

APR 21 1958

ESBO TECHNICAL
LIBRARY

93

ÜBERSICHT

HOCHVOLTELEKTROPHORESE

H. MICHL

II. Chemisches Institut der Universität, Wien (Österreich)

EINLEITUNG

Die Einführung der Papierchromatographie am Ende des zweiten Weltkrieges bedeutete einen enormen Fortschritt bei der Untersuchung niedermolekularer Stoffe. Jedoch erweckten die damals hier in Mitteleuropa vorhandenen Schwierigkeiten bei der Beschaffung geeigneter Papiere und Lösungsmittel, die langen Versuchszeiten und die schwer erkennbaren Zusammenhänge zwischen R_F Wert und chemischer Konstitution den Wunsch nach einem Verfahren, das diese Nachteile vermeidet und eine einigermaßen vergleichbare Trennwirkung aufweist.

Die von WIELAND UND FISCHER^{137, 139} neuentdeckte Papierelektrophorese—als eigentlicher Erfinder gilt, wenn man von elektrokapillaranalytischen Verfahren⁶¹ absieht, PAUL KÖNIG^{65, 66}—schien sich dafür zu eignen. Bei dieser Methode werden die verschiedenen Wanderungsgeschwindigkeiten von Substanzen im elektrischen Feld zu ihrer Trennung ausgenützt. Ein Streifen Filtrierpapier dient dabei als Träger für das leitende Lösungsmittel und das Substanzgemisch, das durch den Einfluss des angelegten elektrischen Feldes in die einzelnen Komponenten zerteilt wird. Dieses Verfahren war sehr einfach und elegant. Mit einer Spannungsquelle, Elektroden, Filtrierpapier und zwei Glasplatten konnte man Stoffmengen von wenigen Mikrogramm untersuchen. Bei derartigen Anordnungen dauerten aber die Versuche mehrere Stunden bis Tage, da man nur mit Spannungsgefällen von etwa 2–10 V/cm arbeiten konnte; auch war die Trennschärfe für niedermolekulare Stoffe oft unbefriedigend. Beide Eigenschaften hängen, wie folgender vereinfachende Gedanke zeigt⁷⁰, eng zusammen: hat man z.B. auf einem Fleck von 0.5 cm Durchmesser zwei Substanzen aufgetragen und vergrößert sich dieser während der Versuchsdauer von 0.5 auf 1 cm, so muss man die Substanzen mindestens 1 cm weit auseinanderziehen, um eine Auftrennung erkennen zu können. Hält man nun die Versuchsdauer so kurz, dass keine Vergrößerung der Flecken eintritt, so genügt der halbe Weg oder man bekommt auf der gleichen Trennstrecke eine doppelt so gute Auftrennung. Da eine Vergrößerung der Flecken im genannten Ausmass bei niedermolekularen Stoffen schon innerhalb von 2 Stunden eintreten kann⁶⁹, ist eine Verbesserung der Trennschärfe nur bei deutlicher Steigerung der Wanderungsgeschwindigkeit zu erwarten. Nach dieser Überlegung müsste also eine drastische Erhöhung des Spannungsgefälles die gewünschte Verbesserung des Auflösungsvermögens mit sich bringen. Erhöht man aber bei der Elektrophorese das Spannungsgefälle, so steigt die Wanderungsgeschwindigkeit linear, die entwickelte Joulesche Wärme wächst aber mit dem Quadrat. Eine

möglichst gute Ableitung dieser Wärme ist deshalb eine unerlässliche Voraussetzung für Versuche mit höheren Spannungsgefällen. Die damals üblichen Geräte für Papier-electrophorese waren naturgemäss diesen Anforderungen nicht gewachsen und auch der Ausweg, die Pufferkonzentration und damit die Stromstärke und die Joulesche Wärme zu vermindern, ist nur in Ausnahmefällen gangbar^{20, 84, 109}. Auch die Apparatur von BERRAZ¹², von der behauptet wurde^{22, 78}, dass sie eine gewisse Ähnlichkeit mit der in Fig. 1 und 2 dargestellten Apparatur besässe, wäre mangels jeder Kühlvorrichtung

