

Tabelle II sind die gut übereinstimmenden Werte für  $p$  zusammengefasst. Nur bei der Malonsäure streuen die Zahlen auffallend stark, sodass sie bei der Berechnung des Mittelwertes nicht berücksichtigt wurden.

Der Grad der Übereinstimmung der  $p$ -Werte gibt bereits Aufschluss darüber, inwieweit die Punkte auf einer Parabel liegen. Setzt man dann die Mittelwerte für  $p$  in die Parabelgleichung ein, so müssen sich umgekehrt die  $R_F$ -Werte errechnen lassen. Tatsächlich stimmten die dabei erhaltenen  $R_F$ -Werte mit den experimentell ermittelten sehr gut überein, was in der Spalte  $\Delta R_F$  zum Ausdruck kommt.

Die Kieselgelschicht-Chromatographie kann ebenfalls für die Trennung *cis-trans*-isomerer ungesättigter Dicarbonsäuren eingesetzt werden. Wir prüften dies am Isomeren-Paar Maleinsäure-Fumarsäure mit dem Lösungsmittelsystem Benzol-Methanol-Eisessig (45:8:4) und erhielten für die Maleinsäure  $R_F = 0.07$  und für die Fumarsäure  $R_F = 0.23$ . Das Sichtbarmachen der Substanzflecken erfolgte durch Besprühen mit einer soda-alkalischen Kaliumpermanganat-Lösung, wobei gelbe Flecken auf violetterm Grund entstanden. Hierbei war es nicht notwendig, die an der Schicht fest haftenden Essigsäure-Reste zu entfernen. Wir werden an anderer Stelle ausführlich über die Chromatographie *cis-trans*-isomerer ungesättigter Dicarbonsäuren berichten.

Bundesanstalt für Materialprüfung,  
Berlin-Dahlem (Deutschland)

H. J. PETROWITZ  
G. PASTUSKA

- <sup>1</sup> E. LEDERER UND M. LEDERER, *Chromatography*, II. Auflage, Elsevier, Amsterdam, 1957, pp. 181-184, (dort weitere Literatur).
- <sup>2</sup> J. R. HOWE, *J. Chromatog.*, 3 (1960) 389.
- <sup>3</sup> F. MICHEEL UND W. LEIFELS, *Microchim. Acta*, (1961) 467.
- <sup>4</sup> J. L. OCCOLOWITZ, *J. Chromatog.*, 5 (1961) 373.
- <sup>5</sup> J. G. KIRCHNER, J. M. MILLER UND G. J. KELLER, *Anal. Chem.*, 23 (1951) 420.
- <sup>6</sup> E. STAHL, *Chemiker-Ztg.*, 82 (1958) 323.
- <sup>7</sup> H. J. PETROWITZ, *Materialprüfung*, 2 (1960) 309; *Angew. Chem.*, 72 (1960) 921.
- <sup>8</sup> G. PASTUSKA, *Z. anal. Chem.*, 179 (1961) 355.

Eingegangen den 18. Juli 1961

*J. Chromatog.*, 7 (1962) 128-130

### Dessalage imparfait de certaines solutions de protéines après filtration sur gels de dextrane

PORATH ET FLODIN<sup>1</sup> ont montré qu'il est possible de séparer les protéines et les sels d'une solution en lui faisant traverser une colonne d'un gel de dextrane dont les grains ne sont pas perméables aux macromolécules protidiques. Ces dernières ne parcourent ainsi qu'un volume limité et sortent de la colonne avant les sels qui parcourent le volume total de la colonne, y compris le liquide des grains. Une colonne de 1 cm<sup>2</sup> de section et de 20 à 30 cm de haut peut ainsi séparer les protéines plasmatiques et le

*J. Chromatog.*, 7 (1962) 130-132

sulfate ammonique d'un mélange (volume total = 2 ml) effectué en vue de l'analyse de ses constituants protidiques.

Trois préparations commerciales sont vendues par la firme Pharmacia (Uppsala, Suède) sous le nom de Sephadex G-25, G-50 et G-75. Leurs grains sont imperméables aux molécules dont le poids moléculaire excède respectivement 3,500-4,000, 8,000-10,000 et 40,000-50,000. Il est par conséquent possible de séparer certaines protéines selon leur masse moléculaire en utilisant la troisième de ces préparations<sup>2</sup>.

On admet généralement que les protéines et les sels ne sont pas retenus par les particules de dextrane. Toutefois, certaines substances basiques<sup>3</sup> et diverses protéines basiques<sup>4</sup> sont adsorbées, en absence de sels tout particulièrement<sup>3</sup>. Nous avons constaté d'ailleurs que la séparation des constituants d'un mélange de séralbumine et de phosphate sodique acide ne s'effectue correctement que si la colonne a été préparée en solution saline diluée et si le développement est assuré par la même solution (NaCl 0.02 M par exemple).

