

34. Die Fraktionierung von Serumproteinen mit flüssigen Phasenpaaren

3. Mitteilung [1]

Eine Zentrifuge für Gegenstromverteilung

von P. v. Tavel und W. Bolliger

Theodor Kocher Institut der Universität Bern

(12. I. 68)

Zusammenfassung. Eine Zentrifuge zur schrittweisen Gegenstromverteilung ist gebaut worden, mit welcher die Phasentrennung nach jedem Verteilungsschritt beschleunigt werden kann. Sie eignet sich für multiplikative Verteilungen mit nahezu kritischen Phasenpaaren und andern Systemen, deren Phasen sich nur langsam trennen. Die Zentrifuge enthält 40 Verteilelemente zu 27 ml und arbeitet voll automatisch auch im Kaltraum. Sie ermöglicht 3 Arbeitsweisen: Schrittweiser Transport der spezifisch leichteren oder der schwereren Phase, oder alternierender Transport beider Phasen im Gegenstrom. Ihre Trennschärfe ist geringer als die eines CRAIG'schen Apparates, da sich die überführten Phasenvolumina jeweils in die nächsten Elemente verdrängen. Versuche mit einer Komponente zeigen, dass die Verteilungen den berechneten Werten nahezu entsprechen, wenn pro Verteilungsschritt weniger als $\frac{3}{4}$ des Volumens an mobiler Phase in einem Element verschoben werden. Die Trennschärfe eines CRAIG'schen Apparates wird mit der Zentrifuge erst nach einer höheren Schrittzahl erreicht.

Polyäthylenglykol von \bar{M}_w 30000 wurde in Fraktionen verschiedener Viskosität, d.h. verschiedenen mittleren Molekulargewichts, zerlegt. Ein als einheitlich angesehenes Human-Serumalbumin zeigte eine kleine Nebenkomponente, die auch elektrophoretisch nachzuweisen war.

1. Einleitung. – Die Gegenstromverteilung eines Substanzgemisches zwischen zwei nicht mischbaren Lösungsmitteln hat sich für die Zerlegung der verschiedensten Gemische relativ niedermolekularer Verbindungen bewährt. CRAIG und Mitarbeiter haben mit dieser Methode Peptide getrennt [2]. Vereinzelt ist auch die Zerlegung von Proteingemischen gelungen, wo geeignete zweiphasige Lösungsmittelsysteme gefunden werden konnten [3]. Der allgemeinen Anwendung der Gegenstromverteilung zur Fraktionierung von Proteinen stehen zwei Schwierigkeiten entgegen: 1. fällt es schwer, Phasenpaare zu finden, die Eiweissverbindungen ausreichend lösen ohne sie zu denaturieren; 2. ist die Verteilung makromolekularer Verbindungen in einem gegebenen Lösungsmittelpaar umso einseitiger, je grösser ihr Molekulargewicht ist. Da einander ähnliche makromolekulare Verbindungen in der Regel in dieselbe Phase gehen, ist ihre Trennung mit Gegenstromverteilung schwierig.

ALBERTSON [4] verwendet als Phasenpaar die beschränkt mischbaren wässrigen Lösungen zweier geeigneter hochmolekularen Verbindungen, z.B. Dextran und Polyäthylenglykol. Solche Phasenpaare enthalten bis zu 98% Wasser und lösen Proteine gut. Sie trennen sich aber oft nur langsam und die Proteinkomponenten lassen sich schwer wieder isolieren.

In früheren Untersuchungen [1] wurde gezeigt, dass sich Phasenpaare von 3 und mehr Komponenten, deren Zusammensetzung nahe beim kritischen Punkt liegt, zur Verteilung von Proteinen eignen können. Wenn die Systeme einen hohen Wasser-

gehalt in beiden Schichten aufweisen, lösen sie z. B. Serumproteine in brauchbarer Konzentration mit unterschiedlichem Verteilungskoeffizienten.

Wenn sich die Phasenzusammensetzung vom kritischen Punkt entfernt, verschiebt sich der Verteilungskoeffizient makromolekularer Verbindungen sehr schnell nach extrem hohen oder niederen Werten. Derartige Verbindungen lassen sich deshalb noch in nahezu kritischen Systemen fraktionieren, in welchen sich niedermolekulare Stoffe ohne Unterschied mit praktisch gleicher Konzentration in beide Phasen verteilen. Für Proteinfractionierungen eignen sich nur wenige koexistente Phasenpaare eines Mehrkomponentensystems. Ihre Auswahl ist einerseits durch die Nähe des kritischen Punktes beschränkt, wo wegen der Ähnlichkeit der beiden Phasen keine Differenzierung der gelösten Komponenten möglich ist. Andererseits sinkt die Löslichkeit der Proteine mit zunehmendem Phasenunterschied rasch ab.

BRÖNSTED [5] hat gezeigt, dass der Logarithmus des Verteilungskoeffizienten makromolekularer Verbindungen gleicher Konstitution mit deren Molekulargewicht wächst. Die Gegenstromverteilung muss sich deshalb auch zur Zerlegung polymerhomologer Reihen synthetischer Polymerer eignen. In der Literatur sind entsprechende Versuche bereits bekannt [6]. Bei hohen Molekulargewichten wird man hiezu Phasenpaare nahe am kritischen Punkt verwenden.

In der Proteinchemie sind heute eine grosse Zahl sehr leistungsfähiger Methoden bekannt, mit welchen viele Enzyme und Proteine aus biologischem Material isoliert worden sind. Sie trennen meist nach der Molekelgrösse (z. B. Gelchromatographie) und Ladung (Elektrophorese, Ionenaustauschchromatographie). Die Gegenstromverteilung bietet den Vorteil, nicht nur nach der Molekelgrösse sondern auch nach feineren konstitutionellen Unterschieden zu differenzieren. Der entscheidende Parameter ist der Verteilungskoeffizient oder das Verhältnis der Aktivitätskoeffizienten in beiden Phasen. In ihnen kommt die Summe aller Wechselwirkungen zwischen gelösten Teilchen und dem Lösungsmittel zum Ausdruck. Die Gegenstromzerlegung lässt sich in weiten Grenzen multiplikativ steigern. Die Verteilung erfolgt in übersichtlicher Weise, so dass man sie berechnen und aus dem Vergleich von Experiment und Berechnung wichtige Angaben über die erzielte Zerlegung eines Gemisches gewinnen kann.

Die Durchführung multiplikativer Verteilungen von Proteinen in nahezu kritischen Lösungsmittelpaaren ist dadurch wesentlich erschwert, dass sich die Flüssigkeitsschichten nach der Gleichgewichtseinstellung nur sehr langsam, oft erst nach Stunden, entmischen. Um diese Schwierigkeiten zu überwinden, haben wir eine vielstufige Gegenstromverteiltrennzentrifuge gebaut, in welcher die Schichtentrennung durch Zentrifugieren beschleunigt wird. In der vorliegenden Arbeit werden ihre Konstruktion sowie Versuche zur Prüfung ihres Wirkungsgrades beschrieben. Über ihre Anwendung zur Fraktionierung von Proteinen soll später berichtet werden.

