

wir bei den isolierten Isoenzymen wiederholt eine Heterogenität fest. Die Refokussierung zeigte eine Umwandlung in Komponenten mit niedrigeren und höheren isoelektrischen Punkten. Diese Umwandlung nahm bei Aufbewahrung der isolierten Isoenzyme unter verschiedenen Bedingungen mit der Zeit zu. Die Umwandlung wurde auch dann beobachtet, wenn die analytische Refokussierung unmittelbar nach der präparativen Trennung ohne Einschaltung zusätzlicher Arbeitsschritte wie Dialyse, Ultrafiltration oder Aus-

fällen mit Ammoniumsulfat durchgeführt wurde. Sowohl die bei der präparativen Fokussierung isolierten Isoenzyme als auch die durch Umwandlung gebildeten Isoenzyme zeigten identische Absorptionsspektren im Bereich von 240 - 700 nm und gleiche Molekülgrößen bei der Dünnschicht-Gelfiltration. Bei der Behandlung der Isoenzyme mit 8 M Harnstoff oder 7,5 M Guanidinhydrochlorid wurden keine Veränderungen der isoelektrischen Muster festgestellt, was gegen die Annahme von Konformeren spricht.

## 12. Isolierungsverfahren mit wasserunlöslichen Proteinharzen. Ionenselektive Elektroden

12.1 H. Fritz, E. Fink, E. Jaumann, B. Förg-Brey und G. Wunderer (Inst. f. Klin. Chem. u. Klin. Biochem., Univ. München)

Zur Isolierung von Proteaseinhibitoren und Kallikreinen durch Affinitäts-Chromatographie (Isolation of Protease Inhibitors and Kallikreins by Affinity Chromatography)

Durch die Verwendung wasserunlöslicher Trypsinharze (Trypsin polymer gebunden an Cellulosefasern) wurde die Isolierung der folgenden Proteaseinhibitoren wesentlich erleichtert und beschleunigt: Trypsinspezifische Inhibitoren (Mol. Gew. bei 6 600) und Trypsin-Plasmin-Inhibitoren (Mol. Gew. bei 6 700) aus Samenblasen von Meerschweinchen, Trypsin-Plasmin-Inhibitoren (Mol. Gew. bei 11 600) aus Ebersperma, Trypsin-Inhibitor (Mol. Gew. bei 5 400) und Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitor (Mol. Gew. bei 12 700) aus Humansperma, Trypsin-Plasmin-Inhibitoren aus Blutegeln (Mol. Gew. bei 4 800 bzw. 6 300) und Trypsin-Plasmin-Chymotrypsin-Kallikrein-Inhibitoren (Mol. Gew. bei 6 500) aus Seeanemonen. Bei genügend langer Einwirkungsdauer wurden auch bei geringer Inhibitorkonzentration die Hemmstoffe aus den Gewebsextrakten nahezu quantitativ vom Trypsinharz-Komplex gebunden; die Ablösung der Inhibitoren gelang mit schwach sauren Salz-Pufferlösungen in Ausbeuten von 80 - 100%. Anfallende Inhibitorgemische ließen sich danach durch Ionenaustausch-Chromatographie in die Isoinhibitoren auftrennen, deren Reinheit durch die Aminosäureanalysenwerte, einheitliche Endgruppen und durch das elektrophoretische Verhalten weitgehend belegt ist.

Zur Isolierung von Organ- und Serum-Kallikreinen (von Schwein und Mensch) wurden wasserunlösliche Derivate des Trypsin-Kallikrein-Inhibitors aus Rinderorganen verwendet. Die Ablösung der Kallikreine aus den wasserunlöslichen Inhibitoradsorbaten gelang in 70 - 90%iger Ausbeute mit 0,5 - 2,0 M Guanidin- und Harnstofflösungen vom pH 5 - 8. Die spezifische enzymatische Aktivität der nach der Entsalzung erhaltenen Kallikreinpräparate entspricht der reinsten Vergleichspräparate, die mit üblichen chromatographischen Verfahren isoliert wurden.

12.2 C. Fuchs, K. Paschen, H. W. Heiß, D. Knoll und C. v. Westberg (Physiol. Inst., Lehrstuhl I, Univ. Göttingen, und Med. Univ. -Klinik Tübingen)

Neue Methode zur Messung des ionisierten Calciums im Serum mit einer ionenselektiven Elektrode (New Method for the Determination of Ionized Calcium in Serum with an Ion Selective Electrode)

Das Gesamt-Calcium im Serum liegt in einer diffusiblen und einer nichtdiffusiblen Fraktion vor. Beim diffusiblen Anteil unterscheidet man das im engeren Sinne biologisch aktive ionisierte Calcium vom komplex gebundenen. Das ionisierte Calcium wurde bisher meist komplexometrisch, colorimetrisch oder mittels eines Bioassays in Serum oder Serumultrafiltrat bestimmt. Diese Methoden sind z. T. jedoch ungenau, zeitraubend, schwer durchführbar und erfordern größere Probenvolumina.

Seit einiger Zeit steht eine ionenselektive Durchflusselektrode zur Verfügung, mit der unter anaeroben Bedingungen Calciumionenbestimmungen potentiometrisch durchgeführt werden können. Die Serumgewinnung, -lagerung und -aufarbeitung erfolgt in vollvakuierten Vacutainern<sup>®</sup>, wodurch störende CO<sub>2</sub>-Verluste und pH-Änderungen verhindert werden. Die absolute und relative Meßgenauigkeit der Elektrode wurde von E. W. Moore (J. Clin. Invest. 49, 318 (1970)) eingehend untersucht und diskutiert. Die Eichung der Elektrode erfolgt mit selbst hergestellten Na<sup>+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-haltigen Ca<sup>2+</sup>-Standardlösungen. Die Serumkonzentrationen wurden nach der folgenden Formel exakt und einfach berechnet:

$$[Ca^{2+}]_{\text{Serum}} = [Ca^{2+}]_{\text{Standard}} \times 10^{\Delta E/S}$$

$\Delta E$  = Potentialdifferenz Serum-Standard; S = Nernst Faktor. - Bei 15 aufeinanderfolgenden Messungen in einem Poolserum lag der Variationskoeffizient bei 0,5%. Nach Eichung der Elektrode können bis zu 20 Seren in einer Stunde analysiert werden. Für Doppelbestimmungen sind Probenvolumina von 0,5 ml Serum meist ausreichend. Normalwertbestimmungen wurden bei 81 Studenten durchgeführt. Die Ergebnisse von  $2,43 \pm 0,094$  mVal/l ( $\bar{x} \pm s_x$ ) entsprachen einer Normalverteilung. Der Anteil des ionisierten Calciums am Gesamt-Calcium betrug  $49,7 \pm 2,18\%$ .