf eine Verlangsamung

¹⁾ *J. H. Quastel & S. F. Van Straten*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **81**, 6 (1952).

²⁾ *H. Tauber & E. L. Petit*, Am. Soc. **74**, 2865 (1952); Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **80**, 143 (1952).

³⁾ *P. R. Morrison et al.*, Am. Soc. **70**, 3103 (1948).

der Denaturierung durch den stabilisierenden Einfluss des Albumins auf die γ -Globulin-Lösung zurückzuführen sein.

Tabelle.

Adsorption von Blutplasma-Proteinen aus physiologischer Kochsalzlösung an Cellulosepulver-Kolonnen (wo nichts anderes angegeben, handelt es sich um Proteine aus menschlichem Blute, Versuchsbedingungen siehe exp. Teil).

Prot.-Frakt. 1)	Gehalt	Quelle ²⁾	Prot.-Menge ³⁾	g Adsorbens	totale E bei 280 m μ		% Durchlauf
					vor dem Kolonnendurchtritt	nach dem Kolonnendurchtritt	
I-2	Fibrinogen	H.	14 mg	4	6,000	0,000	0
I-2	Fibrinogen	L.	12 mg	4	5,200	0,000	0
I	nur ca. 60% Fibrinogen	H.	12 mg	5	13,500	5,000	37,1
Serum (Hund)		V.	½ ml	8	38,800	38,200	98,5
Plasma (Hund, Oxalat)		V.	1 ml	28	69,300	65,800	94,9
Serumalbumin, krist. (aus V, Rind)		Ar.	16 mg	5	7,000	6,880	98,3
„ α_1 -acid glycoprotein“ (aus VI)		S.	16 mg	5	12,200	12,300	100,8
II	γ -Globulin	K.	10 mg	5	15,800	6,100	38,6
II	γ -Globulin (vor Lagerung)	Sq.	14 mg	5	17,200	8,890	51,7
II	γ -Globulin nach 1 Jahr	Sq. 4)	40 mg	33	56,800	15,630	27,5
II	γ -Globulin nach 1 Jahr	Sq. 4)	95 mg	37	115,200	32,400	27,8
II-e	Fraktion des Durchlaufes aus vorstehend. Versuch		ca. 6 mg	7	7,550	6,360	86,5

Experimenteller Teil.

1. Standardbedingungen für Chromatogramme: Als Adsorbens verwendeten wir durchgehend „Genuine *Whatman*, ashless cellulose powder, standard grade“ (*W. & R. Balston*, England). Wir arbeiteten mit überschüssigem Adsorbens, sehr oft mit ca. 1 g Cellulose für je 3 mg Protein (siehe Tab.). Für die Versuche mit γ -Globulin-Präparaten konnte die Adsorbensmenge auf die Hälfte, für diejenigen mit Fibrinogen auf den achten Teil reduziert werden, ohne Änderung im Versuchsergebnis. Die Cellulose-Kolonnen wurden

¹⁾ Die römischen Zahlen bedeuten die Fraktionen der Alkohol-Salz-Fraktionierung nach *Cohn et al.* (l. c.).

²⁾ H. = Harvard University Laboratory of Physical Chemistry; L. = Dr. *A.G. Loewy*; V. = Dr. *H. Vars*; S. = Dr. *K. Schmid*; K. = Dr. *E. Katchalsky*; Ar. = *Armour*, Chicago; Sq. = *Squibb and Sons*, New Brunswick. Wir sind dem oben erwähnten Institute sowie den aufgeführten Einzelpersonen und Firmen für die Überlassung der Präparate zu grossem Danke verpflichtet.

³⁾ Der Salzgehalt der Fraktionen ist nicht in Abzug gebracht.

