

## SUMMARY

By labelling with  $^{18}\text{O}$  it was shown that the reaction of the ester  $3\beta$ -benzoyloxy-cholestene-(1) ( $\text{I}^*$ ) in an unpolar solvent on alumina to give the alcohol  $3\alpha$ -hydroxy-cholestene-(1) (II) occurs with alkyl-O-fission. The alcohol  $3\beta$ -hydroxy-cholestene-(1) ( $\text{IV}^*$ ) corresponding to  $\text{I}^*$  remained practically unchanged under these conditions.

The ester  $\text{I}^*$  recovered from alumina had lost  $^{18}\text{O}$  (probably from the carbonyl group), apparently without concurrent hydrolysis by acyl-O-fission.

The mechanisms of these changes are discussed.

Organisch-chemische Anstalt der Universität Basel und  
Pharmazeutisch-chemisches Laboratorium SANDOZ, Basel

### 236. Über den Einfluss der Polyphosphate auf die Löslichkeit einiger Plasmaproteine und die Möglichkeit der Plasma-Fraktionierung mit Polyphosphat<sup>1)</sup>

von Hs. Nitschmann, E. Rickli und P. Kistler<sup>2)</sup>

(27. VIII. 59)

#### Einleitung

Eine Reihe polyvalenter Säuren, darunter vor allem die Polyphosphorsäure (früher Metaphosphorsäure genannt), sind seit langem für ihre starke eiweissfällende Wirkung bekannt. Diese Wirkung ist meist nur unspezifisch zur vollständigen Denaturierung biologischer Flüssigkeiten herangezogen worden, im Falle der Polyphosphorsäure auch zu ihrer analytischen Unterscheidung von den niedermolekularen Gliedern der Reihe (Ortho- und Pyrophosphorsäure). Untersuchungen über die Möglichkeiten einer fraktionierten Fällung von Proteingemischen mit Hilfe solcher mehrwertiger Anionen gibt es aber nur wenige.

MORAWETZ & HUGHES<sup>3)</sup> haben die fällende Wirkung von Methacrylsäure-Polymerisaten und Maleinsäureanhydrid-Copolymerisaten auf Rinder-Serumalbumin untersucht. Aus den Niederschlägen isoliertes Serumalbumin liess keine Anzeichen einer Denaturierung erkennen. Ungefähr gleichzeitig haben WIELAND *et al.*<sup>4)</sup> über Versuche zur Fraktionierung von Serum mit Polyacrylsäuren berichtet. ISLIKER & STRAUSS<sup>5)</sup> gelang die Isolierung eines Antikörpers aus dem Komplex mit seinem Antigen (PR 8-Influenza-Virus) mit Hilfe von Polymethacrylat.

Auch mit Polystyrolsulfonsäure lassen sich Proteine im sauren pH-Gebiet ausfällen. Das verschiedenartige Verhalten von Serumalbumin und  $\gamma$ -Globulin bei Gegenwart dieses Fällungs-

<sup>1)</sup> Diese Arbeit wurde durch Mittel aus einem dem Schweizerischen Roten Kreuz von der Firma HOFFMANN-LA ROCHE, Basel, gewährten Forschungskredit unterstützt. – Ein Teil der hier mitgeteilten Resultate wurde am IV. Internationalen Kongress für Biochemie, Wien 1958, vortragen.

<sup>2)</sup> Einige orientierende Versuche zur Frage der Plasmafraktionierung mit Polyphosphat wurden vom erstgenannten Autor schon 1956 mit E. W. BÖTTCHER durchgeführt.

<sup>3)</sup> H. MORAWETZ & W. L. HUGHES jr., J. physic. Chemistry **56**, 64 (1952).

<sup>4)</sup> TH. WIELAND, H. GOLDMANN, W. KERN, H. E. SCHULTZE & H. D. MATHEKA, Makromol. Chem. **10**, 136 (1953).

<sup>5)</sup> a) H. C. ISLIKER & P. H. STRAUSS, Federation Proc. **13**, 236 (1954); b) *idem*, Vox Sanguinis **4**, 196 (1959).

mittels ermöglichte ISLIKER<sup>6)</sup> die Trennung dieser beiden Proteine, auch im Falle, wo sie einen Antigen-Antikörper-Komplex bildeten.

Verschiedene Autoren<sup>7)</sup> haben die Eigenschaft der  $\beta_1$ -Lipopoglobuline, besonders schwerlösliche Komplexe mit gewissen Polysaccharid-Schwefelsäureestern zu bilden, zu deren Abscheidung aus Serum herangezogen.

ASTRUP *et al.*<sup>8)</sup> haben mit verschiedenen Anionen, unter anderem auch Polyphosphat, orientierende Versuche zur fraktionierten Fällung von Seren ausgeführt. Eingehender haben sich RANE & NEWHOUSER<sup>9)</sup> mit der Möglichkeit der Plasmafraktionierung befasst. Ihre Publikation beschränkt sich aber, ebenso wie ihr Patent, auf die Verwendung eines einzigen Phosphates, nämlich des cyclischen Tetrametaphosphates.

Die Wirkung der handelsüblichen linearen Polyphosphate auf die Löslichkeit von Proteinen schien deshalb einer näheren Untersuchung wert. Die Plasmaproteine wurden für die Versuche gewählt, weil die Fraktionierung des humanen Blutplasmas auch ein Problem von grosser praktischer Bedeutung ist, werden doch humane Plasmafraktionen in der Medizin in stetig wachsendem Masse eingesetzt. Wir berichten im folgenden über Löslichkeitsstudien an einigen wichtigen Plasmaproteinen, welche zeigen, dass diese Proteine bei mässig sauren pH durch Polyphosphat ohne Denaturierung gefällt werden und dass bei Wahl geeigneter Bedingungen auch weitgehende Trenneffekte erreicht werden können<sup>10)</sup>. Über die praktische Ausführung eines Polyphosphat-Fraktionierverfahrens, das den Möglichkeiten Human-Blut verarbeitender Laboratorien angepasst ist und den Forderungen, die an klinische Präparate gestellt werden, entspricht, wird an anderer Stelle berichtet werden<sup>11)</sup>.

### I. Methodisches

*Die verwendeten Polyphosphate.* Die meisten Versuche wurden mit einer Polyphosphorsäure ausgeführt, die von der Firma SIEGFRIED AG., Zofingen, Schweiz, unter der Bezeichnung *Acidum metaphosphoricum purum glaciale*<sup>12)</sup> in den Handel gebracht wird. Mit Hilfe der Endgruppentitration nach SAMUELSON<sup>13)</sup> wurde für dieses Präparat ein mittlerer Polymerisationsgrad (DP) von 15 bestimmt. Die papierchromatographische Untersuchung nach EBEL<sup>14)</sup> mit quantitativer Phosphatbestimmung der ausgeschnittenen Flecke ergab, dass ca. 70% des Materials aus höheren Polymeren (DP > 10) besteht. Der Rest besteht aus Orthophosphat, Triphosphat und anderen linearen Oligophosphaten. Sehr ähnlich zusammengesetzte Polyphosphorsäuren werden auch von anderen Firmen in den Handel gebracht.

