

116. Über die Auswertung von Elektrophorese-Diagrammen nach *L. G. Longworth* und *Philpot-Svensson*

von *E. Wiedemann*.

(27. III. 47.)

Die zunehmende Bedeutung der Elektrophorese als analytische Test- und Kontrollmethode bei Untersuchungen an Proteinen und Proteiden hat es als wünschenswert erscheinen lassen, die Elektrophorese-Methodik, wie wir sie insbesondere *A. Tiselius* verdanken, durch Vervollkommnung der technischen Hilfsmittel wie durch Verfeinerung der Arbeitsweise einer routinemässigen Anwendung unter gleichzeitiger Steigerung der Messgenauigkeit zugänglich zu machen.

Die Untersuchungen von *L. G. Longworth*¹⁾, *H. Svensson*²⁾ und des Verfassers³⁾ verfolgen dieses Ziel unter Anwendung optischer Registriermethoden, die zu direkt auswertbaren Bildern führen. Es sind dies die «Schlieren scanning method» (*L. G. Longworth*) und die direkte Diagrammaufzeichnung (*Philpot-Svensson*). Diese Messmethoden machen die erhebliche Rechenarbeit, wie sie bei Aufnahmen nach der Skalenmethode von *O. Lamm*⁴⁾ notwendig ist, entbehrlich, wenn auch zunächst unter Verzicht auf höchste Messgenauigkeit.

Systematische Bestimmungen von Fehlergrössen, wie sie vom Verfasser anlässlich der Konstruktion einer neuen Elektrophorese-Apparatur und der Auswertung einer grossen Zahl von *Philpot-Svensson*-Diagrammen auszuführen waren, haben ergeben, dass bei zweckmässiger Durchbildung der apparativen Hilfsmittel und bei einigermaßen günstiger Wahl der Versuchsbedingungen auch bei der Aufnahmemethode von *Philpot-Svensson* die Genauigkeit der üblichen analytischen Bestimmungsmethoden ohne weiteres erreicht wird, ja in verschiedener Hinsicht sogar erheblich übertroffen werden kann⁵⁾.

Da die Erzeugung störungsfreier Gradienten ohne Schwierigkeiten gelingt, und ihre Wiedergabe im auszuwertenden Bilde prinzipiell mit einer Unsicherheit von nur $\pm 0,2\%$ möglich ist, sollten sich grössere Streuungen der Werte bei vergleichenden Messungen mit identischen Versuchsansätzen, wie sie bisher beobachtet worden sind, bis auf Schwankungen von etwa $\pm 0,4\%$ vermeiden lassen, wenn die Kurvenzüge des *Philpot-Svensson*-Bildes möglichst dünn und mit

¹⁾ *L. G. Longworth*, Ind. Eng. Chem. Anal. **18**, 219 (1946).

²⁾ *H. Svensson*, Ark. Kem. **22**, A, No. 10, 1 (1946).

³⁾ *E. Wiedemann*, Helv. **30**, 168 (1947); **30**, 639 (1947); **30**, 648 (1947).

⁴⁾ *O. Lamm*, Nova Acta Reg. Soc. Sci. Upsaliensis **10**, 6 (1937).

⁵⁾ *E. Wiedemann*, Helv. **30**, 639 (1947).

annähernd konstanter Linienbreite wiedergegeben werden, und die Auswertung des Bildes mit entsprechender Genauigkeit erfolgt. Der ersten dieser beiden Bedingungen kann durch eine zweckmässige Konstruktion des drehbaren Spaltes ausreichend genügt werden¹⁾; die Möglichkeiten einer entsprechend genauen Bildauswertung seien im folgenden diskutiert.