⁴⁾ Für diese Bestimmung wurde die obige γ -Globulin-Fraktion nach einjähriger Lagerung bei Zimmertemperatur verwendet.

nach dem AufschlÄmmen mit destilliertem Wasser, mit Phosphatpuffer pH 7,2, $\mu = 0,15$, und mit physiologischer Kochsalzlösung je mehrere Std. gewaschen. Dann haben wir das Plasma, das Serum oder die Lösung des Protein-PrÄparates in meist 1 ml 0,15-m. NaCl aufgetragen und mit der Kochsalzlösung nachgewaschen. Mit Hilfe eines automatischen Kollektors fingen wir, meist im Kaltraum, Fraktionen von gleichem, definiertem Volumen auf.

2. ZusÄtzliche Eluierungsversuche: Durch Änderung des Lösungsmittels haben wir versucht, auch das Fibrinogen und die α - γ -Globuline zu eluieren, allerdings erfolglos. Wir verwendeten:

a) ZusÄtze zur physiologischen Kochsalzlösung: Harnstoff, 0,1-m.; Glykokoll, 0,2-m.; β -Alanin, 0,2-m.; Lactose, 4%; Dextrose, 4%; Dextran, 5%; Serumalbumin (menschliches), zugesetzt entweder in der gleichen oder in der dreifachen Gewichtsmenge der adsorbierten Fraktion.

b) Pufferlösungen an Stelle der physiol. Kochsalzlösung: Ionenstärke $\mu = 0,15$: Citrat pH 4,7; Acetat pH 5,0; Phosphat pH 6,9, 7,2, 7,4, 7,7, 8,0; sekundÄres Phosphat pH ca. 8,4.

Ionenstärke $\mu = \text{ca. } 1,0$: Phosphat pH 7,2, 8,0; sekundÄres Phosphat pH ca. 8,4 (Chromatogramm bei Zimmertemperatur).

Ionenstärke $\mu = \text{ca. } 2,4$: Phosphat pH 7,2 (Zimmertemperatur).

3. Messungen der Protein-Konzentration: Wir verwendeten die optische Extinktion bei 280 m μ (*Beckman-Quartz-Spektrophotometer*) als relatives Konzentrationsmass. Die Extinktion jeder Fraktion wurde mit ihrem Volumen multipliziert und die Summe dieser Produkte mit der totalen Extinktion der Ausgangslösung verglichen. Die Genauigkeit dieses Verfahrens ist nicht allzu gross; Fehler bis zu 2% oder bei Summierung vieler kleiner Fraktionen sogar 3% sind möglich. Grössere Abweichungen erhielten wir lediglich bei Versuchen mit γ -Globulinen, bei denen die Durchflussgeschwindigkeit oder die Kolonnengrösse allzu stark von der Norm abwich. Diese Differenzen können durch die leicht denaturierende Wirkung der Cellulose auf γ -Globulin-PrÄparate erklärt werden.

Die wichtigsten Messergebnisse haben wir in der beiliegenden Tab. zusammengefasst. Für den Vergleich der verschiedenen Proteine untereinander oder für die Arbeit mit rohen Gemischen wie z. B. der Fraktion I sind die verschiedenen spezifischen Extinktionen der Proteine in Rechnung zu ziehen¹⁾.

4. Elektrophoresen und Ultrazentrifugationen: Eine Lösung von Rinder-Serumalbumin (*Armour*) und eine γ -Globulin-Fraktion (*Squibb*, mit 51–52% e- γ -Globulin) wurden elektrophoretisch und sedimentativ vor und nach dem Adsorptionsversuch geprüft. Im Falle der γ -Globuline war es notwendig, den Durchlauf des Chromatogrammes durch Vakuum-Gefriertrocknen und nachheriges Wiederauflösen zu konzentrieren. Die Fraktionen wurden gegen das bei der physikalischen Messung in Verwendung kommende Lösungsmittel dialysiert.

