

## 184. Die Fraktionierung von Serumproteinen mit flüssigen Phasenpaaren

2. Mitteilung<sup>1)</sup>

von P. v. TAVEL

(5. VI. 62)

### 1. Die Fraktionierung von Proteinen in zweiphasigen Systemen

Die multiplikative Gegenstromverteilung in flüssigen Phasenpaaren nach CRAIG<sup>2)</sup> ermöglicht nicht nur die Zerlegung von Proteingemischen, sondern auch die Prüfung unbekannter Proteine auf Einheitlichkeit. Sie trennt Verbindungen nach ihrem Verteilungskoeffizienten, dem Verhältnis ihrer Aktivitäten in den beiden Phasen. Sie erfordert zweiphasige Systeme, welche Proteine in beiden Phasen lösen, ohne sie zu denaturieren. Die unpolaren organischen Lösungsmittel, die sich nur beschränkt mit Wasser mischen und sich zur Bildung von Phasenpaaren eignen, fallen aber meistens Proteine aus oder denaturieren sie stark (Butylalkohol bzw. Phenol, Formamid).

Einige Proteine liessen sich auf Phasenpaare aus niedern Alkoholen, Salzen und viel Wasser verteilen. Kleine Zusätze von sogenannten Lösungsvermittlern (z. B. Fettsäuren) können gelegentlich die Verteilung von Proteinen zugunsten der Phase mit dem höhern Gehalt an Lösungsmittel erheblich verschieben<sup>3)</sup>. Die schwer denaturierbaren Caseine sind in phenolhaltigen Phasenpaaren getrennt worden<sup>4)</sup>. ALBERTSON hat zweiphasige Systeme für die Verteilung von Zellfragmenten und Proteinen empfohlen, die zwei nicht mischbare, wasserlösliche makromolekulare Verbindungen wie Dextran und Methylcellulose enthalten<sup>5)</sup>.

Zur Verteilung von Serumproteinen haben sich nahezu kritische Phasenpaare aus Diäthylcarbitol (Diäthylenglykoldiäthyläther, DAC) und Salzlösungen als geeignet erwiesen<sup>1)</sup>. Sie sind erstmals von PORTER für die Verteilungschromatographie von Gammaglobulin verwendet worden<sup>6)</sup>. Im nahezu kritischen Zustand zeichnen sie sich durch einen hohen Wassergehalt von 70–80% aus. Sie lösen Albumin und Gammaglobulin in beiden Phasen. Nach BRÖNSTED<sup>7)</sup> ist die Verteilung chemisch gleichartiger Verbindungen in koexistenten Phasen um so einseitiger, je grösser ihr Molekulargewicht ist. Deshalb lösen sich Proteine in kritischen Phasenpaaren, in denen sich niedermolekulare Verbindungen gleichmässig verteilen würden, vorwiegend in einer der beiden Phasen. Der Verteilungskoeffizient gelöster Verbindungen hängt weitgehend davon ab, wie nahe das System an den kritischen Punkt herankommt. Er strebt nach

<sup>1)</sup> 1. Mitteilung: P. v. TAVEL, *Helv.* 38, 520 (1955).

<sup>2)</sup> L. C. GRAIG, P. ALEXANDER & R. J. BLOCK, *Analytical Methods in Protein Chemistry*, Vol. I, 121 ff., Pergamon Press 1960; E. HECKER, *Verteilungsverfahren im Laboratorium*, Verlag Chemie 1955.

<sup>3)</sup> T. P. KING, L. C. GRAIG, *J. Amer. chem. Soc.* 80, 3366 (1958).

<sup>4)</sup> J. WALTHER, *Diss. Bern* 1952; P. v. TAVEL & R. SIGNER, *Adv. in Protein Chemistry* XI, 296 (1956).

<sup>5)</sup> P. A. ALBERTSON, *Nature* 182, 709 (1958).

<sup>6)</sup> R. R. PORTER, *Biochem. J.* 53, 320 (1953); 59, 405 (1955).

<sup>7)</sup> J. B. BRÖNSTED, *C. r. des travaux du laboratoire Carlsberg, série chimique* 22, 99 (1938).

1, wenn sich die Phasen der kritischen Zusammensetzung nähern. Ein praktisches Mass dafür, wie nahe ein Phasenpaar an den kritischen Punkt herankommt, liefert der Dichteunterschied der Phasen<sup>1)</sup>. Er ist in diesem Punkte Null und nimmt zu, je mehr sich die Phasen entmischen. Dies gilt auch, wenn im System weitere Stoffe gelöst sind.

Tabelle I. *Zusammensetzung nahezu kritischer Phasenpaare mit Diäthylcarbitol und ihr Verteilungsvermögen für Human-Serumalbumin und -Gammaglobulin*

Temperatur +1°. Phasendichteunterschied 0,1 g/ml. Phasenvolumen je 50% ± 5%. Die Streuungen der Dichteunterschiede und der Phasenvolumenverhältnisse können den Gehalt einzelner Komponenten um ca. 0,5% verschieben. pH der proteinfreien Systeme nach Verdünnen 1:5. Proteinkonzentration 1%.

Nr.	% DAC	% Phosphate wasserfrei		% H <sub>2</sub> O	pH	Verteilungs- koeffizient		Bemerkungen	
						Alb.	Glob.		
<i>System A</i>									
		<i>K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></i>							
1	9,8	14,2	—	76	9,1	3,4	29		
2	10,0	13,4	1	75,5	8,0	2,5	21		
3	9,6	12,6	2,0	75,8	7,6	2,3	25		
4	9,7	10,7	4,7	74,8	7,15	2,7	17		
5	9,4	8,9	8,0	73,8	6,8	3,2	unlös.		
<i>System B</i>									
		<i>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(NH<sub>4</sub>)H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></i>							
1	9,1	16,1	—	75	8,1	80	>100		
2	9,3	14,4	2	74,1	7,5	60			
3	9,8	12,3	4,1	73,8	7,15	35	bis		
4	10,9	10,1	6,0	73	6,8	20			
5	11,4	8,1	8,0	72,5	6,6	12	100		
<i>System C</i>									
		<i>Na-Monoglycerophosphat</i>							
		<i>Na<sub>2</sub>GlPh</i>	<i>NaHGIPh</i>						
1	11,8	15,2	—	72,9	9,4	1,0	111		
2	11,6	15,1	0,15	73,1	8,2	0,73	69		
3	11,7	14,7	0,8	72,8	7,4	0,46	42		
4	12,5	12,5	3,6	71,4	6,7	0,18	17		
5	12,7	9,8	8,3	69,1	6,3	0,07	—	weniger als 1%	
6	15,0	5,1	16,0	64,0	5,7	0,01	—	Gammaglobulin gelöst	
<i>System D</i>									
		<i>MgSO<sub>4</sub></i>	<i>Na<sub>2</sub>GlPh</i>						
1	12,5	9,2	0,2	78	7,8		0,5		
2	13,1	8,9	0,9	77,1	7,8		0,7		
3	12,8	8,9	1,9	76,4	7,8		1,6		
4	11,8	8,8	2,9	76,5	7,8		3,4		
<i>System E</i>									
		<i>Na<sub>2</sub>GlPh</i>	<i>Sorbit</i>					Dichteunterschied	
								Alb. Globulin	
1	14,0	11,4	11,4	63,2	8,7	0,5% Protein			
2	15,6	9,0	18,0	57,4		0,33	2,1	0,04	0,055
3	17,4	7,2	21,5	53,9		—	0,4	—	0,055
4	19,5	5,8	23,2	51,5		0,15	0,07	0,05	0,075
5	70,8	—	2,9	26,3		—			

Seit der 1. Mitteilung sind weitere Diäthylcarbitol-Systeme untersucht und ihre Eignung zur Verteilung von Serumproteinen geprüft worden.

