

Die Verteilung von hochmolekularen Stoffen und von Zellfragmenten in flüssigen Phasenpaaren zur Fraktionierung*

Von P. v. TAVEL

Theodor-Kocher-Institut der Universität Bern, Freiestraße 1, Bern

Summary

The possibilities and the problems of fractionating high molecular substances and cell fragments with liquid phase pairs are discussed. Low molecular substances are now currently separated by countercurrent distribution. For high molecular substances, however, it is difficult to find suitable phase pairs. According to BRÖNSTED the selectivity of fractionation by distribution must increase with the molecular weight. Nearly critical phases are best suited for macromolecular substances. Examples of such system are given for 3 types of substances:

1. Systems of organic solvents for the fractionation of synthetic polymers. They can be used alternatively for the separation according to molecular weight or according to chemical composition.
2. Phase pairs for the distribution of serum proteins.
3. Systems composed of two incompatible solutions of high polymer substances. They are especially useful for the separation of large particles like cell fragments, membranes and nucleic acids.

1. Einleitung

Die Isolierung reiner chemischer Stoffe ist die Voraussetzung für alle Strukturaufklärungen, für die Bestimmungen von Eigenschaften und deren Beziehung zur Konstitution. Die Fortschritte der chemischen Forschung wurden deshalb zeitweise wesentlich durch die Erschließung neuer Trenn- und Isolierungsverfahren beschleunigt. Für niedermolekulare Stoffe sind in den letzten zwanzig Jahren sehr leistungsfähige Trennverfahren entwickelt worden, die sich weitgehend universell für eine sehr große Zahl von Verbindungen anwenden lassen: die Gaschromatographie, die Dünnschichtchromatographie und das Zonenschmelzen. Ältere Methoden sind verbessert worden, wie z. B. die Gegenstromverteilung.

Für makromolekulare Stoffe, namentlich auch Biopolymere, fehlen derart universelle Verfahren. Trennmethode, die sich für niedermolekulare Verbindungen eignen, versagen oft bei Polymeren wegen des hohen Molekulargewichts, der geringen Flüchtigkeit oder weil die Eigenschaftsunterschiede, nach welchen Komponenten getrennt werden, mit zunehmendem Molekulargewicht kleiner werden. Makromolekulare Verbindungen werden durch Kombination meist mehrerer Methoden isoliert, wie:

- Fällung, Extraktion
- Gelfiltration
- Zentrifugation
- Adsorption, Ionenaustausch
- Elektrophorese

Während Fällungs- und Extraktionsverfahren nach Löslichkeitsunterschieden trennen, unterscheiden Gelfiltration und Zentrifugation nach Molekulargewicht, letztere auch nach der Dichte, und Ionenaustausch und Elektrophorese auf Grund elektrischer Eigenschaften. Von Fall zu Fall muß die Kombination der Methoden experimentell gesucht werden, um gewünschte Komponenten zu isolieren. Ein generelles Verfahren wie die Gaschromatographie zur Zerlegung niedermolekularer Gemische fehlt für hochmolekulare Verbindungen.

Es gibt zur Zeit eine Reihe aktueller Probleme der Isolierung und Trennung makromolekularer Stoffe, z. B.

- die Zerlegung von Bausteinen von Zellmembranen,
- die Isolierung spezifischer Antikörper in relativ großer Menge,
- die Fraktionierung von Zellfragmenten und Organellen,
- die Zerlegung von Mischungen von Kopolymeren mit verschiedenem Monomerenverhältnis.

Es kann deshalb nützlich sein, nach weiteren Trennmethode, die auf Grund anderer Eigenschaften trennen als die bekannten Methoden.

In diesem Übersichtsartikel sollen die Möglichkeiten diskutiert werden, hochmolekulare Stoffe und Aggregate durch Verteilen in flüssigen Phasenpaaren zu trennen und zu fraktionieren.

2. Die Verteilung in flüssigen Phasenpaaren

Die Trennung von Stoffgemischen mit beschränkt mischbaren Lösungsmitteln ist seit dem Altertum bekannt¹ und jedem Chemiker geläufig. Nach NERNST verteilt sich eine Komponente in einem flüssigen Phasenpaar mit einem bestimmten Konzentrationsverhältnis $K = \frac{c'}{c''}$, das bei verdünnten Lösungen konzentrationsunabhängig ist. K wird der Verteilungskoeffizient genannt. c' und c'' bedeuten die Konzentrationen in der oberen (') und untern (") Phase. Zwei Stoffe lassen sich durch Verteilung in wenigen Schritten trennen, wenn sich ihre Verteilungskoeffizienten um ein bis zwei Zehnerpotenzen unterscheiden. Sind die Koeffizienten ähnlicher, so führt oft eine geeignete vielfach wiederholte Verteilung mittels

* Nach einem Vortrag vor der Berner Chemischen Gesellschaft am 10. Dezember 1971.

¹ A. BITTEL, *Chemie-Ing.-Techn.* 31 (1959) 365.

Gegenstromextraktion zum Ziel. Geräte hiezu sind im Handel und werden immer weiter entwickelt².

Die multiplikative Verteilung hat als Fraktionierungsmethode besondere Vorzüge^{3,4}.

- Die Verteilung läßt sich fast unbegrenzt multiplikativ wiederholen.
- Der multiplikative Vorgang läßt sich leicht berechnen. Der Vergleich einer experimentellen Verteilung mit der Berechnung liefert ein scharfes Kriterium über die Reinheit auch unbekannter Komponenten.
- Die Methode ist sehr schonend.

Makromolekulare Stoffe und Biopolymere sind vereinzelt mit Gegenstromverteilung isoliert und gereinigt worden, wobei Phasenpaare verwendet wurden, wie sie für niedermolekulare Verbindungen benützt worden sind. Die meisten Polymeren lösen sich in diesen Phasenpaaren schlecht oder so einseitig, daß eine Gegenstromverteilung nicht vorgenommen werden kann. BRÖNSTED⁵ hat das Verteilungsverhalten von Kolloiden und Stoffen hohen Molekulargewichts näher untersucht. Diese Arbeiten zeigen, daß die Fraktionierung hochmolekularer Stoffe mit flüssigen Phasenpaaren aussichtsreich ist, wenn geeignete Lösungsmittelsysteme gefunden werden können.

3. Die Brönstedtschen Ergebnisse

J. N. BRÖNSTED hat erkannt, daß das Verteilungsgleichgewicht von Kolloiden und Makromolekülen von zwei Energien abhängt⁵. Es sind:

1. Die kinetische Energie der Teilchen. Sie ist vom Molekulargewicht unabhängig und wirkt im Sinne gleichmäßiger Verteilung in beiden Phasen.
2. Die Differenz der potentiellen Energien, welche das gelöste Teilchen in der einen und andern Phase aufweist. Sie wächst ungefähr proportional mit dem Molekulargewicht und bedingt eine ganz einseitige Verteilung auf diejenige Phase, in der die potentielle Energie geringer ist.

