

wert für die Bindungswinkel beträgt aber 112° . In Kolonne VI, Tab. 11, sind die Mittelwerte aus den beiden Kristallstrukturanalysen unter Berücksichtigung einer Spiegelebene zusammengestellt. Diese Mittelwerte sind systematisch grösser als die entsprechenden Modellwerte. Die Temperaturbewegung als eine mögliche Ursache dieser Erscheinung ist weiter oben diskutiert.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] M. DOBLER, J. D. DUNITZ & A. MUGNOLI, *Helv.* **49**, 2492 (1966).
- [2] U. W. ARNDT & D. C. PHILLIPS, *Acta crystallogr.* **14**, 807 (1961).
- [3] A. J. C. WILSON, *Nature* **150**, 152 (1942).
- [4] J. KARLE & H. HAUPTMANN, *Acta crystallogr.* **3**, 181 (1950); M. DOBLER & J. D. DUNITZ, *Helv.* **48**, 1429 (1965).
- [5] P. R. PINNOCK, C. A. TAYLOR & H. LIPSON, *Acta crystallogr.* **9**, 175 (1956).
- [6] P. GROTH, *Acta chem. scand.* **19**, 1497 (1965).
- [7] M. SHIRO, T. SATO, N. KOYAMA, Y. MAKI, K. NAKANISHI & S. UVEO, *Chem. Commun.* **1966**, 97; M. DOBLER & B. DÜRR, unveröffentlichte Arbeit.
- [8] F. A. L. ANET & M. ST. JACQUES, *J. Amer. chem. Soc.* **88**, 2585 (1966).
- [9] G. FERGUSON, D. D. McNICOL, W. OBERHÄNSLI, R. A. RAPHAEL & J. A. ZABKIEWICZ, *Chem. Commun.* **1968**, 103.
- [10] J. B. HENDRICKSON, *J. Amer. chem. Soc.* **86**, 4854 (1964).
- [11] M. BIXON & S. LIPSON, *Tetrahedron* **23**, 769 (1967).
- [12] K. B. WIBERG, *J. Amer. chem. Soc.* **87**, 1070 (1965).
- [13] W. R. BUSING & H. R. LEVY, *Acta crystallogr.* **17**, 142 (1964).
- [14] D. W. J. CRUICKSHANK, *Acta crystallogr.* **9**, 754 (1956); C. S. PAWLEV, *ibid.* **20**, 631 (1966); V. SCHOMAKER & K. N. TRUEBLOOD, *ibid.* **21**, A 247 (1966).
- [15] H. MLADECK & W. NOWACKI, *Helv.* **47**, 1280 (1964).
- [16] J. D. DUNITZ & K. VENKATESAN, *Helv.* **44**, 2033 (1961).
- [17] J. D. DUNITZ & H. ESER, *Helv.* **50**, 1565 (1967).
- [18] J. D. DUNITZ & P. STRICKLER, *Tetrahedron Letters* **33**, 3933 (1966); P. GANIS, persönliche Mitteilung.

173. Die Fraktionierung von Serumproteinen mit flüssigen Phasenpaaren

4. Mitteilung [1]

Die Gegenstromfraktionierung von γ -Globulinen

von P. v. Tavel

THEODOR-KOCHER-Institut der Universität Bern

(11. VII. 68)

Zusammenfassung. γ -Globuline sind mit fast-kritischen flüssigen Phasenpaaren aus Diäthylenglykol-diäthyläther, Wasser, Magnesiumsulfat und Dinatriumglycerophosphat bei $+1^\circ\text{C}$ mittels multiplikativer Gegenstromverteilung fraktioniert worden. Der mittlere Verteilungskoeffizient des γ -Globulingemischs ist vom pH und vom Mengenverhältnis Magnesiumsulfat/Dinatriumglycerophosphat abhängig. Er lässt sich auf einen für die multiplikative Verteilung günstigen Wert einstellen. Diese wurde in einer Verteilenzentrifuge vorgenommen, mit welcher die Phasen nach jeder Gleichgewichtseinstellung rasch getrennt werden können. Mit 40 Gefässen wurden über 200 Verteilungsschritte ausgeführt. Das γ -Globulin konnte reproduzierbar in eine Reihe von Fraktionen zerlegt werden, deren Verteilungskoeffizienten stetig bis über das 10fache ansteigen. Die Verteilungskoeffizienten entsprechen den für die Prozesse berechneten Werten. Die wegen ihrer

Verteilungskoeffizienten eindeutig verschiedenen Fraktionen unterscheiden sich aber weder in der Ultrazentrifuge noch immuno-elektrophoretisch; d. h. ihre elektrophoretische Beweglichkeit und ihr Verteilungskoeffizient stellen im gegebenen Phasenpaar zwei unabhängige Parameter dar. Die Gegenstromverteilung zerlegt das Gemisch nach anderen Eigenschaftskriterien als die Elektrophorese und die Ionenaustausch-Chromatographie. Die Fraktionen eines bovinen Antisalmonellen-Colostrum- γ -Globulins zeigten ausser einer Randfraktion keinen Unterschied in ihren Antikörper-Titern.

1. Einleitung. – Die γ -Globuline des Serums sind als Träger der Antikörper-Eigenschaften von besonderem Interesse. Ihre Hauptmenge, die γ G-Immunglobuline, bilden ein Gemisch vieler Komponenten von einheitlichem Molekulargewicht um 160000. Andere physiko-chemische Eigenschaften, wie ihre elektrophoretische Beweglichkeit und ihre isoionischen Punkte, variieren aber in weiten Grenzen. Auch Antikörper, die gegen bestimmte Antigene spezifisch sind, erweisen sich als physiko-chemisch uneinheitlich.

γ -Globuline können mit physiko-chemischen Methoden in Gruppen zerlegt werden. Eine partielle Abtrennung der γ A- bzw. γ G- und γ D-Immunglobuline ist durch Fällung mit Alkohol oder Neutralsalzen möglich oder mittels DEAE- oder CM-Ionenaustauschern [2]. Kleine Mengen lassen sich in der Stärkegel-Elektrophorese zerlegen. PORTER hat mittels Verteilungschromatographie Antikörper in γ -Globulinfraktionen anreichern können [3]. Die eine Phase eines 2phasigen Systems wurde von Kieselguhr in der Säule festgehalten, während die Gegenphase als Elutionsmittel hindurchlief. Spezifische Antikörper sind durch Bindung an Antigene aus dem Gemisch isoliert worden [2].