Zur Untersuchung des Einflusses des Polymerisationsgrades auf die Fällwirkung stellten wir uns selber ein hochmolekulares Na-Polyphosphat her, indem wir  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  2 Std. auf ca.

<sup>6)</sup> H. C. ISLIKER, *Helv.* **40**, 1628 (1957).

<sup>7)</sup> a) P. BERNFELD, V. M. DONAHUE & M. E. BERKOWITZ, *J. biol. Chemistry* **226**, 51 (1957); b) M. BURSTEIN & J. SAMAILLE, *J. Physiol.* **49**, 83 (1957); c) J. L. ONCLEY, K. W. WALTON & D. G. CORNWELL, *J. Amer. chem. Soc.* **79**, 4666 (1957).

<sup>8)</sup> T. ASTRUP, A. BIRCH-ANDERSON & K. SCHILLING, *Acta chem. scand.* **8**, 901 (1954).

<sup>9)</sup> a) L. RANE & L. R. NEWHOUSER, *US Armed Forces Med. J.* **5**, 368 (1954); b) *idem*, *US Patent* 2726235 (Dec. 6, 1955).

<sup>10)</sup> Die hier mitgeteilten Ergebnisse stellen einen Teil der Dissertation (Bern 1959) von E. RICKLI dar: Über die Fraktionierung von humanen Plasmaproteinen mit Polyphosphat.

<sup>11)</sup> Hs. NITSCHMANN, E. RICKLI & P. KISTLER, *Vox Sanguinis* (in Vorbereitung).

<sup>12)</sup> Was die Nomenklatur der kondensierten Phosphate anbelangt, so halten wir uns an die Vorschläge von E. THILO (siehe «Kondensierte Phosphate in Lebensmitteln», Symposium, Mainz 1957, Springer Verlag, p. 5). Danach wird die alte Bezeichnung Metaphosphat nur noch für die cyclischen Phosphate verwendet, während die linearen Kondensate Polyphosphate genannt werden.

<sup>13)</sup> O. SAMUELSON, *Svensk kemisk Tidskrift* **56**, 343 (1944).

<sup>14)</sup> J. P. EBEL, *Bull. Soc. chim. France* **10**, 991 (1953).

800° erhitzten und dann 15 Std. bei ca. 600° temperierten. Dieses Präparat zeigte einen mittleren Polymerisationsgrad von 100. Durch saure Hydrolyse in der Wärme wurden dann vier Präparate mit folgenden mittleren DP erhalten: 100, 66, 47, 34. Die Prozentanteile der Moleküle mit  $DP > 10$  betragen: 65, 65, 62, 58.

Präparate von Na-Triphosphat und Na-Trimetaphosphat wurden uns freundlicherweise durch Dr. H. MATTENHEIMER, Physiologisch-Chemisches Institut der Freien Universität Berlin, zur Verfügung gestellt. Das erstere erwies sich papierchromatographisch als rein, während das letztere durch etwas Polyphosphat verunreinigt war. Die Reinigung gelang durch Ausfällen des Polyphosphates mit  $Ba^{++}$  und Austausch des überschüssigen  $Ba^{++}$  gegen  $Na^{+}$  mit Amberlite JR-120. Ein Präparat von reinem Na-Tetrametaphosphat stellten wir uns nach BELL<sup>15)</sup> aus Phosphor-pentoxyd her.

*Verwendete Proteine.* Alle Proteine waren humanen Ursprungs; Serumalbumin und  $\gamma$ -Globulin waren nach NITSCHMANN, KISTLER & LERGIER<sup>16)</sup> im Zentrallaboratorium des Blutspendendienstes des Schweiz. Roten Kreuzes hergestellt worden. Das Albumin war papierelektrophoretisch praktisch rein, während das  $\gamma$ -Globulin nur etwa 94-proz. war. Die Begleitproteine wurden nach HOREJSI & SMETANA<sup>17)</sup> mit Rivanol (2-Äthoxy-6,9-diaminoacridinlactat) gefällt. Aus dem mit Aktivkohle von Rivanol befreiten Filtrat wurde das  $\gamma$ -Globulin mit 25% Alkohol gefällt. Das Präparat ergab nun in der Papierelektrophorese nur noch eine Bande.

Fibrinogen wurde nach BLOMBÄCK & BLOMBÄCK<sup>18)</sup> gewonnen. Das Präparat war zu 97% mit Thrombin gerinnbar.

Das  $\beta_1$ -Globulin (metallbindendes Globulin, Siderophilin) war ein reines, nach INMAN<sup>19)</sup> hergestelltes, Fe-freies Präparat, das uns freundlicherweise von Dr. R. B. PENNELL, Protein Foundation Laboratory, Jamaica Plain, Mass., USA, überlassen wurde.

Das verwendete Plasma war wie üblich mit Citrat und Glucose stabilisiert. Es wurde vom Zentrallaboratorium des Blutspendendienstes des Schweizerischen Roten Kreuzes zur Verfügung gestellt. Mit Komplexon stabilisiertes Plasma verhielt sich gleich.

*Ausführung der Löslichkeitsbestimmungen.* Die Löslichkeit der Proteine in Gegenwart von Polyphosphat wurde in Reihenversuchen bestimmt, wobei in den Ansätzen einer Reihe nur eine bestimmte Bedingung, z. B. das pH, systematisch variiert wurde. Die Mischungen wurden in Zentrifugengläsern hergestellt durch rasches Vermischen der abgemessenen Proteinlösung und einer Mischung, enthaltend das erforderliche Volumen einer 10-proz. Lösung von Polyphosphorsäure und/oder Na-Polyphosphat, eine berechnete Menge NaCl-Lösung zum Einstellen der gewünschten Ionenstärke und das nötige Volumen  $H_2O$  zum Auffüllen auf ein konstantes Endvolumen (gewöhnlich 6,2 ml). Die verschlossenen Zentrifugengläser wurden schräg auf einer Rollmaschine montiert und zur Gleichgewichtseinstellung über Nacht in einem thermokonstanten Raum langsam gerollt. Die Gläser wurden dann bei der gleichen Temperatur zentrifugiert, bis das Überstehende klar abgossen werden konnte. In der Lösung wurde nun das pH gemessen und der N-Gehalt nach KJELDAHL bestimmt. Gesamt-Phosphor-Bestimmungen in den Fraktionen wurden nach BERENBLUM & CHAIN<sup>20)</sup> ausgeführt.

## II. Ergebnisse

1. *Beeinflussung der Löslichkeit des Albumins durch Polyphosphat.* – a) *Einfluss von pH und Ionenstärke.* Aus den drei Kurven der Fig. 1 lässt sich ersehen, dass die Löslichkeit des Albumins in Gegenwart von überschüssigem Polyphosphat mittleren Polymerisationsgrades eine sehr ausgeprägte pH-Abhängigkeit zeigt. Beim Senken des pH sinkt unterhalb pH 5,5 plötzlich in einem engen pH-Intervall von

<sup>15)</sup> R. N. BELL, Ind. Eng. Chemistry **44**, 568 (1952).

