

## Moderne Methoden der Stofftrennung 2

Fachtagung des Schweizerischen Chemiker-Verbandes am 2. Schweizerischen Treffen für Chemie, 12. und 13. September 1968, in Basel

### Methoden der multiplikativen Verteilung\*

Von P. V. TAVEL

Theodor-Kocher-Institut der Universität Bern

#### Summary

A survey is given on fractionation by countercurrent distribution. The possibilities of application of the method for separation of macromolecular substances are discussed and it is shown that fractionation of serum proteins and synthetic polymers is possible in nearly critical phase pairs.

Die Extraktion mit beschränkt mischbaren Flüssigkeiten wird seit mehr als dreitausend Jahren zur Gewinnung reinerer Stoffe verwendet<sup>1</sup>. Das Ausschütteln im Scheidetrichter, das sogenannte «Ausäthern», ist wohlbekannt. Zwei Verbindungen lassen sich auf diese Weise leicht trennen, wenn sich ihre Verteilungskoeffizienten um etwa eine Zehnerpotenz unterscheiden. Der Verteilungskoeffizient  $k$  ist das Verhältnis der Konzentration in der spezifisch leichteren zu derjenigen in der schwereren Phase. Nach NERNST sind die Verteilungskoeffizienten in verdünnten Lösungen von der Konzentration unabhängig und zeigen gerade Verteilungsisothermen, solange die Verbindung in beiden Phasen gleiche Molekularzustände annimmt. Wenn das nicht der Fall ist und bei höheren Konzentrationen sind die Verteilungsisothermen gekrümmt.

Unterscheiden sich die Verteilungskoeffizienten zweier zu trennenden Verbindungen weniger als etwa eine Zehnerpotenz, so kann ihre Trennung erreicht werden, indem die Verteilung des Gemisches im Phasenpaar oftmals so wiederholt wird, daß sich der geringe Anreicherungseffekt einer einmaligen Verteilung vervielfacht. Hierzu wird das Gemisch zwischen gegenläufig aneinander vorbeigeführten Phasenlösungen ausgetauscht. Man nennt daher diese Verfahren multiplikative Verteilungen oder Gegenstromverteilung (Countercurrent distribution). Bevor freilich diese umständliche Methode verwendet wird, empfiehlt es sich, zu prüfen, ob die Komponenten nicht in einem andern Phasenpaar besser getrennt werden können.

#### Die Wahl des zweiphasigen Systems

Damit sich ein Phasenpaar für multiplikative Verteilung eignet, muß es folgende Forderungen erfüllen:

1. Der Trennfaktor, das Verhältnis der Verteilungskoeffizienten  $\beta = \frac{k_A}{k_B}$ , soll möglichst groß sein; in der Regel nicht kleiner als 1,5.
2. Der mittlere Verteilungskoeffizient des Komponentengemischs soll zwischen etwa 0,2 und 5 liegen.
3. Die Komponenten sollen in den Phasen analytisch leicht zu erfassen sein, z. B. mittels Extinktions- oder Rückstandbestimmungen.
4. Die getrennten Komponenten müssen sich leicht und unverändert isolieren lassen.
5. Die Phasen sollen sich schnell entmischen. Dies setzt geringe Viskosität, hohen Dichteunterschied und ausreichende Oberflächenspannung der Phasen voraus.

Für die Wahl geeigneter Lösungsmittel ist man weitgehend auf experimentelle Erfahrungen angewiesen. Immerhin bestehen einige Faustregeln, die bei der Zusammenstellung zweiphasiger Systeme nützlich sind. Ob sich zwei Lösungsmittel nicht, beschränkt oder unbeschränkt mischen, hängt von den Nebenvalenz-Wechselwirkungen innerhalb und zwischen den Lösungsmitteln ab. Die Erfahrung hat gezeigt, daß im wesentlichen die Wasserstoffbrücken mehr als andere Nebenvalenzeffekte das Lösungsverhalten bestimmen<sup>2</sup>. Reine Lösungsmittel oder Mischungen, die durch H-Bindungen vernetzt oder assoziiert sind, mischen sich schlecht oder nicht mit solchen, die sich an H-Brücken nicht beteiligen können. Zur H-Bindung sind ein Protonen-Donator, ein locker gebundenes H-Atom, und ein Protonen-Akzeptor, ein elektronegatives Atom mit einem freien Elektronenpaar, nötig. Sie können in ein und demselben oder in verschiedenen Molekeln sein. HECKER hat auf Grund dieser Beurteilung die sogenannte «mixotrope Reihe» aufgestellt, in welcher die Lö-

\* Vortrag gehalten am 2. Schweizerischen Treffen für Chemie anlässlich der 4. Internationalen Fachmesse für Laboratoriums- und Verfahrenstechnik in Basel, am 13. September 1968.

<sup>1</sup> A. BITTEL, *Chem.-Ing.-Techn.* 31 (1959) 365.

<sup>2</sup> F. A. V. METZSCH, *Z. angew. Chem.* 68 (1956) 323. E. HECKER, *Chimia* 8 (1954) 229.

lösungsmittel nach ihrer Fähigkeit geordnet sind, als Protonen-Donator oder -Akzeptor zu wirken. Lösungsmittel benachbarter Klassen sind unbeschränkt, andere beschränkt oder nicht mischbar.

Die Regel ist nur bedingt gültig, da neben der funktionellen Gruppen die C-Zahl der Alkylreste und die Ringssysteme berücksichtigt werden müssen: z.B. ist Äthanol mit Wasser unbeschränkt mischbar, n-Butanol aber nicht. Eine feinere Abstufung ist auch nach der Bindungsenergie der H-Brücken vorzunehmen.