Die Verteilung muß daher um so einseitiger werden, je höher das Molekulargewicht ansteigt. Die potentielle Energie der gelösten Partikel hängt von den Wechselwirkungskräften der Nebenvalenzen zwischen Makromolekül und Lösungsmittel ab. BRÖNSTED hat für polymerhomologe Stoffe die Abhängigkeit des Verteilungskoeffizienten vom Molekulargewicht mit $K = e^{\lambda \cdot M}$ ausgedrückt, wobei λ eine Konstante für das System Phasenpaar-gelöste Komponente darstellt. M ist das Molekulargewicht.

G. V. SCHULZ⁶ hat die Beziehung ausführlicher formuliert:

$$\ln K = e^{P(E' - E'')/RT},$$

wobei P der Polymerisationsgrad, E' und E'' die freien Enthalpien pro Monomerrest in den Phasen ' und ''

bedeuten. RT , Gaskonstante mal Temperatur, ist der Ausdruck für die kinetische Energie. Der Verteilungskoeffizient ändert in einem gegebenen System mit dem Molekulargewicht oder durch eine Verschiebung der Phasenzusammensetzung mit der Temperatur oder durch geringfügige Zusätze weiterer Lösungsmittel.

Zur experimentellen Überprüfung der Molekulargewichtsabhängigkeit hat BRÖNSTED Sebacin- und Valeriansäurebutylester verwendet. Die Abhängigkeit der Verteilungskoeffizienten mit der Phasenzusammensetzung konnte er an der Verteilung von Arsentrisulfid- und Chromhydroxid-Solen in Phasenpaaren aus Wasser, Äthanol und Butylalkohol zeigen. Um allzu einseitige Verteilungen zu vermeiden, mußten nahezu kritische Systeme verwendet werden. Ihre Phasenzusammensetzung ließ sich durch geringe Temperaturänderungen verschieben. Die theoretischen Ansätze konnten experimentell im wesentlichen bestätigt werden. Auch die Verteilungen von Polyäthylenoxid in Chloroform-Wasser, die SCHULZ und NORDT⁶ ausgeführt haben und in denen die Phasenzusammensetzung durch geringe Zusätze von Benzol verändert wurden, bestätigen die Brönstedtsche Theorie.

Diese Untersuchungen zeigen einerseits, daß die Verteilungskoeffizienten außerordentlich stark mit dem Molekulargewicht ansteigen, andererseits, daß eine nicht völlig einseitige Verteilung nur in nahezu kritischen Phasenpaaren erreicht werden kann.

4. Phasenpaare für die Fraktionierung hochmolekularer Stoffe

Die optimalen Bedingungen, um zwei hochmolekulare Stoffe durch Verteilung in flüssigen Phasenpaaren trennen zu können, liegen dann vor, wenn die Komponenten sich in verschiedenen Phasen anreichern und das Verhältnis ihrer Verteilungskoeffizienten 10 und mehr beträgt. In der Regel müssen aber chemisch ähnliche Verbindungen getrennt werden, die sich in derselben Phase anreichern, jedoch entsprechend ihren Verteilungskoeffizienten verschieden stark. Eine multiplikative Verteilung ist nur dann aussichtsreich, wenn sich wenigstens eine Komponente noch in der Gegenphase zu einem beträchtlichen Teil löst.

Es gibt kaum Polymere, die sich in zwei Lösungsmitteln lösen, die gegenseitig nur beschränkt mischbar sind. Eine Ausnahme bildet Polyäthylenoxid, das sowohl in Wasser als auch in Chloroform löslich ist. Am besten eignen sich nahezu kritische Phasenpaare aus drei und mehr Lösungsmitteln. Zweckmäßig gibt man zu einem guten Polymerlöser zwei gegenseitig nicht mischbare Lösungskomponenten, eine polarere und eine weniger polare, die sich mit dem ersten Lösungsmittel gut mischen. Diese brauchen das Polymere selbst nicht zu lösen. Ein solches System ist im Gibbsschen Dreiecksdiagramm (Abb. 1) dargestellt. Alle Mischungen innerhalb der Mischungslücke zerfallen in Phasenpaare, deren

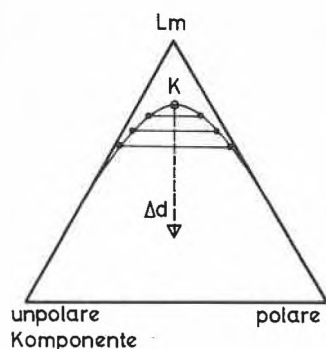


Abb. 1. Diagramm eines Phasenpaares aus drei Lösungsmittelkomponenten. *Lm*: Lösungsmittel für das zu trennende Gemisch; *K*: kritischer Punkt; Δd : Phasendichteunterschied

Zusammensetzung durch Punkte auf den beiden Ästen der Binodallinie liegen. Alle Mischungen auf ihrer Verbindungsgeraden, der Konnode, zerfallen in Phasen gleicher Zusammensetzung, aber unterschiedlicher Menge. Im kritischen Punkt laufen die beiden Äste der Binodallinie zusammen. Hier werden die Phasen einander gleich. Je weiter die Konnoden vom kritischen Punkt entfernt sind, um so mehr weichen die Phasenzusammensetzungen voneinander ab. Der Abstand eines Phasenpaares vom kritischen Punkt kann durch den Unterschied der Dichten oder der Brechungsindizes der Phasen charakterisiert werden. Der Dichteunterschied kann leicht mit einem Tauchkörper und einer Torsionswaage bestimmt werden, ohne daß die Phasen getrennt werden müssen.

Ein solches 3-Komponenten-System ist für die Verteilung von hochmolekularen Stoffen um so geeigneter, je höher die Mischungslücke reicht, was eine gute Löslichkeit für das Polymere gewährleistet, und je besser der kritische Punkt im Scheitel der Binodallinie liegt. Die Konnoden sind dann ungefähr horizontal, und beide Phasen enthalten viel Polymerlöser, was zur gleichmäßigen Verteilung beiträgt. Im kritischen Punkt ist der Verteilungskoeffizient für alle gelösten Komponenten unterschiedslos $K=1$. Mit zunehmendem Dichteunterschied verschiebt sich die Verteilung immer mehr zugunsten der oberen ($K > 1$) oder untern Phase ($K < 1$), und zwar nach BRÖNSTED um so schneller, je höher das Molekulargewicht ist. Mit der Wahl der drei Lösungsmittelkomponenten ist entschieden, ob sich eine Komponente in der oberen oder untern Phase anreichert. Will man den Verteilungsschwerpunkt in die Gegenphase verlegen, so muß eine vierte Lösungsmittelkomponente zugefügt werden, in der Regel ein Polymerlösungsmittel, das sich mehrheitlich in derjenigen Phase löst, die weniger von der gelösten Komponente aufgenommen hat.