<sup>16)</sup> Hs. NITSCHMANN, P. KISTLER & W. LERGIER, Helv. **37**, 866 (1954).

<sup>17)</sup> J. HOREJSI & R. SMETANA, Acta med. scand. **155**, 65 (1956).

<sup>18)</sup> B. BLOMBÄCK & M. BLOMBÄCK, Arkiv för Kemi **10**, 415 (1957).

<sup>19)</sup> J. K. INMAN, 10th Conf. on Plasma Proteins and Cellular Elements of the Blood, 1956 (Protein Foundation, Cambridge, Mass.).

<sup>20)</sup> J. BERENBLUM & E. CHAIN, Biochem. J. **32**, 286, 295 (1938).

ca. 0,7 Einheiten die Löslichkeit auf praktisch Null. Steigende Ionenstärke verschiebt das Fällungs-pH-Intervall nach etwas tieferen Werten, d. h. im kritischen Gebiet wird die Löslichkeit des Albumin-Polyphosphat-Komplexes durch Salz erhöht. Ein Wieder-in-Lösung-Gehen des Albumins bei weiterem Senken des pH (bis 2) wird bei dieser Menge Polyphosphat nicht beobachtet.

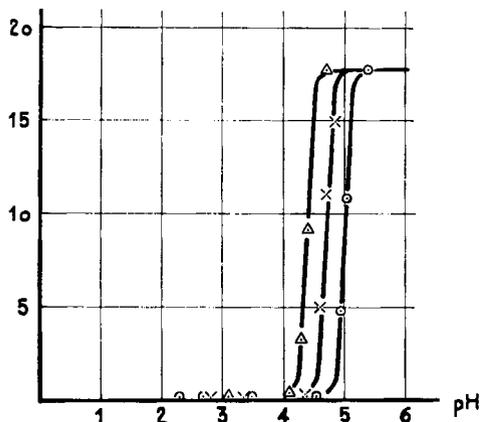


Fig. 1. Löslichkeit des Serumalbumins in Gegenwart von Polyphosphat ( $DP = 15$ ) in Abhängigkeit vom pH für drei Ionenstärken (○: 0,033; ×: 0,100; △: 0,200)

Proteinkonzentration: 18 mg/ml;  $(HPO_3)_n$ -Konzentration: 7,2 mg/ml; Temperatur: 20°  
Ordinate (auch in allen folgenden Figuren): mg Protein gelöst pro ml

b) *Einfluss der Temperatur.* Die pH-Abhängigkeitskurve der Löslichkeit des Albumins bei Ionenstärke 0,2 wurde genau unter den Bedingungen der vorhergehenden Versuchsreihe (Fig. 1) nochmals aufgenommen, und zwar einmal bei 20° und einmal bei 0°. Signifikante Unterschiede wurden nicht gefunden, so dass der Temperatureinfluss in diesem Intervall praktisch vernachlässigt werden kann.

c) *Einfluss der Menge des Fällungsmittels.* Der Abfall aller 4 Kurven der Fig. 2 beginnt ungefähr bei pH 4,6. Die Steilheit des Abfalles mit dem pH ist um so grösser, je grösser die Polyphosphatkonzentration. Unterschreitet die Polyphosphatkonzentration 2 mg/ml (bei einer Albuminkonzentration von 18 mg), so wird das Albumin nicht mehr vollständig ausgefällt und die Löslichkeit steigt bei weiterer pH-Senkung sogar wieder an. Das Löslichkeitsminimum zeigt um so höhere Werte und liegt bei um so höherem pH, je geringer die Polyphosphatkonzentration ist. Die pH der Minima dürften den isoelektrischen Punkten der Albumin-Polyphosphat-Komplexe entsprechen, deren Existenz aus noch zu beschreibenden Versuchen evident geworden ist.

d) *Einfluss des Polymerisationsgrades des Polyphosphates auf sein Fällungsvermögen.* In Fig. 3 sind die Löslichkeits-Kurven des Albumins mit 5 verschiedenen hochpolymeren Polyphosphaten bei sonst identischen Bedingungen wiedergegeben. Es wurde absichtlich eine zur vollständigen Fällung ungenügende Menge Polyphosphat zugesetzt in der Meinung, dass dabei allfällige Unterschiede im Fällungsvermögen deutlicher hervortreten würden. Die Kurven und insbesondere die Löslichkeitsminima liegen so nahe beieinander, dass von einem signifikanten Unterschied nicht gesprochen werden kann, besonders wenn man bedenkt, dass die Zusätze so dosiert worden sind, dass überall gleichviel Polyphosphat von einem DP über 10 vorhanden war. Die nicht

mitgerechneten niedermolekularen Anteile dürften bei der Fällung aber doch auch noch etwas mitgewirkt haben. Der Durchschnittspolymerisationsgrad des Polyphosphates ist also zwischen 15 und 100 praktisch ohne Einfluss auf das Fällungsvermögen. Diese hier für das Serumalbumin gemachte Feststellung dürfte allgemeinere Gültigkeit haben, hat doch ISLIKER<sup>6)</sup> für das System  $\gamma$ -Globulin/Polystyrol-

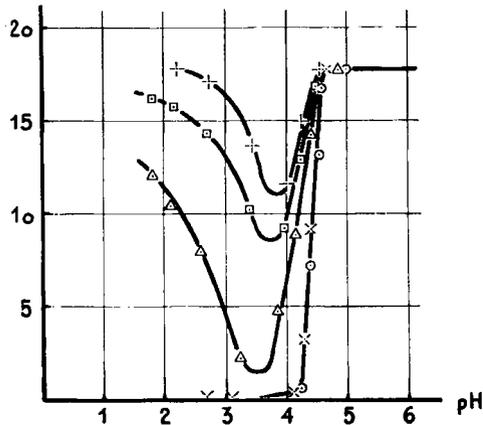


Fig. 2. Löslichkeit des Serumalbumins in Abhängigkeit vom pH bei verschiedenen Konzentrationen (angegeben in mg  $(\text{HPO}_3)_n/\text{ml}$ ) an Polyphosphat ( $DP = 15$ )

○ : 6,5; × : 3,2; △ : 1,6; □ : 1,1; + : 0,08  
Proteinkonzentration: 18 mg/ml. Ionenstärke: 0,2, Temp. 20°

sulfonat genau dieselben Verhältnisse gefunden. Die Fällwirkung hängt also nicht von der Grösse der Polyphosphat-Anionen, sondern nur von der Anzahl der total zugesetzten Säure-Äquivalente ab. Erst wenn man zu den niederen Oligophosphaten übergeht, treten strukturell bedingte Unterschiede zutage.