In Fig. 1 ist das *Philpot-Svensson*-Bild eines humanen Plasmas wiedergegeben, wie es mittels der neuen Apparatur²⁾ unseres Laboratoriums im Laufe eines 1–2-stündigen Versuchs regelmässig erhalten werden kann. Die apparative Einrichtung, insbesondere der neue, drehbare Spalt erlaubt es, die Linien des Diagramms fast durchwegs schmal zu halten, so dass die zur Auswertung dienende Mittellinie der Kurve und der Basis³⁾ einer ca. 15-fachen Vergrösserung der Kleinbildaufnahme im Format 24 × 36 mm mit einem Flächenfehler von nur ± 0,1 bis ± 0,2% entnommen werden kann. Die Eliminierung der Extragradien in beiden Teilbildern⁴⁾ ermöglicht es zudem, die Ausmessungen des einen Teilbildes durch die des anderen zu kontrollieren.

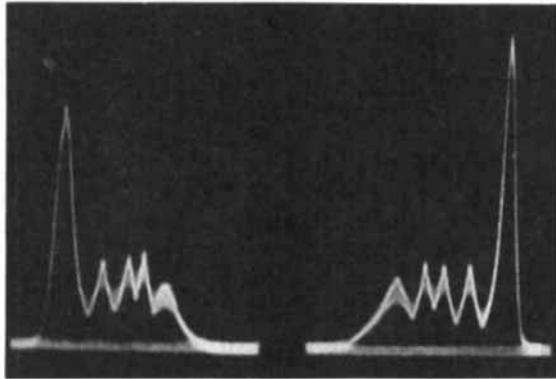


Fig. 1.

Die Auswertung des Bildes erstreckt sich auf die Bestimmung der senkrechten Flächenhalbierenden jedes einzelnen Kurvenzuges, woraus mit Bezug auf die Gradienten-Ausgangslage die apparente Beweglichkeit $\underline{u}(\underline{v})$ jeder einzelnen Komponente nach der Formel:

$$\underline{u}(\underline{v}) = \frac{q s \kappa}{i t}$$

zu berechnen ist, sowie auf die Bestimmung der einzelnen, von den Gradienten mit der Basis eingeschlossenen Flächen, die bei gleichem Brechungsindex der Einheitskonzentration der anwesenden Komponenten deren Konzentrationen direkt proportional sind.

¹⁾ *E. Wiedemann*, *Helv.* **30**, 648 (1947).

²⁾ Beschreibung erfolgt demnächst.

³⁾ *E. Wiedemann*, *Schweiz. med. Wschr.* **76**, 241 (1946).

⁴⁾ *E. Wiedemann*, *Helv.* **30**, 168 (1947).

Da die letztere Messung oder die unter ihrer Zuhilfenahme mögliche Konzentrationsbestimmung nach der Formel:

$$c = \frac{1}{F G K a b \operatorname{tg} \Theta} \int y \, dx$$

immer mehr an Bedeutung gewinnt, so ist es wichtig, gerade diese Messung so genau als möglich auszuführen.

Das herkömmliche Vorgehen¹⁾ besteht darin, den passend vergrösserten Kurvenverlauf (maximale Gradientenhöhe etwa 30 cm im Bilde) durch Extrapolation von Hand in einzelne Kurven aufzulösen und deren Flächenwerte mit der Basis dann durch Planimetrierung zu bestimmen. Die Summe der einzelnen Flächenwerte muss dann dem Flächenwert des ganzen, nicht extrapolierten Kurvenzuges mit der Basis gleich sein.

Es liegt auf der Hand, dass diesem Vorgehen zwei Nachteile anhaften:

1. ist es relativ langwierig, so dass die Bewältigung eines grösseren Versuchsmaterials einen nicht unerheblichen Zeitaufwand erfordert, und
2. ist ihm eine gewisse Unsicherheit eigentümlich, da die Extrapolation der Kurvenzüge auf diese Weise nur in Annäherung an ihren wirklichen Verlauf erfolgen kann.