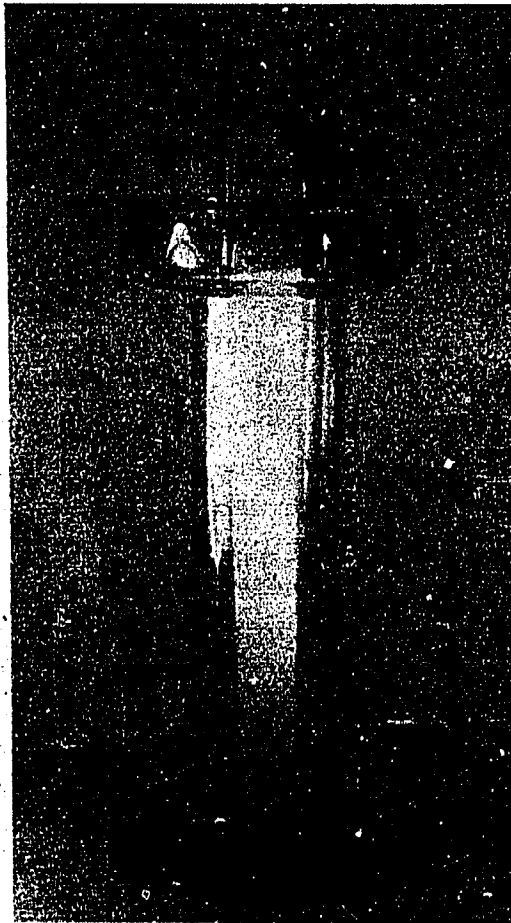


Fig. 1.

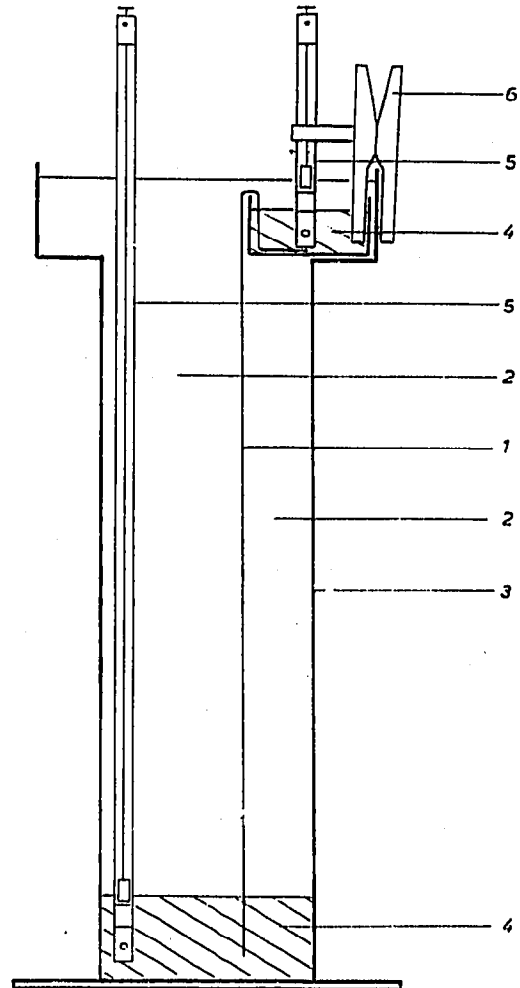


Fig. 2.

Fig. 2. 1. Filtrierpapierstreifen. 2. Organisches Lösungsmittel. 3. Glasgefäss. 4. Mit Zellosepulver verdickter Puffer. 5. Elektrode (Ag/AgCl). 6. Klammer.

völlig ungeeignet gewesen. Am besten schien sich noch für das Arbeiten bei hohen Spannungsgefällen die Apparatur von CREMER UND TISELIUS zu eignen²⁶. Hier wird der Filtrierpapierstreifen zwischen Glasplatten eingebettet und in ein Chlorbenzolbad versenkt. Das garantierte wohl eine ausgezeichnete Kühlung, gab aber bei niedermolekularen Stoffen häufig verwaschene Diagramme.