Die Elektrophoresen nahmen wir vor mit einer *Tiselius*-Apparatur bei pH 8,6 in Veronalpuffer von der Ionenstärke $\mu = 0,1$, die sedimentativen Bestimmungen mit einer analytischen *Spinco*-Ultrazentrifuge in 0,15-m. Natriumchlorid-Lösung. Die mit Ausgangslösung und mit Durchlauf erhaltenen Bilder waren jeweils identisch. Auch die e- γ -Globuline enthielten, wie die für den Versuch verwendete Fraktion II, 80–85% s = 7 und 15–20% s₂₀ = 10 Komponenten²⁾.

SUMMARY.

The use of cellulose as an adsorbent for the proteins of plasma in aqueous solution has been investigated.

¹⁾ *F. R. N. Gurd*, Methods of chemical analysis of protein solutions (Harvard University, Laboratory of Physical Chemistry).

²⁾ *J. L. Oncley, G. Scatchard & A. Brown*, J. Physic. & Coll. Chem. **51**, 184 (1947). Das Auftreten dieser s₂₀ = 10 γ -Globulin-Fraktion ist eine Eigentümlichkeit der Harvard-Alkohol-Salz-Fraktionierung; bei anderen Anreicherungsverfahren der γ -Globuline trifft man sie nicht an.

1. Cellulose powder columns retain fibrinogen, but none of the main components of the native serum.

2. Isolated albumin and an α_1 -acid glycoprotein are not adsorbed on cellulose.

3. γ -Globulins, as obtained by alcohol-salt fractionation, are partially adsorbed. This indicates that they undergo a partial physical change by the isolation procedure and/or storage. The percentage of adsorbed globulins is variable but characteristic for each preparation. Adsorption on cellulose columns may be used for determination of the "purity" of such a fraction or for additional purification.

4. Some aspects of the paper chromatography of plasma proteins are discussed. In this connection it seems particularly important that the adsorptive properties of a small part of the γ -globulins change during contact with the cellulose column. Such changes may be more pronounced on paper sheets.

Die Versuche zu dieser Arbeit hat der Verfasser im University Laboratory of Physical Chemistry, Harvard University, Boston, Mass., im Department of Physiological Chemistry, University of Wisconsin, Madison, Wis., und im Department of Physiological Chemistry, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pa., ausgeführt. Er dankt den amerikanischen Universitäten für die ihm gewährte Gastfreundschaft, sowie der „Stiftung für Stipendien auf dem Gebiete der Chemie“ für ein Stipendium. Für manchen wertvollen Rat und praktische Hilfeleistung möchte er auch den folgenden Herren seinen Dank aussprechen: Prof. E. Katchalski (Weizmann Institute of Science, Rehovoth, Israel), Dr. K. Schmid (Massachusetts General Hospital, Boston, Mass.), Prof. H. F. Deutsch (University of Wisconsin, Madison, Wis.), sowie Prof. H. Vars und Dr. E. Staple (University of Pennsylvania, Philadelphia, Pa.).

Theodor-Kocher-Institut, Universität Bern¹⁾.

12. Die Glykoside der Samen von *Strophanthus caudatus* (Burm. ex L.) Kurz.

Glykoside und Aglykone, 122. Mitteilung²⁾

von O. Schindler und T. Reichstein.

(23. XI. 53.)

Im folgenden wird über die chemische Untersuchung der Samen einer weiteren *Strophanthus*-Art berichtet. Die Samen (vgl. Fig. 2a und 2b) und ein zugehöriges Herbarmuster (vgl. Fig. 1) erhielten wir vom Curator des Botanischen Gartens³⁾ in Bogor (Java) unter der

¹⁾ Jetzige Adresse.

²⁾ 121. Mitt.: R. Richter, O. Schindler & T. Reichstein, *Helv.* **37**, 76 (1954).

³⁾ Herrn C. L. L. H. van Woerden, Curator des „Kementarian Pertanian, Djawatan Penjelidikan Alam (Kebun Raya Indonesia)“ Bogor-Djawa, Indonesia, möchten wir auch hier unseren besten Dank für dieses wertvolle Material aussprechen.