Es ist zwar möglich, diese Unsicherheit durch sehr sorgfältige Ausführung der Extrapolation, wie durch einen Vergleich der auslaufenden Kurvenäste mit auf Pauspapier gezeichneten idealen Verteilungskurven nach *C. F. Gauss* klein zu halten; viel gewonnen wird indessen damit nicht, da der Zeitaufwand sich noch vergrössert und der Fehler, wie entsprechende Versuche gezeigt haben, nur durch mühsame Korrekturen reduziert werden kann.

Diese Schwierigkeiten bei der Flächenauswertung haben *H. Labhart*²⁾ veranlasst, ein Auswertegerät für Elektrophorese-Diagramme zu entwerfen, das den Vorgang der Extrapolation und Flächenbestimmung rasch vorzunehmen gestattet. Mit diesem Gerät wird dem vergrösserten Kurvenverlauf des Elektrophoresebildes eine Schar von verschieden hohen normalen Verteilungskurven durch Parallelprojektion überlagert; durch Neigen des Diapositivs, das diese Kurven aufgezeichnet enthält, um die senkrechte Flächenhalbierende der Kurven, wird der Flächeninhalt des Projektionsbildes aller Kurven in gleicher, definierter Weise vermindert, so dass es möglich ist, den Flächenwert jeder einzelnen Elektrophorese-Kurve mit der Basis nach dem Zusammenfallen mit dem überprojizierten Bilde der gleich hohen Normalkurve aus dem Flächenwert dieser Kurve mit ihrer Basis, sowie dem Neigungswinkel des Diapositivs zu berechnen.

Wir haben uns gefragt, ob es möglich ist, auf Grund dieses Prinzips eine Genauigkeit der Bildauswertung zu erreichen, die der bei der Aufnahme von Elektrophorese-Diagrammen nach *Philpöt-Svensson*³⁾ gleichkommt. Wir fanden, dass es zunächst erforderlich ist, das Bildformat relativ gross zu wählen. Die untere Grenze, an die man gehen darf, ist 18 × 24 cm; besser ist es jedoch, die Bildgrösse 24 × 36 cm zu wählen, so dass die Höhe des grössten Kurvenzuges im Bilde etwa 30 cm erreicht. Ist einem solchen Kurvenzug das Projektionsbild einer normalen Verteilungskurve zu überlagern, so setzt dieser Vorgang, wenn er fehlerfrei erfolgen soll, bei der Parallelprojektion ein streng aplanatisch (und eventuell auch chromatisch) korrigiertes Linsensystem von etwa 32 cm freier Öffnung voraus;

¹⁾ *E. Wiedemann*, Schweiz. med. Wschr. **76**, 241 (1946).

²⁾ *H. Labhart*, Exper. **3**, 36 (1947).

³⁾ *E. Wiedemann*, Helv. **30**, 168 (1947); **30**, 639 (1947); **30**, 648 (1947).

am besten also eine Schlierenoptik, wie sie zur Aufnahme von Elektrophorese-Diagrammen benötigt wird, von ganz erheblicher Grösse und entsprechend hohem Preise. Sowohl die Verwendung einfacher Linsen, mit denen eine streng aplanatische Abbildung unmöglich ist, als auch eine Herabsetzung des Linsendurchmessers muss die Verhältnisse wesentlich verschlechtern.

Die Flächenbestimmung von Elektrophorese-Kurven unter Einschluss der Basislinie vermittelt Überprojektion normaler Verteilungskurven setzt ferner voraus, dass die Elektrophorese-Kurven normale Verteilungskurven sind und deshalb mit diesen streng zur Deckung gebracht werden können. Es ist indessen seit langem bekannt und auch sehr leicht einzusehen, dass nur die Diffusionskurven reiner Substanzen dieser Bedingung streng genügen¹⁾. Bei Elektrophorese-Kurven hat man schon im Hinblick auf eine eventuell mangelhafte Separierung von Komponenten, dann aber auch auf die Änderung der Leitfähigkeit κ an jedem Gradienten damit zu rechnen, dass diese Kurven, besonders wenn sie gross sind, eine geringfügige Asymmetrie aufweisen, auch wenn man durch zweckmässige Wahl der Versuchsbedingungen (relativ hohe Elektrolyt-Konzentration und relativ niedrige Protein-Konzentration) die Änderung der Leitfähigkeit κ an den Gradienten so klein wie möglich zu halten bestrebt ist.