In der Folge wurde dann vom Verfasser eine Anordnung beschrieben, die den Anforderungen einigermaßen gerecht wird und Spannungsgefälle bis etwa 50 V/cm gestattete⁷⁹. Für Untersuchungen, die bei diesem oder höheren Spannungsgefällen

durchgeführt wurden, prägten WESTPHAL und Mit. den Namen "Hochvoltelektrophorese"¹³⁶. Diese Bezeichnung, die physikalisch nicht genauer umrissen werden kann und soll, hat sich allgemein durchgesetzt und wird auch im Folgenden verwendet werden.

Seit dieser Zeit ist eine ganze Reihe von Apparaten entwickelt worden. Es gibt auch eine ganze Anzahl von Möglichkeiten der Kühlung⁸⁴, bevorzugt werden aber zur Zeit nur zwei Systeme: Apparaturen mit flüssigen und Apparaturen mit festen Wärmeaustauschern.

APPARATE

Apparate mit flüssigen Wärmeaustauschern^{25, 51, 62, 68, 79, 95, 102, 104, 106, 115, 118, 122, 125}

Solche Apparate lassen sich oft mit primitiven, in jedem Labor vorhandenen Hilfsmitteln zusammenstellen. Trotz ihrer Einfachheit erreicht ihr Auflösungsvermögen bei vielen Stoffklassen das der weiter unten beschriebenen, um Größenordnungen teureren Geräte mit festen Wärmeaustauschern. Nachteile sind die etwas umständlichere Handhabung und das Lösungsvermögen des flüssigen Wärmeaustauschers für manche Substanzen.

Diese Apparaturen bestehen im Wesentlichen (Fig. 1 und 2) aus einem senkrechten Zylinder (3), der mit einem organischen Lösungsmittel (2) gefüllt ist und oben und unten Elektrodengefäße mit den Stromzuführungen (4, 5) enthält. In dem hier gezeigten Apparat ist in einfachster Weise das obere Elektrodengefäß mittels einer Klammer (6) am Rande eines Standglases befestigt. Die Elektrodenräume füllt man mit einem Brei aus Puffer und Zellulosepulver. Ein Filtrierpapierstreifen wird mit der Pufferlösung befeuchtet und leicht zwischen Filtrierpapier abgepresst. Dann trägt man mittels eines Pinsels oder einer Kapillare die Substanz in Form eines Striches normal zur Längsrichtung des Streifens auf und hängt ihn zwischen die Elektrodengefäße. Hierauf setzt man die beiden Elektroden (5) ein—dieser Stand ist in Fig. 1 festgehalten—und füllt das Gefäß mit Toluol oder einer anderen organischen Flüssigkeit. Jetzt kann der Strom eingeschaltet und der Versuch begonnen werden.

Wird nun der Streifen durch den elektrischen Strom "geheizt", so gibt er die Wärme an die organische Phase ab und diese gerät in Konvektion; sie steigt auf und sinkt längs der kühlen Gefäßwand zu Boden. Diese Art der Wärmeableitung ist recht wirksam, sie lässt sich durch die Verwendung einer kräftigen Aussenkühlung leicht weiter steigern. Es können auf diese Weise bis zu 0.2 W/cm^2 der Streifenfläche abgeführt werden. Auch waagrechte Anordnungen des Streifens wurden schon beschrieben^{25, 95, 106, 118}, hier kann die Kühlwirkung mittels eines Rührers verbessert werden.

Die organische Phase soll einer Anzahl Anforderungen, wie Nichtmischbarkeit mit den verwendeten Puffern und untersuchten Substanzen, leichte Entfernbarkeit vom Filtrierpapier, Feuersicherheit, keine Belästigungen der Experimentierenden durch Dämpfe usw. genügen. Empfohlen wurden unter anderen Chlorbenzol²⁶, Hexan

bzw. Heptan⁵¹, Tetrachlorkohlenstoff⁷⁷ und Toluol⁷⁹. Tabelle I gibt eine Übersicht über die in diesem Zusammenhang interessierenden physikalischen und chemischen Eigenschaften^{4, 26, 57}.