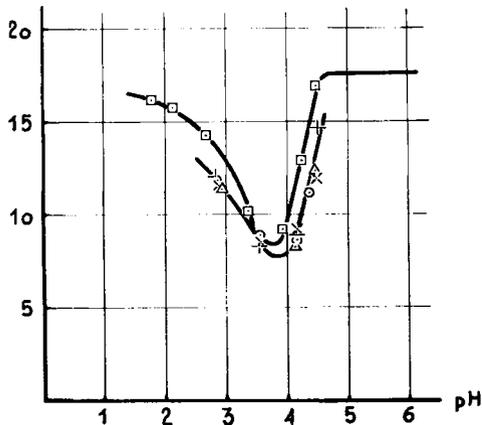


Fig. 3. Löslichkeit des Serumalbumins in Abhängigkeit vom pH in Gegenwart von Polyphosphat verschiedenen Polymerisationsgrades

Protein: 18 mg/ml. Polyphosphat (Anteil mit  $DP > 10$ ): 0,75 mg/ml. Ionenstärke: 0,2, Temp. 20°.  
DP des Polyphosphates: ○ : 100; × : 66; + : 46; △ : 33; □ : 15

c) *Einfluss der Konstitution auf das Fällungsvermögen bei niederen Oligophosphaten.* In Fig. 4 sind die Albumin-Löslichkeitskurven für drei reine Oligophosphate eingezeichnet, zusammen mit der schon in Fig. 2 gegebenen Kurve für Polyphosphat vom DP = 15. Die übrigen Bedingungen sind gleich oder mindestens vergleichbar. Die Phosphatmenge ist so dosiert, dass sie beim Polyphosphat für eine quantitative Ausfällung des Albumins ausreicht. Gleichviel des cyclischen Tetrametaphosphates ermöglicht ebenfalls noch eine vollständige Ausfällung, doch erfolgt der Löslichkeitsabfall bei einem etwas tieferen pH und ist auch weniger steil als bei Polyphosphat. Bei den beiden Triphosphaten ist eine weitere Differenzierung in der Wirkung zu finden. Der Löslichkeitsabfall setzt bei beiden bei einem noch etwas tieferen pH ( $\sim 4,0$ ) ein. Mit Triphosphat geht die Löslichkeitskurve durch ein Minimum, das bei pH ca. 3 liegt, während mit dem cyclischen Trimetaphosphat die Albuminlöslichkeit zwar nicht wie mit Polyphosphat auf Null abfällt, aber mit sinkendem pH auch nicht wieder ansteigt. Hier handelt es sich sicher um einen strukturbedingten Unterschied, denn im Versuch mit Trimetaphosphat sind sogar weniger Säureäquivalente zugefügt worden als in dem mit Triphosphat (nur 5,2 mg/ml statt 6,5). Ausserdem ist die cyclische Molekel 3-basisch, die offene aber 5-basisch.

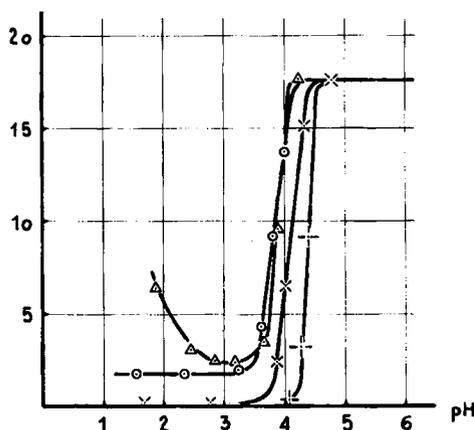


Fig. 4. Löslichkeit des Serumalbumins in Abhängigkeit des pH in Gegenwart verschiedener kondensierter Phosphate

○: Triphosphat, △: Trimetaphosphat, ×: Tetrametaphosphat, ⊕: Polyphosphat (DP = 15). Proteinkonzentration: 18 mg/ml. Phosphatkonzentration: 6,5 mg/ml (nur bei Trimetaphosphat: 5,2 mg/ml). Ionenstärke 0,2. Temp. 20°

2. *Beeinflussung der Löslichkeit des  $\gamma$ -Globulins durch Polyphosphat.* – a) *Einfluss von pH und Ionenstärke.* Fig. 5 zeigt, dass sich das  $\gamma$ -Globulin in Gegenwart von überschüssigem Fällungsmittel sehr ähnlich wie das Albumin verhält. Bei pH-Senkung wird auch hier plötzlich ein rapider Löslichkeitsabfall beobachtet. In einem Intervall von 0,6–0,7 pH-Einheiten fällt die Löslichkeit auf praktisch Null ab. Der löslichkeitserhöhende Einfluss der Ionenstärke ist in gleicher Weise vorhanden, ist aber im Fällungsintervall bedeutend stärker als beim Albumin. Das wirkt sich so aus, dass bei Ionenstärke 0,04 das  $\gamma$ -Globulin bei einem höheren pH ausfällt als das Albumin, während es bei Ionenstärke 0,2 umgekehrt ist.

b) *Einfluss der Temperatur.* Senkung der Temperatur von 20° auf 0° hat auch beim  $\gamma$ -Globulin nur sehr geringen Einfluss auf den Kurvenverlauf; die Form bleibt gleich, der Kurvenabfall liegt bei einem nur ca. 0,1 Einheiten höheren pH.

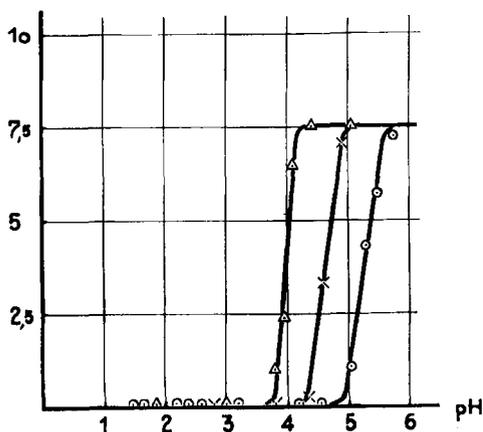


Fig. 5. Löslichkeit von  $\gamma$ -Globulin in Gegenwart von Polyphosphat ( $DP = 15$ ) in Abhängigkeit vom pH für drei Ionenstärken ( $\circ$ : 0,04;  $\times$ : 0,1;  $\triangle$ : 0,2)  
Proteinkonzentration: 7,5 mg/ml. Polyphosphatkonzentration: 6,5 mg/ml. Temp.: 20°

c) *Einfluss der Menge des Fällungsmittels.* Die Kurvenschar der Fig. 6 gibt ein wesentlich anderes Bild als die entsprechende für Albumin in Fig. 2. Auch bei Polyphosphatunterschuss zeigen die Löslichkeitskurven kein Minimum. Der Abfall der Kurve wird mit sinkender Polyphosphatmenge nur weniger steil und verschiebt sich nach tieferen pH. Die Verhältnisse sind auch anders als bei der Verwendung von Polystyrolsulfonat als Fällungsmittel, für welches ISLIKER<sup>6)</sup> gefunden hat, dass sein Komplex mit  $\gamma$ -Globulin bei pH unter 3 wieder sehr leicht löslich ist.