Um den Forderungen nach grossem Bildformat, streng korrekter Überprojektion und der Möglichkeit der Berücksichtigung von Kurvenasymmetrien zu genügen und dabei ohne übermässige Kosten auszukommen, erwies es sich als notwendig, das Parallelprojektionsverfahren aufzugeben und zur Zentralprojektion überzugehen. Die Zentralprojektion bietet zunächst den Vorteil eines hellen Bildes, weil bei ihr erhebliche relative Öffnungen des abbildenden Systems zulässig sind, sowie die weiteren Vorteile hoher Bildschärfe und bester Orthoskopie, deren maximale Restfehler bei den in Frage kommenden Objektiven vom Typ des *Zeiss*-Tessars in der Grössenordnung von 0,05% liegen²⁾ und daher völlig vernachlässigt werden dürfen. Eine über das Elektrophorese-Diagramm zu projizierende normale Verteilungskurve wird also mittels der Zentralprojektion hell (d. h. mit gutem Kontrast), sehr scharf und ganz verzeichnungsfrei wiedergegeben. Praktisch unmöglich ist es hingegen bei dieser Projektionsmethode, den Flächeninhalt solcher Kurven mit ihrer Basis durch Neigen des Diapositivs zu variieren, und auf diese Weise das Projektionsbild mit der auszuwertenden Kurve zur Deckung zu bringen.

Dieser Nachteil der Zentralprojektion lässt sich jedoch wie folgt leicht umgehen: Um aus einer Kurvenschar beliebiger, aber gleicher Höhe oder Halbwertsbreite eine Kurve mit einer bestimmten Elektro-

¹⁾ *O. Lamm*, Nova Acta Reg. Soc. Sci. Upsaliensis **10**, 6 (1937).

²⁾ Vgl. *W. Merté* in: Handb. d. Photographie, hg. von *A. Hay* und *M. v. Rohr*, Bd. I, S. 288. Springer, Wien 1932.

phorese-Kurve zur Deckung zu bringen, variiert man einfach den Vergrößerungsmaßstab, was bei guten Vergrößerungsapparaten (z. B. *Leitz-Focomat*) sogar unter Erhaltung der Scharfeinstellung möglich ist; man hat dann nur zu berücksichtigen, dass zwei Dimensionen gleichzeitig verändert werden, und dass der Flächeninhalt des Projektionsbildes eine Funktion seiner Höhe oder Halbwertsbreite ist.