Dieselben Regeln lassen sich auch zur Abschätzung der Verteilungskoeffizienten einer Verbindung in einem gegebenen Phasenpaar anwenden. Je stärker die Nebenvalenzbindung eines gelösten Stoffes zu einer Phase ist, um so mehr verschiebt sich das Verteilungsgleichgewicht zu ihren Gunsten.

Nach COLLANDER<sup>3</sup> nimmt im Phasenpaar Äther-Wasser und Butanol-Wasser  $\log k$  innerhalb homologer Reihen in erster Näherung proportional zur C-Zahl zu. Die funktionelle Gruppe bestimmt die Lage der Geraden im Diagramm (Abb. 1).

Die Verteilung eines Stoffes in einer Phase kann dadurch gefördert werden, daß man ihm eine Verbindung

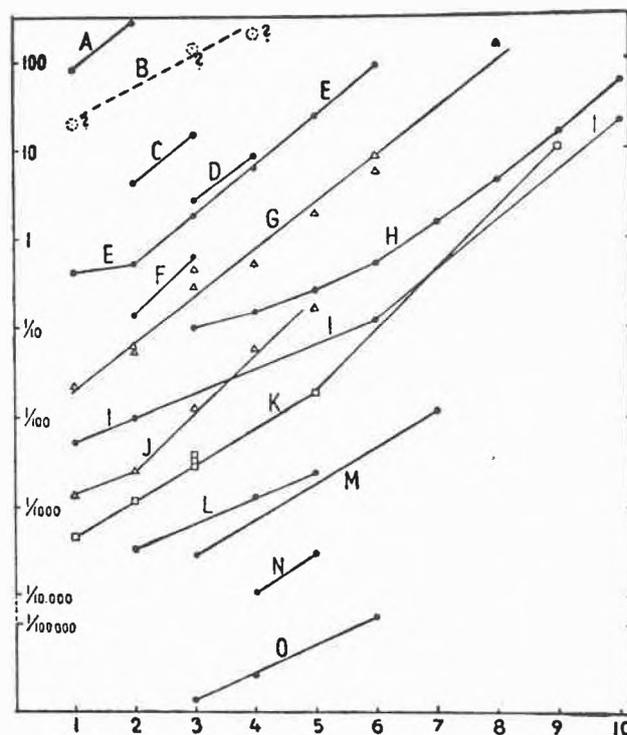


Abb. 1. Abhängigkeit des Logarithmus der Verteilungskoeffizienten (Ordinate) von der C-Zahl (Abszisse) im Phasenpaar Äther/Wasser nach<sup>3</sup>

A Alkyljodide, B Methankohlenwasserstoffe, C  $\alpha$ -Bromfettsäuren, D Alkylacetate, E Fettsäuren, F Alkylcarbamate, G Alkylamine, H Dicarbonsäuren, I Glykole, J Fettsäureamide, K (Alkyl)-Harnstoffe, L Diamine, M (Alkyl)-Malonamide, N 4wertige Alkohole, O  $\alpha$ -Aminosäuren

<sup>3</sup> R. COLLANDER, *Acta Chem. Scand.* 3 (1949) 717, 4 (1950) 1085, 5 (1951) 774.

mit großer Affinität zur Phase zufügt, welche sich mit der zu verteilenden Komponente assoziiert. Mit solchen Lösungsvermittlern oder «Carriers» läßt sich die Selektivität der Phasenpaare verbessern. z.B. kann die Verteilung von Säuren in organischen Phasen mit quaternären Ammoniumbasen mit großen Alkylresten begünstigt werden.

Abweichungen vom Nernstschen Verteilungssatz sind dann zu beobachten, wenn in der einen oder andern Phase Assoziationen oder Dissoziationen auftreten.

In der Literatur sind umfangreiche Tabellen zu finden<sup>4</sup>, die für viele Stoffklassen zweiphasige Systeme enthalten, die zu ihrer Untersuchung verwendet worden sind. Für neue Trennprobleme müssen Phasenpaare empirisch ermittelt werden. Drei- und Mehr-Komponenten-Systeme dürften noch viele neue Möglichkeiten bieten.

### Multiplikative Verteilschemas

Multiplikative Verteilungen lassen sich nach verschiedenen Verfahren durchführen, je nach Trennproblem ist das eine oder andere vorzuziehen. Sie unterscheiden sich im wesentlichen durch drei Merkmale:

1. Das Stoffgemisch kann einmalig oder kontinuierlich zugegeben werden.
2. Die Phasenpaare werden jeweils in infinitesimalen oder endlichen Volumen zum Austausch gebracht. Es können auch infinitesimale Phasenvolumen mit endlichen ins Gleichgewicht gesetzt werden<sup>5</sup>.
3. Die Bewegung der Phasen erfolgt kontinuierlich oder schubweise.

Für den Trenneffekt, die Anreicherung, die Ausbeute und den Aufwand sind die beiden ersten Merkmale entscheidend. Zu jedem Verfahren gibt es zudem eine Reihe von Varianten<sup>6</sup>. Hier seien nur zwei einander gegenübergestellt: die multiplikative Verteilung nach CRAIG und die Arbeitsweise mit kontinuierlichem Phasentransport, erstmals von JANTZEN<sup>7</sup> angewendet.

Das bekannteste multiplikative Verteilschema ist der Craigsche Grundprozeß. Das Verteilprinzip ist in Abb. 2 dargestellt. In einer Batterie von Verteilgefäßen befinden sich gleiche Volumen Unterphase. In das 1. Glas gibt man Oberphase und einmalig das zu trennende Gemisch hinzu. Nach dem Mischen zur Gleichgewichtseinstellung und nachdem sich die Phasen wieder getrennt haben, wird die Oberphase in das nächste Glas überführt und dem 1. Gefäß eine neue Portion reiner Oberphase zugefügt. Damit ist der 1. Verteilungsschritt vollzogen.