Meist nimmt das Lösungsvermögen eines Phasenpaares für hochmolekulare Verbindungen mit der Entfernung vom kritischen Punkt rasch ab, so daß man für Fraktionierungen auf den relativ engen Bereich um den kritischen Punkt beschränkt ist. Fast kritische Phasenpaare eignen sich schlecht für niedermolekulare Stoffe, weil sich ihre Verteilungskoeffizienten in den allzuähn-

lichen Phasen zu wenig unterscheiden. Bei den hochmolekularen Stoffen dagegen ist die Differenzierung wegen der ausgesprochen einseitigen Verteilung ausreichend. Nahezu kritische Phasenpaare haben jedoch den Nachteil, daß sie sich wegen der geringen Dichteunterschiede und der kleinen Oberflächenspannung nur langsam entmischen. Dies bedingt sehr lange Versuchszeiten für multiplikative Verteilungen. Um sie abzukürzen, haben wir eine Verteilenzentrifuge entwickelt, welche die Phasen nach jeder Durchmischung durch Zentrifugieren rasch wieder trennt⁷.

In den folgenden Abschnitten werden drei Beispiele zweiphasiger Systeme beschrieben, welche sich für synthetische Polymere, Proteine und größere Aggregate eignen.

5. Lösungsmittelsysteme für synthetische Polymere

Zur Prüfung der Fraktionierungsmöglichkeiten synthetischer Polymerer mit flüssigen Phasenpaaren wurden Polymethacrylsäureester gewählt^{*8}. Sie unterschieden sich einerseits nach Molekulargewicht, andererseits nach den Estergruppen, wobei reine Methyl- und Äthylester, sowie ein Methyl-Äthyl-Kopolymer (1:1) verwendet wurden. Nach einigem Suchen wurde als geeignetes

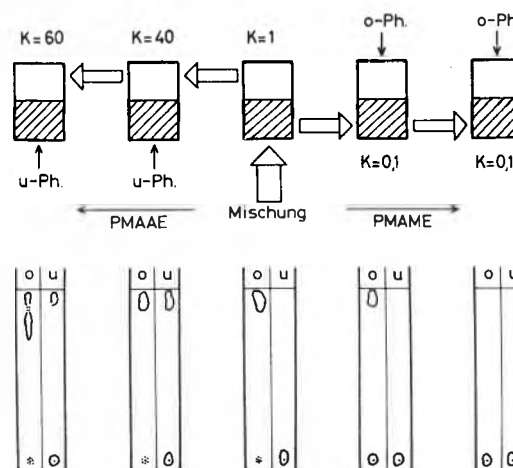


Abb. 2. Zweistufige Trennung eines Gemisches von Polymethacrylsäuremethylester (PMAME) und -äthylester (PMAAE) (1:1) im Phasenpaar von Aceton, *n*-Hexan, Wasser. *K*: Verteilungskoeffizienten. o-Ph.: obere Phasen, u-Ph.: untere Phasen. Unten Dünnschichtchromatogramme. Startpunkt unten. Der Methylester bleibt am Ausgangspunkt, der Äthylester wandert mit der Front⁸.

* Definierte Präparate wurden uns freundlicherweise von der Lonza AG, Fribourg, zur Verfügung gestellt.

² R. SIGNER und H. ARM, *Chemiker-Zig.* 95 (1971) 519. T. TANIMARA, J. J. PRISANO, Y. ITO und R. L. BOWMAN, *Science* 169 (1970) 54.

³ R. SIGNER und P. V. TAVEL, *Advances Protein Chem.* 11 (1956) 237.

⁴ P. V. TAVEL, *Chimia* 23 (1969) 57.

⁵ J. N. BRÖNSTED, *Z. physik. Chem.* (Bodenstein-Band) 1931, 257; J. N. BRÖNSTED und E. WARNING, *ibid.* 155 (1931) 343; J. N. BRÖNSTED und P. COLMANT, *ibid.* 168 (1934) 381.

⁶ G. V. SCHULZ, *Z. physik. Chem. A* 179 (1937) 22; G. V. SCHULZ und E. NORDT, *J. prakt. Chem. N. F.* 155 (1940) 115.

⁷ P. V. TAVEL und W. BOLLIGER, *Helv. Chim. Acta* 51 (1968) 278.

⁸ P. V. TAVEL und V. BIERI, *Makromol. Chem.* 149 (1971) 63.

Phasenpaar die Mischung Aceton (70%) als Polymerlöser, *n*-Hexan (22%) und Wasser (8%) ermittelt. Dieses System vermag 1 bis 2% der Ester zu lösen. In diesem System bei 20°C nahezu kritischen Phasenpaar geht der Methyl-ester fast vollständig in die untere, polare Phase, der Äthylester in die weniger polare, obere Phase.

Die Verteilung der Ester ist so einseitig, daß ihr Gemisch im Schütteltrichter in einem Schritt getrennt werden kann (Abb. 2). Dieses verteilt sich als Ganzes gleich auf beide Phasen ($K=1$). Setzt man aber wieder die beiden Phasen einzeln mit frischen Gegenphasen ins Gleichgewicht, so zeigt das Paar mit der 1. oberen Phase einen Koeffizienten von 40, dasjenige der 1. untern Phase einen solchen von 0,1. Wiederholt man die Verteilung nochmals, so ändert die Verteilung nicht mehr wesentlich. Die oberen Phasen enthalten die eine, die untern die andere Komponente. Diese lassen sich als Äthylester bzw. Methyl-ester mittels Dünnschichtchromatographie identifizieren.

Um die Ester nach Molekulargewicht oder Kopolymere nach ihrem Gehalt an Estergruppen zu fraktionieren, ist es erwünscht, sie gleichmäßiger auf beide Phasen zu verteilen oder sie sogar ganz in die andere Phase überzuführen. Bei Zusatz von weniger als 1% Benzol tritt der Methyl-ester vollständig in die weniger polare Oberphase über, während der Äthylester mit weniger als 1,5% Eisessig in die polare Unterphase wechselt (Abb. 3). Benzol und Eisessig sind Lösungsmittel für die Ester und gehen in die unpolare Hexanphase bzw. in die polare wäßrige Phase, wo sie die Löslichkeit der Ester erhöhen und so das Verteilungsgleichgewicht verschieben. Benzol und Eisessig kompensieren sich in ihrer Wirkung. Das Kopolymere, der Methyl-Äthylester (1:1), zeigt ein Verhalten, das zwischen demjenigen der beiden reinen Ester liegt.