Bei der Verteilung von Serumproteinen in fast-kritischen Phasenpaaren im Gegenstromverfahren stellten wir fest, dass sich γ -Globulin-Komponenten sehr verschieden auf die Phasen verteilen [4]. Nachdem eine Verteilzentrifuge zur schnellen Trennung der sich langsam entmischenden fast-kritischen Phasen gebaut worden war [1], konnte die vielstufige multiplikative Verteilung von γ -Globulin untersucht werden.

Die Gegenstromverteilung ermöglicht, kleine Strukturunterschiede für die Fraktionierung auszunützen, da sie die Gemischbestandteile auf Grund des Verhältnisses ihrer Nebervalenzbindungen zu den beiden Phasenmedien trennt. Dies kommt im NERNSTschen Verteilungskoeffizienten quantitativ zum Ausdruck. Die gebräuchlichen Fraktionierungsmethoden für γ -Globulin dagegen differenzieren im wesentlichen nach dem Ladungszustand und dem Molekulargewicht der Proteinkomponenten.

2. Die Verteilung von γ -Globulin in kritischen Phasenpaaren von Diäthylenglykol-diäthyläther und Salzlösungen. – 2.1. *Die Wahl des 2phasigen Systems.* PORTER hat für die Zerlegung von γ -Globulinen mittels Verteilungschromatographie wässrige Phasenpaare verwendet, die Glykoläther (Cellosolve) und Phosphate enthielten [3]. Um Denaturierung zu vermeiden, musste er unter 0°C und, wegen der Empfindlichkeit der Systeme, mit grosser Temperaturkonstanz arbeiten. Er erwähnt auch, dass γ -Globulin sich im zweiphasigen Gemisch von Diäthylenglykol-diäthyläther (Diäthylcarbitol, DAC), Magnesiumsulfat und Wasser verteilen lässt [5]. Dieses Phasenpaar zeichnet sich durch einen hohen Wassergehalt in beiden Phasen aus und ist daher für die Verteilung von Proteinen günstig.

Die Tabelle zeigt die analytisch ermittelten Zusammensetzungen der Phasenpaare in verschiedenen Abständen vom kritischen Punkt. In dessen Nähe ändert sich der

Gehalt an Salz und organischem Lösungsmittel der Phasen proportional mit ihrem Dichteunterschied Δd . Dieser ist ein praktisches Mass für den Abstand der Zusammensetzung des Systems von derjenigen im kritischen Punkt [6]. Mit zunehmendem Dichteunterschied wird die leichtere Phase reicher an Diäthylcarbitol, ärmer an Salzen und spezifisch leichter. Die schwerere Phase verhält sich umgekehrt. Die Tabelle dient der Herstellung von Phasenpaaren mit verschiedenen Phasenvolumenverhältnissen.

Phasenzusammensetzungen in Gew.-% wasserfreier Komponenten nahezu kritischer Phasenpaare von Diäthylcarbitol, Magnesiumsulfat, Dinatriumglycerophosphat im Verhältnis 4,16:1 (g/g) und Wasser bei +1,5°C

pH vor Zugabe des Diäthylcarbitols 7,4. Die Dichte der leichteren und schwereren Phase ist 1,106 – bzw. + $\Delta d/2$.

Phasendichte- unterschiede Δd g/ml	leichte Phase		H ₂ O ad 100%	schwere Phase		H ₂ O ad 100%
	% DAC	% Salze		% DAC	% Salze	
0,05	13,9	9,0		7,9 ₈	14,0	
0,07	15,4	8,0		7,1	14,9	
0,09	16,9	7,0		6,3	15,9	
0,11	18,4	6,0		5,4 ₈	16,9	
extrapoliert auf den kritischen Punkt $\Delta d = 0$:		DAC 10,0%, Salze 11,6%, Wasser 78,4%, Dichte 1,106 g/cm				

2.2. Die Verteilung von γ -Globulin im Phasenpaar Diäthylcarbitol, Magnesiumsulfat, Dinatriumglycerophosphat, Wasser. Wie BRÖNSTED gezeigt hat [7], verteilen sich hochmolekulare Verbindungen einseitig und differenziert in kritischen Phasenpaaren, in welchen sich niedermolekulare Stoffe ohne Unterschied in beiden Phasen gleich lösen. Der Verteilungskoeffizient k , das Verhältnis der Konzentrationen in der leichteren (DAC-reicheren) und der schwereren (salzreicheren) Phase, liegt für γ -Globulin im DAC/MgSO₄/H₂O-System von PORTER bei +1° wesentlich unter 1, während

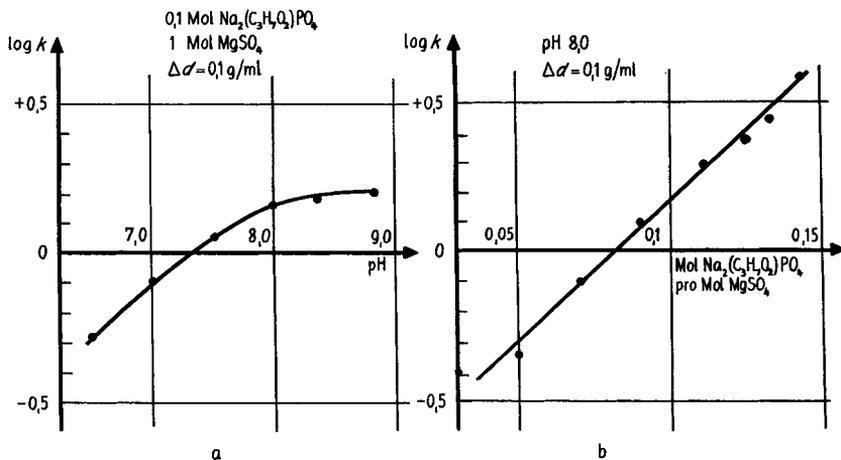


Fig. 1. Abhängigkeit des Verteilungskoeffizienten k von Human- γ -Globulin im System Diäthylcarbitol, Magnesiumsulfat, Natriumglycerophosphat, Wasser bei +1,5°C: a) vom pH; b) vom Verhältnis Natriumglycerophosphat/Magnesiumsulfat

für die multiplikative Verteilung ein Koeffizient um 1 erwünscht ist. Ersetzt man aber das Magnesiumsulfat z.T. durch Dinatriumglycerophosphat, so kann der Verteilungskoeffizient über 1 erhöht werden. Dieses wirkt als Proteinüberträger in die DAC-Phase.