2. Die Verteiltrennzentrifuge. – 2.1. *Prinzip.* Auf einer senkrechten drehbaren Scheibe sitzen zylindrische Glasgefässe radial angeordnet (Fig. 1). Je eine radial innen liegende Öffnung eines Glases ist mit einer aussen liegenden des nächsten verbunden, so dass ein kontinuierliches Leitungssystem entsteht. Die Zu- und Ableitung des Leitungssystems führen durch die Welle und deren Enden zu den ruhenden Teilen der Apparatur. Das System wird vollständig mit dem Phasenpaar so gefüllt, dass jedes

Gefäß gleiche Mengen der beiden Flüssigkeiten enthält. Dreht sich die Scheibe schnell genug, so befindet sich in jedem Element die schwerere Phase aussen, die leichtere innen. Man kann leichte Phase von einem Wellenende her durch die schwere Phase im 1. Gefäß pressen, wo sie die leichte Phase in das nächste Glas vedrängt. Aus jedem Element wird die leichte Flüssigkeit durch die schwere Schicht des folgenden hindurch gedrängt, bis aus dem letzten eine dem eingepumpten Volumen entsprechende Menge an leichter Phase durch das Wellenende austritt. Sofern die Phasen sich dank genügender Zentrifugalkraft sofort entmischen, bleibt das Phasenvolumenverhältnis in jedem Gefäß während des ganzen Vorgangs unverändert. Analog lässt sich in umgekehrter Richtung schwere Phase durch die Gläserreihe treiben, wobei sie die leichtere Phase durchströmt.

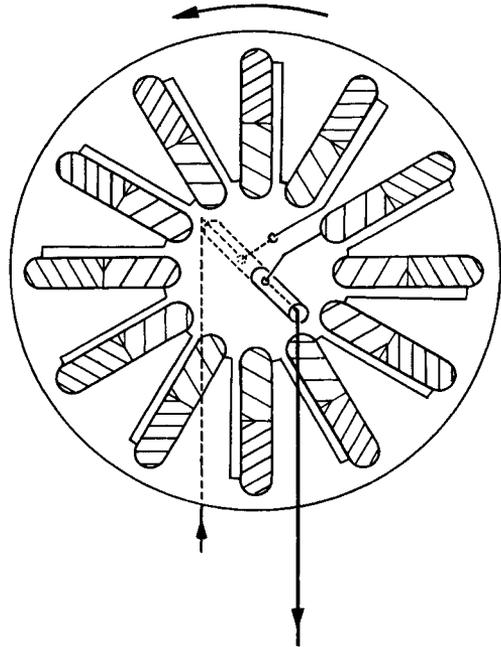


Fig. 1.
Anordnung der Verteilgefäße auf der drehbaren Scheibe, Zu- und Ableitung durch die Welle.

Ein Schritt der multiplikativen Verteilung vollzieht sich in 3 Arbeitsgängen: 1. Mischen der Phasen bei langsamer Drehzahl zur Einstellung des Verteilungsgleichgewichts. 2. Zentrifugieren zur Scheidung der Phasen. 3. Einpressen eines Phasenvolumens bewegter Phase, während die Drehzahl so weit herabgesetzt ist, dass die Schichten gerade noch getrennt bleiben.

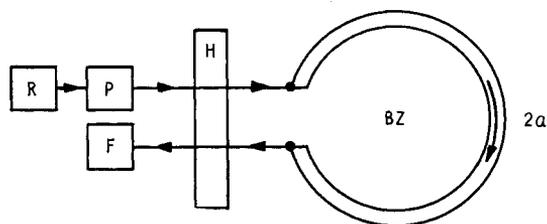
Ein elektrisches Gerät steuert automatisch die Drehzahl, die Pumpen und einen mehrfachen Hahn, der die Leitungen für jeden Arbeitsgang verbindet oder sperrt, und einen Fraktionensammler für die austretenden Proben.

Dieses Bauprinzip ermöglicht 2 Arbeitsweisen (Fig. 2a):

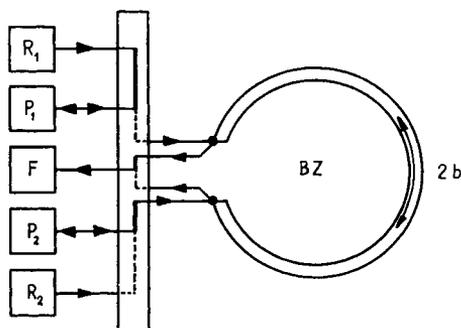
1. Die Bewegung der leichten Phase allein, wobei die Gemischkomponenten aus dem 1. Glas umso schneller durch die Batterie hindurch eluiert werden, je grösser ihr Verteilungskoeffizient ist.

2. Die Bewegung der schweren Phase allein, wobei die Komponenten mit kleinerem Verteilungskoeffizienten schneller verschoben und extrahiert werden.

Fig. 2. Leitungsführung für Phasentransport



a) Transport einer Phase



b) Alternierender Phasentransport

R	Phasenreservoir	Hahnstellung 1	alles gesperrt
P	Pumpe	Hahnstellung 2	—————
F	Fraktionensammler	Hahnstellung 3	alles gesperrt
BZ	Batterie auf Zentrifuge	Hahnstellung 4	-----
H	Hahn		

Man kann noch eine 3. Arbeitsweise anwenden, wenn für jede Phase eine Pumpe vorgesehen ist (Fig. 2b). Alternierend werden je 1 Volumen schwerere und leichtere Phase injiziert, welche die Batterie in entgegengesetzter Richtung durchlaufen. Im Fraktionensammler fängt man abwechselnd schwere bzw. leichte Proben auf. Der Hahn arbeitet in 4 Schritten, zwei Arbeits- und zwei Ruhestellungen. Das zu trennende Gemisch wird in der Mitte der Batterie zugefügt. Komponenten, deren Verteilungszahl nahe bei 1 liegt, verbleiben am Ort, während die andern umso rascher eluiert werden, je einseitiger sie sich auf die Phasen verteilen.

2.2. Die technische Ausführung (Gesamtansicht vgl. Fig. 3). 40 zylindrische Gläser sind radial auf zwei senkrechten, auf einer Welle sitzenden Scheiben angeordnet. Die Verteilelemente fassen 27 ± 1 ml. Sie sind mit Polyäthylenstopfen mit Gummifüllung verschlossen, die ein kurzes und ein langes bis zum Boden reichendes rostfreies Stahlrohr von 3,5 mm Durchmesser halten (Fig. 4).