Bei Apparaturen mit flüssigen Kühlmedien ist die Handhabung von übergrossen Gefässen oft umständlich. Deshalb ist die Länge des Filtrierpapierstreifens und damit

TABELLE I

Stoff	Wärmeleitzahl in $\text{cal} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{grad}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$	Löslichkeit in Wasser (g/100 ml)	Dampfdruck in Torr bei 20°	Temperatur der Selbstentzündung	Explosionsgrenzen in Mischung mit Luft
Chlorbenzol	0.00030	0.049 (30°)	9	—	—
Heptan	0.00034	0.0052 (16°)	35	233°	1-6%
Tetrachlorkohlenstoff	0.00028	0.077 (25°)	91	—	—
Toluol	0.00036	0.063 (25°)	22	549°	1.3-7%

der Trennweg begrenzt. Es wurde aus diesem Grunde vorgeschlagen, den Streifen nicht gerade zwischen die Elektroden zu hängen, sondern ihn zu winkeln^{122, 125}, ihn zick-zack zu führen^{95, 106} oder auf Rollen zu wickeln^{8, 145}.

Der Filtrierpapierstreifen soll, wie bereits erwähnt, zwischen Filtrierpapier abgepresst und verhältnismässig trocken (Gewicht des luftgetrockneten Streifens: Puffer etwa wie 1:1.2) eingehängt werden. Damit in diesem Falle der überschüssige Puffer nur langsam aus den Elektrodengefässen angesaugt werden kann, sind diese mit einem Brei aus Filtrierpapier und Puffer^{81, 122} auszufüllen. Ohne diese Vorsichtsmassnahme besteht die Gefahr, dass die aufgetragene Substanz weggeschwemmt wird ("Dochteffekt") und zerrinnt.

Für länger dauernde Versuche ist es ferner zweckmässig, reversibel arbeitende Elektroden zu verwenden, z.B. wie in Fig. 1 und 2 zwei Silber/Silberchlorid Elektroden, die durch ein Diaphragma von den Elektrodenräumen getrennt werden.

Apparate mit festen Wärmeaustauschern^{10, 27, 32, 43, 82, 90, 133, 134, 140}

Die zweite Art von Apparaturen führt die Joulesche Wärme an gekühlte, elektrisch isolierte Platten ab. Man kann den Filtrierpapierstreifen zwischen zwei solche Flächen legen^{43, 82}, oft genügt auch nur eine und der Streifen wird mit einer Platte aus einem durchsichtigen Material bedeckt. Eine Apparatur dieser Art^{87, 90}, die seit 6 Jahren ohne wesentliche Änderung oder Reparatur im hiesigen Institut in Verwendung steht, zeigt die Fig. 3 und 4.

Sie besteht im wesentlichen aus einem Kühler (3), der mit einer Glasplatte (2) bedeckt ist. An den Enden befinden sich Puffergefässe (5), die durch Stromschlüssel (6) mit den reversibel arbeitenden Elektroden (8) verbunden sind. Alle diese Bestandteile werden von dem Kunststoffgehäuse (9) aufgenommen.

Zu Beginn des Versuches wird der halbfeuchte Filtrierpapierstreifen (1) auf die Glasplatte (2) gelegt und die Substanz aufgetragen. Die leitende Verbindung von Filtrierpapierstreifen (1) und Puffergefäss (5) erfolgt durch ein Stück eines mit einem Docht aus Filtrierpapier versehenen pufferfeuchten Zellophanschlauches (4). Nach