Figur 1 zeigt die Abhängigkeit des mittleren Verteilungskoeffizienten von «gepooltem» Human- γ -Globulin vom pH und vom Verhältnis Dinatriumglycerophosphat zu Magnesiumsulfat. Die Messungen beziehen sich auf einen konstanten pH-Wert und sind auf einen gleichen Phasendichteunterschied von $\Delta d = 0,1$ g/ml umgerechnet. Erfahrungsgemäss ändert sich der Logarithmus des Verteilungskoeffizienten k nahe beim kritischen Punkt proportional zum Phasendichteunterschied Δd . Mit zunehmendem Gehalt an Dinatriumglycerophosphat einerseits und pH andererseits verschiebt sich die Verteilung zugunsten der DAC-haltigeren Phase. Die pH-Messung mit Glaselektroden hängt stark vom Gehalt an organischem Lösungsmittel ab. Es erwies sich daher als zweckmässig, die pH-Abhängigkeit der Verteilungskoeffizienten auf die pH-Werte vor Zugabe des Diäthylcarbitols zu beziehen.

Der Verteilungskoeffizient von γ -Globulin ist ein Mittelwert der Koeffizienten seiner verschiedenen Komponenten. Das wird schon deutlich, wenn man ein γ -Globulin-haltiges Phasenpaar trennt und die Phasen mit proteinfreien Gegenphasen wieder ins Gleichgewicht setzt. Während z.B. im ursprünglichen Phasenpaar ein Verteilungskoeffizient von $k = 1,2$ gemessen wird, zeigt das zweite Phasenpaar, das mit der leichten (DAC-Phase) gebildet wurde, ein $k = 1,4$, dasjenige aus der schweren Phase ein $k = 0,7$. Das sind Unterschiede, die in multiplikativer Gegenstromverteilung zu einer weitgehenden Trennung der Komponenten führen müssen.

3. Die multiplikative Verteilung von γ -Globulin. – 3.1. *Der Verteilungsprozess.* Die Verteilung wurde nach dem CRAIGSchen Verteilschema [8] mit einer Verteilenzentrifuge zu 40 Gläsern [1] ausgeführt. Das Substanzgemisch wurde mit den Phasenpaaren in die ersten 4 Gläser der Verteilenzentrifuge eingeführt, dann mit jedem Verteilungsschritt jede leichte bzw. schwere Phase in die Gefässe nächst höherer Nummer verschoben, frische mobile Phase in das erste Gefäss gegeben und dem letzten eine Fraktion derselben Phase entnommen. In der Regel wurden pro Schritt und Element nur $\frac{2}{3}$ ihres Volumens an mobiler Phase transportiert und 200 Transfers ausgeführt, was 133 theoretischen Transfers entspricht [1]. Nach diesem Prozess war das Protein fast vollständig in die Fraktionen eluiert.

3.2. *Die Verteilung des γ -Globulins.* Human- γ -Globulin und bovines Colostrum- γ -Globulin wurden in mehreren Versuchen in zweiphasigen Systemen aus Diäthylcarbitol, Magnesiumsulfat, Dinatriumglycerophosphat und Wasser bei $+1,5^\circ$ multiplikativ verteilt. Das Phasenpaar war in der Regel so zusammengesetzt, dass die pH-Werte vor Zugabe des Diäthylcarbitols zwischen 8,0 und 8,4, der Phasendichteunterschied unter 0,08 g/ml und der mittlere Verteilungskoeffizient des γ -Globulins zwischen 1,0 und 1,5 lagen.

Wenn die leichte, DAC-reichere Phase bewegt wird, bietet die Verteilung des γ -Globulins auf die Fraktionen stets dasselbe Bild (Fig. 2, Kurve A): Nach ca. 40 proteinfreien Fraktionen, entsprechend den Verteilschritten, die notwendig sind, um die Proteinfrent durch die Batterie zu bewegen, folgt ein steiler Anstieg der γ -Globulin-konzentration zu einem Maximum, worauf die Kurve allmählich abfällt.

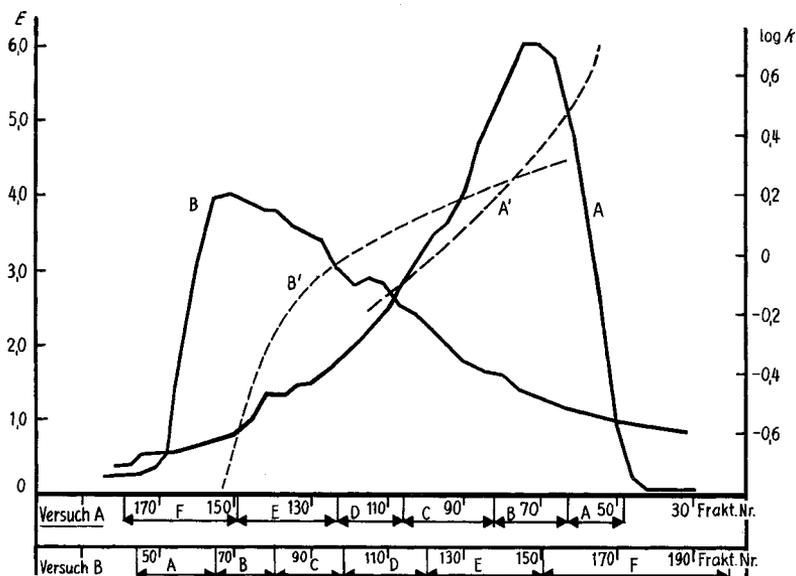


Fig. 2. Multiplikative Verteilungen von Colostrum- γ -Globulin im System DAC, $MgSO_4$, $Na_2(C_3H_7O_2)PO_4$, H_2O bei $1,5^\circ C$, pH 8,4 (vor Zugabe des DAC)