Die Verteilung ist in allen Fällen um so extremer, je höher die Molekulargewichte sind (Abb. 3). Dies ent-

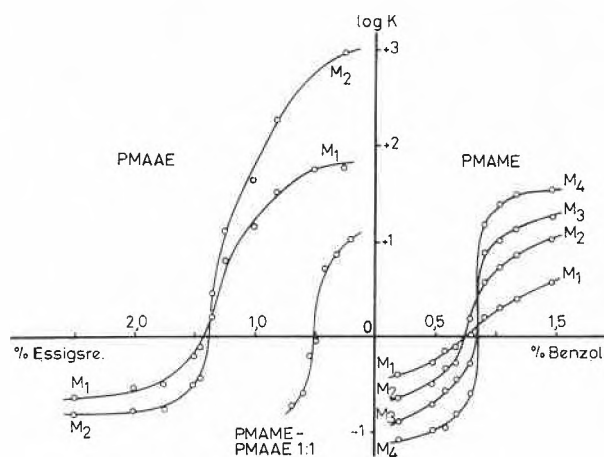


Abb. 3. Logarithmus der Verteilungskoeffizienten K von Polymethacrylsäuremethylester (PMAME) und -äthylester (PMAAE) und eines Mischesters 1:1 im Phasenpaar Aceton, *n*-Hexan, Wasser in Abhängigkeit von Benzol- und Essigsäurezusätzen. M_1 bis M_4 zunehmende mittlere Molekulargewichte 55 000 bis 600 000⁸

spricht der Voraussage nach BRÖNSTED, doch besteht die Linearität zwischen $\log K$ und M nur in einem kleinen Bereich um $K=1$. Die Benzol- und Eisessig-Konzentrationen, bei welchen gleiche Verteilung auf die Phasen ($K=1$) vorliegt, ist unabhängig vom Molekulargewicht.

Die Trennung der Ester nach Molekulargewicht durch Verteilung in diesen Phasenpaaren ist nicht leicht, weil deutliche Unterschiede in den Verteilungskoeffizienten mit dem Molekulargewicht nur bei ziemlich einseitiger Verteilung vorliegen, die für eine Gegenstromverteilung weniger geeignet ist. Dagegen erscheint eine Fraktionierung nach chemischer Zusammensetzung möglich, indem man die Phase mit dem Polymergemisch sukzessive mit einer Gegenphase extrahiert, deren Gehalt an Benzol oder Eisessig allmählich gesteigert wird. Eine Komponente nach der andern wird so extrahiert. Es ist ein Vorteil, daß die Fraktionierungen nach Molekulargewicht und chemischer Zusammensetzung nicht bei denselben Bedingungen erfolgen und damit weitgehend unabhängig voneinander vorgenommen werden können.

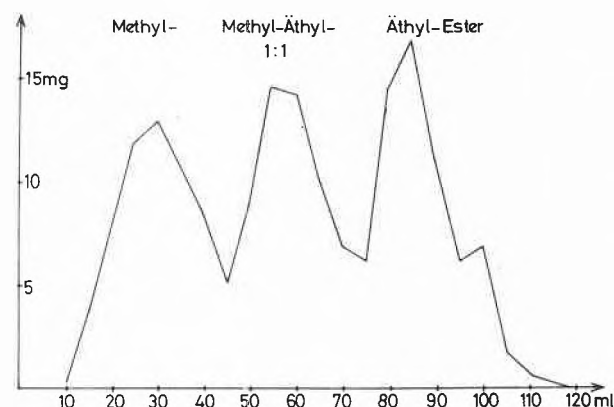


Abb. 4. Trennung von Polymethacrylsäuremethylester-, -äthyl- und -methyläthyl (1:1)-Ester in benzolhaltiger Oberphase durch Flüssig-Extraktion mit Unterphase, deren Essigsäuregehalt allmählich erhöht wurde. Abszisse: Elutionsvolumen

Abb. 4 zeigt einen Versuch der Trennung der beiden unipolymeren und des kopolymeren Esters. Aus einer benzolhaltigen Oberphase des Aceton-Hexan-Wasser-Systems, in der die drei Komponenten gelöst waren, wurden mit Unterphasen mit zunehmendem Essigsäuregehalt sukzessive alle drei Ester extrahiert. Trotz der keineswegs optimalen Versuchsbedingungen sind die drei Stoffe fast vollständig getrennt.

Damit zeichnet sich für die Fraktionierung hochmolekularer Stoffe mit flüssigen Phasenpaaren ein neues Verfahren ab: die Extraktion mit ändernder Phasenzusammensetzung. Während bisher bei der Gegenstromverteilung die Trennung mit Phasen konstanter Zusammensetzung durch eine hohe Zahl von Verteilungsschritten erzwungen wurde, ermöglicht die Variation der Phasenzusammensetzung, die Anzahl Schritte wesentlich zu verkleinern. Ein solches Verfahren setzt eine

genaue Kenntnis der Verteilungssysteme und der Verteilungskoeffizienten voraus.

Bei den Polymethacrylsäureestern war es relativ einfach, ein geeignetes Phasenpaar zu ermitteln, weil sie sich in Lösungsmitteln mittlerer Polarität lösen. Deshalb ließen sich polarere und weniger polare Lösungsmittel zur Scheidung in zwei Phasen finden. Es ist anzunehmen, daß das Aceton-Hexan-Wasser-System auch für andere acetonlösliche Polymere verwendet werden kann. Für Polymere wie Polyäthylen, die sich nur in unpolaren Lösungsmitteln lösen, dürfte es wesentlich schwieriger sein, Zweiphasensysteme zu ermitteln.

6. Phasenpaare zur Verteilung von Proteinen

Organische Lösungsmittel, wie Phenol, Harnstofflösung, welche Proteine lösen, denaturieren diese meistens. Zu deren Verteilung sind Mehrkomponentensysteme mit hohem Wassergehalt erforderlich.

CRAIG und seine Mitarbeiter haben Serumalbumin⁹, Ribonuklease und Lysozym¹⁰ in unkritischen Phasenpaaren aus 2-Butanol, Wasser und Puffer bzw. aus Athanol, Ammoniumsulfat und Wasser multiplikativ verteilt. Ferner gelang es ihnen, das Gemisch der α - und β -Ketten des Hämoglobins im System 2-Butanol-0,5-M-Essigsäure und 10% Dichloressigsäure im Volumverhältnis 9:10:1 zu zerlegen¹¹. Ähnliche Phasenpaare hatten sie zuvor für die Fraktionierung von Peptiden benützt.