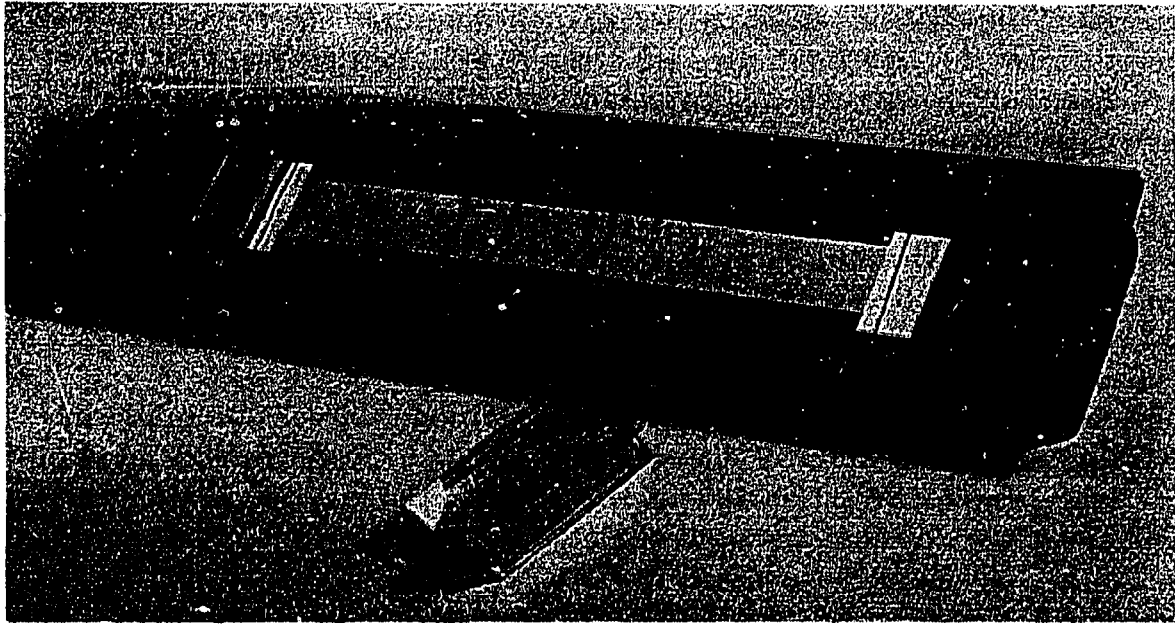


Fig. 3.

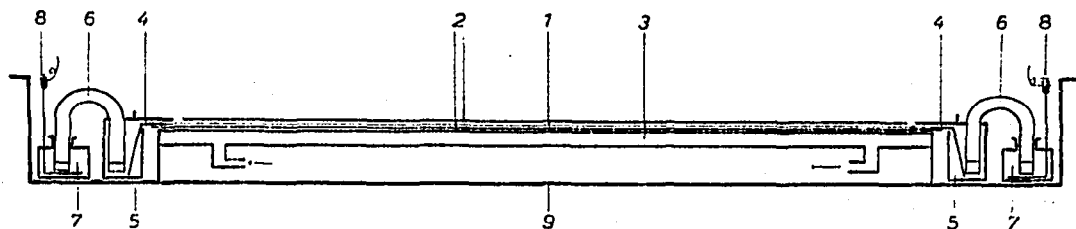


Fig. 4. 1. Filtrierpapierstreifen. 2. Glasplatten. 3. Kühler. 4. Zellophanmembran. 5. Puffergefäß. 6. Stromschlüssel. 7. Elektrodenkammer. 8. Elektrode (Cu/CuCl_2). 9. Gehäuse.

dem Bedecken des Streifens mit einer Glasplatte (2) werden die Elektrodengefäße (8) und die mit Puffer gefüllten Stromschlüssel (6) eingesetzt, das Gehäuse (9) mit einem (hier nicht gezeigten) Deckel geschlossen und die Verbindungen mit der Stromquelle hergestellt.