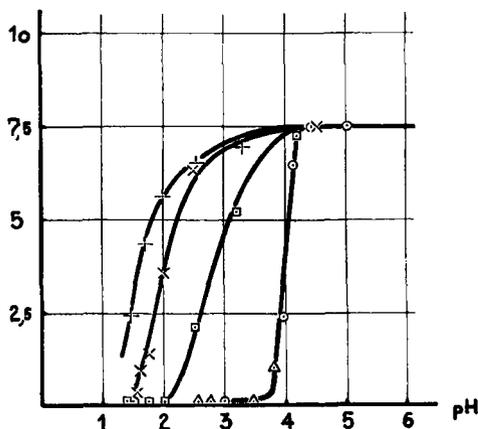


Fig. 6. Löslichkeit des  $\gamma$ -Globulins in Abhängigkeit vom pH bei verschiedenen Konzentrationen (angegeben in mg  $(HPO_3)_n/ml$ ) an Polyphosphat ( $DP = 15$ )  
 $\circ$ : 6,5;  $\triangle$ : 3,2;  $\square$ : 0,5;  $\times$ : 0,4;  $+$ : 0,3  
Proteinkonzentration: 7,5 mg/ml. Ionenstärke: 0,2. Temp. 20°

3. *Beeinflussung der Löslichkeit des Fibrinogens durch Polyphosphat.* Über die Verhältnisse beim Fibrinogen gibt Fig. 7 Aufschluss. Fibrinogen lässt sich auch durch blosses Ansäuern praktisch quantitativ ausfällen, wenn bei Ionenstärke 0,2 das pH auf 4,75 oder darunter gesenkt wird. Bei Gegenwart von Polyphosphat erfolgt die Fällung je nach zugesetzter Menge schon bei pH zwischen 5,5 und 5,0. Dass die Verhältnisse nicht einfach sind, zeigt die Tatsache, dass sich die Kurven für 0,1 mg  $(\text{HPO}_3)_n$  und für 6,5 mg schneiden. Die Niederschläge gehen bei weiterer pH-Senkung nicht wieder in Lösung.

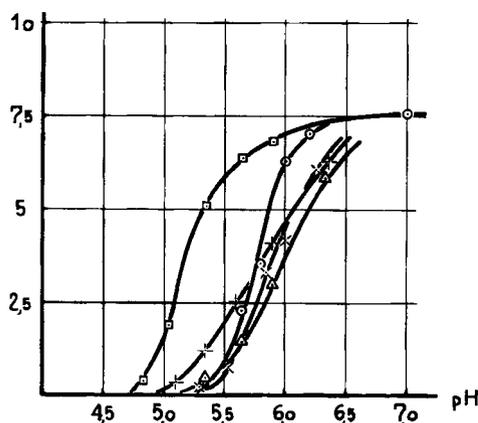


Fig. 7. Löslichkeit des Fibrinogens in Abhängigkeit vom pH bei verschiedenen Konzentrationen (angegeben in mg  $(\text{HPO}_3)_n/\text{ml}$ ) von Polyphosphat (DP = 15):

○: 6,5; ×: 0,4; △: 0,2; +: 0,1; □: 0

Proteinkonzentration: 7,5 mg/ml. Ionenstärke: 0,2. Temp. 20°

4. *Fraktionierungsversuche an Albumin- $\gamma$ -Globulin-Mischungen.* Bei Betrachtung der Fig. 8 zeigt sich, dass die Steilstufen des Löslichkeitsabfalles von Albumin,  $\gamma$ -Globulin und Fibrinogen auf der pH-Skala weit genug gegeneinander verschoben sind, um durch richtige pH-Wahl die Auftrennung einer Mischung dieser Proteine zu ermöglichen. Das  $\beta_1$ -Globulin vom Albumin zu trennen, scheint dagegen unmöglich. Um abzuklären, ob die Trennung der besonders wichtigen Plasmakomponenten Albumin und  $\gamma$ -Globulin nicht durch gegenseitige Wechselwirkungen behindert wird, haben wir zunächst bei 4 pH zwischen 4,46 und 4,13 Fraktionierungsversuche an einer Mischung der beiden reinen Proteine vorgenommen, deren Konzentrationsverhältnis ungefähr demjenigen im Plasma entsprach (Alb.:  $\gamma$ -Globulin = 4:1) (s. Tab. 1).

Je 5 ml der 5-proz. Proteinmischung wurden bei 20° mit 0,4 ml 10-proz. Polyphosphorsäure (DP = 15) versetzt. Sofortige Einstellung des gewünschten pH. Ionenstärke: 0,2. Nach Äquilibrierung über Nacht wurde zentrifugiert und im Überstehenden der N-Gehalt bestimmt. Zur papierelektrophoretischen Analyse wurden die Niederschläge nicht ausgewaschen. Auswertung der Elektropherogramme mit der Elutionsmethode.

Die beiden Proteine beeinflussen sich in ihrer Fällbarkeit nicht merklich. Bei pH > 4,27 findet sich nur Albumin im Niederschlag; der geringe  $\gamma$ -Globulingehalt der Niederschläge ist, wie wir uns überzeugt haben, auf die nicht entfernte Mutterlauge zurückzuführen. Bei pH 4,13 wird bereits etwas  $\gamma$ -Globulin mitgefällt, aber

dafür findet sich das Albumin quantitativ im Niederschlag. Das pH für einen optimalen Trenneffekt liegt also, wie zu erwarten war, um 4,2 herum. Es muss sehr genau eingestellt werden, denn schon einige Hundertstel Einheiten beeinflussen das Ergebnis merklich.

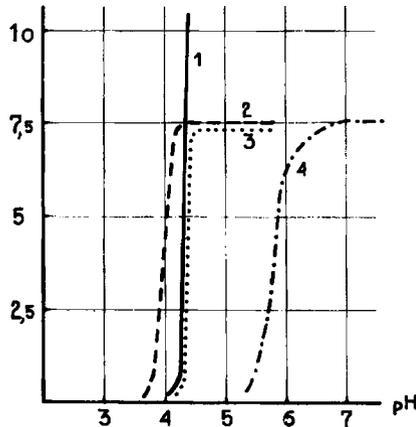


Fig. 8. Löslichkeit von Albumin (1),  $\gamma$ -Globulin (2), metallbindendem  $\beta_1$ -Globulin (3) und Fibrinogen (4) in Abhängigkeit vom pH bei Gegenwart von 0,5 mg/ml. Polyphosphat (DP = 15) Ionenstärke: 0,2. Temperatur: 20°