<sup>4</sup> F. A. V. METZSCH, *Z. angew. Chem.* 65 (1953) 586, 68 (1956) 323. O. JÜBERMANN, in HOUBEN-WEYL, *Methoden der organischen Chemie*, Band I/1.

<sup>5</sup> W. FISCHER, *Chem.-Ing.-Techn.* 36 (1964) 85.

<sup>6</sup> L. C. CRAIG, in WEISSBERGER, *Technique of Organic Chemistry*, Vol. III/1, 2nd edition. O. JÜBERMANN, in HOUBEN-WEYL, *Methoden der organischen Chemie*, Band I/1, 4. Auflage, S. 227. E. HECKER, *Verteilungsverfahren im Laboratorium*, Verlag Chemie, 1955.

<sup>7</sup> E. JANTZEN, *Dechema-Monographie* 5 (1932) 48, 92.

Mit jedem weiteren Schritt wird das Verteilungsgleichgewicht in jedem Glas hergestellt, die Oberphasenreihe um ein Element nach rechts verschoben und um ein Glied vermehrt. Der Grundprozeß ist beendet, wenn die Oberphasen bis zum letzten Gefäß vorgeückt sind.

Bei diesem Prozeß werden die Gemischkomponenten mit den Oberphasen nach rechts getragen und immer wieder mit Unterphase ausgetauscht. Komponenten mit hohen Verteilungskoeffizienten, die sich vorwiegend in die Oberphase verteilen, gelangen im Grundprozeß in höhere Gefäßnummern als solche mit niederen Koeffizienten, die in den Anfanselementen verbleiben.

Im Grundprozeß können auch die Unterphasen bewegt und die Oberphasen stationär gehalten werden. Er läßt sich auch fortsetzen, indem die Ober- oder Unterphasen am Ende der Batterie als Fraktionen beiseite gestellt werden, anstatt sie in ein neues Verteilungselement zu geben. In den Fraktionsreihen sind die Komponenten analog wie nach dem Grundprozeß verteilt.

Interessant sind Verfahren, in welchen mit jedem Verteilungsschritt die beiden Phasen gleichzeitig oder abwechselnd in entgegengesetzter Richtung verschoben werden und das Gemisch einmalig oder wiederholt in der Mitte zugeführt wird. Im letzteren Fall bildet sich allmählich ein stationärer Zustand (steady state) aus, in welchem eine konstante Konzentration in der Batterie und den ausfließenden Lösungen vorliegt<sup>8</sup>.

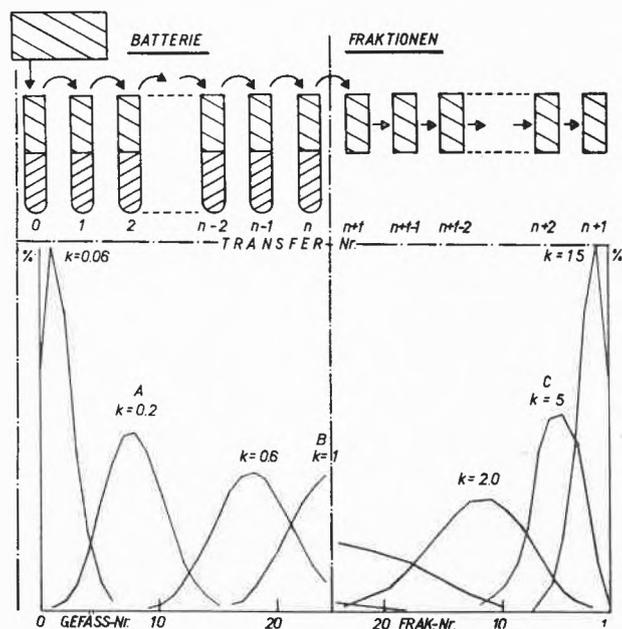


Abb. 2. Craigscher Grundprozeß und Entnahme der Oberphasen

▨ untere Phase      ▩ obere Phase

Darunter Verteilung der Komponenten mit den Verteilungskoeffizienten  $k = 15, 5, 2, 0, 1, 0, 0,6, 0,2$ , und  $0,06$  in den Fraktionen und in der Batterie nach 48 Verteilungsschritten mit 24 Verteilgefäßen

<sup>8</sup> F. C. ALDERWEIRELDT, *Anal. Chem.* 33 (1961) 1920.

Um diese multiplikativen Verteiloperationen auszuführen, gibt es heute verschiedene käufliche Batterien, die automatisch funktionieren. Eine Apparatur von CRAIG z. B. enthält mehrere 100 Dekantiergefäße (Abb. 3). Mit diesen kann durch Schaukeln gemischt und durch Kippen die Oberphase transportiert werden<sup>6, 9</sup>.

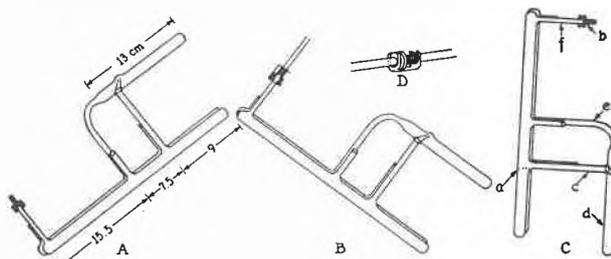


Abb. 3. Dekantiergefäß der Apparatur von CRAIG zur Gegenstromverteilung. A-B Schaukeln zur Gleichgewichtseinstellung. C Transport der oberen Phase. a Niveau der unteren Phase. c Überlaufrohr für obere Phase. d Zwischengefäß. e mündet in das nächste Gefäß. Nach CRAIG<sup>6</sup>

Das zweite Verfahren mit kontinuierlichem Phasentransport wird in der Regel mit dauernder Gemischzugabe ausgeführt. Es gibt verschiedene senkrechte Kolonnen und horizontale Batterien zu seiner Anwendung<sup>10</sup>, eine bewährte ist diejenige von SCHEIBEL<sup>11</sup>.