Einige Bedeutung kommt dem Feuchtigkeitsgehalt des Streifens zu^{82,86,130}. Vom Standpunkt einer möglichst guten Wärmeableitung aus, wäre es natürlich günstiger, den Streifen so nass einzulegen, dass die Pufferlösung in direkten Kontakt mit der Kühlfläche kommt; das entspräche einem Verhältnis des Gewichtes vom lufttrockenen Streifen: Puffer von 1:2.0–2.5. Bei einem solchen Vorgehen würde aber das Auflösungsvermögen stark herabgesetzt, da Puffer und Substanzlösung viel leichter verrinnen. Ausserdem herrschen in dem Pufferfilm zwischen dem Filtrierpapierstreifen und der Kühlfläche andere Wanderungsbedingungen, wie im Filtrierpapier selbst. Legt man aber, wie oben gefordert, einen verhältnismässig trockenen Streifen (Gewicht des lufttrockenen Streifens: Puffer gleich 1:1.0–1.2)⁸² ein, so wird dieser durch die Zellolofasern von der Kühlfläche in einem bestimmten Abstand von einigen hundertstel Millimetern gehalten werden. Wir haben also eine sehr enge "feuchte Kammer" vor uns, wie sie in geräumiger Ausführung die Niedervoltelektrophorese benützt. Um

einen Streifen mit einem gewünschten Feuchtigkeitsgehalt reproduzierbar herzustellen, zieht man ihn erst durch die Pufferlösung, quetscht ihn dann zwischen Filtrierpapier oder mit Hilfe einer Art Wäschewrangel^{133, 134} ab und kontrolliert sein Gewicht. Ein so hergestellter halbtrockener Streifen hat das Bestreben, nach dem Einlegen in die Apparatur frischen Puffer aus den Puffergefässen anzusaugen, weshalb man ihn mittels der Zellophanmembrane von Flüssigkeitsströmungen isoliert. Bei der Apparatur von FOSTER³² wird auf diese Massnahme verzichtet und man lässt die im elektrischen Feld wandernde Substanz gegen die Pufferströmung anlaufen; die in diesem Apparat gefundenen Beweglichkeiten (³⁷, s.a. Tabelle X) sind offenbar deshalb auch viel kleiner, als sie sonst gefunden wurden⁸².

Von der durch den elektrischen Strom im Streifen entwickelten Wärme soll ein möglichst grosser Anteil durch Wärmeleitung und nicht in Form von Verdampfungswärme abgegeben werden. Das Lösungsmittel des Puffers destilliert sonst auf die Kühlflächen und bildet dort grosse Tropfen. Werden diese dann wieder vom Streifen angesaugt, so schwemmen sie die Substanz von diesen Stellen fort, wodurch der Streifen nach dem Anfärben ein charakteristisch marmoriertes Aussehen erhält (s.a. Tabelle V). Möglichst hydrophob gehaltene Kühlflächen (silikonisiertes oder mit Vaseline gefettetes Glas, PVC-Platten o.ä.) fördern das Auftreten von Übersättigungserscheinungen und vermindern dadurch die Kondensation. Eine weitere recht wirksame Massnahme ist die Herabsetzung der Dampfspannung des Puffers oder zumindest des Partialdruckes vom Wasser. Dies lässt sich durch Arbeiten bei niedrigen Temperaturen—etwa von 0 bis + 5°—erreichen, wodurch die Verwendung von Kühlaggregaten erforderlich wird^{133, 134}. Beim Arbeiten mit niedrigen Temperaturen steigt aber die Viskosität des Puffers stark an (s. Tabelle II), um diese zu überwinden, muss man im gleichen Masse das Spannungsgefälle steigern. Wie die Tabelle II zeigt, hat man das Spannungsgefälle bei 0° fast zu verdoppeln, wenn man die gleiche Wanderungsgeschwindigkeit wie bei 20° erreichen will. Dieser Effekt wird unter Umständen noch durch die Temperaturabhängigkeit des Dissoziationsgrades verschärft.