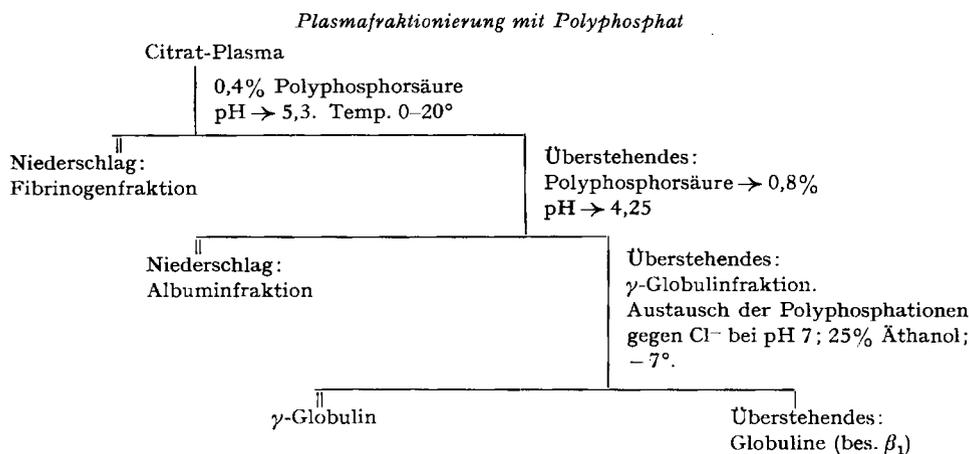
Tabelle 1. Fraktionierung eines Albumin- $\gamma$ -Globulin-Gemisches mit Polyphosphat bei verschiedenen pH

Fällungs- pH	Protein total gefällt in %	Niederschlag enthält		Überstehendes enthält mg (%)	
		mg Alb.	mg $\gamma$ -Glob.	mg Alb.	mg $\gamma$ -Glob.
4,46	25	62	4	144 (78)	41 ( 22)
4,38	54	129	5	71 (61)	45 ( 39)
4,27	73	179	9	25 (38)	42 ( 62)
4,13	86	199	17	0 (0)	34 (100)

5. *Fraktionierungsversuche an Plasma.* Aus den bisher mitgeteilten Resultaten geht hervor, dass durch schrittweises Senken des pH in einem genügend Polyphosphat-Ionen enthaltenden Plasma eine Zerlegung in Fraktionen von sehr unterschiedlicher Zusammensetzung möglich ist. Die Reihenfolge, in der die Proteine ausfallen, ist – wie für Albumin und  $\gamma$ -Globulin gezeigt wurde – abhängig von der Ionenstärke. Im wie üblich gewonnenen Citratplasma beträgt letztere ca. 0,15 bis 0,2, so dass – falls nicht stark verdünnt wird – das Albumin vor dem  $\gamma$ -Globulin ausfallen muss.

Folgendes einfaches Fraktionierschema zeigt, wie das Plasma in drei Fraktionen zerlegt werden kann, von denen jede eines der drei klinisch besonders wichtigen Proteine: Fibrinogen, Albumin,  $\gamma$ -Globulin, in optimaler Ausbeute enthält. Die übrigen Globuline verteilen sich auf die drei Fraktionen. Die weitere Aufteilung

zwecks Reinigung der Hauptkomponenten haben wir in diesem Schema nur für die  $\gamma$ -Globulinfraction einbezogen. Grundsätzlich können für die Unterfraktionierung beliebige Methoden herangezogen werden. Für das  $\gamma$ -Globulin bevorzugen wir die Fällung durch Zusatz von 25% Äthanol bei pH 7 und  $-7^\circ$ , ein Schritt, der dem bekannten COHN'schen Plasmafraktionierungsverfahren (Methoden 6 und 9) entnommen ist. Das  $\gamma$ -Globulin lässt sich auch durch einen nochmaligen Zusatz von 0,4% Polyphosphorsäure und Senkung des pH auf 3,2 ausfällen, doch ist das so gewonnene Präparat weniger rein als das mit Alkohol gefällte.



Die mit Polyphosphat ausgefällten Fraktionen enthalten beträchtliche Mengen dieses Anions. Auch das Überstehende von der Albuminfällung enthält noch viel Polyphosphat, von dem ein Teil in den mit Alkohol erzeugten  $\gamma$ -Globulin-Niederschlag eingehen würde. Will man die Fraktionen vom Fällungsmittel Polyphosphat befreien – für Präparate zur klinischen Verwendung ist das absolut notwendig – so bedient man sich am besten geeigneter Ionenaustauscher. Wegen der Grösse der auszutauschenden Anionen müssen die Austauscher genügend weitmaschig sein, um das Eindiffundieren der grossen Ionen in die Körner zu ermöglichen. Nach unsern Erfahrungen eignet sich Duolite A-102<sup>21)</sup> besonders gut<sup>22)</sup>. Der Austausch des Polyphosphates z. B. gegen Chlorid gelingt mit diesem Harz unter Ausnützung seiner vollen Bindungskapazität und ohne wesentlichen Proteinverlust.

Über die Zusammensetzung der drei nach dem erwähnten Schema erhaltenen Fraktionen gibt Tabelle 2 Auskunft. Die Zahlen basieren auf TISELIUS-Elektrophorese-Diagrammen und betreffen einen Versuch mit 200 g Plasmaprotein.

Zusätzliche Daten über die Zusammensetzung der Fraktionen haben Mikro-Immunelektrophoresen nach SCHEIDEGGER<sup>23)</sup> ergeben<sup>24)</sup>. Im Rohalbumin lassen

<sup>21)</sup> Produkt der CHEMICAL PROCESS COMPANY, Redwood City, Cal., USA.

<sup>22)</sup> Auf die technischen Details der Polyphosphatelimination mit Hilfe von Ionenaustauschern wird in der in Vorbereitung befindlichen Publikation<sup>11)</sup> eingegangen.

<sup>23)</sup> J. J. SCHEIDEGGER, Intern. Arch. Allergy appl. Immunol. 7, 103 (1955).

<sup>24)</sup> Die Ausführung der Immunelektrophoresen verdanken wir Herrn Dr. R. BÜTLER, Zentrallaboratorium des Blutspendedienstes des Schweizerischen Roten Kreuzes in Bern.

sich noch  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ -, metallbindendes  $\beta_1$ -Globulin und  $\gamma$ -Globulin erkennen; im alkoholgefällten  $\gamma$ -Globulin, die Globuline  $\alpha_2$ ,  $\alpha_{2M}$ ,  $\beta_{2A}$  und  $\beta_{2M}$ ; im Roh- $\gamma$ -Globulin noch metallbindendes  $\beta_1$ -Globulin.

Tabelle 2. Zusammensetzung der Fraktionen aus 200 g Plasmaprotein

Fraktion	Proteinart	Absolute Menge in g	Relative Verteilung in %	Ausbeute in %
Plasma	Albumin	110	55	
	$\alpha_1$ -Glob.	12	6	
	$\alpha_2$ -Glob.	18	9	
	$\beta$ -Glob.	30	15	
	$\gamma$ -Glob.	22	11	
	Fibrinogen	10	5	
Fibrinogen (roh)	Albumin		22	ca. 100
	Globuline ( $\alpha_1$ , $\alpha_2$ , $\beta$ )		34	
	Fibrinogen		44	
Albumin (roh)	Albumin	113	70	ca. 100
	$\alpha$ -Glob.	26	16	
	$\beta$ -Glob.	15	9	
	$\gamma$ -Glob.	6	4	
$\gamma$ -Globulin (mit Alkohol gefällt)	$\alpha_2$ -Glob.	1,4	8	74
	$\gamma$ -Glob.	16,2	92	