Bei kontinuierlichem Phasentransport ist es wesentlich, daß sich das Verteilungsgleichgewicht zwischen den aneinander vorbeiströmenden Phasen dauernd möglichst vollständig einstellt, wie in Rektifizierkolonnen das Gleichgewicht zwischen Dampf und Kondensat angestrebt wird. In der Scheibel-Kolonne (Abb. 4) wird das durch abwechselnde Misch- und Entmischungszonen erreicht. In den ersten wird das Phasenpaar gerührt. Die andern sind mit spiralgewickelttem Maschendraht gefüllt. In ihnen können sich die Phasen in Ruhe trennen. Leichte Phase fließt von unten nach oben, die schwere in umgekehrter Richtung. Das Gemisch wird in der Regel dauernd je nach Trennproblem in der Mitte, in der oberen oder unteren Hälfte zugeführt. Die Kolonne benötigt einige Zeit, bis der stationäre Zustand erreicht ist, und liefert dann zwei stark angereicherte Fraktionen.

Um das Verteilungsgleichgewicht einzustellen, baut man auch in horizontalen Batterien abwechselnd Mischer- und Entmischerkammern ein oder verwendet nach SIGNER rotierende Scheiben<sup>12</sup>, die durch beide Flüssigkeitsschichten drehen und einen dünnen Film der einen Phase durch die andere ziehen.

Bei der Verteilungschromatographie von MARTIN und SYNGE<sup>13</sup> wird einmalige Gemischzugabe mit kontinuier-

<sup>9</sup> O. POST und L. C. CRAIG, *Anal. Chem.* 35 (1963) 641. F. C. ALDERWEIRELDT und M. VERZELE, *Bull. Soc. Chim. Belgique* 70 (1961) 703.

<sup>10</sup> O. JÜBERMANN, in HOUBEN-WEYL, *Methoden der organischen Chemie*, Band I/1, S. 322.

<sup>11</sup> E. G. SCHEIBEL, *Chem. Eng. Progr.* 44 (1968) 681, 777.

<sup>12</sup> R. SIGNER und H. ARM, *Helv. Chim. Acta* 50 (1966) 47.

<sup>13</sup> A. J. P. MARTIN und R. L. M. SYNGE, *Biochem. J.* 35 (1941) 1358.

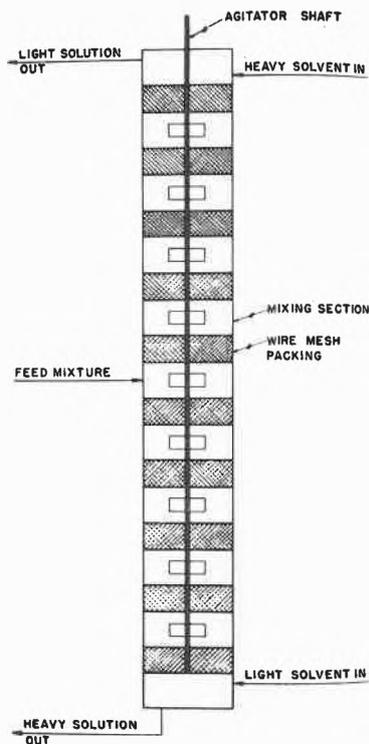


Abb. 4. Verteilkolonne nach SCHEIBEL, schematisch, mit 9 Misch- und 10 Entmischungszonen. Gemischzufuhr in der Mitte. Leichte Phase fließt von unten nach oben. Schwere Phase von oben nach unten. Nach CRAIG und SCHEIBEL<sup>6</sup>

lichem Phasentransport angewandt. Hier wird die unbewegte Phase durch ein festes Trägermaterial, z. B. Kieselsäuregel, in der Säule festgehalten und von der mobilen Gegenphase durchströmt. Im Eluat treten die Komponenten in der Reihenfolge ihrer Verteilungskoeffizienten aus.

Die Methoden mit einmaliger Stoffzugabe, das Craig-Verfahren und seine Varianten, liefern ein «Komponentenspektrum» (Abb. 5). Sie eignen sich zur analytischen Zerlegung von unbekanntem Mehrkomponentengemischen in ihre Bestandteile. Alle Verfahren dagegen mit kontinuierlicher Gemischzufuhr trennen nur in zwei Fraktionen, die bei richtiger Betriebsführung die Komponenten weitgehend getrennt enthalten (Abb. 6). Sie eignen sich zur präparativen Trennung größerer Gemischmengen.

Der apparative Aufwand und der Bedarf an Lösungsmittel zur Zerlegung eines Zwei-Komponenten-Gemischs

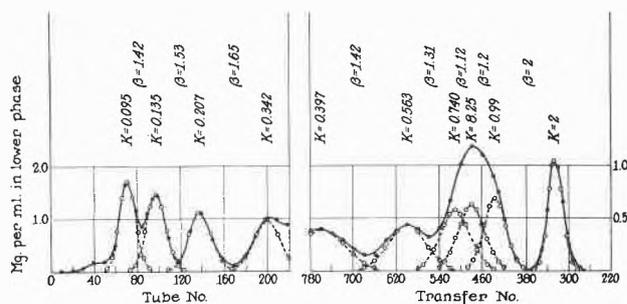


Abb. 5. Verteilung von 10 Aminosäuren in 220 Dekantiergefäßen mit 780 Verteilschritten. Nach CRAIG<sup>6</sup>