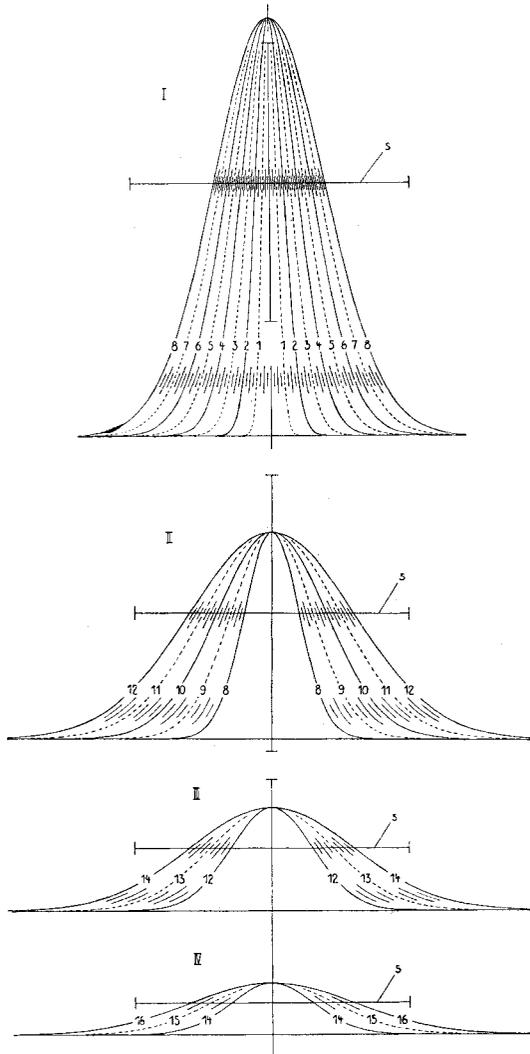


Fig. 2.

Hieraus folgt, dass die gewünschte Kongruenz auch in diesem Falle mit einer Schar von Kurven entweder gleicher Höhe und verschiedener Breite oder gleicher Breite und verschiedener Höhe erreich-

bar ist, und dass es nicht nötig ist, im Diapositiv beide Dimensionen zu variieren. Will man sich aber die Möglichkeit offen halten, auch asymmetrische Elektrophorese-Kurven mittels Überprojektion in guter Näherung auszuwerten, so fällt die zweite der Möglichkeiten ausser Betracht und man hat eine Schar von Kurven gleicher Höhe zu verwenden. Bei asymmetrischen Elektrophorese-Kurven werden dann zwei ein wenig verschiedene Kurvenäste die gewünschte Kongruenz erzielen lassen und damit die entsprechend genaue Bildauswertung ermöglichen.

Nach diesem Prinzip haben wir 16 normale Verteilungskurven, im Flächenwert mit ihrer Basis je um den gleichen Betrag steigend, von Kurve 1—8 mit 30 cm Höhe, von Kurve 8—12 mit 15 cm Höhe, von Kurve 12—14 mit 7,5 cm Höhe und von Kurve 14 bis 16 mit 3,75 cm Höhe so genau aufgezeichnet, dass der (planimetrisch kontrollierte) Flächenfehler jeder Kurve unter $\pm 0,2\%$ liegt. Zwischen den Kurven 1—14 sind je 3. zwischen den Kurven 14—16 ist je 1 Zwischenwert angegeben, so dass insgesamt 56 Kurven resultieren. Dazwischen liegende Werte sind zu extrapolieren. Ferner ist über den Kurven eine genau 20,0 cm lange Meßstrecke eingezeichnet. Ein von diesen Kurven hergestelltes Diapositiv, das in Fig. 2 wiedergegeben ist, dient dazu, sie über die auszuwertenden Elektrophorese-Kurven zu projizieren.

Unter Berücksichtigung des Umstandes, dass hierbei nicht immer beide Schenkel einer Elektrophorese-Kurve symmetrisch zueinander sein werden, dass diese sich also nicht immer mit den korrespondierenden Kurvenästen des überprojizierten Bildes decken werden, verfährt man wie folgt: Man projiziert die passende Kurvengruppe des Diapositivs über die auszuwertende Kurve, achtet auf genaues Zusammenfallen der Kurvenhöhen und der Basislinien und liest dann die Nummern des linken und rechten Kurvenastes (z. B. I/3,0 und I/3,25), die mit der auszuwertenden Kurve zusammenfallen, ab. Ferner misst man die Länge der Meßstrecke s des Projektionsbildes auf etwa 0,5 mm genau. Aus diesen Daten folgt dann der Flächeninhalt F der auszuwertenden Kurve mit ihrer Basis nach der Formel:

$$F = \left(\frac{F}{2_{(l)}} + \frac{F}{2_{(r)}} \right) s^2.$$

Die Werte für $F/2$ und s^2 werden einer Zahlentabelle oder im allgemeinen mit genügender Genauigkeit einer graphischen Darstellung entnommen, wie sie Fig. 3 zeigt.