Fig. 3. Verteilzentrifuge

Von links nach rechts Phasenreservoir, Pumpen, Steuergerät davor Fraktionensammler, Verteilzentrifuge links unten zentraler Hahn, rechts Antrieb.

Das kurze Rohr bildet die oben erwähnte radial innere, das lange die äussere Öffnung. Die Elemente werden in einem Gestell, in welchem sie parallel und senkrecht stehen, gefüllt, verschlossen und mit Polyäthylenschläuchen verbunden. Danach schiebt man je 20 Gläser vom Gestell an eine Scheibe und befestigt sie mit Federklammern ohne die Verbindungen zu lösen. Die beiden Sätze werden untereinander und mit den Übergangsstücken an den Wellenenden verbunden, welche die Überführung der Flüssigkeit von den ruhenden zu den drehenden Teilen gewährleisten.

An den Wellenenden ragen genau zentrierte Stahlrohre 4 cm weit heraus, auf welche dicht passende Stücke aus glasfaserverstärktem Teflon aufgesteckt sind. Diese sind nur leicht gehalten, so dass sie allfälligen exzentrischen Bewegungen der Stahlrohre ohne Widerstand folgen, ohne sich mitzudrehen. Phasenflüssigkeit wirkt als Schmiermittel. Ihr Verlust ist so gering, dass er nicht ins Gewicht fällt. Die Teflonstücke sind wieder mit Polyäthylenschlauch mit dem zentralen Hahn ver-

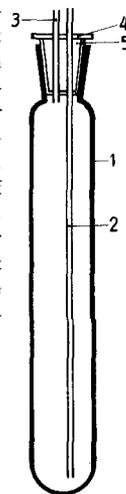


Fig. 4. Verteilelement

1 Glas, 2 langes Rohr, 3 kurzes Rohr, 4 Polyäthylen-Stopfen, 5 Gummifüllung

bunden. Alle Leitungen zwischen Apparateilen sind aus Polyäthylenschläuchen hergestellt, die ineinander gesteckt werden können. Wegen der kleinen innern Durchmesser von 2–4 mm erwiesen sich diese Verbindungen als genügend druckfest.

Als Pumpen dienen Injektionsspritzen zu 20 ml. Ihre Kolbenstangen sitzen auf Zapfen an den Enden eines Balkens, der um einen Drehpunkt in der Mitte schwingt. Mit jeder Schwenkung des Balkens wird eine Spritze gefüllt, die andere entleert. Der zentrale Hahn verbindet sie abwechselnd mit dem Phasenvorrat oder mit der Zentrifuge. Die Einspritzvolumina werden durch den Ausschlag des Balkens über verstellbare Endschalter bestimmt, welche seinen Antriebmotor steuern.

Der zentrale Hahn und die Verbindungen zwischen den Apparateilen sind in Fig. 5 schematisch dargestellt. Das Hahnkükken mit Einkerbungen besteht aus rostfreiem Stahl, der Mantel aus glasfaserverstärktem Teflon, in welches Stahlröhrchen als Anschlußstutzen für die Polyäthylenschläuche eingelassen sind. Der Hahn besteht aus 2 Sektionen, jede ausgerüstet mit den

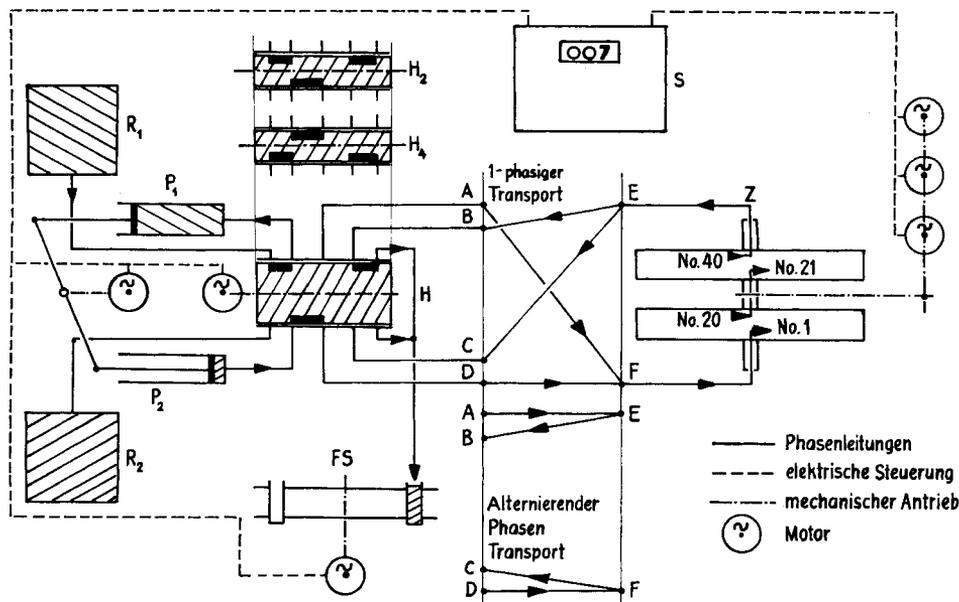


Fig. 5. Verbindungen der Verteilzentrifuge

Transport 1 Phase (Phase 1 = Phase 2) AF, DF, EB, EC, Alternierender Phasentransport AE, DF, EB, FC

FS Fraktionensammler H Hahn Hahnstellungen H_1, H_3 alles gesperrt

H_2 Transport Phase 2, H_4 Transport Phase 1

P_1, P_2 Pumpen für Phase 1 bzw. 2

R_1, R_2 Phasenreservoir für Phase 1 bzw. 2

S Steuergerät Z Verteilzentrifuge

Anschlüssen für die Zu- und Ableitungen für eine Pumpe und zum Fraktionensammler. Er dreht sich stets in gleicher Richtung, in 4 Schritten pro Umgang. Nach Schritt 1 und 3, während des Mischens und Zentrifugierens, sind alle Leitungen gesperrt. Nach Schritt 2 und 4 ist je eine der Spritzen mit dem Phasenvorrat verbunden, die andere mit dem Einlauf in die Batterie und deren Auslauf mit dem Fraktionensammler.

Im *alternierenden* Betrieb fördert die eine Spritze stets die leichte, die andere die schwere Phase und die Zufuhr der Phasen zur Batterie erfolgt im Wechsel von beiden Seiten her. Da an jedem Wellenende nur eine Leitung zugeführt wird, fließt von der Batterie zum Teflonstutzen abwechselnd leichte und schwere Phase hin und her durch denselben Schlauch. Nach dem Übergangsstück teilt sich die Leitung zum Hahn in einen Zweig für die Zufuhr und einen für die Ableitung, die beide an derselben Hahnsektion angeschlossen werden (Fig. 5, A-E, F-C, D-F, E-B).