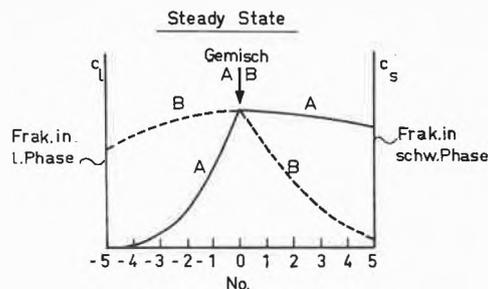


Abb. 6. Schematische Konzentrationsverteilung zweier Komponenten A und B in einer Batterie von 11 Elementen nach Erreichen des «Steady state»-Zustandes.  $c_l$  Konzentration in leichter,  $c_s$  in schwerer Phase

mischs ist beim Craig-Verfahren bedeutend größer als bei kontinuierlicher Phasenführung und infinitesimalen Austauschvolumen<sup>14</sup>. Dies beruht auf der bekannten Erfahrung, daß es vorteilhafter ist, eine Lösung in vielen Schritten mit kleinen Proportionen des Lösungsmittels zu extrahieren, als dieses in einem Mal zuzugeben. Sogar für die Trennung von drei Komponenten kann die kontinuierliche Kolonne vorteilhafter sein, auch wenn das Gemisch in zwei Arbeitsprozessen zerlegt werden muß. Das Craig-Verfahren behält aber seinen Wert bei der Zerlegung unbekannter Mehrstoffgemische und zur analytischen Zerlegung kleiner Mengen.

#### Berechnungen

Bei allen Verteilschemas lassen sich die Komponentenkonzentrationen in den Fraktionen und den Extrakten aus den Verteilungskoeffizienten, den Phasenvolumen und Strömungsgeschwindigkeiten, der Anzahl Stufen und Trennschritte berechnen, wobei in der Regel die Gültigkeit des Nernstschen Verteilungssatzes erforderlich ist<sup>6</sup>. Das Craigsche Verfahren hat für analytische Zwecke den Vorteil, daß der Vergleich zwischen berechneten und experimentellen Verteilkurven ein wertvolles Kriterium für die Reinheit einer fraktionierten unbekanntem Komponente liefert. Für Verbindungen, die sich «ideal» verhalten, ist die Verteilung eine Gaußsche Verteilungskurve. Die Lage des Maximums in der Fraktionenreihe liefert den Verteilungskoeffizienten, zur Berechnung der vollständigen Gaußschen Kurve sind lediglich noch einige bekannte Versuchsparameter erforderlich. Im Grundprozeß nimmt der Abstand der Verteilungsschritte proportional zur Anzahl  $n$  der Verteilungsschritte zu, die Breite in halber Höhe der Gauß-Kurven aber nur mit  $\sqrt{n}$  (Abb. 7), so daß der Trenneffekt durch Vermehrung der Verteilungsschritte soweit gesteigert werden kann, bis die Trennung durch die zunehmende Verdünnung der Komponenten uninteressant oder der apparative Aufwand zu groß wird. Ist die experimentelle Kurve breiter als die berechnete, so ist in der Regel die Komponente unrein. Die Prüfung der Kon-

<sup>14</sup> E. G. SCHEIBEL, *Chem.-Ing.-Techn.* 27 (1955) 341.

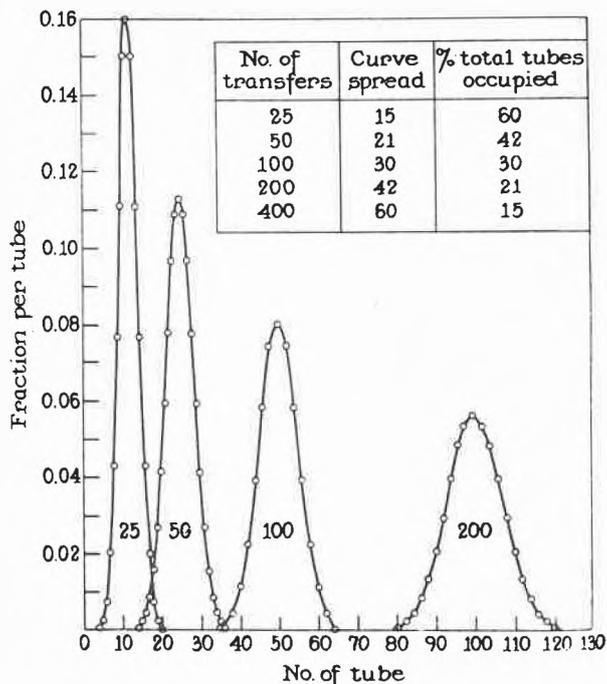


Abb. 7. Ideale Verteilungskurven einer Komponenten mit  $k = 1$  in gleichen Phasenvolumen nach  $n = 25, 50, 100$  und  $200$  Verteilungsschritten. Nach CRAIG

stanz der Verteilungskoeffizienten in den Fraktionen der Glockenkurve ist ein weiterer Reinheitstest.

Für kontinuierliche Verfahren lassen sich die optimalen Betriebsbedingungen und der Aufwand berechnen<sup>14</sup>. HORN<sup>15</sup> hat Arbeitsunterlagen veröffentlicht, mit welchen jedes Verteilschema berechnet werden kann, ausgehend von der Wirkung der einzelnen Verteilstufe.

**Beispiele**

Die Leistungsfähigkeit der Gegenstromverteilung sei an einem Beispiel illustriert. KORTÜM und BITTEL<sup>16</sup> haben die Trennung von stereoisomeren Mentholen, der

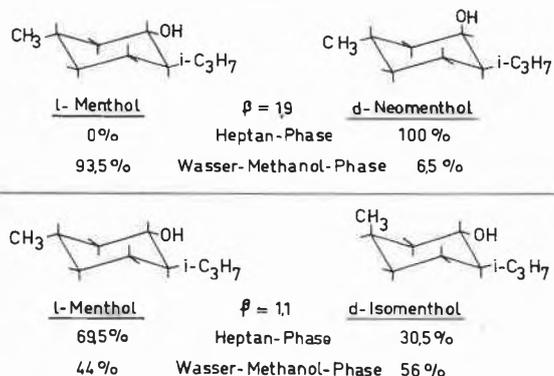


Abb. 8. Trennungsversuche von l-Menthol, d-Isomenthol und d-Neomenthol mit Scheibel-Kolonnen nach <sup>16</sup>

cis-trans-Isomeren des Methylcyclohexanols und derjenigen des 1,2,4,5-Tetrabromcyclohexans untersucht. Sie verwendeten 2 Scheibel-Kolonnen zu je 30 Rührer-Füllkörperzonen von 1,3 m Länge und 4,0 cm  $\varnothing$ . Das Isomerengemisch wurde in der Mitte zwischen beiden Kolonnen injiziert. Das zweiphasige System bestand aus n-Heptan (50), Wasser (25), Methanol (50).