## 2. Zweiphasige Systeme mit Diäthylcarbitol

Im PORTER'schen System, Diäthylcarbitol-MgSO<sub>4</sub>-Wasser, das früher<sup>1)</sup> benutzt wurde, eignen sich TRIS-Puffer (TRIS = Trishydroxymethylaminomethan) oder Glycerophosphate als Puffer für pH-Werte über 6 (Tab. ID). Mischungen von Mono- und Dinatriumglycerophosphat sind als Puffer für das pH-Gebiet zwischen 4,5–8,5 (pK 6,3) wegen ihrer guten Löslichkeit auch in hoher Konzentration verwendbar. Um Gemische von Diäthylcarbitol und Wasser, die bei Zimmertemperatur und darunter in jedem Verhältnis mischbar sind, in 2 Phasen zu scheiden, können statt des Magnesiumsulfats Orthophosphate benützt werden. Ihre beschränkte Löslichkeit begrenzt aber die pH-Gebiete, für welche sie sich verwenden lassen. In Tabelle I sind nahezu kritische Systeme mit K- und NH<sub>4</sub>-Phosphaten sowie Monoglycerophosphate zusammengestellt. Für Proteinverteilungen erwiesen sich die letzten als zweckmässig. Sie umfassen das pH-Gebiet von 9,4 bis unter 5,7 (Tabelle IC). Bei allen diesen nahezu kritischen Gemischen nehmen mit sinkendem pH der Diäthylcarbitol- und der Salzgehalt zu und der Wassergehalt ab, wodurch die Proteinlöslichkeit eingeschränkt wird. Auch Polyalkohole und Kohlehydrate können homogene wässrige Lösungen von Diäthylcarbitol in Phasenpaare scheiden. Diese sind aber bei der kritischen Zusammensetzung so wasserarm, dass sie Proteine nicht lösen. Dagegen kann in den Diäthylcarbitol-Phosphat-Systemen das Phosphat zum Teil durch Sorbit ersetzt werden, um die Ionenstärke herabzusetzen (Tab. IE).

Alle zweiphasigen Gemische mit Diäthylcarbitol sind sehr temperaturempfindlich, so dass sie bei konstanter Temperatur ( $\pm 0,1^\circ$ ) gehandhabt werden müssen. Beim Abkühlen verringert sich in der Regel der Phasendichteunterschied. Im Hinblick auf die spätere Verwendung der Phasenpaare zur Verteilung von Proteinen wurde bei  $+1^\circ$  gearbeitet, wo die Denaturierung durch das organische Lösungsmittel geringer ist als bei Zimmertemperatur.

Tabelle II. *Phasenzusammensetzung in Gew.-% nahezu kritischer Phasenpaare von Diäthylcarbitol-Na<sub>2</sub> Glycerophosphat-Wasser*

bei  $+1^\circ$  und Dichteunterschieden zwischen 0 und 0,1 g/ml

Dichteunterschied g/ml	Diäthylcarbitol		Glycerophosphat		Wasser	
	oben	unten	oben	unten	oben	unten
0,033	14,9	10,3	12,9	17,0	72,2	72,7
0,043	15,7	9,6	12,2	17,5	72,1	72,7
0,061	17,0	8,4	11,0	18,9	72,0	72,5
0,082	18,9	6,9	9,4	19,9	71,6	73,2
extrapoliert gegen Dichteunterschied 0 = Zusammensetzung im kritischen Punkt	12,3		15,0		72,7	

Um eine Vorstellung über die Entmischung der Phasen mit zunehmendem Dichteunterschied zu erhalten, wurden einige Systeme analysiert (vgl. Tabelle II). Wie zu erwarten, steigt die Konzentration an Diäthylcarbitol in der oberen organischen Phase und sinkt in der untern wässrigen, während diejenige des Glycerophosphates umgekehrt unten zu und oben abnimmt. Bis zum Dichtenunterschied von 0,1 g/ml erfolgen diese Konzentrationsverschiebungen linear je bis zu 6% des Gesamtsystems. Der Wassergehalt fällt dabei nur um etwa 1%.

**3. Das Verhalten von Albumin und Gammaglobulin in Diäthylcarbitol-Systemen**

Um die Eignung der Diäthylcarbitol Systeme der Tabelle I für die Verteilung von Serumproteinen zu prüfen, wurde die Verteilung von Serumalbumin und Gammaglobulin untersucht. Die Verteilungskoeffizienten  $K$ , das Verhältnis der Konzentration in der oberen organischen zu derjenigen in der untern wässrigen Phase sind bei einem Dichteunterschied um 0,1 g/ml und einer Proteinkonzentration um 1% bestimmt. Die Resultate sind auch in Tabelle I enthalten. Wenn bei einem System weniger als 1% des Proteins in Lösung ging, ist dies vermerkt. Aus den Messungen lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

a) *Dichteunterschied und Lösungsvermögen.* Mit wachsendem Dichteunterschied und abnehmendem Wassergehalt fällt das Lösungsvermögen für Proteine rasch ab.

Das wird im Versuch deutlich, der in Tabelle III dargestellt ist. Im gewählten Phasenpaar aus Diäthylcarbitol, Glycerophosphat und Wasser bei pH 8,7 sinkt nach einer Verminderung des Wassergehaltes um 5% des Gesamtsystems die Löslichkeit beider Proteine unter 0,5%.

Tabelle III. *Verteilungskoeffizienten und Löslichkeit von Albumin und Gammaglobulin bei verschiedenem Dichteunterschied im Phasenpaar aus DAC-Na<sub>2</sub>-Glycerophosphat-Sorbit (1:1)-Wasser (System Tab. I E 1) bei +1°, pH 8,7. Die Löslichkeit ist in % der in Versuch 1 gelösten Menge angegeben. Proteincinwaage pro Phasenpaar 0,5%*

Versuch Nr.	1	2	3	4	5
Relative Verminderung des Wassergehaltes . . . . % 100% = ganzes System	0	1,5	3,0	6,0	8,5
<i>Albumin</i>					
Dichteunterschied g/ml . . . .	0,048	0,084	0,106	0,142	0,157
Verteilungskoeffizient . . . .	0,31	0,12	0,07	0,05	—
gelöstes Protein . . . . . %	100	101,5	100,5	92,5	82
<i>γ-Globulin</i>					
Dichteunterschied g/ml . . . .	0,051	0,081	0,105	0,137	0,154
Verteilungskoeffizient . . . .	3,0	4,4	5,7	(6,0)	—
gelöstes Protein . . . . . %	100,0	97,5	99	70	32,5

Die Proteinlöslichkeit nimmt mit dem pH oberhalb 7 zu, einerseits weil die Systeme wasserhaltiger werden, andererseits weil mit der Entfernung vom isoelektrischen Punkt die Löslichkeit der Serumproteine wächst.

Im System Diäthylcarbitol-Glycerophosphat-Wasser bei pH 8,6 und +1° wurden Löslichkeiten bei Albumin von über 5%, bei Gammaglobulin von über 3% beobachtet.

b) *Dichteunterschied und Verteilungskoeffizient.* Im kritischen Punkt muss der Verteilungskoeffizient aller gelösten Komponentent 1 betragen. Mit zunehmender Entmischung der Phasen wird  $K > 1$ , wenn sich das Protein in der oberen Phase anreichert, und  $K < 1$ , wenn es sich besser in der untern löst.

Ein Beispiel gibt ebenfalls Tabelle III, wo sich Albumin in der untern, Gammaglobulin in der obern Phase anreichert. Im Hinblick auf die spätern Anwendungen ist darauf hinzuweisen, dass es nicht möglich ist, durch Änderung des Dichteunterschiedes allein zu bewirken, dass eine Verbindung in der obern statt in der untern Phase anreichert wird oder umgekehrt, d. h.  $K < 1$ ,

nicht in  $K > 1$  umgewandelt werden kann. Hierzu muss das lösende System aus andern Komponenten zusammengesetzt werden oder es sind sogenannte Lösungsvermittler zuzufügen.