— Extinktion bei 280 nm

- - - - - Logarithmus Verteilungskoeffizient

A: Phasenvolumverhältnis 13,5/13,5 (l./schw.) 200 Transfers à 9,7 ml leichter Phase

B: Phasenvolumverhältnis 9/18, 200 Transfers à 13,5 ml schwerer Phase

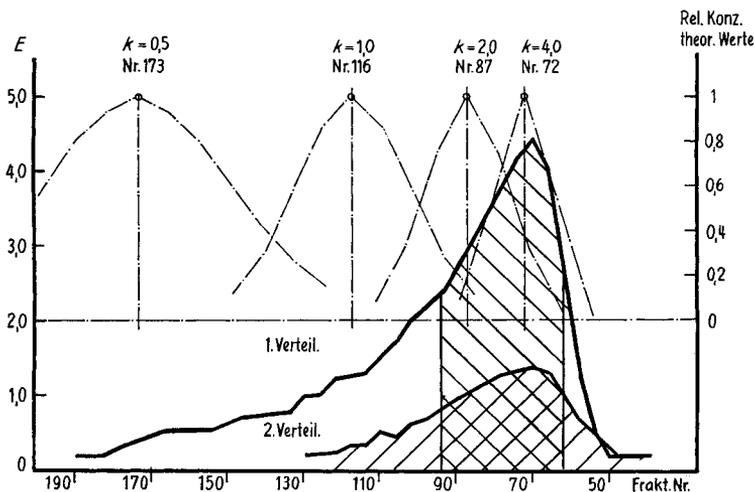


Fig. 3. Wiederholte Verteilung von Colostrum- γ -Globulin im Phasenpaar, wie Versuch A Fig. 2

1. Verteilung: 196 Transfers von 9 ml leichter Phase, 1,6 g γ -Globulin, in Nr. 1–4 eingesetzt.

2. Verteilung: 50% der  Fläche, 0,28 g γ -Globulin, 196 Transfers, wie 1. Verteilung

- - - - - Berechnete Verteilungen für $k = 0,5, 1, 2, 4$ bei denselben Versuchsbedingungen

Jeder neunten Fraktion wurde Gegenphase zugesetzt und der Verteilungskoeffizient bestimmt (Fig. 2, Kurve A'). Wie zu erwarten, ist der Verteilungskoeffizient in den ersten Fraktionen hoch, wenn die leichte Phase bewegt wird, tief, wenn man die schwere Phase transportiert. Die beobachteten Verteilungskoeffizienten zeigen entlang der Verteilungskurve einen steten Gang und liegen im Intervall von $k = 5$ bis $0,5$. Sie sind in denjenigen Fraktionsnummern zu finden, in welchen sie nach der Berechnung des Verteilprozesses zu erwarten sind.

Wählt man bei sonst gleichen Versuchsbedingungen an Stelle der leichteren die schwerere (salzreichere) Phase als mobile Phase, so zeigt die Verteilungskurve denselben Verlauf mit dem Maximum in den ersten Fraktionen und allmählichem Abfall (Fig. 2, Kurve B). Das Maximum enthält aber jetzt γ -Globuline mit niederem Verteilungskoeffizienten, während diejenigen mit hohen Werten in den späten Fraktionen erscheinen. Daraus ist ersichtlich, dass das Maximum nicht durch das Mengenverhältnis der Komponenten zustande kommt, sondern durch den Fraktionierungsmodus. Es ist zu bedenken, dass beim Transport der leichten Phase (Fig. 2, Kurve A) alle Komponenten mit Verteilungskoeffizienten von $k = 1$ bis ∞ in den Fraktionen Nr. 40–80 auftreten müssen, diejenigen mit $k = 0$ bis 1 in den beliebig zahlreichen Fraktionen über 80.

3.3. *Die wiederholte Verteilung von Fraktionen.* γ -Globulin, das aus einer Fraktionengruppe isoliert worden war, wurde nochmals unter denselben Versuchsbedingungen verteilt (Fig. 3). Der Schwerpunkt der Verteilung kam wieder in diejenigen Fraktionsnummern zu liegen, aus welchen das Material zur zweiten Verteilung ausgewählt worden war. Dass Protein auch in niedrigere und höhere Fraktionen gelangen würde, war zu erwarten, da aus der ersten Verteilung noch keine reinen Komponenten isoliert worden waren.

4. Die Untersuchung der Fraktionen. – Die aus der Zentrifuge austretenden Reihen der Fraktionen wurden jeweils in 5–8 Fraktionsgruppen (A, B, C ...) von ungefähr gleichem Proteingehalt unterteilt und ihr Protein isoliert. Um festzustellen, ob sich die γ -Globuline dieser Gruppen ausser durch den Verteilungskoeffizienten auch durch andere Eigenschaftsparameter unterscheiden, wurden ihr elektrophoretisches Verhalten, ihre Sedimentationsgeschwindigkeiten in der Ultrazentrifuge und ihre immunoelektrophoretischen Bilder verglichen.

4.1. *Die Elektrophoresen* wurden nach der Methode der «Disk-Elektrophorese» [9] in Polyacrylamid-Gel bei Bedingungen vorgenommen, wie sie zur Serumuntersuchung verwendet werden. Alle Fraktionsgruppen zeigen nur die breite Zone der γ -Globuline, die überall gleich schnell wandert; elektrophoretisch sind sie also nicht zu unterscheiden.

4.2. *Sedimentationskonstanten.* Ausgangsmaterial und die Fraktionengruppen wurden in der analytischen Ultrazentrifuge bei 20° und 59780 U/min in ca. 1proz. Lösung in 0,9proz. Kochsalzlösung untersucht. Das Human- γ -Globulin zeigt eine Hauptkomponente (89%) mit einer unkorrigierten Sedimentationskonstante $s_{app} = 6,2$ Svedberg und eine Nebenkomponekte (11%) mit s_{app} von 9,4 Svedberg, dagegen kein Makroglobulin. Untersuchte Fraktionengruppen aus der Mitte der Verteilung wiesen dasselbe Sedimentationsdiagramm auf.