Menthol besitzt 3 asymmetrische C-Atome, 8 optische Isomere und 4 racemische Formen (Abb.8).

Versucht wurde u. a. die Trennung von äquimolekularen Mengen von d-Neomenthol und l-Menthol mit dem Verhältnis der Verteilungskoeffizienten 1,9. Bei optimalen Strömungsgeschwindigkeiten enthielten

die Heptan-Phase	100 % d-Neomenthol
	0 % l-Menthol
die Wasser-Methanol-Phase	6,5% d-Neomenthol
	93,5% l-Menthol

Die Trennung von l-Menthol und d-Isomenthol ist weit schwieriger, weil das Verhältnis der Verteilungskoeffizienten nur 1,1 beträgt, immerhin enthielt

die Heptan-Phase	bis zu 69,5% l-Menthol
	30,5% d-Isomenthol
und die Wasser-Methanol-Phase	44 % l-Menthol
	56 % d-Isomenthol

In den letzten Jahren ist die Gegenstromverteilung speziell zur Fraktionierung von ungesättigten Fettsäuren<sup>17</sup>, hochsiedenden Phenolen aus Steinkohlenteer<sup>18</sup> und seltenen Erden<sup>19</sup> erfolgreich verwendet worden. Die Methode wird routinemäßig für viele biochemische Untersuchungen benützt.

**Entwicklungsmöglichkeiten zur Fraktionierung makromolekularer Verbindungen**

CRAIG und Mitarbeitern ist es nach der erfolgreichen Zerlegung von Peptidgemischen gelungen, auch Proteine, Insulin, Albumin<sup>20</sup> und die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten des Hämoglobins<sup>21</sup> zu verteilen, indem sie im wesentlichen dieselben Phasenpaare benützten wie bei Peptiden.

Proteine müssen in Phasenpaaren mit einem hohen Wassergehalt verteilt werden, weil sie ohne Denaturierung in organischen Lösungsmitteln nicht löslich sind.

ALBERTSON hat makromolekulare Verbindungen und Zellfragmente zwischen nicht mischbaren verdünnten Lösungen zweier Polymerer differenziert verteilt<sup>22</sup>. Als solche dienen z. B. Dextran und Methylcellulosen. Bei genügend großem Molekulargewicht bilden ihre verdünnten Lösungen Koazervate, die 95% und mehr Wasser enthalten. Sie können dazu verwendet werden, bio-

<sup>17</sup> R. O. BUTTERFIELD, C. R. SCHOLFIELD, H. J. DUTTON *et al.*, *Anal. Chem.* 38 (1966) 87, 1695, 35 (1963) 1589.

<sup>18</sup> C. KARR, P. ESTEP und L. L. HIRST, *Anal. Chem.* 32 (1960) 463.

<sup>19</sup> W. FISCHER *et al.*, *Z. angew. Chem.* 78 (1966) 19.

<sup>20</sup> W. HAUSMANN und L. C. CRAIG, *J. Amer. Chem. Soc.* 80 (1958) 2703.

<sup>21</sup> R. J. HILL *et al.*, *J. Biol. Chem.* 237 (1962) 1549.

<sup>15</sup> F. HORN, *Chem.-Ing.-Techn.* 36 (1964) 99.

<sup>16</sup> G. KORTÜM und A. BITTEL, *Chem.-Ing.-Techn.* 30 (1957) 95.

logisches Material zu fraktionieren. Doch ist ihre Anwendung wegen der hohen Viskosität der Phasen und ihrer langsamen Trennung sehr mühsam.

PORTER<sup>23</sup> hat mittels Verteilungschromatographie mit beschränkt mischbaren Phasenpaaren  $\gamma$ -Globuline und andere Proteine fraktioniert. Es gelang ihm, Immunglobuline anzureichern. Er verwendete Phasenpaare aus Glykoläthern (Butylcellosolve, Diäthylenglykoldiäthyläther), Phosphate oder Magnesiumsulfat und 70 bis 80% Wasser. Um Denaturierung der Serumproteine zu vermeiden, müssen diese Systeme bei Temperaturen um 0° verwendet werden. Sie eignen sich nicht nur zur Verteilungschromatographie, sondern auch für eigentliche Gegenstromverteilung.

Bei derartigen Phasenpaaren ist es wesentlich, nahezu kritische Systeme mit hoher Mischungslücke, hochliegendem kritischem Punkt und horizontalen Konnoden zu verwenden, damit beide Phasen viel Wasser enthalten (Abb. 9). Ein solches System bilden z.B. Diäthylenglykoldiäthyläther, Natriumglycerophosphat und Wasser bei pH 7 bis 9. Ihr Lösungsvermögen für Proteine nimmt aber rasch ab, wenn sich die Phasenzusammensetzung von der kritischen entfernt.