In der Nähe des kritischen Punktes ändert sich  $\log K$  des Proteins proportional zum Dichteunterschied, wie übrigens auch derjenige der Hauptbestandteile, die das System aufbauen. Dies entspricht der BRÖNSTED'schen Beziehung

$$d(\ln K) = - \frac{\alpha \cdot M}{k \cdot T} dx.$$

wo  $\alpha$  und  $k$  Konstanten,  $M$  das Molekulargewicht,  $T$  die Temperatur bedeuten und  $dx$  eine Änderung der Zusammensetzung ist, die proportional zum Dichteunterschied gesetzt werden kann<sup>7</sup>).

c) *Einfluss der Systemkomponenten.* Im System von Diäthylcarbitol und Magnesiumsulfat reichert sich das Gammaglobulin in der wässrigen (untern) Phase an<sup>1</sup>), in den Gemischen mit Phosphat dagegen in der organischen (oberen). Albumin löst sich, ausser im System mit Ammoniumphosphat, besser in der wässrigen Phase. Die Förderung der Löslichkeit des Gammaglobulins in der organischen Phase ist mit Glycerophosphat am ausgeprägtesten. Schon 1% Glycerophosphat genügt, damit sich im Phasenpaar mit Magnesiumsulfat Gammaglobulin statt in der untern in der obern Phase anreichert. Es ist deshalb anzunehmen, dass Glycerophosphat als Lösungsvermittler wirkt. Überraschend ist die starke Anreicherung von Albumin in der obern Phase mit Ammoniumphosphat, während sonst dieses Protein in den andern Phasenpaaren in die untere Schicht geht. Dies lässt vermuten, dass nicht nur die Anionen der Systemkomponenten, sondern auch ihre Kationen die Verteilung der Proteine beeinflussen. Die nicht ionogenen Systemkomponenten wie Polyalkohole begünstigen eine Anreicherung in den wässrigen Phasen, doch bewirken sie auch eine Verminderung des Wassergehaltes und der Löslichkeit des Proteins. Dieser Effekt kann wohl ihrer geringen Polarität und der Senkung der Ionenstärke in der wässrigen Phase zugeschrieben werden.

d) Die Verteilungskoeffizienten sind unter 5% konzentrationsunabhängig.

e) *Erhöhung des pH* über 7 verschiebt das Verteilungsverhältnis zugunsten der organischen Phase und erhöht das Lösungsvermögen für Proteine. Das Verhältnis der Verteilungskoeffizienten von Albumin und Gammaglobulin beträgt ca. 100 und ist pH unabhängig.

Die Vielfalt dieser Phasenpaare ist noch nicht erschöpfend untersucht. Sie ermöglicht aber für multiplikative Anwendungen Phasenpaare mit vorteilhaften Verteilungskoeffizienten auszuwählen.

#### 4. Die Zerlegung von Serumproteingemischen durch multiplikative Verteilungen in Diäthylcarbitol - Phasenpaaren

Alle multiplikativen Verteilungen wurden nach dem GRAIG'schen Verfahren<sup>2</sup>) durchgeführt (vgl. experimenteller Teil). Am Ende eines solchen Prozesses befindet sich jede im System gelöste Komponente in einer beschränkten Gruppe von Verteilungselementen. Die in den Phasenpaaren enthaltenen Mengen liegen auf einer symmetrischen GAUSS'schen Verteilungskurve mit einem Konzentrationsmaximum in der Mitte der Gruppe. Dieses wird im Laufe der Verteilung um so weiter durch die Reihe der Gläser verschoben, je grösser der Verteilungskoeffizient der Komponente ist. Bei gleichen Volumen der Schichten kommt das Maximum für den Verteilungskoeffizien-

ten  $K = 1$  in die Mitte der Batterie zu stehen. Die Fläche unter der Verteilungskurve entspricht der Gesamtmenge der Komponente.

a) *Die Zerlegung eines Gemisches von Albumin und Gammaglobulin.* Die Verteilungskoeffizienten von Human-Serumalbumin und -Gammaglobulin in Phasenpaaren aus Diäthylcarbitol und Natriumglycerophosphat liegen bei pH 7–8 für eine Trennung sehr günstig. Albumin löst sich vorwiegend in der untern, Gammaglobulin fast ausschliesslich in der obern Schicht. Das Verhältnis der Verteilungskoeffizienten beträgt nahezu 100. Um die Denaturierung durch das organische Lösungsmittel möglichst zu unterdrücken, wurde bei  $-5^\circ$  gearbeitet. Die Verteilungskoeffizienten betragen im Phasenpaar dieser Temperatur 0,7 für Albumin und über 60 für Gammaglobulin, das damit ganz am äussersten Ende der Batterie angereichert würde. Um dem entgegenzuwirken, wurde ein Phasenvolumverhältnis von 1:2, obere zu unterer Phase, gewählt. Das Albumin enthielt eine geringe Menge eines andern Serumproteins, nach der Papierelektrophorese zu schliessen ein Alphaglobulin.

Nach 12 Verteilungsschritten wurde jeder Phase 1 ml entnommen und dessen Extinktion bei  $280\text{ m}\mu$  gemessen. Der Rest der Phasenpaare wurde einzeln ausdialysiert, gefriergetrocknet und papierelektrophoretisch untersucht.

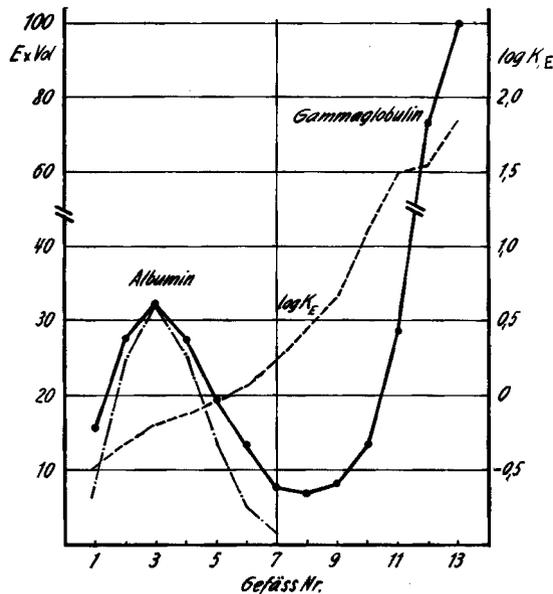


Fig. 1. Verteilung von Albumin und Gammaglobulin

- Verteilungskurve: Extinktion x Fraktionsvolumen.
- Verhältnis der Extinktionen  $K_E$  obere zu unterer Phase, log. Maßstab.
- .-.- Theoretische Verteilung einer idealen Komponente, deren Verteilungsmaximum mit demjenigen des Albumins zusammenfällt.

Fig. 1 gibt das Ergebnis des Versuches wieder. Die Verteilungskurve weist die Maxima der beiden Proteine in den Fraktionen auf, in welchen sie auf Grund der Vorversuche zu erwarten war, für Albumin bei 3, für Gammaglobulin im letzten Phasenpaar. Die Papierelektrophoresen zeigen Albumin bis in die Fraktion 10, Gammaglobu-

lin von 8 an aufwärts. Die Mischfraktionen 8–10 enthalten jedoch nur einen kleinen Bruchteil der gesamten Proteinmenge. Die Verunreinigung des Albumins erscheint in den Fraktionen 1–7 und dürfte noch stärker in den Unterphasen angereichert sein als das Albumin.

Das Verhältnis der Extinktionen in der obern und untern Schicht steigt durch die Fraktionenreihe stetig an. Wo benachbarte Phasenpaare ein reines Protein enthalten, sollten sie ein gleiches Extinktionsverhältnis aufweisen, das dem Verteilungskoeffizienten der isolierten Komponenten entspricht. Das ist bei keinem der beiden Proteinen der Fall. Die Albuminfraktionen sind noch durch das Alphaglobulin verunreinigt, wie aus den Papierelektrophoresen hervorgeht.

b) *Die Verteilung von Human-Serum.* Als nächstes wurde ein Standardpräparat von Human-Serum des Schweiz. Roten Kreuzes in einem Phasenpaar aus Diäthylcarbitol, Glycerophosphat und Wasser bei  $-7,5^\circ$  verteilt. Darin lösen sich die Serumproteine nicht vollständig. Ein Niederschlag sammelt sich beim Scheiden der Phasen an der Grenzfläche. Die elektrophoretische Prüfung zeigt aber, dass die meisten Serumproteine in den klaren Phasen enthalten sind, wenn auch z. T. in geringerer Konzentration als im Normalserum. Die Lipoproteine dürften ausgefällt sein. Zur multiplikativen Verteilung über 24 Schritte wurden klare Phasen in den beiden ersten Gefäßen eingesetzt. Einzelheiten siehe experimenteller Teil.