Bei *einphasigem* Betrieb dagegen gehen diese Zweige zu verschiedenen Hahnsektionen, weil von beiden Pumpen die Phase stets an dasselbe Wellenende zu führen ist, während die Fraktionen vom andern Ende abwechselnd über die beiden Hahnsektionen abfließen (Fig. 5, A-F, D-F, E-C, E-B).

Es hat sich bewährt, alle Leitungen zu schliessen, solange die Flüssigkeit nicht zirkulieren muss.

Die Scheibe wird durch 3 Motoren mit Getriebe auf 800–900 U/min zum Zentrifugieren, auf ca. 100 U/min während des Phasentransportes und mit etwa 12 U/min zum Mischen angetrieben. Das entspricht 90 und 200 g innen bzw. aussen in den Gläsern beim Zentrifugieren und 1,2 bzw. 2,7 g beim Phasentransport. Die Motoren werden abwechselnd elektromagnetisch an die Vorgelegewelle gekuppelt. Die Steuerbefehle hierzu kommen vom zentralen Gerät her. Fig. 3 zeigt die ganze Anlage.

Da die leichte Phase in jedem Gefäss durch die Gegenphase geführt wird, muss sie den durch die Zentrifugierung verursachten hydrostatischen Druck der schweren Phase überwinden, um in die nächste Zelle zu gelangen. Analog muss die transportierte schwere Phase entgegen der Zentrifugalkraft durch die innere Öffnung ins folgende Element fliessen. Der Druck, welcher dem Einpressen einer Phase dadurch entgegensteht, ist proportional der Gefässzahl, der Schichthöhe der Gegenphase in jedem Gefäss, dem Phasendichteunterschied und der Zentrifugalbeschleunigung. Er kann auf mehrere Atmosphären ansteigen. Für den Phasentransport muss daher die Drehzahl möglichst tief gehalten werden, aber noch so hoch, dass die Schichten in jedem Element getrennt bleiben. Während des Zentrifugierens werden die Gläser von einem durch die rasche Drehung der Scheiben erzeugten Luftstrom aus dem temperaturkonstanten Raum umspült, in welchem die Maschine steht, so dass keine Erwärmung der Gläser stattfindet.

Die Regelung der Arbeitsgänge erfolgt vom zentralen Steuergerät aus. Die Misch- und Zentrifugierzeiten können unabhängig zwischen 1 und 20 Min. gewählt werden. Die Dauer des Einspritzvorganges richtet sich nach dem Strömungsdruck und dem Volumen. Jeder Arbeitsgang kann auch einzeln ausgelöst werden. Im Dauerbetrieb folgt ein Zyklus automatisch dem andern. Ein Zähler gibt die Anzahl vollzogener Verteilschritte an.

In den gebräuchlichen Gegenstromverteilapparaten werden die Phasenpaare vollständig getrennt bevor die mobilen Phasen ins nächste Element gegeben werden. In der Verteilzentrifuge wäre diese Massnahme zu kompliziert gewesen. Dadurch, dass sich die einzelnen Portionen bewegter Phase verdrängen, ist eine Vermischung der verdrängten mit der nachfolgenden Flüssigkeit nicht zu vermeiden. Anteile der in der bewegten Phase gelösten Substanz können daher zurückbleiben oder ein Element überspringen. Diesem Nachteil kann dadurch begegnet werden, dass jeweils nur ein Bruchteil (z. B. $\frac{3}{4}$) des Phasenvolumens, das sich in einem Gefäss befindet, übergeführt wird. Das ist bei der Einstellung der Verteilungszahl, dem Verhältnis der übergeführten zur verbleibenden Substanzmenge, mit dem Phasenvolumenverhältnis zu berücksichtigen.

Die beschriebene Verteilzentrifuge hat sich auch im Kaltraum bei $+ 1^\circ$ gut bewährt, wo mehrere multiplikative Verteilungen zu über 200 Schritten ausgeführt worden sind. Die Baumaterialien (Glas, Stahl, Polyäthylen, Teflon) erwiesen sich als genügend resistent und quellfest für Lösungsmittelsysteme, die Diäthylcarbitol, Tetrahydrofuran, Alkohol und wenig Chloroform enthielten, nicht aber für solche mit Trichloräthylen, welches die Gummifüllungen der Stopfen zum Quellen brachte. Bei alternierendem Phasentransport kann nur eine beschränkte Anzahl von Verteilschritten vorgenommen werden, weil sich in den Gefässen an den Enden und in der Mitte der Batterie das Phasenvolumenverhältnis allmählich ändert. Dies rührt daher, dass die Zuleitungen zur Batterie sowohl für die Zufuhr von Phase als auch für die Entnahme der Fraktionen verwendet werden müssen.

3. Berechnung der Verteilungskurven. – Das Verteilverfahren mit der Zentrifuge entspricht prinzipiell dem CRAIG'schen Verteilprozess und lässt sich wie dieses berechnen. Es unterscheidet sich lediglich dadurch, dass in einem Verteilungsschritt nicht die ganze in einem Element enthaltene bewegte Phase überführt wird, sondern nur ein Bruchteil $a < 1$. Die nach n Verteilungsschritten im Gefäss No r (gezählt von 0 bis n) enthaltene Menge einer gelösten Komponente T ist nach [2] [7]

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

G ist die Verteilungszahl. Sie gibt das Verhältnis der Substanzmenge an, die pro Verteilungsschritt von einem Element zum andern überführt wird, zu der in der Zelle verbleibenden Menge. Wenn in einem Gefäss die Gesamtmenge 1 einer Komponente gelöst ist und p die Menge in der bewegten Phase bezeichnet, so ist bei einem Verteilungskoeffizienten k und dem Phasenvolumenverhältnis v_b/v_{st} (b bewegt, st stationär):

$$K = k v_b/v_{st}, \quad p = \frac{K}{1+K}, \quad (2)$$

$$G = \frac{a p}{1 - a p}. \quad (3)$$

Die Lage des Verteilungsmaximums kommt in das Glas Nr. r_{max}

$$r_{max} = \frac{nG}{1+G} = n a \phi \tag{4}$$

zu liegen, wenn n grösser als 25 und G nicht stark von 1 abweicht.

Bei nur partiellem Phasentransport ($a < 1$) wird die Anreicherung einer Komponente in einer Zelle unvollständig ausgenützt. Die Trennschärfe ist bei diesem Verfahren gegenüber dem vollständigen Transport ($a = 1$) vermindert, und zwar umso mehr, je kleiner der übergeführte Phasenbruchteil (a) ist. Bei partiellem Phasentransport ($a < 1$) kann für eine Komponente dieselbe Verteilung innerhalb gewisser Grenzen erzielt werden, wie sie bei vollständigem Transport ($a = 1$) erhalten würde. Hierzu muss das Phasenvolumverhältnis nach (2) und (3) so gewählt werden, dass die Verteilungszahlen für beide Fälle gleich werden. Es ist aber dann für alle andern Komponenten des Gemischs festgelegt und damit ihre Verteilungszahlen. Der Anreicherungsfaktor $\beta = G_A/G_B$, das Verhältnis der Verteilungszahlen der Stoffe A und B , wird kleiner als bei vollständigem Phasentransport. Um dieselbe Trennschärfe zu erreichen, müssten eine grössere Anzahl Verteilungsschritte ausgeführt werden.