In dieser Darstellung sind eingetragen: Die Werte von $F/2$ für $s = 1,00$ cm in bezug auf die 56 normalen Verteilungskurven und ihre Zwischenwerte sowie die Quadratzahlen von s für die s -Werte 1,00 bis 20,00. Diese Bereiche erscheinen gross genug, um für alle praktisch vorkommenden Fälle zu genügen: Es können Kurven von maximal 30 cm Höhe bis herunter auf 1 cm Höhe ausgemessen werden, wobei die Kurve 1 einem sehr steilen, die Kurve 16 einem sehr flachen Gradienten entspricht. Der Messvorgang erfolgt rasch und die Genauigkeit der Auswertung ist derjenigen der Aufnahme des Bildes angepasst. Ein Beispiel möge das erläutern:

Um das linke Teilbild (die «descending boundaries» des Versuches darstellend) der Fig. 1 auszuwerten, wird zunächst das Kleinbild-Negativ dieser Aufnahme mittels eines (auf einwandfreie Orthoskopie geprüften) Vergrößerungsapparates im nicht ganz verdunkelten Raum auf ein Blatt Papier im Hochformat A 3 projiziert. Man orientiert dabei das auszuwertende Teilbild zentrisch zur optischen Achse; der Vergrößerungs-

maßstab wird so gewählt, dass eine 7,5-fache lineare Vergrößerung in bezug auf die Gradientenlage in der Zelle erfolgt. Da der Blendenausschnitt für ein Teilbild der normalen analytischen Zelle ebenso wie der zur Erzeugung der zugehörigen Basislinie 38 mm hoch ist, so ist diese Vergrößerung erreicht, wenn die Basislinie im Projektionsbild 285 mm Länge aufweist. Man zieht dann die Mittellinie der ganzen Kurve sowie der Basis aus.

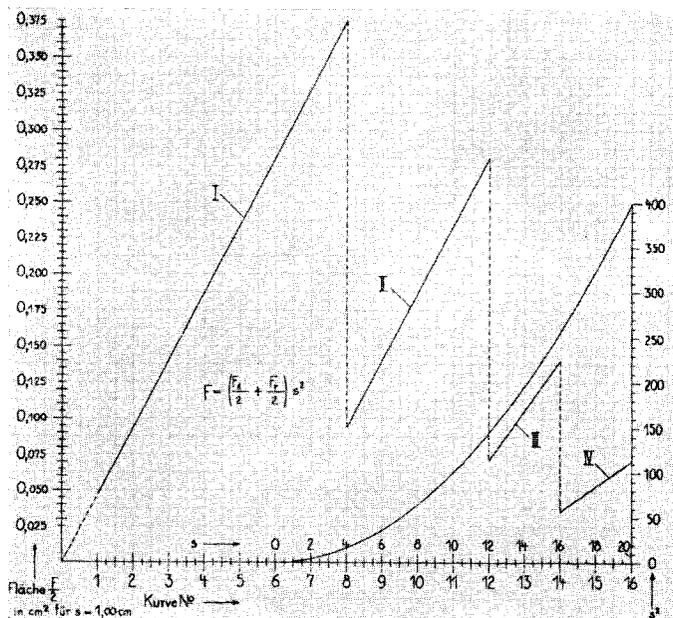


Fig. 3.

Auf diesen Linienzug projiziert man hierauf das in Fig. 2 wiedergegebene Diapositiv, wobei nacheinander die passenden normalen Verteilungskurven mit den einzelnen Kurven des Linienzuges durch Verändern des Vergrößerungsmaßstabes bei gleicher Höhe zum Zusammenfallen gebracht werden. Dieser Vorgang ist sehr rasch ausführbar. Von jedem Kurvenzug werden zwei Daten notiert: die Kurvennummer links und rechts¹⁾ und die mit einem aufgelegten Lineal mit 0,5-mm-Teilung gemessene Länge der Strecke s im Projektionsbild (also auf der Papierebene). Durch diese zwei Daten ist die Fläche jeder Kurve mit der Basis bestimmt.