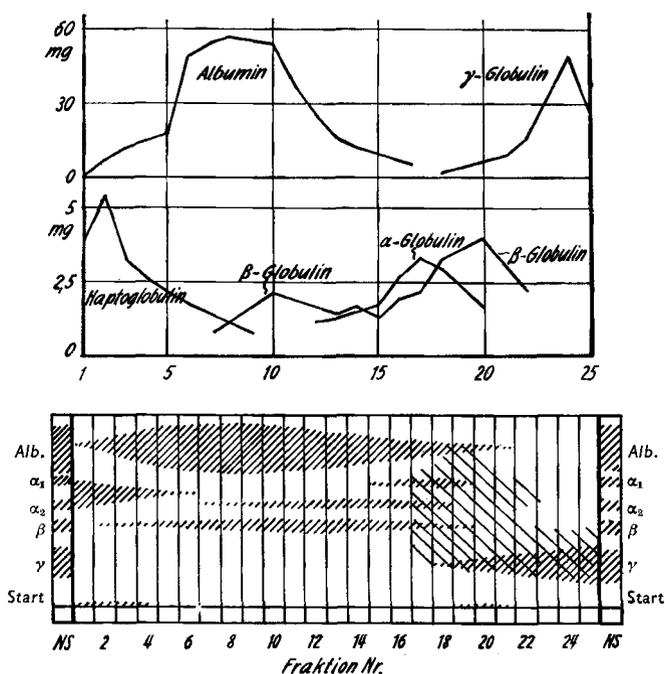


Fig. 2. Verteilung von Normal-Serum des Schweiz. Roten Kreuzes  
unten: Schematische Darstellung der Papierelektrophoresen. NS = Normalserum.

Gefärbte Protein zonen , diffuse Verfärbungen ;

oben: Aus den Papierelektrophoresen und Rückstandsgewichten geschätzte Proteinmengen.

Die Phasenpaare blieben während der Verteilung, die ungefähr 1 Woche dauerte, klar, abgesehen von geringen Niederschlägen in den Phasengrenzflächen. Anfangs konnten bis in die Mitte der Batterie gelbe Komponenten verfolgt werden. Am Ende der Verteilung lagen 25 Fraktionen vor, deren Protein durch Ausdialysieren und Gefriertrocknen isoliert, gewogen und mittels Papierelektrophorese analysiert wurde. An Hand der Farbintensitäten der Elektrophoresezonen des Albumins, Alpha<sub>1</sub>-, Alpha<sub>2</sub>-, Beta- und Gamma-Globulins konnten die relativen Mengen dieser Komponenten in jeder Fraktion abgeschätzt werden. Einzelne Fraktionen wurden zudem immunoelektrophoretisch untersucht.

Fig. 2 gibt das Bild der Elektrophoresen und die Mengenverteilung schematisch wieder. Die Komponenten treten in der Fraktionsfolge nach der Grösse ihrer Verteilungskoeffizienten geordnet auf. Als erste findet sich in den Phasenpaaren 1–5 ein Alphaglobulin mit dem Maximum in den ersten beiden Gläsern. Es muss einen  $K$ -Wert unter 0,1 besitzen. Dann folgt Albumin, wegen der grossen Menge in breiter Verteilung von 1–20. Alpha<sub>2</sub>-Globuline sind in geringer Konzentration von Fraktion 7 bis gegen 19 erkennbar. Die Betaglobuline erstrecken sich von Fraktion 2 bis gegen 19 mit einem Schwerpunkt von 10–20. Die Fraktionen 17–20 haben nur wenig Protein und zeigen verwachsene elektrophoretische Zonen aller Serumproteine. Die Fraktionen über 20 enthalten Gammaglobulin mit dem Maximum bei 24. Alle Fraktionen setzen sich aus mehreren Eiweisskomponenten zusammen ausser der ersten und letzten, in denen fast reines Alphaglobulin bzw. Gammaglobulin isoliert ist.

Die immunoelektrophoretische Untersuchung zeigte bei 25 Gammaglobulin neben einer Spur eines nicht identifizierten Proteins. Fraktion 1 erwies sich als immunochemisch reines *Haptoglobin*, indem nur *eine* Präzipitationslinie auftrat. Der Identitätsbeweis konnte immunoelektrophoretisch in folgender Weise erbracht werden: 1. Die Immunreaktion mit Antiserum, das mit Haptoglobin 1:50 abgesättigt war, blieb aus. 2. Nach Zusatz von Hämoglobin verringerte sich die elektrophoretische Verschiebung auf den Wert, der dem Haptoglobin-Hämoglobinkomplex entspricht. 3. Der Vergleich der Immunelektrophorese mit reinem Haptoglobin zeigte keinen Unterschied. Der kleine Verteilungskoeffizient des Haptoglobins dürfte mit dem hohen Kohlehydratgehalt des Proteins zusammenhängen. Da Kohlehydrate Diäthylcarbitol aus wässriger Lösung in eine selbständige Phase zu verdrängen mögen, ist anzunehmen, dass Glykoproteine in der wässrigen Phase angereichert werden.

Die Verteilung der Serumproteine zeigt eine andere Reihenfolge als die Elektrophorese, worin das andersgeartete Auswahlprinzip der Fraktionierungsmethode zum Ausdruck kommt.

## 5. Die Reinheitsprüfung von Serumproteinen durch multiplikative Verteilung in Diäthylcarbitol-Systemen

Der Vergleich experimenteller Verteilungen mit Verteilungskurven, die für ideale Komponenten mit gleichem Verteilungskoeffizienten berechnet sind, liefert eine strenge Prüfung der Reinheit unbekannter Verbindungen.

Die relative Menge einer Komponente  $T_{n,r}$  in irgendeinem Phasenpaar, von 0 bis  $n$  gezählt, kann nach GRAIG<sup>2)</sup> für jeden Verteilungskoeffizienten aus der Zahl  $n$  der Verteilungsschritte berechnet werden. Wenn  $p$  und  $q$  die Mengen in der oberen bzw. in der unteren Schicht des Aus-

gangssysteme bezeichnen und ihre Summe  $p+q=1$  gleich der Totalmenge der Komponente gesetzt wird, ist

$$T_{n,r} = \frac{n!}{n!(n-r)!} p^r \cdot q^{(n-r)} \quad (1)$$

Die Beziehung von  $p$  und  $q$  zum Verteilungskoeffizienten  $K$  ist mit

$$K = \frac{p/v_o}{q/v_u} \quad (2)$$

gegeben, wo  $v_o$  und  $v_u$  die Volumen der oberen bzw. unteren Schicht bedeuten. Aus der Lage des Verteilungsmaximums  $r_{max}$  kann der Verteilungskoeffizient der Komponente nach

$$K = \frac{r_{max}}{(n - r_{max})} \frac{v_u}{v_o} \quad (3)$$

ermittelt werden.

Die Reinheitsprüfung durch multiplikative Verteilung setzt voraus, dass in allen Verteilungsschritten das Gleichgewicht in jedem Phasenpaar hergestellt und die Substanz während der Verteilungsoperation nicht verändert wird, und dass die Phasen quantitativ übergeführt werden. Der Verteilungskoeffizient braucht nicht im voraus bekannt zu sein. Er kann aus der Lage des Maximums der Verteilung ermittelt werden. Wählt man zur Berechnung der Konzentration der Phasenpaare den Verteilungskoeffizienten und die Stoffmenge so, dass bei einer Fraktion, z. B. derjenigen des Maximums, die experimentellen und theoretischen Werte gleich werden, so müssen diese auch bei allen andern Phasenpaaren übereinstimmen, wenn eine reine Komponente vorliegt.