Fast kritische Phasenpaare eignen sich aber für die Gegenstromverteilung im allgemeinen nicht. Die Phasen sind einander allzu ähnlich. Niedermolekulare Verbindungen verteilen sich ohne Unterschied gleich in beide Phasen. BRÖNSTED<sup>25</sup> hat gezeigt, daß die Verteilung makromolekularer Verbindungen und von Kolloiden um so einseitiger wird, je höher ihr Molekulargewicht ist und je mehr sich die Phasenzusammensetzung von derjenigen im kritischen Punkt entfernt. Phasenpaare die weit ab vom kritischen Punkt liegen, enthalten makromolekulare Verbindungen ausschließlich in der einen oder andern Phase. Am kritischen Punkt andererseits müssen sie sich auf beide Phasen gleich verteilen. Beide Gebiete sind für multiplikative Verteilungen deshalb

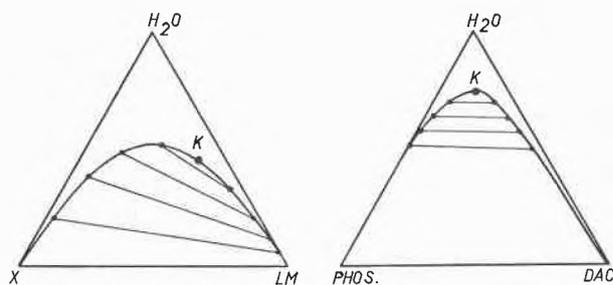


Abb. 9. Dreiecksdiagramme von Drei-Komponenten-Systemen: links für Proteinverteilung ungeeignet, rechts für Proteine geeignet, große Mischungslücke und hoher kritischer Punkt

<sup>22</sup> P. Å. ALBERTSON, *Biochim. Biophys. Acta* 27 (1958) 378, 37 (1960) 230.

<sup>23</sup> R. R. PORTER, *Biochem. J.* 53 (1953) 320, 59 (1955) 405.

<sup>24</sup> P. V. TAVEL, *Helv. Chim. Acta* 38 (1955) 520, 45 (1962) 1576.

<sup>25</sup> J. N. BRÖNSTED *et al.*, *Z. phys. Chem. (BODENSTEIN-Festband)* 1931, 257, 155 (1931) 343, *Abt. A* 168 (1934) 381.

ungünstig. Dagegen ist das enge Zwischengebiet fast kritischer Phasen geeignet, makromolekulare Verbindungen unterschiedlich auf beide Phasen zu verteilen. Um reproduzierbare Resultate zu erzielen, ist es wichtig, die Zusammensetzung der Phasenpaare auf einen exakten Abstand vom kritischen Punkt einzustellen. Das läßt sich experimentell an Hand des Phasendichteunterschiedes leicht bewerkstelligen.

Berücksichtigt man diese Verhältnisse, so lassen sich z. B. Serumproteine in Phasenpaaren in den erwähnten Systemen aus Glykoläthern, Glycerophosphaten und Wasser durch multiplikative Verteilung fraktionieren. Je nach pH und Wahl der Salzkomponenten liegen die Verteilungskoeffizienten höher oder tiefer, und man kann zur Trennung bestimmter Serumproteine Phasenpaare mit günstigen Anreicherungsfaktoren finden.



Abb. 10. Verteilzentrifuge mit 40 Verteilgefäßen. Von links nach rechts Phasenvorrat, Pumpen, Steuergerät, davor Fraktionsensammler, Zentrifugenscheibe, Antrieb<sup>26</sup>

Kritische Phasenpaare haben freilich auch den Nachteil, daß sie nach dem Mischen zur Gleichgewichtseinstellung mehrere Stunden benötigen, um sich zu trennen. Nachdem in langwierigen Vorversuchen erkannt worden war, daß eine Gegenstromverteilung von Proteinen nützlich sein könnte, hat die Werkstatt des Theodor-Kocher-Instituts eine Verteilzentrifuge (Abb. 10) konstruiert, mit welcher die Phasentrennung beschleunigt werden kann<sup>26</sup>. Die Verteilgefäße auf der Zentrifugenscheibe sind mit Verbindungen vom Boden des einen Glases zum Stopfen des nächsten in Serie geschaltet. Die Gläserbatterie wird zuerst mit Phasenpaar beladen, und dann auf die Zentrifuge gebracht. Ein Verteilungsschritt vollzieht sich in drei Arbeitsgängen: Mischen, bei langsamer Drehzahl 12 U/min. Zentrifugieren bei 800 U/min., Phasentransport bei 100 U/min. Zum Phasentransport werden von einem Wellenende her durch eine Stopfbüchse etwa  $\frac{2}{3}$  des Phasenvolumens an mobiler Phase (leichte oder schwere) injiziert, die im 1. Gefäß

<sup>26</sup> P. V. TAVEL und W. BOLLIGER, *Helv. Chim. Acta* 51 (1968) 278.

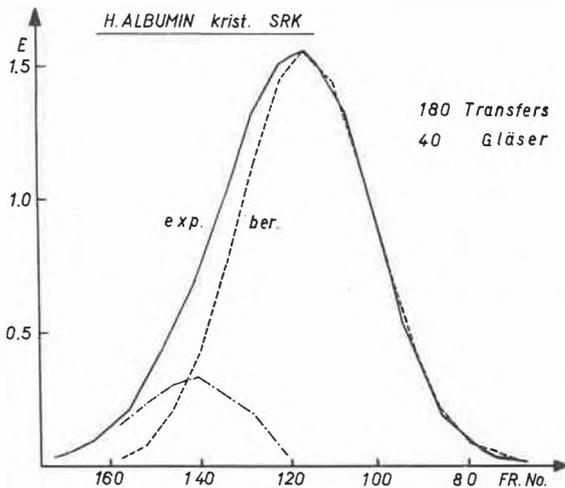


Abb. 11. Verteilung von Human-Albumin SRK im zweiphasigen System von Diäthylcarbitol, Natriumglycerophosphat, Wasser bei 1,5°. 180 Verteilschritte in 40 Verteilgefäßen. — Konzentration in den Fraktionen, — — — berechnete Werte, — · — — Differenz<sup>26</sup>

durch die Gegenphase strömt und mobile Phase ins nächste Element verdrängt. Diese Phasenverschiebung setzt sich durch die ganze Batterie fort, bis am andern Wellenende ein entsprechendes Volumen mobiler Phase in den Fraktionensammler austritt. Ein Verteilungsschritt vollzieht sich in etwa 15 min.