Es ist ein grosser Vorteil dieser Zentralprojektions-Auswertemethode, bei sich überschneidenden Kurven unter einigermaßen günstigen Umständen sofort den ganzen Kurvenverlauf sehr scharf zu ergeben, auch wenn die betreffende Kurve nicht streng symmetrisch ist. Liegt dieser Fall vor, wie dies fast immer bei der Elektrophorese-Aufnahme von Gemischen, z. B. Plasmaanalysen, zu beob-

¹⁾ Da das Diapositiv der Fig. 2 aus praktischen Gründen eine Unterteilung der Kurvenscharen unter Variation des Maßstabes aufweist, empfiehlt es sich, die Kurvennummern mit vorgesetzter römischer Kennziffer zu schreiben, z. B. I/4,25—4,50 oder II/9,0—9,0. Auf diese Weise werden Irrtümer mit Sicherheit vermieden, wie sie sonst wegen des doppelten Vorkommens der Kurven 8, 12 und 14 entstehen könnten.

achten ist, so hat man, um die Extrapolation der Kurven auszuführen, lediglich die passenden Kurvenäste des Projektionsbildes der Normalkurven zusätzlich einzuzichnen und zu kontrollieren, ob die Höhensummen der sich überschneidenden Kurvenäste die Höhe der Versuchskurve ergeben. Etwas verwickelter wird die Extrapolation, wenn sich an einer Stelle mehr als zwei Kurvenäste überschneiden oder wenn die Kurvenäste erst jenseits der benachbarten Kurvenscheitel-Ordinate die Abszisse erreichen. In diesen Fällen führt nur die Extrapolation der Kurvenzüge unter wiederholter Korrektur und laufender Kontrolle der Höhensummen zum Ziel. Wie man dabei vorzugehen hat, ist von Fall zu Fall verschieden. Man kann zum Beispiel von den Schnittpunkten zweier sich kreuzender Kurvenäste ausgehen, deren Lage im allgemeinen besonders leicht zu finden ist, oder die Höhe eines zwischen zwei grösseren Gipfeln liegenden kleineren Gipfels durch Subtraktion der unter ihm sich ergebenden Höhen der durchlaufenden Kurvenäste bestimmen. Aber auch in solchen Fällen ist die Überprojektion scharfer Normalkurven sehr nützlich, weil sie sehr rasch Extrapolationsversuche zu kontrollieren und zu korrigieren erlaubt.

In der nachfolgenden Fig. 4 ist die auf die angegebene Weise erfolgte Auswertung des linken Teilbildes von Fig. 1 dargestellt. Über jeder Kurve ist die mit ihr zur Deckung gebrachte Normalkurve sowie die Masszahl von s angegeben. Die nach der Formel: $F = (F/2_{(1)} + F/2_{(2)}) s^2$ der Tabelle bzw. der Darstellung der Fig. 3 entnommenen und