6. *Untersuchungen an den Fraktionen.* Bei der Anwendung eines neuen Fällungsmittels für Proteine stellt sich stets die Frage, ob es die native Struktur und die spezifischen Eigenschaften der Proteine unverändert lässt.

a) Die *Fibrinogenfraktion*, bereitet aus frischem Plasma, ist ohne besondere Schwierigkeiten und restlos löslich, wenn das Lösen in Citratpuffer bei pH 7 sofort nach der Fällung vorgenommen wird. Vom gesamten Protein dieser Fraktion (nicht ausgewaschen) sind 40–50% mit Thrombin gerinnbar<sup>25</sup>). Das ist der Prozentsatz, der auch für die Fraktion I der COHN'schen Methode gefunden wird. Längeres Liegenlassen des Fibrinogen-Polyphosphat-Niederschlags bei pH 5,3 beeinträchtigt die Ausbeute an löslichem und gerinnbarem Fibrinogen. Dabei handelt es sich aber nicht um eine schädigende Wirkung des Polyphosphates, denn die Fibrinogenverluste beim Lagern von Niederschlägen erzeugt bei pH 5,3, aber ohne Polyphosphat, sind sogar noch grösser.

Fibrinogen, gewonnen aus Trockenplasmakonserven, ist nur unvollständig löslich und stark durch denaturierte Lipoproteine verunreinigt, doch liegt das nicht an der Fraktioniermethode, sondern am Ausgangsmaterial.

<sup>25</sup>) Die Gerinnungszeiten von Fibrinogenlösungen mit Thrombin werden durch die Anwesenheit von Polyphosphat wesentlich verlängert. Der Effekt wird durch Zusatz von Calcium, das mit dem Polyphosphat lösliche Komplexe bildet, aufgehoben.

b) Da bekannt ist, dass das *Serumalbumin* gegen stärker saure pH empfindlich ist<sup>26)</sup>, haben wir seiner Prüfung besondere Aufmerksamkeit geschenkt.

Die mit Polyphosphat gefällte Albuminfraktion wurde bei pH 7 in Lösung gebracht und mit Duolite A-102 (Cl-beladen) vom Polyphosphat befreit. Im Sedimentationsdiagramm dieses Präparates erschien die Albuminspitze mit ihrer normalen Sedimentationskonstante ( $S_{20} = 4,15 \cdot 10^{-13}$ ). Das elektrophoretische und immunoelektrophoretische Verhalten lässt ebenfalls nichts abnormes erkennen.

Empfindliche Tests für Denaturierung sind die Messung der spezifischen Drehung des polarisierten Lichtes und der Abbaugeschwindigkeit durch proteolytische Fermente.

Eine 2-proz. Lösung von reinem, mit der Alkohol-Fraktionierungsmethode gewonnenen Albumin wurde bei pH 7 mit 0,4% Polyphosphat versetzt. Diese Lösung ergab ein  $[\alpha]_D^{20}$  von  $-56,0^\circ$ . Das pH wurde dann für 2 Std. auf 4,25 gesenkt. Nach Rückneutralisation auf pH 7 wurde  $[\alpha]_D^{20}$  zu  $-55,3^\circ$  bestimmt. Derselbe Versuch, aber mit pH-Senkung auf 3,5 ergab ebenfalls  $-55,3^\circ$ . Die kleinen Differenzen von ca. 1% liegen innerhalb der Fehlergrenze. Sogar bei pH 3,5 erleidet also Serumalbumin in Gegenwart von Polyphosphat innerhalb 2 Std. keine Veränderung, die durch die optische Drehung erfassbar wäre.

Die proteolytische Abbaugeschwindigkeit durch Chymotrypsin bei pH 8 und  $37^\circ$  wurde durch titrimetrische Erfassung der freigesetzten Protonen nach WALEY & WATSON<sup>27)</sup> und nach LABEYRIE<sup>28)</sup> gemessen. Es wurden zwei Albumin-Präparate verglichen, die aus dem gleichen Plasma stammen. Beide waren nach NITSCHMANN, KISTLER & LERGIER<sup>18)</sup> hergestellt worden, das eine direkt aus dem Plasma, das andere aus dem mit Polyphosphat gefällten und dann dem Ionenaustausch unterworfenen Rohalbumin. Die Abbaugeschwindigkeit war bei beiden Präparaten innerhalb der Fehlergrenze gleich<sup>29)</sup>.

Nach diesen Ergebnissen darf angenommen werden, dass das Polyphosphatverfahren ein vollständig natives Albumin liefert.

c) Das nach dem Schema der Fig. 9 mit Alkohol gefällte  $\gamma$ -Globulin verhielt sich in der Ultrazentrifuge normal, indem 96% mit  $S_{20}$  ca.  $7 \cdot 10^{-13}$  und 4% mit  $S_{20}$  ca.  $17 \cdot 10^{-13}$  sedimentierten. Umfassende Bestimmungen von Antikörpertitern, auf die es beim  $\gamma$ -Globulin natürlich besonders ankommt, stehen noch aus. Es ist aber bekannt, dass die Antikörper auch gegen recht saure pH (bis 3) resistent sind<sup>30)</sup>. Isoagglutinin-Titerbestimmungen an einem Polyphosphat- $\gamma$ -Globulin haben denn auch Werte ergeben, die durchaus im gewohnten Rahmen liegen. Man darf also annehmen, dass auch das  $\gamma$ -Globulin in unserem Verfahren im nativen Zustand anfällt.

### III. Diskussion

Während Polyphosphat-Anionen die Löslichkeit von Proteinen bei pH, die in der Nähe des isoelektrischen Punktes dieser Proteine oder darüber liegen, nicht wesentlich beeinträchtigen, bewirken sie eine sehr starke Verminderung der Löslichkeit im sauren Gebiet. Bei Überschuss von Polyphosphat finden sich die Plasmaproteine unterhalb pH 3 praktisch vollständig im Niederschlag, ausgenommen vielleicht gewisse saure Glykoproteine. Das pH-Übergangsgebiet (Fällungsintervall) umfasst meist weniger als eine pH-Einheit. Die pH, die zur vollständigen Ausfällung erforderlich sind, sind für die Plasmaproteine mehr oder weniger voneinander verschieden. Die Reihenfolge, in der die Proteine beim Senken des pH ausfallen, entspricht nicht

<sup>26)</sup> K. AOKI & J. P. FOSTER, J. Amer. chem. Soc. **78**, 3538 (1956).

<sup>27)</sup> S. G. WALEY & J. WATSON, Biochem. J. **55**, 328 (1953).

<sup>28)</sup> F. LABEYRIE, Bull. Soc. Chim. biol. **38**, 1271 (1956).

<sup>29)</sup> Für Einzelheiten wird auf die Dissertation von E. RICKLI<sup>18)</sup> verwiesen.