Das Colostrum- γ -Globulin enthielt kurz nach dem Fällen nur die Hauptkomponente mit $s_{app} = 6,4$ und eine geringe Menge Makroglobulin mit $s_{app} = 18,5$. Colostrum- γ -Globulin, das aus einem Phasenpaar vor der Verteilung wieder isoliert worden war, zeigte neben der Hauptkomponente und dem Makroglobulin wieder die Nebenkomponeute zu $s_{app} = 9$. Von den Fraktionsgruppen A–F des Versuchs Fig. 2A wurden A, C, E und F untersucht. Ihre Sedimentationsdiagramme und Konstanten stimmen innerhalb der Fehlergrenzen überein, ausser der relativen Menge der Nebenkomponeute s_{app} um 9, die bei A und C 15 bzw. 13,5%, bei F aber 21% ausmacht; die Makroglobulin-komponeute ist nirgends zu finden.

Im ganzen zeigen auch die Sedimentationskonstanten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Fraktionsgruppen.

4.3. *Immunelektrophorese.* Die Immunreaktion wurde beim Human- γ -Globulin mit Antihuman-Pferdeserum ausgelöst, bei Rinder-Colostrum- γ -Globulin mit Antirinder-colostrum-Kaninchenserum.

Beim Human- γ -Globulin zeigten alle Fraktionsgruppen stets reine γ G-Immunglobulinlinien, gelegentlich eine ganz schwache γ A-Immunglobulinlinie; Makroglobuline waren nicht zu sehen. Lediglich in den letzten Fraktionen, welche die Komponenten mit den niedrigsten Verteilungskoeffizienten enthielten, waren Linien weiterer Serumproteine zu beobachten. Diese waren aus Spuren im Ausgangsmaterial während des Verteilungsprozesses angereichert worden.

Auch beim Colostrum- γ -Globulin ist kein Unterschied zwischen der Reaktion mit Anti-Rinder- und Anti-Colostrum-Serum festzustellen. Die Bilder zeigen durchwegs einen starken weiten γ -Globulinbogen und zwei schwache kleinere Bogen, die nicht näher identifiziert wurden, vermutlich aber von γ -A- oder γ -M-Immunglobulin herühren (Fig. 4).

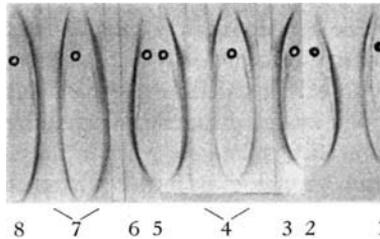


Fig. 4. Immunelektrophoresen, Verteilung A Fig. 2. Immunreaktion mit Anticolostrum-Kaninchenserum

- | | |
|---|------------------------|
| Nr. 1: γ -Globulin aus 1. Phasenpaare vor der Verteilung, | |
| Nr. 2: γ -Globulin- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Fällung aus Colostrum, | |
| Nr. 3: Frak. Gruppe A, | Nr. 6: Frak. Gruppe D, |
| Nr. 4: Frak. Gruppe B, | Nr. 7: Frak. Gruppe E, |
| Nr. 5: Frak. Gruppe C, | Nr. 8: Frak. Gruppe F, |

4.4. *Antikörpertiter.* Das Colostrum- γ -Globulin war von einer gegen Salmonellen immunisierten Kuh gewonnen worden. Der Titer des entsprechenden Antikörpers wurde in den Fraktionen mittels Agglutinations- und mit dem Anti- γ -Globulin-Test nach COOMBS bestimmt. Für den ersten wurden zu einer Verdünnungsreihe der 2-proz. γ -Globulinlösungen von $1/20$ bis $1/5120$ konstante Mengen Antigenlösung, einer

mit Formalin behandelten Salmonellensuspension, zugefügt. Der Antikörpertiter wird mit der höchsten Verdünnung angegeben, bei welcher die Suspension noch agglutiniert. In Fig. 5 ist das Resultat der Untersuchung einer Versuchsreihe dargestellt.

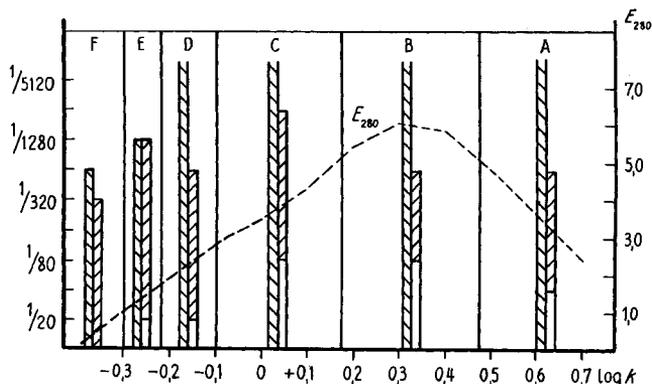
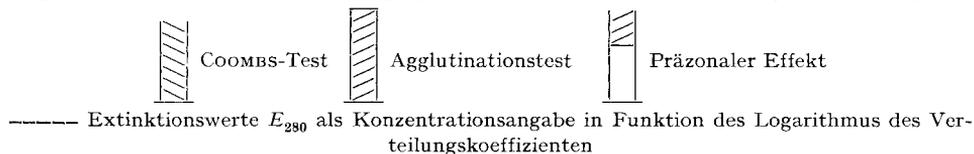


Fig. 5. Antikörpertiter der Fraktionen A–F der Verteilung Colostrum- γ -Globulin, Fig. 2A



Alle Fraktionsgruppen zeigen einen hohen Antikörpertiter. Ausser bei der letzten Fraktion F mit den Komponenten von niederem Verteilungskoeffizienten ist überall ein «präzonaler Effekt» zu beobachten. Er rührt daher, dass die Agglutination bei grossem Überschuss an Antikörper unterbleibt.