Abb. 11 zeigt die Verteilung eines lange gelagerten kristallisierten Albumins des Blutspendedienstes des SRK. Die experimentelle Verteilungskurve scheint einer theoretischen Gauß-Kurve zu entsprechen, der exakte Vergleich zeigt aber, daß eine kleine Menge einer zweiten Komponente vorhanden sein muß, die bei der bescheidenen Zahl an Verteilelementen noch nicht getrennt werden konnte. Sie wurde auch in der Gelektrophorese nachgewiesen und dürfte aus dimerem Albumin bestehen.

Auch das Gemisch der  $\gamma$ -Globuline, wohl eines der schwierigsten aktuellen Trennprobleme, läßt sich in viele Fraktionen von verschiedenen Verteilungskoeffizienten zerlegen<sup>27</sup>.

Nach den Beobachtungen von BRÖNSTED müßten auch polymer homogene Reihen von synthetischen Hochpolymeren nach dem Molekulargewicht fraktioniert werden können. ALMIN<sup>28</sup> ist es gelungen, im Phasenpaar aus Trichloräthylen, Chloroform und Wasser die Molekulargewichtsverteilung von Polyäthylenglykolen mit mittleren Molekulargewichten bis 6000 zu bestimmen. Mit der Verteilzentrifuge zu nur 40 Elementen konnten auch Präparate von Polyäthylenglykolen mittleren Molekulargewichts bis 30000 fraktioniert werden<sup>26</sup>. Die Fraktionen unterscheiden sich eindeutig in ihrer Viskosität und damit in ihrem mittleren Molekulargewicht. Es ist freilich nicht leicht, für die Verteilung synthetischer Polymerer geeignete Phasenpaare zu finden.

<sup>27</sup> P. V. TAVEL, *Helv. Chim. Acta* 51 (1968) 1526.

<sup>28</sup> K. E. ALMIN, *Acta Chim. Scand.* 11 (1957) 936, 1541, 13 (1959) 1263.

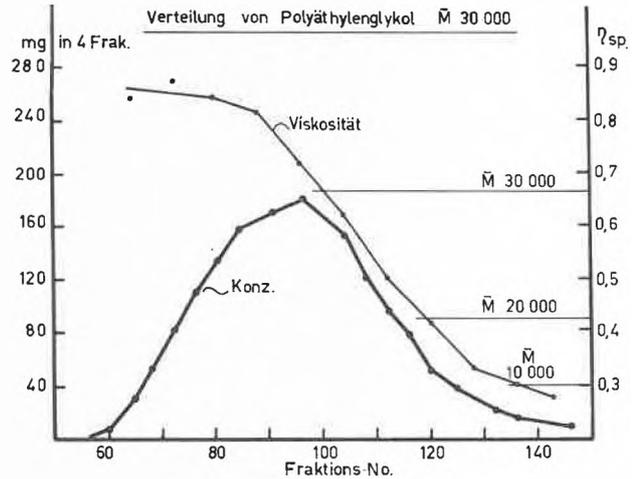


Abb. 12. Verteilung von Polyäthylenglykol  $\bar{M}$  30 000 im Phasenpaar Wasser, Alkohol, Tetrahydrofuran, Chloroform 40 Verteilgefäße mit je 9 ml leichter und 18 ml schwerer Phase. 150 Verteilungsschritte zu 7,2 ml transportierter leichter Phase. — beobachtete Verteilung, — — — berechnete Verteilung, — · — — spezifische Viskosität<sup>28</sup>

#### Vergleich der Gegenstromverteilung mit andern Trennmethode

Gegenstromverteilung ist bezüglich apparativem, Arbeits- und Lösungsmittelaufwand eine der anspruchsvollsten Methoden. Sie rechtfertigt sich aber in besonderen Fällen durch ihre Vorteile.

1. Sie trennt nach andern Eigenschaftsparametern, als die meisten gebräuchlichen Methoden:

- Gelfiltration und U.Z., die nach Molekulargewicht fraktionieren,
- Elektrophorese, die nach Ladung und Molekulargewicht differenziert,
- Chromatographie, die nach Ioneneigenschaften, Adsorptionskräften trennt.

Die Verteilung in Phasenpaaren unterscheidet nach den Nebenvaleenzwechselwirkungen der Komponenten zum Lösungsmedium und ihrem Molekulargewicht. Mit geeigneten Phasenpaaren lassen sich sehr geringfügige Eigenschaftsunterschiede erfassen.

Solange das praktische Reinheitskriterium vieler organischer Stoffe darin besteht, daß sie mit keiner Methode in verschiedene Komponenten zerlegt werden können, sind neue Trennmethode, die nach weiteren Eigenschaftsparametern trennen, stets notwendig.

2. Die Verteilungen lassen sich auf Grund weniger bekannter Parameter berechnen. Der Vergleich von Experiment und Theorie ist ein strenges und sehr wertvolles Kriterium auf Einheitlichkeit auch für unbekannte Stoffe.

3. Gegenstromverteilung läßt sich vom Mikromaßstab für analytische Untersuchungen bis zum industriellen Maßstab für präparative Zwecke durchführen.

4. Die Methode ist in den meisten Fällen sehr schonend für das Material, wenn sich geeignete Phasenpaare zur Verteilung finden lassen. Sie eignet sich für Stoffe, welche im Gaschromatographen nicht unzersetzt untersucht werden können.