Ein weiteres Reinheitskriterium bildet die Übereinstimmung der Verteilungskoeffizienten, die nach 3 Methoden ermittelt worden sind: a) Im Phasenpaar, in

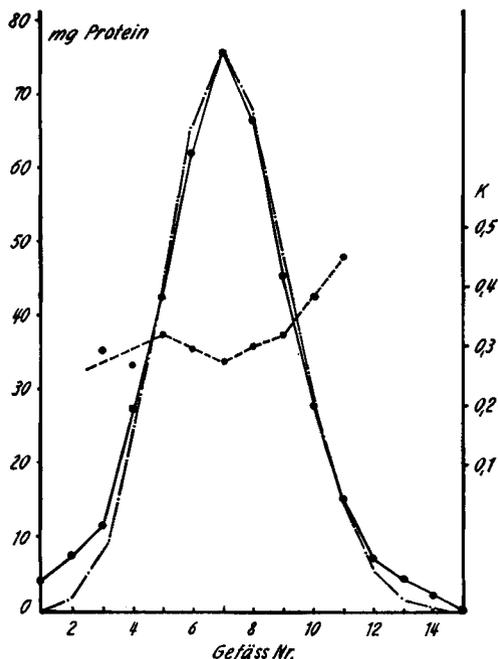


Fig. 3. Verteilung von krist. Human-Serumalbumin

- Proteinmenge nach KJELDAHL-Bestimmungen.
- - - - Für ideale Komponente zu erwartende Verteilung.
- Verteilungskoeffizienten.

welchem reine Substanz gelöst wurde. b) Aus der Lage des Verteilungsmaximums nach einer multiplikativen Verteilung mittels Formel (3) und (2). c) In Phasenpaaren der multiplikativen Verteilung. Alle Phasenpaare, welche dieselbe Komponente rein enthalten, müssen gleiche Verteilungskoeffizienten aufweisen.

a) *Die Reinheitsprüfung von Serumalbumin.* Um die Eignung der Diäthylcarbitol-Systeme zur Reinheitsprüfung von Serumproteinen zu erproben, wurde ein reines kristallisiertes Serumalbumin des Schweiz. Roten Kreuzes verteilt. Die Methode ist am genauesten, wenn das Verteilungsmaximum der untersuchten Komponente in die Mitte der Batterie zu stehen kommt, d.h.  $p/q = 1$  ist. Zur Anwendung gelangte das Phasenpaar Tabelle I, C3, aus Diäthylcarbitol und Glycerophosphat mit einem Dichteunterschied von 0,110 und je 11,5 ml oberer und 8,5 ml unterer Schicht. Nach 19 Verteilungsschritten befand sich das Albumin in den ersten 14 Fraktionen, mit einem ausgeprägten Maximum in Fraktion 7 (vgl. Fig. 3). Die Proteinmenge in jedem Phasenpaar wurde sowohl mittels der Extinktion bei 280  $m\mu$  als auch durch KJELDHAL-Analysen ermittelt. Die Werte stimmten innerhalb der Fehlergrenzen überein.

Die berechneten Proteinmengen sind überraschenderweise bei den Fraktionen 6, 8, 9 grösser als die experimentellen, während sie bei reinen Stoffen höchstens gleich werden sollten. Diese Anomalie der Verengung der Glockenkurve haben auch HAUSMANN & GRAIG bei Albumin in andern Systemen beobachtet<sup>8)</sup>.

Die Schwankungen der Verteilungskoeffizienten dürften den Messfehlern zuzuschreiben sein. Der Vergleich der auf verschiedene Weise ermittelten Verteilungskoeffizienten zeigt eine befriedigende Übereinstimmung: Im Phasenpaar des Maximums 0,48, aus der Lage des Maximums 0,45. Verteilung des Ausgangsmaterial im zweiphasigen System 0,38.

Versuche mit einem Präparat Rinderalbumin zeigten deutlich Begleitkomponenten mit grösserem und kleinerem Verteilungskoeffizienten (vgl. Fig. 4). Als die Fraktionen um das Maximum nochmals verteilt wurden, waren die Verunreinigungen noch festzustellen, jedoch schwächer.

Diese Versuche erweisen die prinzipielle Eignung der nahezu kritischen Diäthylcarbitol-Phasenpaare zur Reinheitsprüfung von Proteinen. Freilich muss von Fall zu Fall festgestellt werden, ob die untersuchten Proteine nicht durch das zweiphasige System verändert werden. Albumin scheint bei den angewandten Bedingungen nicht denaturiert worden zu sein, sonst wäre die Übereinstimmung kaum so gut.

b) *Untersuchung von Gammaglobulin auf Einheitlichkeit.* In gleicher Weise wie das Albumin wurde auch Gammaglobulin multiplikativ in fast kritischen Phasenpaaren verteilt. Das Schweiz. Rote Kreuz stellte ein elektrophoretisch reines Gammaglobulin zur Verfügung, das nach der Rivanolmethode<sup>9)</sup> hergestellt worden war. Es ist aber bekannt, dass auch elektrophoretisch reines Gammaglobulin keineswegs einheitlich ist und Komponenten von verschiedenem Kohlehydratgehalt und differenzierter immunochemischer Wirkung enthält.

Als zweiphasiges Verteilungssystem wurde Diäthylcarbitol-Sorbit-Glycerophosphat verwendet, in dem sich Gammaglobulin mit ungefähr gleicher Konzentration in beiden Phasen löst. Das System ist im experimentellen Teil beschrieben. Mehrere

<sup>8)</sup> W. HAUSMANN & L. C. GRAIG, J. Amer. chem. Soc. 80, 2703 (1958).

<sup>9)</sup> J. HOREJSI & R. SMETANA, Acta Medica Scand. 155, 65 (1956).

Verteilungen und auch solche im Diäthylcarbitol- $MgSO_4$ -System ergaben übereinstimmende Resultate.

Das Gammaglobulin verteilt sich über alle Phasenpaare mit einem flachen Maximum in den höheren Fraktionen. Der Verteilungskoeffizient steigt stetig von einem Wert um 0,1 bis gegen 100 an, wobei der Mittelwert demjenigen des Ausgangsgemisches entspricht.

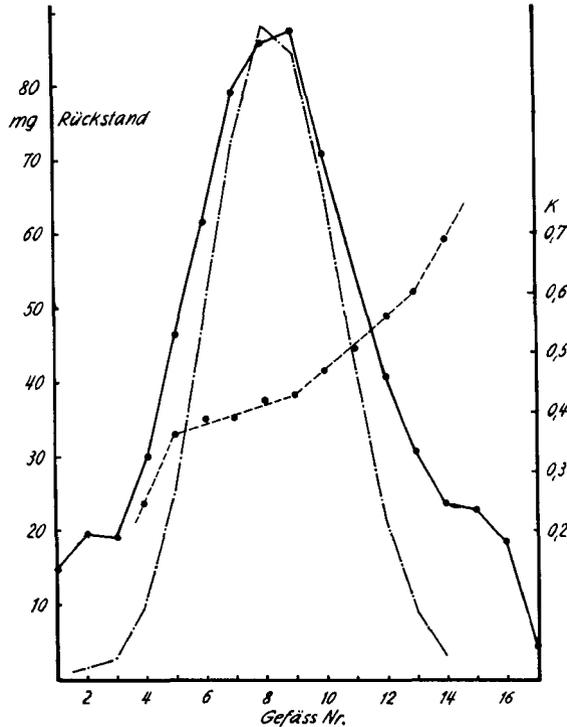


Fig. 4. Verteilung von Rinder-Serumalbumin

- Proteinmenge, Rückstand nach Dialyse.
- - - - Für ideale Komponente zu erwartende Verteilung.
- - Verteilungskoeffizienten.

Das überraschende Resultat lässt 2 Interpretationen zu: Entweder es hat eine Zerlegung des bezüglich der Verteilungseigenschaften sehr heterogenen Proteins in verschiedene Komponenten stattgefunden, oder das Protein ist durch das Lösungsmittelsystem erheblich verändert worden. Mit einigen zusätzlichen Untersuchungen wurde versucht zu entscheiden, welche Deutung die wahrscheinlichere ist.