Tabelle 1 illustriert diese Zusammenhänge an einigen Zahlenbeispielen.

Tabelle 1. Verteilungszahlen und Anreicherungs Faktoren bei verschiedenen Bruchteilen übergeführter leichter Phase

a	v_b/v_{st} um für $k = 1$ $G = 1$ werden zu lassen	G für $k = 0,5$	β $k = 1/0,5$	G für $k = 2,0$	β $k = 2/1$
1	1/1	0,5	2	2	2
0,85	1,43/1	0,54	1,83	1,69	1,69
0,75	2/1	0,60	1,67	1,5	1,5
0,67	3/1	0,66	1,5	1,34	1,34

Oft werden so viele Verteilungsschritte ausgeführt, dass das Maximum der Substanzmenge aus der Batterie austritt und in einer Fraktion erscheint. Numeriert man die Fraktionen mit $R (= n)$ gleich wie die Verteilungsschritte, so kann mit (4) entweder die Fraktion R_{max} bzw. der Verteilungsschritt n , bei welchem das Maximum aus der Batterie austritt, berechnet werden, wenn G bekannt ist, oder es können aus der experimentell ermittelten Lage des Maximums $R_{max} G$ und nach (3) und (2) k bestimmt werden.

Eine einheitliche, sich ideal verhaltende Komponente gibt in der Fraktionenreihe eine GAUSS'sche Verteilungskurve der Form [8]

$$S = S_{max} \cdot e^{-(x^2G/2n)}, \tag{5}$$

wobei x die Fraktionsnummer bedeutet, von $x = 0 = R_{max}$ aus nach rechts positiv, nach links negativ gezählt, S_{max} ist die Substanzmenge in der Fraktion $x = 0 = R_{max}$. Der Vergleich einer experimentell beobachteten Verteilung mit Gleichung (5) gibt Aufschluss darüber, ob eine Komponente sich einheitlich und ideal verhält.

Die Verteilung nach alternierendem Transport leichter und schwerer Phase liess sich durch Berechnung weniger Verteilungsschritte auch für m Doppelschritte er-

kennen. Wenn das Substanzgemisch ins Gefäss Nr. $r' = 0$ und jeweils derselbe Volumbruchteil a der beiden Phasen überführt wird, so entspricht die Verteilung den Produkten der Glieder der Reihen der beiden Binome:

$$[A + (1 - A)]^m \quad \text{und} \quad [(1 - B) + B]^m, \quad (7)$$

wo $A = a(1 - p)$ und $B = ap$ bedeuten.

Die Substanzmenge $S_{r'}$ in den Verteilelementen Nr. r' , von $r' = 0$ nach rechts positiv und nach links negativ gezählt, entsprechen den Gliedern i der Reihe

$$S_{r'} = \sum_{i=0}^{i=m+r'} A_i \cdot B_{(m+r')-i}, \quad (8)$$

wo A_i und B_i die Glieder der Binomialreihen (7) bedeuten. Sie werden null für Indices $> m$, da Binomialreihen mit dem m -ten Gliede abbrechen. Das Maximum der Reihe liegt beim Glied r'_{max} dessen Produktsumme das Produkt der Maxima der A - und B -Reihe enthält.

Die Substanzmengen in den Fraktionen $\pm R'$ lassen sich dadurch finden, dass man die aus der Batterie beim Verteilungsschritt $R' = m$ austretenden Substanzmenge berechnet.

4. Funktionsprüfungen an der Verteilentrifuge. – Vorerst wurden einheitliche Komponenten untersucht und ihre Verteilungskurven mit berechneten Werten verglichen. Die Trennungsmöglichkeit mehrerer Komponenten mit bekannten Verteilungskoeffizienten lässt sich aus den berechneten Verteilungen abschätzen, wenn die experimentellen Resultate mit einzelnen Komponenten den theoretischen Berechnungen entsprechen.

Zur Prüfung des Wirkungsgrades der Verteilentrifuge wurde Bernsteinsäure in unkritischen und später in fast kritischen Phasenpaaren verteilt. Als unkritisches Phasenpaar diente Isobutylalkohol-Wasser bei 20°. Für die Herstellung des fast kritischen Phasenpaares wurde Äthylalkohol bis nahe an den kritischen Punkt hinzugefügt. Bernsteinsäure verteilt sich zwischen Isobutanol und Wasser mit einem Verteilungskoeffizienten von $0,93 \pm 0,03$, der bis zu Konzentrationen von 60 mg/ml konstant bleibt.

In den Fig. 6–8 sind die experimentellen und berechneten Verteilungskurven einander gegenübergestellt. Die Abszissen sind seitlich so verschoben, dass sich die Maxima decken. Die theoretischen Kurven sind GAUSS'sche Verteilungskurven. Die Präzision der Verteilung kommt im Verhältnis q der Breite in halber Höhe zur grössten Höhe zum Ausdruck. Eine ungenaue Verteilung äussert sich in einer Verbreiterung der Glockenkurven und einer Erniedrigung ihres Maximums. Die Trennschärfe wird vermindert. Um verschiedene Versuche miteinander zu vergleichen, wurde ein «Wirkungs-Quotient» $Q = q_{\text{theor}}/q_{\text{exp}}$ gebildet. Er erreicht bei theoretischer Verteilung den Wert 1 und wird umso kleiner, je mangelhafter der Prozess abläuft.

Die Verteilungskurven geben die Mengen Bernsteinsäure pro Phasenpaar in einer Zelle an, die titrimetrisch ermittelt wurden. Da die Phasenvolumina während der Verteilung oft schwankten, wurden zur Berechnung ihre Mittelwerte am Ende des Versuches eingesetzt. Die Versuchsbedingungen und Resultate sind in Tabelle 2 (S. 289) zusammengestellt.

In den Versuchen 1 und 2 (Fig.6) wurde die leichte bzw. die schwere Phase des unkritischen Phasenpaares bewegt. Pro Verteilungsschritt wurden 90 bzw. 96% des Volumens mobiler Phase eines Elementes transportiert. Die experimentellen Kurven sind daher breiter und niedriger als die berechneten mit Q -Werten von 0,66 bzw. 0,58, was auf eine Vermischung der verdrängenden mit der verdrängten Phase hinweist. Die Verteilungsmaxima liegen ziemlich genau im berechneten Element.