Die meisten Serumproteine lassen sich bei +1°C in fast kritischen Phasenpaaren von Diäthylenglykoldiäthyläther (Diäthylcarbitol), Wasser und Phosphaten, Glycerophosphaten oder Magnesiumsulfat differenziert verteilen¹². Diese Systeme enthalten mehr als 70% Wasser. Sie sind erstmals von PORTER für die Verteilungs-chromatographie von γ -Globulinen und andern Proteinen verwendet worden¹³. Das Verteilungsgleichgewicht der Proteine in diesen Phasen hängt wesentlich von deren Gehalt an speziellen Kationen und Anionen ab. Diese verschieben die Verteilungskoeffizienten aller Serumproteine in gleichem Sinn. Mit Magnesiumsulfat liegt das Verteilungsgleichgewicht mehr zugunsten der wäßrigen Phase, mit Ammoniumphosphaten zugunsten der organischen Phase. Durch geeignete Wahl der Salze läßt sich eine für die Gegenstromverteilung günstige Gleichgewichtslage einstellen.

Das Resultat einer multiplikativen Verteilung von Humanserum auf 80 Fraktionen ist in der Tabelle 1 zusammengestellt. Mit Disc- und Immunoelktrophorese wurde auf 12 Proteine geprüft und deren Verteilung in der Fraktionenreihe bestimmt. Die höchstmolekularen befinden sich wie erwartet an den Enden der Reihe. Am Anfang sind diejenigen, die sich in der unteren wäßrigen Phase anreichern, in den letzten Fraktionen diejenigen, die sich in der oberen organischen Phase konzentrieren. Die Verteilung geht weder genau parallel mit dem Kohlenhydratgehalt noch mit der elektrophoretischen Beweglichkeit oder den isoelektrischen Punkten der Pro-

Tabelle 1. Multiplikative Verteilung von Serumproteinen im Phasenpaar Diäthylcarbitol, Natriumglycerophosphat und Wasser. Die Fraktionen wurden auf die 12 Serumproteine untersucht

	Fraktion Nr.	MG · 10 ⁻³	Kohlenhydratgehalt %	Elektrophoretische Beweglichkeit	Verteilungskoeffizient
Haptoglobin	1-25	100	19,3	4,5	$K \ll 1$
α_1 -Antitrypsin	25-35	45	12,4	5,4	
Transferrin	26-51	45	5,9	3,1	$K < 1$
Albumin	26-53	69	0,1	5,92	
Präalbumin	39-44	61	0,5	7,6	$K = 1$
Hämopexin	49-61	80	22,6	3,1	
Caeruloplasmin	55-71	160	8,0	4,6	
Komplement	58-79	—	3,3	—	$K > 1$
α_2 -Makroglobulin	61-79	820	8,4	4,2	
γ G-Immunglobulin	65-79	160	2,9	1,2	$K \gg 1$
γ A-Immunglobulin	71-79	110-180	7,6	2,1	
γ M-Immunglobulin	75-79	1000	11,8	2,1	

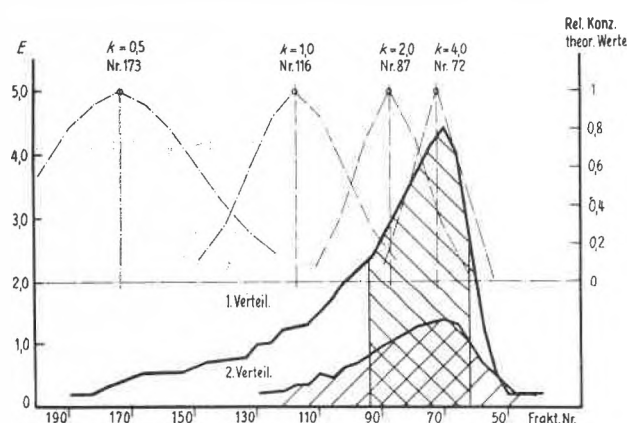


Abb. 5. Wiederholte Verteilung von Colostrum- γ -Globulin im Phasenpaar Diäthylcarbitol, Magnesiumsulfat, Natriumglycerophosphat, Wasser bei 1,5°C, pH 8,4. 1. Verteilung 196 Transfers von 1,4 g γ -Globulin. 2. Verteilung: Die Hälfte des Materials der Fraktionen 62 bis 92 aus 1. Verteilung unter gleichen Versuchsbedingungen. — — — berechnete Verteilungskurven für Komponenten mit $K = 0,5; 1; 2; 4$ bei denselben Versuchsbedingungen nach¹⁴

teine. Offenbar werden die Verteilungskoeffizienten von mehreren Faktoren bestimmt.

Die Immunglobuline zeigen im System Diäthylcarbitol-Magnesiumsulfat-Na-Glycerophosphat-Wasser ein sehr breites Verteilungsspektrum¹⁴ (Abb. 5). R. R. PORTER¹³ war es gelungen, Antikörper mittels Verteilungs-chromatographie in einem ähnlichen Phasenpaar zu konzentrieren. Mit einem Colostrum- γ -Globulin einer gegen Salmonellen immunisierten Kuh haben wir geprüft, ob Antikörper sich in gewissen Fraktionen an-

⁹ W. HAUSMANN und L. C. CRAIG, *J. Amer. Chem. Soc.* 80 (1958) 2703.

¹⁰ T. P. KING und L. C. CRAIG, *J. Amer. Chem. Soc.* 80 (1958) 3366.

¹¹ R. J. HILL, W. KONIGSBERG, G. GUIDOTTI und L. C. CRAIG, *J. Biol. Chem.* 237 (1962) 1549.

¹² P. V. TAVEL, *Helv. Chim. Acta* 38 (1955) 520; *ibid.* 45 (1962) 1576.

¹³ A. J. M. MARTIN und R. R. PORTER, *Biochem. J.* 49 (1951) 215; R. R. PORTER, *ibid.* 53 (1953) 320.

reichern. Wie aber aus Abb. 6 ersichtlich ist, verteilt sich die Antikörperaktivität auf alle Fraktionen ziemlich gleichmäßig. Daraus ist zu schließen, daß entweder das Auflösungsvermögen der Methode nicht ausreichte oder der Antikörper verschiedene Verteilungskoeffizienten und keine einheitliche chemische Struktur besitzt.