1) Die isolierten Proteinfractionen wurden in 4 Gruppen zusammengefasst und papier- und immunoelektrophoretisch untersucht. Alle Papierelektrophoresen zeigen nur die Gammaglobulinzone. Mit zunehmender Fraktionsnummer wird diese Zone enger und es tritt eine wachsende Menge von ungelöstem Protein an der Startlinie auf. Die Immunoelektrophoresen weisen im Protein der ersten Phasenpaare noch mehrere Komponenten wie im Ausgangsprodukt auf. In den höhern Fraktionen dagegen befindet sich immunochemisch einheitliches Gammaglobulin.

Das Protein des Ausgangsmaterials und dasjenige aus den drei ersten Fraktionsgruppen unterschieden sich nicht in ihrer Sedimentationsgeschwindigkeit in der Ultrazentrifuge.

2) Das Gammaglobulin der Fraktionen 14–20 einer Verteilung wurde isoliert und nochmals in gleicher Weise verteilt. Ihr Schwergewicht kam in die Endfraktionen zu liegen, vgl. Fig. 5. Nur ein Bruchteil verblieb in den niedern Fraktionen. Diese Ver-

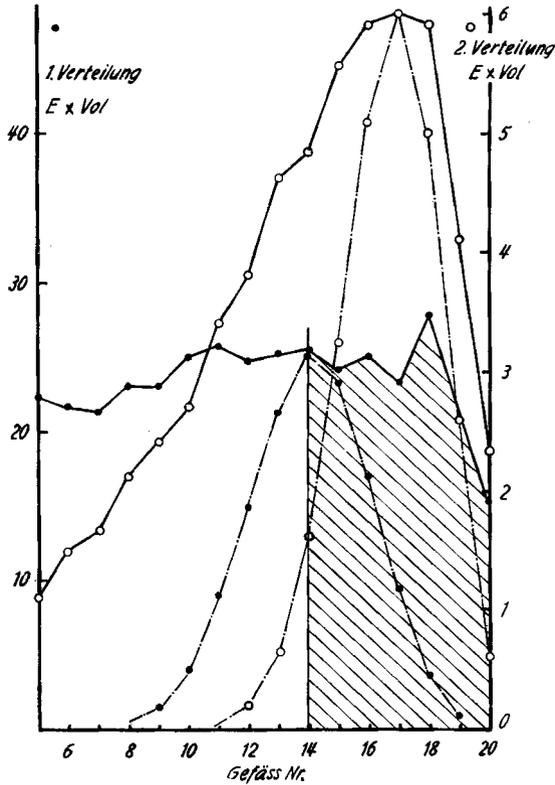


Fig. 5. Verteilung von Gammaglobulin

● 1. Verteilung. ○ 2. Verteilung  
 — Extinktion × Fraktionsvolumen - - - - - theoretische Verteilungskurven  
 1. Verteilung  $p = 0,7$   $q = 0,3$  2. Verteilung  $p = 0,8$   $q = 0,2$

Ein Teil der Fraktion 14–20 diente als Ausgangsmaterial für die 2. Verteilung. Die Maßstäbe der Verteilungskurven sind umgekehrt proportional zu den eingesetzten Proteinmengen.

teilung ist für das Komponentengemisch der 1. Fraktionen 14–20 zu erwarten. Die theoretische Verteilung einer Komponente mit dem Maximum bei 14 zeigt, dass die 2. Verteilung Verbindungen enthalten muss, die z. T. auch in den Fraktionen unter 14 erscheinen müssen. Der Vergleich mit einer theoretischen Verteilungskurve  $p = 0,8$ ,  $q = 0,2$  ergibt, dass das Material im Maximum 17 noch keineswegs einheitlich ist, obschon es wesentlich homogener ist als nach der 1. Verteilung. Die 2. Verteilung lässt aber eine Denaturierung des Proteins nicht ausschliessen.

3) Die Denaturierung eines Proteins äussert sich empfindlich in seiner spezifischen Drehung. Bei einer Denaturierung, die mit der Öffnung der  $\alpha$ -Helixstruktur verbunden ist, wächst die spezifische Drehung nach negativen Werten<sup>10)</sup>. Die spez. Drehwerte der Fraktionengruppen und des Ausgangsmaterials betragen:

im ursprünglichen Präparat	– 52°	Fraktion 0– 4	– 59°
Protein aus dem 1. Phasenpaar		Fraktion 5–11	– 62°
vor der multiplikativen Verteilung	– 52°	Fraktion 12–16	– 39°

Da wenig Material zur Verfügung stand und die Lösungen z.T. etwas getrübt waren, sind diese Messungen an den Fraktionen nicht sehr genau. Sie zeigen aber keinen starken Anstieg nach negativen Drehwerten. Genauere Messungen an Albumin und Gammaglobulin, die 2 Tage bei +1° in einem Phasenpaar gelöst waren, ergaben folgende Drehungen:

Albumin: Ausgangsmaterial – 59,4°, aus Phasenpaar – 65°,

Gammaglobulin: Ausgangsmaterial – 52,2°, aus Phasenpaar – 54,8°.

Die Werte stimmen mit solchen aus der Literatur überein, die für Albumin – 58 bis – 63°, für Gammaglobulin – 51 bis – 52° angibt<sup>11)</sup>.

4) Da sich die Denaturierung von Proteinen deutlich in ihren Löslichkeitseigenschaften äussert, ist zu erwarten, dass sie in den Verteilungskoeffizienten zum Ausdruck kommen. Die Verteilungskoeffizienten und die gelöste Menge von Albumin und Gammaglobulin in einem zweiphasigen System wurden während 5 Wochen mittels der Extinktion klarer Proben bei 280  $m\mu$  verfolgt. Beim Albumin blieben der Verteilungskoeffizient und die gelöste Proteinmenge innerhalb der Fehlergrenzen konstant. Beim Gammaglobulin änderte sich der Verteilungskoeffizient nicht, aber die gelöste Menge sank auf 75%. Das lässt darauf schliessen, dass das Gammaglobulin über lange Zeit allmählich denaturiert wird und ausfällt, wobei das native Protein aber mit unverändertem Verteilungskoeffizienten in Lösung bleibt.

In der multiplikativen Verteilung des Gammaglobulins scheint eine beginnende Trennung eingetreten zu sein, wobei aber ein Teil des Proteins denaturiert worden ist. Eine eingehendere Charakterisierung liess sich bisher wegen der geringen Mengen an getrenntem Protein nicht durchführen.

## 6. Bemerkungen zur multiplikativen Verteilung mit nahezu kritischen Phasenpaaren

Die Versuche wurden ohne grossen apparativen Aufwand ausgeführt, da es vorerst darum ging, die prinzipielle Eignung der Diäthylcarbitolsysteme für Serumproteinverteilungen zu prüfen. Mit der mühsamen Arbeitsweise im Kaltraum war es nicht möglich, mehr als 25 Verteilungsschritte auszuführen und grössere Substanzmengen zu zerlegen. Die gebräuchlichen Gegenstromverteilungsapparate sind für diese nahezu kritischen Phasenpaare ungeeignet, da sich die in der Kälte relativ viskosen Schichten nicht schnell genug scheiden. Die weitere Abklärung des Wertes des Verfahrens erfordert seine Automatisierung. Der Bau einer geeigneten Verteilungszentrifuge ist geplant, mit welcher multiplikative Verteilungen rationeller und in

<sup>10)</sup> S. J. LEACH, Review of Pure and Applied Chemistry 9, 33 (1959).

<sup>11)</sup> B. JIRGENSONS & S. SIROTZKY, J. Amer. chem. Soc. 76, 1367 (1955).

kurzer Zeit durchgeführt werden können. Die Isolierung der Proteine nach der multiplikativen Verteilung mittels Dialyse ist ebenfalls unbefriedigend, sie wird aber z. T. durch Fällungsmethoden ersetzt werden können.

### Experimenteller Teil

1) Die *Proteinpräparate* wurden vom Zentrallaboratorium des Blutspendedienstes des Schweiz. Roten Kreuzes in gefriergetrockneter Form bezogen, Standard Serum SRK gelöst in Ampullen mit einem Proteingehalt von 7,1%.