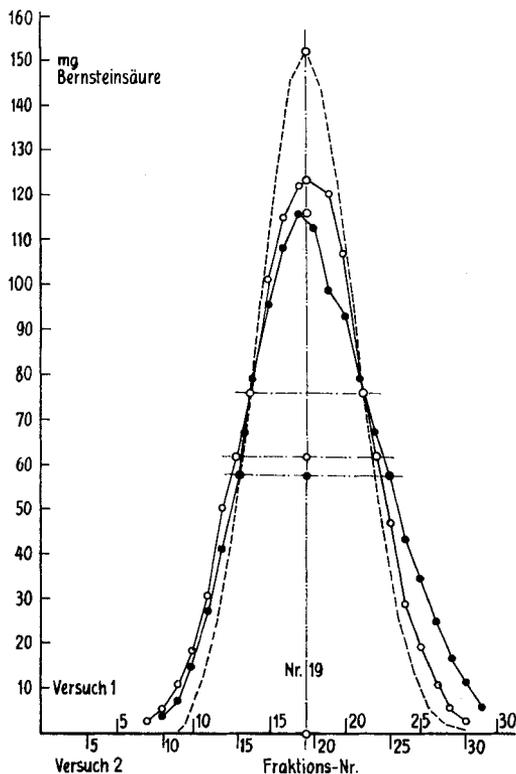


Fig. 6. Verteilung von Bernsteinsäure in Wasser-Isobutanol

Versuch 1 Transport leichter Phase ○—○—○—○
 Versuch 2 Transport schwerer Phase ●—●—●—●
 Berechnete Verteilung — — — — —

Im 3. Versuch wurden im gleichen unkritischen System alternierend die leichte und schwere Phase bewegt, aber im ganzen doppelt so viele Verteilungsschritte ausgeführt wie vorher. Die Phasenvolumina haben sich in diesem Versuch z. T. erheblich verändert, namentlich in den Gefäßen an den Enden und in der Mitte der Batterie. Das rührt daher, dass die Zuleitung frischer Phase und die Entnahme der Gegenphase im nächsten Schritt durch dieselben Zuführungsleitungen erfolgen müssen. Dadurch wird den Endgefäßen mit jedem Verteilungsschritt das Volumen der Zuleitung an abgehender Phase zu wenig entnommen und ein ebensolches Volumen ankommender Phase zu wenig zugeführt. So verschiebt sich mit jedem Verteilungsschritt das Phasen-

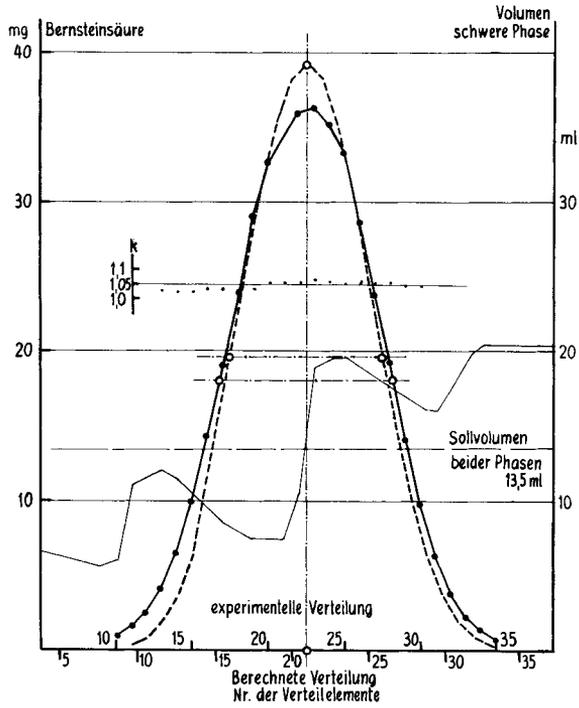


Fig. 7. Verteilung von Bernsteinsäure im fast kritischen System Isobutanol-Alkohol-Wasser
 Alternierender Phasentransport. Versuch Nr. 4 ●●●●●
 Berechnete Verteilung - - - - - Volumen schwerer Phase nach der Verteilung —————

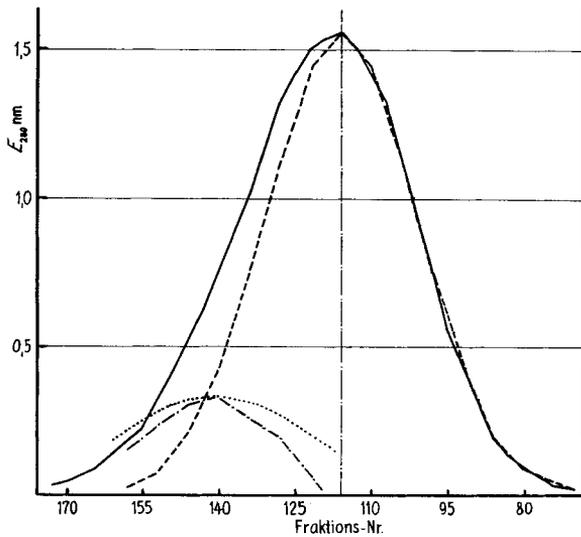


Fig. 8. Verteilung von Human Serumalbumin
 experimentelle Verteilung ————— berechnete Verteilung - - - - -
 Differenz exper.-ber. - · - · - · theor. Verteil. für Differenz ·······

volumen zugunsten derjenigen Phase, die aus dem Endgefäss als Fraktion entnommen wird. Bei der alternierenden Arbeitsweise bezweckt man die Substanzen mit mittlerem Verteilungskoeffizienten in der Mitte der Batterie zu sammeln. Die Volumenverhältnisse in den Randgefässen sind daher weniger wichtig. Auch in der Mitte der Batterie verschieben sich die Phasenvolumina in ähnlicher Weise, weil die Verbindung zwischen den Gläsergruppen von einer Scheibe zur andern länger ist als zwischen 2 Elementen. Da sich aber die Bernsteinsäure ungefähr mit gleicher Konzentration auf beide Phasen verteilt ($k \sim 1$), zeigt die Verteilungskurve trotzdem einen für 80 Verteilungsschritte mit fast vollständigem Phasentransport relativ guten Wirkungsquotienten.