Im COOMBS-Test wird der Agglutinationslösung Anti- γ -Globulin zugesetzt, wodurch die Empfindlichkeit wesentlich erhöht wird und präzonale Effekte unterbleiben.

5. Diskussion der Ergebnisse. – 5.1. Die Frage, ob das γ -Globulin im Phasenpaar denaturiert oder sonst verändert wird, ist in einer früheren Mitteilung untersucht worden [4]. Die bisherigen Beobachtungen weisen nicht auf wesentliche Veränderungen hin:

Die Antikörperaktivität bleibt erhalten. Die wiederholte Verteilung einzelner Fraktionen lässt sie wieder an derselben Stelle erscheinen. Die Fraktionierung entspricht den auf Grund der Verteilungskoeffizienten berechneten Verteilung. Elektrophoretische und Sedimentations-Messungen zeigen keine Veränderungen des Proteins, das aus Phasen isoliert worden ist. Es bleibt die Möglichkeit offen, dass eine kleine Menge einzelner Komponenten des γ -Globulingemisches beim Lösen im Phasenpaar denaturiert wird und ausfällt.

5.2. Die Verteilungskurven in Fig. 2 und 3 können den Eindruck erwecken, dass das Nachhinken der Fraktionen nach dem Maximum ein ähnlicher Artefakt wie das sog. «tailing» bei chromatographischen Trennungen ist. Die deutliche Änderung der Verteilungskoeffizienten, welche dem theoretischen Verteilungsprozess entsprechen, beweist aber, dass eine echte Fraktionierung vorliegt.

Die multiplikativen Verteilungen sind mit einer relativ geringen Zahl von 40 Verteilungselementen durchgeführt worden, so dass man nicht erwarten kann, auf diese Weise ein so vielfältiges Gemisch wie das γ -Globulin in einzelne Komponenten zu zerlegen. Die in Fig. 3 eingezeichneten theoretischen Kurven geben einen Begriff des erzielbaren Auflösungsvermögens bei den angewandten Bedingungen. Dass die experimentellen Kurven nur ein Maximum und keine Schultern zeigen, muss von der Vielzahl der Komponenten herrühren, deren Verteilungskoeffizienten fast kontinuierlich variieren.

5.3. In Fig. 6 ist die Verteilung des Colostrum- γ -Globulins (Fig. 2A und B) in Funktion der Verteilungskoeffizienten dargestellt. Sie geht von der Annahme eines Komponentengemisches mit kontinuierlichem Spektrum von Verteilungskoeffizienten aus, wie sie die experimentellen Verteilungskurven zeigen. Die Flächen unter den Verteilungskurven Fig. 2A und B wurden in Abschnitte unterteilt, die gemäss den

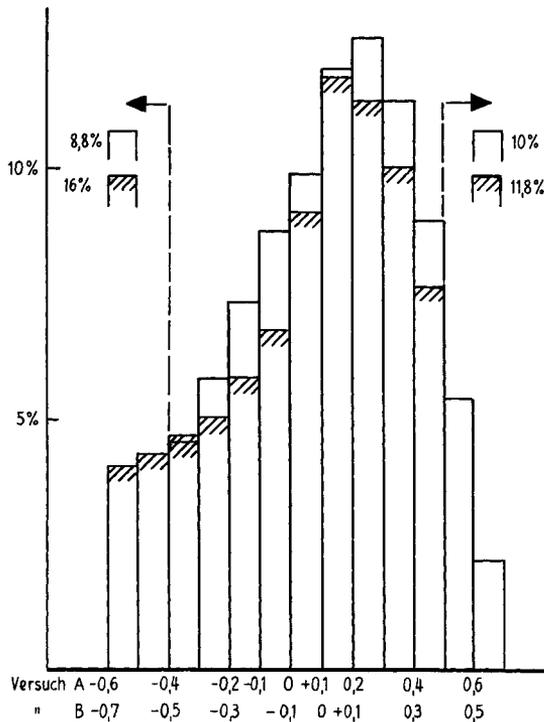
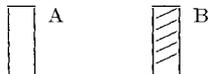


Fig. 6. Mengenverhältnis der Komponenten von Colostrum- γ -Globulin von verschiedenen Verteilungskoeffizienten. Berechnet nach Versuchen A und B, Fig. 2



experimentell bestimmten $\log-k$ -Kurven (Fig. 2, Kurve A'B') $\log-k$ -Intervallen von 0,1 entsprechen. In Fig. 6 sind die prozentualen Anteile der γ -Globulinmengen pro Intervall aufgetragen, die aus den Abschnittflächen berechnet wurden. Wesentlich ist der Vergleich der beiden Versuche Kurve A und B, die innerhalb der Fehlergrenzen der

log- k -Intervallbildung liegen dürften. Da die Verteilungskoeffizienten vom Phasenpaar und Dichteunterschied abhängig sind, die in beiden Versuchen möglicherweise nicht ganz übereinstimmten, wurden die Schwerpunkte als Mitte der Flächen ermittelt und durch Verschiebung der Abscissen um 0,1 zur Deckung gebracht. Die Berechnungen stimmen darin überein, dass das γ -Globulingemisch ein Schwergewicht der Komponenten zwischen $\log k = 0$ und 0,4 ($k = 1$ bis 2,5) enthält. Die Darstellung belegt auch, dass die Maxima der Kurven A und B in Fig. 2 mehr durch den Verteilungsmodus als durch das Mengenverhältnis der Gemischkomponenten verursacht werden.

5.4. Die Feststellung, dass alle Fraktionen immuno-elektrophoretische Sichel gleicher Länge geben wie das Ausgangsmaterial, beweist, dass Verteilung und Elektrophorese das Material auf Grund unabhängiger Eigenschafts-Parameter zerlegen. Während die elektrophoretische und Ionenaustausch-Fraktionierung im wesentlichen auf der Teilchenladung und -grösse beruht, erfolgt die Verteilung auf Grund unterschiedlicher Verhältnisse der Aktivitätskoeffizienten der Komponenten in den beiden Phasen. Diese sind nicht nur vom Molekulargewicht und der Teilchenladung abhängig, sondern auch von Nebervalenzbeziehungen zum Lösungsmedium.