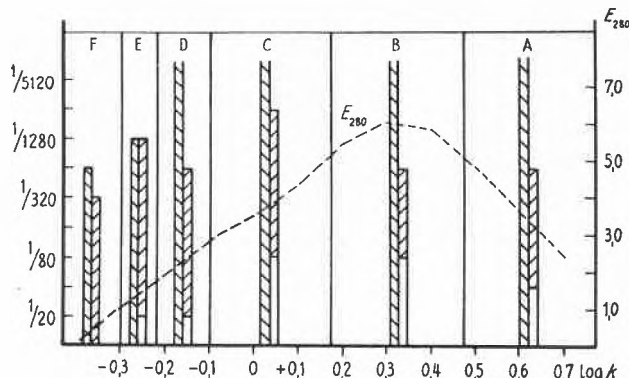


Abb. 6. Antikörpertiter der Fraktionsgruppen A bis F der 1. Verteilung des Colostrum- γ -Globulins (Abb. 5)

▨ Coombs-Test
▧ Agglutinationstest
--- Extinktionswerte E_{280} als Konzentrationsangabe in Funktion des $\log K$ nach ¹⁴

Ein Beispiel, wie die Reinheit von Proteinpräparaten mit Gegenstromextraktion geprüft werden kann, ist in dieser Zeitschrift anderswo⁴ am Beispiel von Albumin beschrieben worden.

7. Verteilung von Zellen und Zellfragmenten in flüssigen Phasenpaaren

In letzter Zeit haben flüssige Phasenpaare von ALBERTSON für die Fraktionierung von Zellen, Viren und Zellfragmenten eine vielseitige Anwendung gefunden¹⁵. Sie bestehen aus den Lösungen zweier unverträglicher Polymerer, wie sie Tabelle 2 auführt. Lösungen von 1 bis 5% dieser Polymeren sind gegenseitig unmischbar. Je höher das Molekulargewicht, um so geringer ist der Polymergehalt, der das Lösungsgemisch in zwei Phasen zu scheiden vermag. Diese Systeme weisen einen hohen Wassergehalt von 90 bis 95% auf. Ohne das Phasengleichgewicht zu verschieben, können pH und Ionenstärke in weiten Grenzen variiert werden, so daß zur Fraktionierung von Zellen und Organellen isotonische und sehr schonende Bedingungen eingehalten werden können. Proteine und andere Biopolymere lassen sich gut verteilen, wenn auch die Verteilungskoeffizienten

nicht sehr differenziert sind. Wenn ihr Molekulargewicht ähnlich demjenigen der Phasenpolymeren ist, so ist ihre Isolierung aus den Phasen nicht immer einfach. Man verwendet hierzu Ionenaustauschchromatographie oder Elektrophorese. Zellen, Viren und Zellfragmente dagegen lassen sich leicht abzentrifugieren.

Das Verteilungsgleichgewicht in diesen Phasenpaaren wird meist durch unbekannte Nebenzonenzwirkungen zwischen den Phasenpolymeren und den verteilten Komponenten bestimmt. Bei übermolekularen größeren Partikeln hängt der Verteilungskoeffizient von ihren Oberflächeneigenschaften ab. Ähnlich wie bei der Verteilung von Proteinen in den Diäthylcarbitolsystemen beeinflusst die Ionenstärke und die Art der Ionen das Verteilungsgleichgewicht. Abb. 7 zeigt die Verteilung von Nukleinsäuren in Dextran-Polyäthylenglykol-Systemen mit verschiedenen Salzen und Abb. 8 bei verschiedenen pH-Werten nach ALBERTSON¹⁶. Hochmolekulare Kalbs-thymus-DNS verteilt sich mit Natriumphosphat-Puffer (0,01 M) allein einseitig zugunsten der oberen Polyäthylenglykolphase mit einem Verteilungskoeffizienten von über 10. Zugabe von Alkalichloriden senken den Verteilungskoeffizienten. Die Kationen wirken in der Folge $K^+ > Rb^+ > Cs^+ > Na^+ > \frac{1}{2}Mg^{++} > NH_4^+ > Li^+$ und entsprechend ihrer Konzentration. Aus Abb. 8 ist ersichtlich, daß bei geeigneter Wahl des pH und des Verhältnisses von primären zu sekundärem Phosphat die verschiedenen Nukleinsäuren sich nicht in den gleichen Phasen anreichern und leicht getrennt werden können.

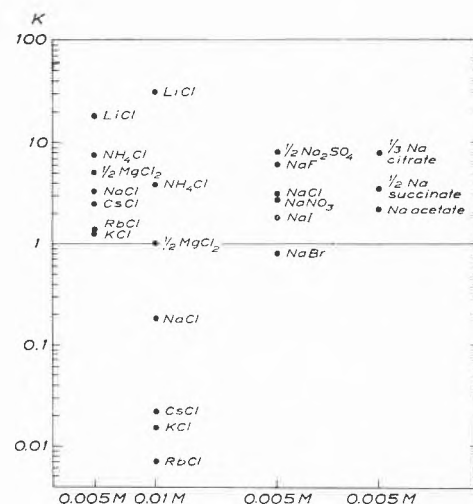


Abb. 7. Verschiebung des Verteilungskoeffizienten K von DNS in Dextran-Polyäthylenglykol mit 0,005 M NaH_2PO_4 und 0,005 Na_2HPO_4 bei Zugabe verschiedener Elektrolyte in Konzentrationen von 0,005 M und 0,01 M nach ¹⁶

Tabelle 2. Gegenseitig nicht-mischbare Polymere für 2phasige Systeme nach ALBERTSON¹⁵

Polypropylenglykol	Hydroxipropyl-dextran
Polyäthylenglykol	Dextran
Polyvinylalkohol	Carboximethyl-dextran
Methylcellulose	Dextransulfat

Bei Zellen, Viren, Organellen und Membranen ist die Verteilung entsprechend dem sehr großen «Molekulargewicht» ganz einseitig. Sie läßt sich auch durch Elektrolytzusatz zugunsten der einen oder andern Phase einstellen. Die suspendierten Partikel verteilen sich aber oft nicht gleichmäßig in einer Phase, sondern rei-

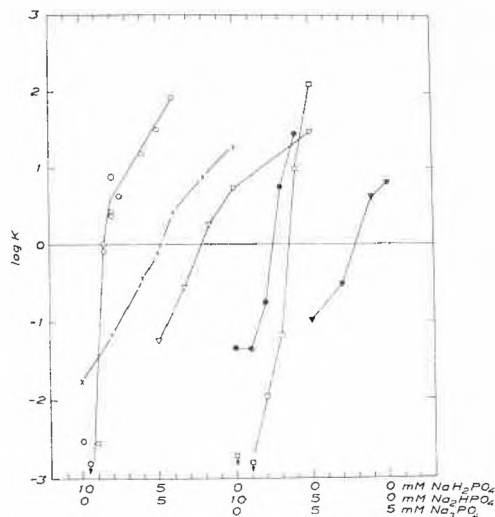


Abb. 8. Verteilung verschiedener Nukleinsäuren bei verschiedenen pH im Phasenpaar Dextran-Polyäthylenglykol nach 16