 Tabelle 2. *Versuche mit Bernsteinsäure zur Funktionsprüfung der Verteilenzentrifuge*

Versuch Nr.	1 (Fig. 6)	2 (Fig. 6)	3	4 (Fig. 7)	5
2phasiges System	Isobutanol-Wasser, unkritisch			Isobutanol-Alkohol-H ₂ O fast krit. $\Delta d = 0,035 \text{ g/ml}^a$	DAC-MgSO ₄ -H ₂ O ^{b)} $\Delta d = 0,102 \text{ g/ml}$
bewegte Phase	leichte	schwere	alternierend	alternierend	leichte
Anzahl Gläser	40	40	40	40	40
Verteilungsschritte	40	40	80 (total)	80 (total)	120
Verteilungskoeffizient k	1,0	1,0	1,0	1,12	0,8
Übergeführter Phasenbruchteil a	0,9	0,96	1. Ph. 0,9/ s. Ph. 1,0	1. Ph. 0,71/ s. Ph. 0,75	0,67
Bernsteinsäure g in Glas Nr.	1,25	1,25	1,25	0,45	0,26
	1	40	21	21	1-4
<i>Experimentelle Verteilungskurve</i>					
Maximum in Zelle Nr.	18	19	22/23	22/23	35/36
$q_{\text{exp.}}$	0,183	0,214	0,469	0,314	0,271
<i>Berechnete Verteilungskurve</i>					
Maximum in Zelle Nr.	18	19	22/23	22/23	–
$q_{\text{theor.}}$	0,123	0,123	0,229	0,258	0,247
$Q = q_{\text{theor.}}/q_{\text{exp.}}$	0,66	0,58	0,49	0,822	0,91
a) Der Phasendichteunterschied Δd diente als relatives Mass für den Abstand der Systemzusammensetzung vom kritischen Punkt [1].					
b) DAC = Diäthylcarbitol.					

Im 4. Versuch wurde Bernsteinsäure mit einem nahezu kritischen Phasenpaar (Phasendichteunterschied 0,035 g/ml) verteilt, aber jeweils nur $\frac{3}{4}$ der mobilen Phasen transportiert. Der Wirkungsquotient steigt dadurch auf 0,82 (Fig. 7).

In einem weitem Versuch mit Bernsteinsäure in einem fast kritischen 2-phasigen System, wie es für die Fraktionierung von γ -Globulin zur Anwendung kam [1], wurde nur die leichte Phase bewegt. Mit einem transportierten Bruchteil von $\frac{2}{3}$ des Phasenvolumens und 120 Schritten wurde ein Wirkungsquotient von 0,9 erreicht. Mit diesen Bedingungen wird das Verteilungsmaximum bis an den Rand der Batterie verschoben.

Mit der Verteilzentrifuge haben wir Polyäthylenglykole von höherem mittlerem Molekulargewicht, nämlich zwischen 10000 und 30000, fraktioniert. In Vorversuchen erwiesen sich Phasenpaare aus Chloroform, Tetrahydrofuran, Äthylalkohol und Wasser als geeignet. Systeme aus Wasser-Trichloräthylen-Chloroform hätten eine wesentlich bessere Auftrennung nach dem Molekulargewicht ermöglicht, doch waren einige

Tabelle 3. Verteilung von Polyäthylenglykol, $\bar{M} = 30000$ (vgl. Fig. 9)

Lösungsmittelsystem:	17,6% (g/g) Tetrahydrofuran 30,0% (g/g) Äthylalkohol 17,3% (g/g) Chloroform 35,1% (g/g) Wasser
Temperatur	20,0 ± 0,3°
Dichteunterschied der Phasen	0,040 g/ml
Eingesetztes Material	2 g in Glas Nr. 1 und 2
Anzahl Gläser	40
Verhältnis leichte/schwere Phase	9/18 ml
transportiertes Phasenvolumen	7,2 ml leichte Phase
Anzahl Verteilschritte	150
Mischen	3 Min.
Zentrifugieren	bis 8. Verteilschritt 6 Min. dann 3 Min.
Lage des Verteil-Maximum in Fraktion Nr.	96
Verteilungszahl berechnet aus der Lage des Max.	1,1
Verteilungskoeffizient	2,15

Baumaterialien der Zentrifuge für diese Lösungsmittel ungeeignet, und die Bildung sehr stabiler Emulsionen, die auch durch Zentrifugieren nicht getrennt werden konnten, bereitete grosse Schwierigkeiten.

Fig. 9 zeigt die Verteilungskurve und die Viskosität der Fraktionen, die unter den in Tab. 3 angeführten Bedingungen erhalten wurden.

Da die Verteilung wesentlich breiter ist als die für ihr Maximum berechnete GAUSS-Kurve, muss das Präparat, wie zu erwarten, polydispers sein. Die spezifischen Viskositäten zeigen, dass die Fraktionen verschiedene mittlere Molekulargewichte enthalten. Die Molekulargewichte sind in den ersten grösser und fallen dann stetig ab, d. h. dass die Verteilungskoeffizienten mit dem Molekulargewicht zunehmen. In der Kurve der spez. Viskosität sind diejenigen Punkte angegeben, welche den Viskositäten des Ausgangsmaterials $\bar{M} = 30000$, sowie Präparaten $\bar{M} = 20000$ und $\bar{M} = 10000$ entsprechen.

Aus dem Versuch geht hervor, dass eine Zerlegung der polymerhomologen Polyäthylenglykole mit der Verteilzentrifuge im Prinzip möglich ist. Mit andern weniger kritischen Lösungsmittelpaaren müsste eine noch bessere Differenzierung möglich sein.

6. Experimentelle Angaben. – 6.1. *Nahezu kritisches System Isobutanol, Äthylalkohol, Wasser.* Temperaturkonstanter Raum, $T = 19,2^\circ \pm 0,5^\circ$. Isobutanol 28,0, Äthylalkohol 15,6, Wasser 56,4 Gew.%. Der Phasendichteunterschied betrug 0,035 g/ml. Er wurde mittels eines Tauchkörpers an einer Nylonsaite und einer Torsionswaage ohne Trennung der Phasen bestimmt.

6.2. *Das nahezu kritische System* für die Verteilung von Bernsteinsäure im Versuch Tabelle 2, Nr. 5 (System für γ -Globulin [1]), setzte sich zusammen aus:

MgSO ₄ · 7H ₂ O	605 g
Dinatriumglycerophosphat, 5H ₂ O (MERCK 4164)	102 g
Wasser	2620 g
Diäthylcarbitol (FLUKA 32190) destilliert	554 g

Bei + 1° schied sich das Gemisch in 2 Phasen im Volumverhältnis Ober- zu Unterphase 2:1. Der Phasendichteunterschied betrug 0,102 g/ml. Die Bernsteinsäurekonzentration durfte im 1. Phasenpaar 0,25% nicht überschreiten, um es nicht zu homogenisieren. Die Bernsteinsäure wurde in diesem System mit Kresolrot als Indikator titriert und ein Blindwert von 0,2 bzw. 0,17 ml 0,01N NaOH pro ml obere bzw. untere Phase abgezogen.

6.3. *Verteilung von Serumalbumin*. Gefriergetrocknetes Human-Serumalbumin (2 × krist.) SRK, einige Jahre bei 1° aufbewahrt.

Fast kritisches System: Diäthylcarbitol, Natriumglycerophosphat Wasser, bei 1,5° hergestellt auf Grund der Phasenanalyse [1].