5.5. Der Antikörpertiter gegen Salmonellen Hd war beim Colostrum- γ -Globulin bei allen Fraktionen hoch und zeigt einen wenig ausgeprägten Schwerpunkt bei gewissen Verteilungskoeffizienten. Dies bestätigt die Erfahrung, dass spezifische Antikörper keine physikalisch-chemisch einheitlichen Verbindungen sind. PORTER [5] hat bei Kaninchen- γ -Globulin festgestellt, dass sich mit zunehmender Immunisierung das Intervall von verteilungschromatographischen Fraktionen mit Antikörper ausdehnt. Es ist denkbar, dass hier der Antikörper in allen Colostrum- γ -Globulin-Fraktionen gefunden worden ist, weil die Spenderkuh stark immunisiert worden war.

5.6. Die Versuche haben gezeigt, dass die Fraktionen physiko-chemisch eindeutig verschieden sind. In weiteren Untersuchungen soll nach weiteren Eigenschaftsunterschieden der Fraktionen gesucht werden, u. a. nach Differenzen im Kohlehydratgehalt.

Experimenteller Teil

1. Zwei γ -Globulin-Präparate wurden untersucht:

a) «gepooltes» humanes γ -Globulin, gefriergetrocknet, vom Blutspendedienst des Schweiz. Roten Kreuzes.

b) Bovines Colostrum- γ -Globulin, das aus Colostrum mit Ammoniumsulfat gefällt, dialysiert und gefriergetrocknet worden war. Die Spenderkuh war gegen Salmonellen Hd immunisiert.

Diäthylenglykol-diäthyläther (FLUKA Nr. 32190, *purum*) wurde von Peroxid befreit und destilliert. Es enthielt jeweils noch Spuren Peroxid, die jedoch in den Phasenpaaren mit Moorschem Salz und Rhodanid nicht nachzuweisen waren. – Das *Dinatriumglycerophosphat* (MERCK Nr. 4164) war ein Gemisch des α - und β -Salzes.

2. *Analysen der Phasen.* Die Zusammensetzung der Phasen wurde durch Vakuumdestillation nach der Methode der Gefriertrocknung bestimmt [4]. MgSO_4 und Natriumglycerophosphat wurden nur als Summe bestimmt.

Die Genauigkeit der Werte in der Tabelle (S. 1528) ist beschränkt; doch sind sie zur Herstellung von Phasenpaaren mit verschiedenen Volumverhältnissen für multiplikative Verteilungen nützlich. Da sich das Volumverhältnis schon mit kleinen Konzentrationsunterschieden stark ändert, ist mit Abweichungen der Phasenvolumina bis zu 10% des Gesamtvolumens zu rechnen. Zweckmässig gibt man das Diäthylcarbitol als letzte Komponente zu, und gegen Ende in kleinen Portionen, bis der gewünschte Dichteunterschied erreicht ist.

3. Die *Phasendichteunterschiede* wurden mit einem Tauchkörper bekannten Volumens und einer Torsionswaage gemessen, wobei die Phasen nicht getrennt werden mussten und im Thermostaten gelassen werden konnten.

4. *Lösen von γ -Globulin im Phasenpaar.* Versucht man gefriergetrocknetes γ -Globulin direkt in einem fast-kritischen Phasenpaar mit Diäthylcarbitol zu lösen, so wird ein Teil denaturiert und bleibt ungelöst in der Phasengrenzfläche zurück. Am besten wird das Protein in einem grossen Teil des Wassers und den Salzen aufgeschwemmt, das pH eingestellt und Wasser bis zur berechneten Menge zugesetzt. Nach Abkühlen auf 1° wird vorgekühltes Diäthylcarbitol unter starkem Rühren sehr langsam aus einer feinen Kapillare zugegeben, bis die Lösung gerade zweiphasig wird und der gewünschte Phasendichteunterschied erreicht ist. Die vorerst durch γ -Globulin getriebene Lösung klärt sich bei der Zugabe des organischen Lösungsmittels, so dass die Bildung der zweiten Phase an der wieder auftretenden Trübung erkannt werden kann. Im Diäthylcarbitol-Magnesiumsulfat-Dinatriumglycerophosphat-System von $1,5^\circ$ lösen sich etwa 3% γ -Globulin, wenn der Phasendichteunterschied 0,08 g/ml nicht übersteigt. Vor der Bestimmung des Verteilungskoeffizienten muss man zuweilen fein dispergiertes Protein aus der einen oder anderen Phase in die Grenzfläche abscheiden lassen, was 1–2 Tage benötigt. Dann bleibt aber der Verteilungskoeffizient des γ -Globulins über lange Zeit konstant.

5. Die *γ -Globulinkonzentrationsbestimmungen* für die Ermittlung der Verteilungskoeffizienten und die Verteilungskurven erfolgten spektrophotometrisch bei 280 nm. E_{280} von γ -Globulin beträgt 14,5. Der Proteingehalt der Fraktionsgruppen wurde nach KJELDAHL bestimmt.

6. Die *Isolierung von γ -Globulin aus den Phasen.* Um Protein aus den Phasen zurückzugewinnen, wurden die Lösungen ausdialysiert und gefriergetrocknet. Der grosse Gehalt an Salzen und organischem Lösungsmittel erzeugt während der Dialyse in geschlossenen Schläuchen einen ausserordentlich hohen Druck, der sie zu zersprengen droht. In offenen Systemen bewirkt er eine starke Verdünnung. Die Dialysiersäcke wurden deshalb in engstehende «Gewebeschläuche» aus weitmächtigem Terylen-Gardinengewebe (1 mm Fadenabstand) gebunden, worin sich die Membran höchstens um 10% ausdehnen konnte.