- Desoxiribonukleinsäure
- × Denaturierte Desoxiribonukleinsäure
- △ Poly-U
- Poly-C
- Poly-A
- ▽ Poly-I

chern sich in der Phasengrenzfläche an. Mit Hilfe der Brönstedtschen Vorstellungen konnte ALBERTSON¹⁷ zeigen, daß die energetisch stabilste Lage eines großen Teilchens in der Grenzfläche liegen kann. Hiezu muß das Gleichgewicht nicht nur der Wechselwirkungskräfte zwischen Teilchenoberfläche und den Phasen berücksichtigt werden, sondern auch diejenigen zwischen den Phasen. Je nach der Intensität dieser Nebenvaleanzkräfte liegt das Verteilungsgleichgewicht zugunsten der Dispersion in der einen oder andern Phase oder aber einer Adsorption in der Grenzfläche. ALBERTSON hat ein Gerät konstruiert, um multiplikative Verteilungen von Gemischen vorzunehmen, wenn einzelne Komponenten sich in der Grenzfläche anreichern¹⁸.

Bemerkenswert ist die differenzierte Verteilung verschiedener Mikroorganismen. Abb. 9¹⁹ zeigt die multiplikative Zerlegung einer künstlichen Mischung von *Saccharomyces*, verschiedenen *E. coli*-Stämmen und von *Chlorella* in Dextran-Polyäthylenglykol, zum Teil mit einem Natriumchlorid-Gradienten von 0,0 bis 0,2 M. Die Methode ist fähig, verschiedene Mutanten zu unterscheiden und zu trennen.

Die roten Blutkörperchen (Erythrocyten) entstehen aus Reticulocyten und haben eine mittlere Lebensdauer von etwa 55 Tagen, nachdem sie in die Blutbahn gelangt sind. In dieser Zeitspanne bilden sie kein neues Protein, und ihre enzymatische Aktivität sinkt nur wenig ab. Dagegen schrumpfen die anfangs prallen Zellen allmählich, bis sie ganz zerfallen. WALTER und SELBY²⁰ konnten nun durch multiplikative Verteilung in 5% Dextran (MG 500000) und 4% Polyäthylenglykol die Zellen nach dem Alter fraktionieren. Um das Alter der

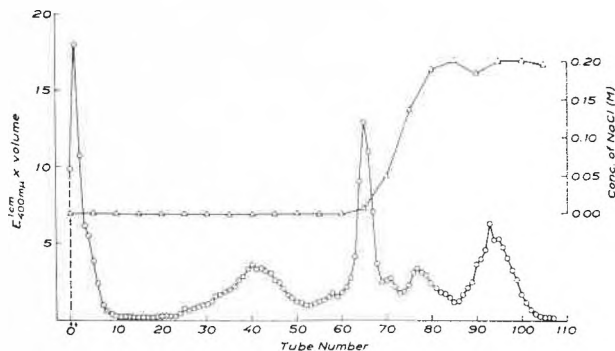


Abb. 9. Multiplikative Verteilung eines künstlichen Bakterien-gemisches im Phasenpaar Dextran-Polyäthylenglykol über 109 Transfers, ab Fraktion 60 mit zunehmender NaCl-Konzentration. Abszisse: Fraktionsnummer. Ordinate: links Extinktion $E_{400 \text{ nm}} \times \text{Vol.}$, rechts NaCl-Konzentration. Die Maxima von links nach rechts: *Saccharomyces Carlsbergensis* S 16/*E. coli* K 12. W. 1177/*E. coli* K 12. 58 (H fr)/*Chlorella pyrenoidosa* 2 Gipfel/*E. coli* ML 3081. Nach ¹⁹

Zellen zu bestimmen, wurden die Ratten zu einem bestimmten Zeitpunkt mit radioaktivem ⁵⁹Fe einmalig markiert. Die Aktivität erschien bei den frisch markierten Tieren in den 1. Fraktionen mit den Reticulocyten, um nach zwei Tagen ihr Maximum in den Erythrocyten der höchsten Fraktionsnummern zu haben. Im Laufe von etwa 50 Tagen verschob sich das Aktivitätsmaximum wieder nach den ersten Fraktionen, wie in Abb. 10 dargestellt ist. Die Autoren konnten weiter zei-

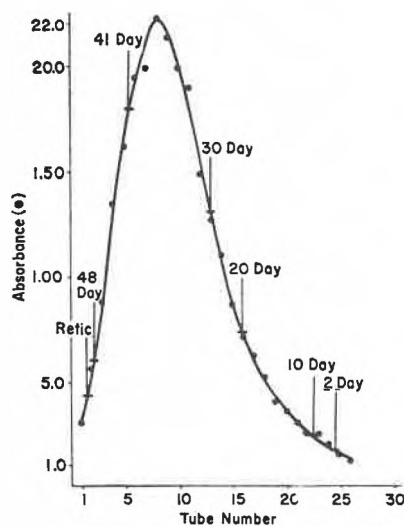


Abb. 10. Zusammenstellung der multiplikativen Verteilung von ⁵⁹Fe-markierten Erythrocyten nach Alter. Abszisse: Fraktionsnummer. Ordinate: Absorption. Die Tagesangaben zeigen die Lage der Aktivitätsmaxima nach der Markierung mit ⁵⁹Fe. Nach ²⁰

¹⁴ P.V. TAVEL, *Helv. Chim. Acta* 51 (1968) 1526.

¹⁵ P. Å. ALBERTSON, *Advances Protein Chem.* 24 (1970) 309.

¹⁶ P. Å. ALBERTSON, *Biochim. Biophys. Acta* 103 (1965) 1.

¹⁷ P. Å. ALBERTSON, *Partition of Cell Particles and Macromolecules*, Wiley, New York, Almquist & Wiksell, Stockholm 1960.

¹⁸ P. Å. ALBERTSON, *Anal. Biochem.* 11 (1965) 121.

¹⁹ P. Å. ALBERTSON und G. D. BAIRD, *Exper. Cell. Res.* 28 (1962) 296.

²⁰ H. WALTER und F. W. SELBY, *Biochim. Biophys. Acta* 112 (1966) 146.

gen, daß der Verteilungskoeffizient parallel zur elektrophoretischen Beweglichkeit geht.