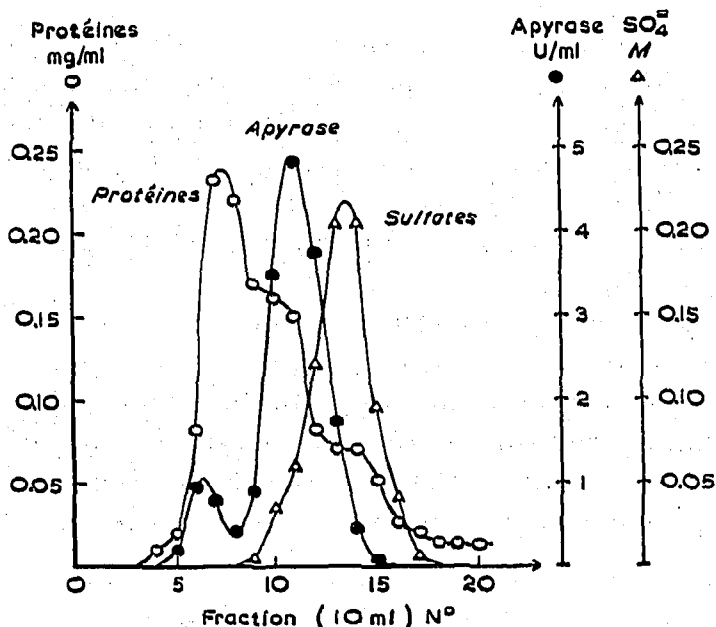


Fig. 1. Diagramme de filtration sur Sephadex G-25 montrant le déplacement successif des protéines, de l'activité ATPasique et du sulfate ammonique. La filtration est effectuée à la chambre froide, sur une colonne de 35 g de Sephadex G-25 (fabrication 1960; 80 % du matériel compris entre 50 et 140 mesh) de 7 cm<sup>2</sup> de section et de 22 cm de haut, préparée en solution 0.02 M de NaCl et lavée à l'eau avant usage. Les 12 ml de solution enzymatique, riche en sulfate ammonique, sont introduits à la vitesse de 3 ml/min puis suivis d'eau pure à la même vitesse. Les fractions collectées sont de 10 ml. Les protéines sont mesurées colorimétriquement par la méthode de Lowry et collaborateurs<sup>6</sup>. L'unité d'activité ATPasique est la quantité d'enzyme catalysant l'apparition d'un mg de phosphate (exprimé en phosphore) par heure à pH 6.5 et à 40°, en présence d'ATP 3 mM et de CaCl<sub>2</sub> 4 mM. Les sulfates sont mesurés par turbidimétrie, sous forme de sulfate de baryum.

Nous avons récemment cherché à éliminer le sulfate ammonique de fractions enzymatiques riches en apyrase (de pomme de terre) par filtration sur Sephadex G-25; cette opération rapide devait remplacer une longue dialyse au cours de laquelle s'observait une inactivation importante de l'enzyme. La filtration sur Sephadex G-25,

pourtant imperméable aux protéines les plus petites, ne permet pas de recueillir l'apyrase débarrassée des sulfates si le développement n'est pas effectué par une autre solution saline assez concentrée. Cette difficulté, particulière à certaines protéines sans doute, ne semble pas avoir encore été signalée<sup>5</sup>.

La Fig. 1 montre que le pic principal des protéines, recueilli au cours d'une filtration sans sel est pauvre en activité ATPasique et que l'enzyme responsable ne sort de la colonne que lorsque les sulfates apparaissent. Si la filtration est effectuée en présence de NaCl 0.02 ou 0.05 M, l'activité ATPasique sort en deux pics d'importance équivalente. Il faut porter la concentration du NaCl à 0.2 M pour que le deuxième pic d'activité ATPasique disparaisse et que toute l'activité enzymatique sorte avec le pic des protéines, se séparant ainsi des sulfates. Le bénéfice de la séparation est toutefois perdu en pratique puisque les protéines se trouvent à nouveau en solution saline concentrée et puisqu'il ne sera notamment plus possible de les adsorber sur DEAE-cellulose par exemple, en raison de la force ionique trop élevée du chlorure sodique présent.

Nos préparations d'apyrase contiennent certes deux enzymes au moins que la chromatographie sur DEAE-cellulose permet de dissocier (LIÉBECQ ET LALLEMAND, résultats inédits). L'un d'entre eux est une ATPase n'ayant presque pas d'activité en présence d'ADP, l'autre est une apyrase vraie, semble-t-il, capable de catalyser la déphosphorylation de l'ATP et de l'ADP. Ce n'est toutefois pas à leur séparation que nous assistons ici; nous avons vérifié que le rapport ADPase/ATPase est bien le même dans les deux pics recueillis.

Le retard de déplacement de l'activité ATPasique en absence de sels peut être dû à une interaction entre ces enzymes et le gel de dextrane. Il s'agit peut-être aussi d'une précipitation de ces protéines au cours du dessalage qu'entraîne la filtration sur Sephadex G-25, dans les fractions de tête particulièrement, suivie de leur remise en solution en présence des sulfates. Cette particularité pourrait éventuellement être mise à profit si elle permettait de séparer certaines protéines d'un mélange et de les purifier de la sorte.

Laboratoire de Biochimie,  
Institut supérieur d'Éducation physique

C. LIÉBECQ

et

Laboratoire de Recherches pour la  
Protection des Populations civiles,  
Université de Liège, Liège (Belgique)

M. J. DEGUELDRE-GUILLAUME

<sup>1</sup> J. PORATH ET P. FLODIN, *Nature*, 183 (1959) 1657.

<sup>2</sup> W. BJÖRK ET J. PORATH, *Acta Chem. Scand.*, 13 (1959) 1256.

<sup>3</sup> B. GELOTTE, *J. Chromatog.*, 3 (1960) 330.

<sup>4</sup> P. E. WILCOX ET J. LISOWSKI, *Federation Proc.*, 19 (1960) 1350.

<sup>5</sup> P. FLODIN, *J. Chromatog.*, 5 (1961) 103.

<sup>6</sup> O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR ET R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265.

Reçu le 20 juin 1961