Die Lösungen wurden in VISKING-Dialysierschlauch (gefaltet, 3 cm breit) gefüllt und dieser so zugeknüpft, dass eine Luftblase eingeschlossen blieb. Über die Dialysiersäcke wurde nun der doppelt genähte «Gewebeschlauch» mit dem Saum nach innen gezogen. Er wurde unmittelbar innerhalb der Knoten des Dialysierschlauches mit dicker, weicher Schnur festgebunden. Die gefüllten Säcke wurden zur Dialyse in einen Korb gelegt und im Wasser geschaukelt, so dass die Luftblase die Innenlösung bewegen konnte. Nach 2 Tagen und 2fachem Wasserwechsel waren die zeitweise prallen Schläuche wieder schlaffer und die Dialyse nahezu beendet. Die Lösungen wurden nun auf etwa $1/4$ ihres Volumens im Kaltraum am Luftstrom von 30° eingengt, noch 1 Tag dialysiert und dann gefriergetrocknet. Die Fraktionsgruppen wurden in 0,9proz. NaCl-Lösung gelöst, ein kleiner Rückstand wurde abzentrifugiert und der Proteingehalt der Lösungen nach KJELDAHL bestimmt.

7. Die *multiplikative Verteilung* erfolgte in der Verteilentrifuge [1] im Kaltraum bei $+1,5^\circ \pm 0,5^\circ$. Die Verteilelemente fassten 27 ± 1 ml. Für die multiplikativen Verteilungen wurden Phasenpaare der Zusammensetzung gemäss der Tabelle mit Phasendichteunterschieden von $\Delta d = 0,7$ bis 0,9 verwendet, die jedoch auf pH 8,0–8,4 eingestellt wurden und MgSO_4 und Na_2 -Glycerophosphat im Verhältnis 5,8:1 enthielten.

Die Bedingungen des Versuchs A Fig. 2 seien als repräsentatives Beispiel angeführt:

Die Gesamtzusammensetzung des Phasenpaares betrug

$\text{MgSO}_4, 7 \text{ H}_2\text{O}$	647 g	} Verhältnis 5,8:1
Na_2 -Glycerophosphat + 5 H_2O	111,5 g	
Wasser	2913 g	
NaOH 1N bis pH 8,4	1 ml	
Diäthylcarbitol bis 2phasig, bei $+1,5^\circ$	649 g	
	4321,5 g	

Das Gemisch schied sich in eine schwere Phase von ca. 820 ml und eine leichte Phase von ca. 3320 ml. Der Phasendichteunterschied betrug 0,08 g/ml.

Pro Element wurden je 13,5 ml Phase eingefüllt, aber pro Verteilungsschritt nur 10 ml (75%) der obern Phase transportiert. Bei einem mittleren Verteilungskoeffizienten des γ -Globulins von 1,51 entspricht dies einer Verteilungszahl von 0,8 (Verhältnis des pro Schritt aus einem Element transportiertes gelöstes zum verbleibenden Material [1]). Nach einigen Probeschritten wurden in den ersten 4 Gläsern 104 ml Phasenpaar, enthaltend 2,75 g γ -Globulin, eingefüllt und mit der automatischen Verteilung über 200 Transfers begonnen. In jedem Verteilungsschritt, der ca. 15 min dauerte, wurde 6 min zur Gleichgewichtseinstellung gemischt und 6 min zentrifugiert.

Das Phasenverhältnis betrug je nach Versuch 1:1 oder 1:2 leichte zu schwerer Phase. Pro Verteilungsschritt wurden $\frac{2}{3}$ bis $\frac{3}{4}$ des Phasenvolumens an mobiler Phase injiziert. Dieses Volumen ist zugleich dasjenige der Fraktionen.

Die Untersuchungen wurden vom SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS unterstützt (Gesuch Nr. 3091), wofür ich seinen Behörden bestens danke. Der Blutspendedienst des Schweiz. Roten Kreuzes stellte humanes γ -Globulin zur Verfügung. Herrn Prof. FEY vom veterinär-bakteriologischen Institut der Universität Bern danke ich für die Überlassung des Colostrum-Serums, die Ausführung der Immunelektrophoresen und die Bestimmungen der Antikörpertiter. Für die treue Mitarbeit bin ich meinen Laboranten K. BAUMANN, U. GSTEIGER, C. WÜTHRICH und A. ZENATY zu Dank verpflichtet.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] 3. Mitteilung: P. v. TAVEL & W. BOLLIGER, *Helv. 51*, 278 (1968).
 [2] C. A. WILLIAMS & M. W. CHASE, «Methods in Immunology and Immunochemistry», Vol. 1, (Academic Press, New York 1967).
 [3] R. R. PORTER, *Biochem. J.* 59, 405 (1955).
 [4] P. v. TAVEL, *Helv.* 45, 1576 (1962).
 [5] R. R. PORTER, *Biochem. J.* 53, 320 (1953).
 [6] P. v. TAVEL, *Helv.* 38, 520 (1955).
 [7] J. N. BRÖNSTED, *C. r. Trav. Lab. Carlsberg, Sér. chim.* 22, 99 (1938).
 [8] HOUBEN-WEYL, «Methoden der organischen Chemie», Bd. I/1, 257 (1958).
 [9] L. ORNSTEIN, *Ann. New York Acad. Sci.* 121, 321 (1964); J. DAVIS, *ibid.* 121, 404 (1964).

174. Echange d'oxygène lors de la substitution électrophile des phénols

par H. Dahn et J.-D. Aubort¹⁾

Institut de Chimie organique, Université de Lausanne

(13 VII 68)

Summary. In the bromodesulfonation of sodium 2,6-dibromophenol-4-sulfonate (I) and similar compounds, the relatively stable quinoloid intermediate II exchanges its carbonyl oxygen with that of $H_2^{18}O$ by an addition-elimination process. The exchange is slower than the formation of the product III; it is roughly comparable to the exchange velocity of quinones of similar structure. By reversibility of the electrophilic addition step, ^{18}O is incorporated into the starting phenol I. In electrophilic substitutions with shorter life-time of the quinoloid intermediate, the oxygen exchange is difficult or impossible to observe.

Le mécanisme généralement adopté pour la substitution électrophile des phénols comporte un produit intermédiaire, de structure quinoloïde [1]. Dans certains cas, lorsque la seconde étape (élimination) est très lente par rapport à la première ($k_a (> k_{-a}) \gg k_b$), l'intermédiaire quinoïde peut être observé directement, par exemple par spectrophotométrie dans l'UV. ou par spectrométrie de RMN. [2] [3].

¹⁾ Extrait de la thèse de J.-D. AUBORT, Lausanne 1968.