In einer weiteren Anwendung der Zweiphasensysteme konnte PHILIPSON²¹ mit ³²P markierten Poliovirus, der Antikörper gebunden hatte, von solchem ohne Antikörper trennen und die beiden Viren anhand ihrer verschiedenen Infektivität unterscheiden.

8. Zusammenfassung

Die Fraktionierung makromolekularer Stoffgemische mit flüssigen Phasenpaaren bietet wertvolle Möglichkeiten und besondere Vorzüge. Die Trennschärfe nimmt mit dem Molekulargewicht der zu trennenden Komponenten zu. Dies ist bemerkenswert, da bei andern Verfahren in der Regel das Gegenteil zutrifft. Es ist aber schwierig, geeignete Phasenpaare zu finden. Sie müssen empirisch gesucht werden. Doch ist eine Methode bekannt, wie sie rationell ermittelt werden können. Am besten eignen sich nahezu kritische Phasenpaare aus mindestens drei Komponenten, wobei die Hauptkomponente ein Lösungsmittel für das Gemisch sein muß und in der Regel zu mehr als 70% im System enthalten sein soll. Mit weiteren zusätzlichen Komponenten lassen sich die Vertei-

lungskoeffizienten auf Werte einstellen, die für die Trennungen günstig sind. Ein erprobtes Phasenpaar dürfte sich auch für andere Verbindungstypen eignen, wenn sie sich in der Hauptkomponente des Lösungssystems lösen. Es wird schwierig, Phasenpaare zu finden, wenn das zu trennende Gemisch ausgesprochen unpolar (z. B. Polyäthylene) oder stark polar (Polyelektrolyte) ist. Synthetische Polymere lassen sich nicht nur nach dem Molekulargewicht, sondern auch im Falle von Kopolymeren nach ihrer chemischen Zusammensetzung fraktionieren.

Phasenpaare, die mit zwei unverträglichen Polymeren hergestellt sind, eignen sich ausgezeichnet für die Fraktionierung von Zellen, Zellfragmenten und hochmolekularen Nukleinsäuren. Die Differenzierung ist außerordentlich scharf und erfolgt nach geringfügigen Strukturunterschieden der Teilchenoberfläche. Es scheint nicht ausgeschlossen, daß ähnliche Verteilungseffekte in biochemischen Systemen und Prozessen eine wesentliche Rolle spielen könnten.

²¹ L. PHILIPSON, J. KILLANDER und P. Å. ALBERTSON, *Virology* 28 (1966) 22.

Kurze Mitteilungen

Bis am 15. des Monats bei der Redaktion eingehende Kurze Mitteilungen werden in der Regel am 15. des folgenden Monats veröffentlicht. Es werden auch Manuskripte aus dem Ausland angenommen. Maximalumfang: 6 Schreibmaschinenseiten (alles inbegriffen)

Heptafulven und Sesquifulvalen^{*1}

Summary

A synthesis of heptafulvene (4) and sesquifulvalene (6) is reported: Acetoxy-tropylium-fluoroborate (2) reacts easily with methyl-lithium and sodium-cyclopentadienide to give the acetoxymethyl-cycloheptatrienes (3) and the acetoxy-cyclopentadienylcycloheptatrienes (5) respectively. Gas-phase pyrolysis of (3) and (5) affords in remarkably good yields heptafulvene (4) and sesquifulvalene (6), which are isolated in crystalline form at low temperatures. Spectroscopic evidence of the title compounds is presented.

Einleitung

Heptafulven und Sesquifulvalen sind als einfache Vertreter nichtbenzoider zyklisch konjugierter Siebenringssysteme von beträchtlichem theoretischem Interesse. Versuche verschiedener Arbeitsgruppen^{2,3} ließen bisher vermuten, daß beide Grundkörper nur in großer Verdünnung bei tiefen Temperaturen existenzfähig seien; eine Isolierung und eingehende spektroskopische Charakterisierung von (4)⁴ und (6)⁵ stand demnach noch aus.

Nach einem einfachen von H. SCHALTEGGER und M. NEUENSCHWANDER entwickelten⁶ und später erheblich erweiterten Verfahren⁷ lassen sich Fulven und zahlreiche

6-Alkyl-, 6-Vinyl- und 6-Äthinylderivate durch Umsetzung von Acetoxychlormethanen mit Natriumcyclo-

* Eingegangen am 3. März 1972.

¹ Fulvensynthesen, 6. Mitteilung. 5. Mitteilung: M. NEUENSCHWANDER, W. K. SCHENK und R. KYBURZ, *Chimia* 25 (1971) 361.

² Heptafulven: vgl. a) W. VON E. DOERING und D. W. WILEY, *Tetrahedron* 11 (1960) 183; b) D. S. MATTESON, J. J. DRYSDALE und W. H. SHARKEY, *J. Amer. Chem. Soc.* 82 (1960) 2853; c) C. JUTZ, *Chem. Ber.* 97 (1964) 2050.

³ Sesquifulvalen: vgl. a) H. PRINZBACH und W. ROSSWOG, *Angew. Chem.* 73 (1961) 543; b) H. PRINZBACH und W. ROSSWOG, *Tetrahedron Letters* 1963, 1217; c) H. PRINZBACH, *Angew. Chem.* 76 (1964) 235; d) H. PRINZBACH und H. KNÖFEL, *Angew. Chem.* 81 (1969) 900.

⁴ Die von W. VON E. DOERING^{2a} an verdünnten Heptafulven-Lösungen gemessenen UV- und IR-Spektren stimmen mit unseren Ergebnissen qualitativ gut überein. Allerdings fehlen einige IR-Banden schwacher und mittlerer Intensität^{2a} im Spektrum unseres durch Kugelrohrdestillation gereinigten Produkts.

⁵ Die von H. PRINZBACH^{3b,d} an verdünnten Sesquifulvalen-Lösungen bestimmte intensive UV-Bande ($\lambda_{\max} = 391$ nm in Isooctan) deckt sich mit unsern Messungen.

⁶ H. SCHALTEGGER, M. NEUENSCHWANDER und D. MEUCHE, *Helv. Chim. Acta* 48 (1965) 955; H. SCHALTEGGER, H. BRÄNDLI und M. NEUENSCHWANDER, *Chimia* 20 (1966) 246.

⁷ M. NEUENSCHWANDER, R. KYBURZ und R. ISELI, *Chimia* 24 (1970) 342; R. KYBURZ, H. SCHALTEGGER und M. NEUENSCHWANDER, *Helv. Chim. Acta* 54 (1971) 1037.