*Diäthylcarbitol*. Präparat von FLUKA *pract.* Zur Reinigung und Entfernung von Peroxiden wurde mit 20-proz. Natriumhydroxid ausgeschüttelt und unter Stickstoff im Vakuum destilliert; Sdp. 74°/13 Torr. Um die letzten Spuren von Peroxid zu entfernen, destillierte man über Natrium. Peroxidnachweis mit Ammoniumferrosulfat und Kaliumrhodamid. *Dinatriummonoglycerophosphat*, krist. (5 $\frac{1}{2}$  H<sub>2</sub>O) MERCK Nr. 6444, ist ein Gemisch der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Verbindung. Glycerophosphorsäure und Natriumhydrogenmonoglycerophosphat wurden aus dem Dinatriumsalz mit Kationaustauscher Amberlite IR 120 hergestellt. Der Gehalt der Mischungen wurde durch potentiometrische Titration ermittelt. Die Äquivalenzpunkte liegen bei pH 9,2 und pH 4, so dass auch mit Phenolphthalein und Methylorange als Indikator titriert werden kann.

2) *Lösen von Protein in zweiphasigen Systemen*. Gefriergetrocknete Proteine können nicht direkt in den nahezu kritischen Phasenpaaren gelöst werden. Um das trockene Protein scheidet sich eine an organischem Lösungsmittel reiche Phase aus, die einen Teil des Proteins sofort denaturiert und unlöslich macht. Proteine sind vorzulösen und Phasenpaaren zuzusetzen, deren Wasser evtl. Salzgehalt um denjenigen der Proteinlösung vermindert ist.

Die Phasenpaare wurden durch Zugabe von Diäthylcarbitol oder Wasser auf einen bestimmten Dichteunterschied eingestellt. Dieser wurde mit einem Tauchkörper, der an einer Nylonsaite von einer Federwaage in die Phasen hing, gemessen. Durch Verändern der Saitenlänge mittels einer Schleife konnte der Tauchkörper in die eine oder andere Schicht getaucht werden. Diese Messungen wurden bei konstanter Temperatur ( $\pm 0,1^\circ$ ) ausgeführt.

Die Proteinkonzentrationen wurden an der Extinktion bei 280 m $\mu$  gemessen, nachdem die Lösungen so verdünnt worden waren, dass sie bei Zimmertemperatur homogen blieben. Blindwerte entsprechender proteinfreier Lösungen wurden in Abzug gebracht.

3) *Zur Analyse der Phasen*. Wasser und Diäthylcarbitol wurden vom Glycerophosphat abdestilliert; im Destillat wurde der Carbitolgehalt mittels der Refraktion bestimmt. Um eine Zersetzung des Glycerophosphats zu vermeiden, wurde nach Art der Gefriertrocknung in einer geschlossenen Apparatur im Vakuum ( $< 0,1$  Torr) destilliert. Der Na<sub>2</sub>-Glycerophosphat-Rückstand wurde gewogen und titriert, um evtl. noch gebundenes Wasser zu erfassen. Der Brechungskoeffizient des Diäthylcarbitols  $n_D^{20}$  betrug 1,421, das Brechungsinkrement pro 1% in Wasser 0,00056. Mit einem ABBÉ-ZEISS-Eintauchrefraktometer konnte der Carbitolgehalt auf  $\pm 0,3\%$  bestimmt werden.

4) *Die multiplikativen Verteilungen* wurden nach dem GRAIG'schen Verfahren<sup>2)</sup> in einer halbautomatischen Batterie nach HECKER<sup>12)</sup> oder in zylindrischen Gläsern durchgeführt, wobei die flüssigen Schichten mit einer Rekordspritze transferiert und durch Zentrifugieren bei konstanter Temperatur geschieden wurden.

Das Phasenpaar mit dem Proteingemisch befindet sich zu Beginn des Versuchs in einem Glas Nr. 1. Im 1. Verteilungsschritt wird die Oberschicht in ein Glas Nr. 2 zu einem Volumen frischer Unterschicht gebracht und ein Volumen Oberphase in das Glas Nr. 1 gegeben. Nach dem Mischen der Phasen zur Einstellung des Verteilungsgleichgewichtes und Scheiden der Phasen ist der 1. Verteilungsschritt abgeschlossen. Mit jedem Schritt wird der Gläserreihe ein weiteres Gefäß mit einem Volumen Unterphase zugefügt, alle Oberphasen in das Glas nächst höherer Nummer überführt und im Gefäß Nr. 1 ein Volumen Oberphase zugegeben. Die Anzahl der Gläser ist stets gleich der Zahl der Verteilungsschritte + 1.

Bei dem geringen Dichteunterschied der Diäthylcarbitol-Phasen und ihrer relativ hohen Viskosität bei den tiefen Temperaturen beansprucht die Scheidung der Phasen 4–6 Std., beim Zentrifugieren bei 50–150 g ungefähr 1/4 Std., wobei die Temperatur konstant zu halten ist. Dies konnte mit einer Zentrifuge im Kaltraum erreicht werden, deren Gläser nicht durch einen Behälter geschützt waren, so dass stets frische Raumluft sie umspülte. Das Mischen der Phasen

<sup>12)</sup> E. HECKER, *Chemie Ing. Techn.* 25, 505 (1953).

erfolgte auf einer senkrechten Scheibe, auf welcher die Gefässe radial befestigt wurden und die mit 6 Umdrehungen pro Minute drehte.

Die Versuchszeit in der Batterie und im «Handbetrieb» mit Spritze und Zentrifuge war für 25 Verteilungsschritte etwa gleich lang und betrug 1 Woche. Das letztere Verfahren war präziser und ermöglichte gelegentliche Phasenvolumenverschiebungen zu berücksichtigen.

5) *Zerlegung des Gemisches von Albumin und Gammaglobulin.* Temperatur  $-5^{\circ} \pm 0,5^{\circ}$ ; pH 7,3  $\pm 0,15$  nach Verdünnen 1:5.

Proteinfreies Phasenpaar: Gesamtzusammensetzung Gew. % wasserfreie Komponenten: 11,25 Diäthylcarbitol 0,8 NaH-Glycerophosphat, 14,6 Na<sub>2</sub>-Glycerophosphat, 73,3 Wasser. Phasendichteunterschied 0,108 g/ml.

Proteinhaltiges Ausgangssystem: 1% Albumin, 1% Gammaglobulin, im übrigen wie proteinfreies Gemisch weniger 2% Wasser. Phasendichteunterschied 0,116 g/ml.

Multiplikative Verteilung: Erstes proteinhaltiges Phasenpaar 6,8 ml obere, 13,2 ml untere Phase mit einem Gehalt von ca. 250 mg Albumin und 170 mg Gammaglobulin. Phasenvolumen je 6,5 ml obere 13,2 ml untere Phase. 12 Verteilungsschritte. Phasentransport von Hand. Mischen je 20 Min. Zentrifugieren je 15 Min. bei 50–150 g. Fraktionen 1–13.

Untersuchung der Phasen nach der Verteilung: Von jeder Unter- und Oberschicht wurde je 1 ml abpipettiert, auf 3,0 ml verdünnt und ihre Extinktion bei 280 m $\mu$  gemessen. Der Blindwert wurde am proteinfreien Gemisch in gleicher Weise ermittelt und abgezogen. Der Rest der Phasenpaare wurde mit 1 ml Wasser homogenisiert, in VISKING-Dialysierschläuchen audialysiert, wobei sich die Lösungen stark verdünnten, und gefriergetrocknet. Von jeder Fraktion und vom Ausgangsgemisch wurde eine Papierelektrophorese in Diäthylbarbiturat-Puffer pH 8,6, 0,15M im LKB-Apparat (LKB-PRODUKTER AB, Stockholm) ausgeführt und mit Amidoschwarz angefärbt.

6) *Die Verteilung von Human-Serum.* Temperatur  $-7,5 \pm 0,5^{\circ}$ .