Natriumglycerophosphat, 5H ₂ O (MERCK 4164)	771 g
Diäthylcarbitol (FLUKA) dest.	634 g
Wasser	2659 g

Das System scheidet sich in 2 Phasen: leichtere Phase 2750 ml, schwerere Phase 1100 ml; Phasendichteunterschied 0,096.

Albuminhaltiges Ausgangssystem:

Natriumglycerophosphat, 5H ₂ O	10,75 g
Wasser	30,5 g
Serumalbumin	2,75 g
Diäthylcarbitol	5,9 g

Die Bestandteile wurden bei 1,5° in der angeführten Reihenfolge gemischt. Die Lösung schied sich in 17 ml leichte und 27 ml schwere Phase. Die leichte Phase enthielt eine geringe Trübung, die sich nach einem Tag in der Grenzfläche abgesetzt hatte. Der Verteilungskoeffizient betrug 0,8. Zur Verteilung gelangten 12 ml untere und 15 ml obere Phase, total 1,5 g Albumin, die in die 1. Zelle gegeben wurden.

Multiplikative Verteilung: Batterie zu 40 Gläsern, 180 Verteilungsschritte. Übergeführte Phase je 10 ml obere Phase ($a = 2/3$). Der Albumingehalt in den Fraktionen wurde spektrophotometrisch bei 280 nm bestimmt, $E_{280}^{1\%} = 5,2$. Das ganze Albumin ist aus der Batterie in die Fraktionen übergetreten. Die Verteilungskurve ist in Fig. 8 wiedergegeben. Das Maximum befindet sich in Fraktion 116. Das Albumin wurde nicht aus den Fraktionen isoliert, da in diesem Zusammenhang nur die Verteilungskurve interessierte. Die theoretische Kurve wurde als GAUSS-Kurve nach (5) berechnet, indem ihr Scheitel in das Maximum der beobachteten Kurve gelegt wurde.

Die Gel-Elektrophorese wurde in Polyacrylamid mit dem Gerät von PLEUGER, Wijnegem, Belgien, nach [9] ausgeführt.

6.4. *Fraktionierung von Polyäthylenglykol*. Eingesetzte Polyäthylenglykole (PAG): PAG. \bar{M} 10000, FLUKA; PAG. \bar{M} 20000, FLUKA; Polyglykol HM 100, \bar{M} 30000 HOECHST.

Zur Bestimmung des *PAG-Gehaltes* in den Phasen wurden Proben in Kolben von 50 ml im Rotationsverdampfer eingedampft und im Vakuum über Phosphorpentoxid getrocknet.

Zur *Viskositätsbestimmung* wurden die Proben zu 1% in Wasser gelöst, durch eine G 3 Fritte filtriert und die Durchlaufzeiten in einem OSWALD-Viskosimeter für 0,5 ml bestimmt (Wasserwert 154").

Die Untersuchungen wurden vom SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS unterstützt (Gesuch Nr. 3091), wofür wir bestens danken. Die ganze Anlage der Zentrifuge wurde in der Werkstatt des Theodor Kocher Instituts gebaut. Für die eifrige Mitarbeit bei den Untersuchungen danken wir Frau J. AMBÜHL-BREDIN und Herrn U. GSTEIGER.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 1. Mitteilung: *Helv.* 38, 520 (1955); 2. Mitteilung: *Helv.* 45, 1576 (1962).
 [2] P. v. TAVEL & R. SIGNER, *Adv. Protein Chemistry*, 11, 236 (1956); L. C. CRAIG in P. ALEXANDER & R. J. BLOCK, «Analytical Methods in Protein Chemistry», Bd. 1, 121, Pergamon Press, Oxford 1960.
 [3] T. P. KING, L. C. CRAIG, *J. Amer. chem. Soc.* 80, 8366 (1958); W. HAUSMANN & L. C. CRAIG, *ibid.* 80, 2703 (1958); R. J. HILL & L. C. CRAIG, *ibid.* 81, 2272 (1959).
 [4] P. A. ALBERTSON, *Nature* 182, 709 (1958); «Partition of Cell Particles and Macromolecules Almquist und Wiksells», Uppsala 1960.
 [5] J. B. BRÖNSTED, *C. r. Travaux Lab. Carlsberg, Série chimique* 22, 99 (1938).
 [6] K. E. ALMIN, *Acta chem. scand.* 11, 936, 1541 (1957); 13, 1263–1298 (1959).
 [7] E. HECKER, «Verteilungsverfahren im Laboratorium», Verlag Chemie, Weinheim 1955.
 [8] L. C. CRAIG in P. ALEXANDER & R. J. BLOCK «Analytical Methods in Protein Chemistry», Bd 1, 134, Pergamon Press, Oxford 1960.
 [9] B. J. DAVIS, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121, 404 (1964).

35. Etudes sur les composés organométalliques IV [1] Stabilité et nature des liaisons de quelques complexes organostanniques

par Jean Affolter, André Jacot-Guillarmod et Klaus Bernauer

Institut de Chimie de l'Université de Neuchâtel

(1 XII 67)

Summary. The complexes between different diorganotin cations and substituted 1,10-phenanthrolines in aqueous solution containing acetate ion have been investigated. Diorganotin cations can co-ordinate two acetate ions. One of these may be replaced by a 1,10-phenanthroline derivative. A comparison of the different equilibrium constants shows that the acid hardness of diorganotin cations is markedly modified if the organic groups bound to the tin are α,β -unsaturated.

Les composés organostanniques forment avec des bases de LEWIS un grand nombre de complexes dans lesquels le nombre de restes organiques fixés à l'étain ne dépasse jamais trois. A l'état solide, l'étain des complexes triorganostanniques possède en général la coordinance maximale cinq, et celui des complexes mono- et diorganostanniques, la coordinance maximale six [2].

Comme le font apparaître de récentes compilations [2] [3], les réactions d'équilibre de ces composés en solution ont été relativement peu étudiées. Ceci est valable en particulier pour les réactions en solution aqueuse où de nombreuses réactions d'hydrolyse apparaissent [4], qui compliquent sérieusement l'interprétation des résultats.

Une des questions en discussion concernant ces complexes est de savoir si les orbitales d libres peuvent participer à la liaison coordinative. Ainsi BEATTIE et McQUILLAN [5] ont établi que la constante de force de la liaison Sn-Cl est considérablement modifiée lorsque $(\text{CH}_3)_3\text{SnCl}$ est complexé avec une molécule de pyridine, alors que la longueur de la liaison reste pratiquement la même; aussi, ces auteurs concluent-ils à une contribution appréciable $d_\pi - p_\pi$ à la liaison Sn-Cl. En revanche, en comparant entre elles les constantes de stabilité de complexes de $(\text{CH}_3)_2\text{Sn}^{2+}$ avec l'acide picolinique,