<sup>30)</sup> Ihre Funktionen (Antikörper-Titer) können sie sogar nach partiellem proteolytischem Abbau beibehalten.

einfach ihren isoelektrischen Punkten; sie ist noch von anderen Faktoren, besonders von der Ionenstärke abhängig. Man würde erwarten, dass aus einer Polyphosphat-haltigen Mischung von Albumin und  $\gamma$ -Globulin bei sinkendem pH zuerst das basischere der beiden Proteine, nämlich das  $\gamma$ -Globulin, ausfällt, da es vor dem Albumin in den kationischen Zustand übergeht. Diese Erwartung wird aber nur bei sehr kleiner Ionenstärke erfüllt. Liegt die Ionenstärke in der Nähe derjenigen des Plasmas, so kehrt sich die Reihenfolge um: Albumin fällt vor dem  $\gamma$ -Globulin aus. Eine begründete Erklärung kann für diese Erscheinungen vorerst nicht gegeben werden.

Die Proteine unterscheiden sich voneinander auch noch dadurch, dass ihre Löslichkeit in Gegenwart von wenig Polyphosphat bei noch weiterem Senken des pH wieder ansteigt (Albumin) oder auch nicht ( $\gamma$ -Globulin).

Die Tatsache, dass die fällende Wirkung des Polyphosphates nur im sauren Gebiet in Erscheinung tritt, lässt schliessen, dass es sich dabei um Wechselwirkungen zwischen den durch Protonenaufnahme positiv geladenen basischen Gruppen des Proteins und den negativen Polyphosphat-Ionen handelt. Die Grösse und damit die Zahl der Ladungen der fällenden Anionen haben auf die Wirkung an sich keinen Einfluss, es kommt nur auf die Zahl der zugesetzten Äquivalente an. Das gilt allerdings nur, solange der Polymerisationsgrad der Polyphosphat-Ionen nicht zu klein ist. Zwischen den niederen offenkettigen und cyclischen Oligophosphaten bestehen spezifische Unterschiede in der Löslichkeitsbeeinflussung der Proteine. Sie sind weniger wirksam als die Polyphosphate. Orthophosphat wirkt nicht fällend.

Ob schon in Lösung, d. h. über dem Fällungs-pH, Komplexe zwischen den Proteinmolekeln und den Polyphosphat-Anionen existieren, haben wir nicht untersucht. In den Proteinfällungen aber finden sich stets beträchtliche Mengen Polyphosphat gebunden. Die gebundene Menge lässt sich ermitteln aus dem gesamten Phosphatgehalt des feuchten Niederschlages, seinem Gehalt an Mutterlauge und dem Phosphatgehalt der Mutterlauge. Eine solche Analyse hat für den Roh-Albumin-Niederschlag (erhalten unter den im Schema angegebenen Bedingungen) folgendes ergeben: 1 g Albumin (roh, trocken) bindet 0,067 g  $(\text{HPO}_3)_n$  vom DP = 15, das heisst 1 Mol Albumin (MG = 65000) mit seinen 93 basischen Gruppen bindet 65 Polyphosphorsäureäquivalente. Unter Vernachlässigung der Tatsache, dass das Albumin nicht rein war, stellt man also fest, dass im Niederschlag ca.  $\frac{2}{3}$  der kationischen Gruppen des Proteins durch Polyphosphat abgesättigt sind.

Trotzdem die eiweissfällende Wirkung eine allgemeine Eigenschaft polyvalenter Säuren zu sein scheint, findet man doch grosse Unterschiede zwischen ihnen, wenn man den Einfluss auf die Löslichkeit der Proteine genauer untersucht. Polystyrol-sulfonat beispielsweise fällt  $\gamma$ -Globulin auch bei physiologischer Ionenstärke bei einem höheren pH als es Albumin fällt, womit es im Gegensatz zu Polyphosphat steht.

Die mit Polyphosphat erzeugten Niederschläge sind bei höherem pH (6 bis 8) wieder löslich und die Proteine erwiesen sich in diesen Lösungen – soweit bisher untersucht – als nativ. Auch längeres Liegenlassen der Niederschläge beeinträchtigt die Löslichkeit nicht<sup>31)</sup>. Hierin scheint die Polyphosphorsäure organischen polyvalenten Säuren überlegen zu sein. Jedenfalls hat ISLIKER<sup>6)</sup> festgestellt, dass mit

<sup>31)</sup> Eine Ausnahme macht der Fibrinogenniederschlag. Es ist aber bekannt, dass alle direkt aus Plasma gewonnenen Fibrinogenniederschläge beim Lagern eine Einbusse an löslichem Fibrinogen erleiden.

Polymethacryl- oder Polystyrolsulfonsäure gewonnene Albumin-Niederschläge rasch altern, so dass nicht mehr alles Protein in Lösung gebracht werden kann. Beim Polyphosphat wirkt sich wahrscheinlich das völlige Fehlen organischer Reste, die mit den an der Oberfläche der Proteinmolekel liegenden Kohlenwasserstoffresten der Aminosäuren in Wechselwirkung treten können, günstig aus. Die Kräfte, die zwischen den Polyphosphatanionen und den positiv geladenen Proteinmolekeln wirken, sind somit wohl rein elektrostatischer Natur, während bei den organischen Polysäuren noch VAN DER WAALS-Kräfte zwischen den hydrophoben Gruppen der beiden Komponenten dazukommen. Eine denaturierende Wirkung der Polyphosphat-Ionen ist schon deshalb nicht zu befürchten.

In den polyphosphathaltigen Proteinlösungen scheint ein sich rasch einstellendes, pH-abhängiges Dissoziationsgleichgewicht vorhanden zu sein, das es ohne weiteres ermöglicht, die Polyphosphat-Ionen mit geeigneten Ionenaustauschern durch andere Anionen, z. B. Cl, zu ersetzen.

Alle diese Umstände lassen die Polyphosphorsäure als ein Reagens erscheinen, das sich in vielen Fällen zur fraktionierten Fällung von Proteingemischen mit Vorteil wird einsetzen lassen.

#### SUMMARY

The influence of polyphosphate on the solubility of the more important human plasma proteins, namely albumin,  $\gamma$ -globulin, fibrinogen and metal binding  $\beta_1$ -globulin, is studied. Besides the polyphosphate concentration the two main factors which determine the solubilities are the ionic strength and the pH, especially the latter. The influence of the temperature is relatively small between 0 and 20° C. On lowering of the pH the solubility of the proteins drops within a narrow pH-range (0,5–1 unit) to practically zero. The precipitating activity of the linear polyphosphates is independent of the polymerisation degree if equivalent amounts are added. With the lowest oligophosphates however remarkable differences in their action were found. The pH necessary for the precipitation of the proteins in the presence of polyphosphate differs sufficiently from one protein to the other to render a fractionation of their mixture possible. Plasma may thus be divided into several fractions by lowering stepwise the pH after addition of a sufficient amount of polyphosphate.

A simple method is described by which three fractions are obtained containing mainly: (1) fibrinogen, (2) albumin and (3)  $\gamma$ -globulin, each of them in very good yield. The polyphosphate precipitates are readily soluble at neutral pH. It is shown that the above-mentioned proteins are recoverable in the native state. The elimination of the polyphosphate ions from the fractions is best achieved by low cross-linked anion exchangers.

Institut für organische Chemie und Theodor-Kocher-Institut  
der Universität Bern

---