Proteinfreies Gemisch, Gew. % wasserfreie Komponenten: 11,6 Diäthylcarbitol, 15,8 Na<sub>2</sub>-Glycerophosphat, 72,6 Wasser, ferner 5 mg Ascorbinsäure pro 100 g System zur Reduktion von Peroxid. Dichteunterschied 0,102 g/ml.

Im proteinhaltigen Gemisch von 50 g wurden 10 g Wasser durch Normalserum zu 7% Protein ersetzt. Nach dem Scheiden der Phasen befand sich ein Teil der Serumproteine ungelöst in der Phasengrenzfläche. Die Rückstandsbestimmung in den klaren Schichten ergab nach dem Audialysieren einen Proteinrückstand von 600 mg pro 40 ml Phasenpaar, dem Volumen das zur multiplikativen Verteilung in den 2 ersten Gefässen eingesetzt wurde.

Die multiplikative Verteilung wurde über 24 Verteilungsschritte mit je 10 ml Ober- und Unterphase wie bei der Trennung von Albumin und Gammaglobulin geführt. Da die Zentrifuge nur 16 Gläser auf einmal fassen konnte, wurde vom 15. Verteilungsschritt an mit jedem Verteilungsschritt ein Glas im Wechsel am Anfang und am Ende der Reihe beiseitegestellt. Diese Gefässe enthielten je eine Unter- bzw. Oberschicht, die als Fraktionen 1–4 bzw. 25–21 unverändert aufbewahrt wurden. Am Ende der Verteilung lagen vor: Fraktionen 1–4 mit Unterphasen, 5–24 mit Phasenpaaren, 21–25 mit Oberphasen. Sie mussten Komponenten enthalten, deren Verteilungskoeffizienten mit der Fraktionsnummer zunahm.

Untersuchung der Fraktionen. Die Zugabe der Ascorbinsäure als Antioxidans verhinderte wegen ihrer hohen Extinktion bei 280 m $\mu$  die Bestimmung des Proteins durch Absorptionsmessung. An ihrer Stelle wurden die Rückstände nach dem Dialysieren bis zur Salzfreiheit und Gefrieretrocknen gewogen (Werte s. Fig. 2). Jede Fraktion wurde papier-elektrophoretisch untersucht. Um das relative Mengenverhältnis der elektrophoretisch unterscheidbaren Proteine zu schätzen, wurden die mit Amidoschwarz gefärbten Zonen ausgeschnitten, mit Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung eluiert und bei 625 m $\mu$  kolorimetriert. Die Grundfärbung des Papiers wurde in jedem Streifen durch Abzug des ermittelten Blindwertes berücksichtigt. Aus den Rückstandsgewichten und dem Verhältnis der Proteinkomponenten liess sich die Menge der Proteine in jeder Phase abschätzen. Sie sind in Fig. 2 angegeben. Die Immunoelktrophoresen der Fraktionen 1, 4, 8, 12, 15, 19 und 25 wurden im Zentrallaboratorium des Blutspendedienstes nach der Methode von GRABAR & SCHEIDEGGER<sup>13)</sup> ausgeführt.

<sup>13)</sup> P. GRABAR & C. A. WILLIAMS, *Biochim. biophys. Acta* 17, 67 (1955); J. URIEL, J. J. SCHEIDEGGER, *Bull. Soc. chim. biol.* 37, 165 (1955); J. J. SCHEIDEGGER, *Int. Arch. of Allergy and Applied Immunology* 7, 103 (1955).

7) *Reinheitsprüfung von Gammaglobulin*. Um das Gammaglobulinverteilungsmaximum ungefähr in die Mitte der Fraktionenreihe zu bringen, wurde das System Diäthylcarbitol- $\text{Na}_2$ -Glycerophosphat-Sorbit-Wasser, Tabelle I E 1, Dichteunterschied 0,1 g/ml, pH 8,7 nach Verdünnen 1:5 mit 16,5 und 33,5 ml oberer bzw. unterer Schicht gewählt. Die Proteinkonzentration betrug 1%. 20 Verteilungsschritte wurden nach der Arbeitsweise ausgeführt, wie sie beim Normalserum angewendet worden war. Die dialysierten und gefriergetrockneten Fraktionen 14–20 wurden vereinigt und in derselben Weise ein zweites Mal in Phasenvolumen von 6 und 12 ml oberer bzw. unterer Phase verteilt. Ein Teil des Proteins ging freilich nicht mehr in Lösung.

In einem zweiten gleichen Versuch wurden die Fraktionen 0–4, 5–11, 12–16, 17–20 vereinigt und das Protein isoliert. Sie dienten der elektrophoretischen und immunochemischen Untersuchung. Ferner wurden die optische Drehung der drei ersten Gruppen, des Ausgangsmaterials und des unverteilten Proteins aus dem 1. Phasenpaar im Phosphat-Puffer pH 7,5, 0,1 M, im 1-dm-Rohr gemessen. Zur Verfügung stand ein ZEISS-Polarimeter mit subjektiver Ablesung mit Natriumlampe.

Die Sedimentationsgeschwindigkeiten in 1-proz. Lösung in demselben Puffer wurden in einer PHŮWE-Ultrazentrifuge bei 45000 T/min bei  $20^\circ \pm 1^\circ$  bestimmt. Die auf Temperatur und Viskosität korrigierten Sedimentationskonstanten aller Fraktionen lagen wie diejenige des Ausgangsmaterials zwischen 5,9 und 6,0 SVEDBERG-Einheiten.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Nahezu kritische wasserreiche Phasenpaare aus Diäthylenglykoldiäthyläther, Ortho- oder Glycerophosphaten, Magnesiumsulfat oder Polyalkoholen, wie Sorbit, lösen im pH-Bereich von 5–9 die Hauptmenge der Serumproteine. Diese verteilen sich mit unterschiedlichen Verteilungskoeffizienten in den Phasenpaaren und werden bei Temperaturen unter  $+1^\circ$  nur z. T. denaturiert. Sie behalten ihre immunochemische Aktivität. Die Verteilungskoeffizienten und die optische Drehung von Albumin und Gammaglobulin ändern sich nur sehr wenig, wenn diese Proteine über längere Zeit in diesen Phasenpaaren gelöst bleiben. Gammaglobulin verliert aber z. T. allmählich seine Löslichkeit.

Die Phasenpaare sind zu mehrstufigen GRAIG'schen Gegenstromverteilungen benutzt worden. Ein Gemisch von Albumin und Gammaglobulin konnte schon in 12 Verteilungsschritten zerlegt werden. Die getrennten Proteine wurden durch Dialyse und Gefrier Trocknung isoliert. In einer 24-stufigen Verteilung von Normalserum reicherten sich die Serumkomponenten in verschiedenen Fraktionen an. Nur Haptoglobin und Gammaglobulin konnten in immunoelektrophoretisch reiner Form in den ersten bzw. in der letzten Fraktion isoliert werden.

Die Verteilung von Albumin- und Gammaglobulin-Präparaten wurde mit berechneten Verteilungen idealer Komponenten verglichen, um ihre Einheitlichkeit zu prüfen. Bei kristallisiertem Humanalbumin deckten sich die experimentellen und berechneten Verteilungen innerhalb enger Fehlergrenzen, was für ein reines Präparat spricht. Bei Gammaglobulin dagegen war das Protein über alle Phasenpaare verteilt. Eine Trennung verschiedener Gammaglobuline ist wahrscheinlicher, als dass dieser Befund durch Denaturierung des Proteins im zweiphasigen Gemisch vorgetäuscht worden ist.

Diese Untersuchungen wurden zeitweise vom SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS unterstützt, wofür ich seinen Organen bestens danke. Dem Zentrallaboratorium des Blutspendedienstes danke ich für die Überlassung von Proteinpräparaten und Herrn Dr. R. BÜTLER für die Ausführung der Immunoelektrophoresen. Ferner danke ich den Herren F. RUDIN, F. BECK und B. KÜNZI und Fräulein S. KIPFER für ihre ausdauernde Mitarbeit bei den Versuchen.

THEODOR KOCHER INSTITUT der Universität Bern