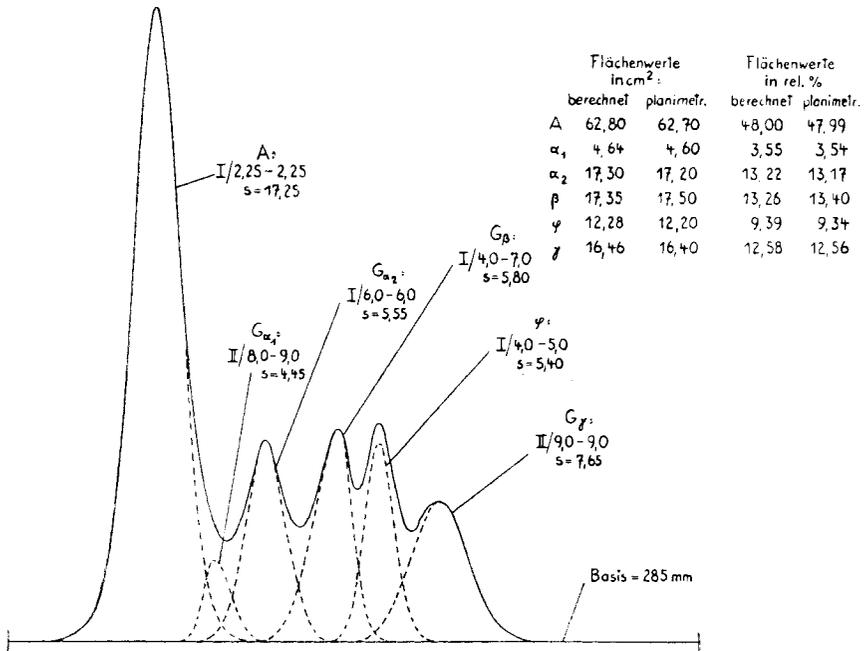


Fig. 4.

miteinander multiplizierten Werte, also die einzelnen Flächenwerte, sind rechts in der Fig. 4 zusammengestellt. Daneben sind die durch mehrfache, äusserst sorgfältige Planimetrierung derselben Kurven ermittelten Werte zum Vergleich angegeben. Die Übereinstimmung der respektiven Werte ist erwartungsgemäss gut, ebenso die der Flächensummen mit dem Planimeterwert des nicht extrapolierten Kurvenzuges mit der Basis, die seine richtige Extrapolierung, wenn auch nur in bezug auf die Summe der einzelnen Flächenwerte, beweist.

Unter der (nach dem Ergebnis der planimetrischen Kontrollen zutreffenden) Voraussetzung, dass der Fehler der Normalkurven $\pm 0,2\%$ ihres Flächenwertes nicht übersteigt, und unter der weiteren, zumeist erfüllten Annahme, dass eine strenge Kongruenz der Kurven des Bildes mit den Normalkurven erzielt wird, dürfte eine Annäherung der gemessenen Flächenwerte an ihren theoretischen Wert bis auf etwa $\pm 0,5\%$ erreichbar sein. Dies entspricht weitgehend der Genauigkeit der Bildwiedergabe von *Philpot-Svensson-Diagrammen*¹⁾, so wie der einer planimetrischen Bildauswertung unter günstigen Umständen, sodass die hier beschriebene Methode nicht nur bei der Auswertung grösseren Versuchsmaterials, sondern auch bei der genauen Interpretierung einzelner Versuche wertvoll sein dürfte.

Der Verfasser dankt auch an dieser Stelle Herrn Prof. A. Stoll herzlich für die grosszügige Unterstützung seiner Elektrophorese-Arbeiten.

Chemisch-pharmazeutisches Laboratorium „Sandoz“
(Prof. Dr. A. Stoll), Basel.

117. Osotriazole aus *l*-Xylose-, *l*-Rhamnose- und *d*-Chinovose-phenylosazon

von E. Hardegger und H. El Khadem.

(27. III. 47.)

R. M. Hann und C. S. Hudson²⁾ publizierten 1944 eine einfache Methode zur Umwandlung von *d*-Glucose-phenylosazon in *d*-Glucose-phenylosotriazol³⁾. Die Herstellung des Triazols erfolgte durch Kochen einer Suspension des Osazons in wässriger Kupfersulfat-Lösung. Spätere Mitteilungen⁴⁾⁵⁾⁶⁾ zeigten die allgemeine Anwendbarkeit dieser Reaktion.

1) E. Wiedemann, Helv. **30**, 639 (1947).

2) Am. Soc. **66**, 735 (1944).

3) In der ursprünglichen Mitteilung als Phenyl-*d*-glucosotriazol bezeichnet.

4) C. S. Hudson, J. Org. Chem. **9**, 474 (1944).

5) W. T. Haskins, R. M. Hann und C. S. Hudson, Am. Soc. **67**, 939 (1945).

6) W. T. Haskins, R. M. Hann und C. S. Hudson, Am. Soc. **68**, 1766 (1946).