Eine wesentlich einfachere, aber nicht so universell anwendbare Methode, den Partialdruck des Wassers herabzusetzen, hat man durch Zusatz bestimmter Stoffe zum Puffer. Man erhält dann bei vielen bisher untersuchten Stoffklassen fast ebenso gute Auftrennungen, wie mit den kostspieligen Kühlaggregaten⁸⁷. So vermag (Tabelle II) z.B. ein Zusatz von 10% Aceton den Partialdruck des Wassers nahezu zu halbieren. Beim Versuch dunstet dann das Aceton bevorzugt ab, kondensiert an der Kühlfläche und wird von dort wieder aufgesaugt. Da aber die mit dem oben genannten Gemisch koexistierende Dampfphase ca. 80% Aceton enthält und die meisten untersuchten Stoffe nicht löst, treten keine Störungen auf⁸⁷.

Bei Puffern, die verhältnismässig grosse Mengen an schwach dissoziierenden Verbindungen enthalten, z.B. dem Pyridin-Essigsäurepuffer⁷⁹, tritt dieser Effekt schon an sich auf. Glycerin und ähnliche Stoffe eignen sich im vorliegenden Fall kaum als Zusätze; sie erhöhen die Viskosität des Puffers viel zu stark, ohne den Partialdruck des Wassers entsprechend zu senken.

Das Spannungsgefälle und die Stromstärke sind nach oben durch die beschränkte Fähigkeit der Apparatur, die Stromwärme abzuführen, begrenzt. Von grosser Bedeutung für den Wärmeaustausch ist das Material, aus dem die Kühlerfläche besteht. An dieses werden recht widersprechende Anforderungen gestellt: es muss einerseits ein elektrischer Isolator sein und eine hohe Durchschlagsfestigkeit besitzen, andererseits soll es aber Wärme gut leiten. Nach der Widemann-Franzschens Regel gehen aber

TABELLE II^{4,57,97}

	Temperatur in °C	Partialdruck des Wassers in Torr	Viskosität in Zentipoise	Spannungsgefälle, die gleiche Wanderungs- geschwindigkeiten ergeben (berechnet nach dem Stokeschen Gesetz) V/cm
Wasser	0	4.58	1.78	89
Wasser	10	9.20	1.30	65
Wasser	20	17.53	1.00	50
Wasser mit 10 (Gew.) % Aceton	20	8.0	1.18	59
Wasser mit 10 (Gew.) % Glycerin	20	17.0	1.31	65

beide Leitfähigkeiten parallel. Von den üblichen Werkstoffen zeigen Glas (Tabelle III) und keramische Massen das günstigste Verhalten. Beim Arbeiten mit nicht wässrigen Lösungsmitteln⁹⁴ sind sie auch viel resistenter gegen die organischen Flüssigkeiten als z.B. Kunststoffe. Wenn manche Apparaturen trotzdem völlig aus PVC oder Polymethacrylsäureestern gebaut sind, so liegt das an deren geringer Zerbrechlichkeit und leichter Bearbeitungsmöglichkeit.

Die erforderliche Dicke der Isolierschicht hängt von der Grösse der Apparatur und damit von der gesamten an diese gelegten Spannung ab. Kleinere Apparate

TABELLE III^{4,103}

	Wärmeleitfähigkeit in $\text{cal} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1} \cdot \text{grad}^{-1}$	Durchschlagsfestigkeit in kV/mm (nach VDE 0363)
Luft	0.000062	etwa 1
Polyvinylchlorid (PVC)	0.00039	50
Polymethacrylsäureester	0.00043	40
Glas	etwa 0.002	20-40
Aluminium	0.585	—

gestatten zwar nur einen kurzen Trennweg, man kommt aber mit dünneren, also besser Wärme ableitenden Isolierschichten aus⁸² und kann dementsprechend stärkere Spannungsgefälle verwenden. Auf diese Weise kann man noch Wärmemengen die einer Leistung von einigen zehntel Watt/cm² entsprechen, ableiten. Die meisten anderen Apparate—besonders solche mit Kunststoffplatten—sollten nicht stärker als mit 0.05-0.1 Watt/cm² belastet werden. Tabelle III gibt eine Übersicht über die Wärmeleitfähigkeit und Durchschlagsfestigkeit einiger in Hochvoltapparaturen verwendeter Materialien.

Der Wärmeaustausch in Apparaten mit festen Kühlflächen ist viel komplizierter als in Apparaturen mit flüssigen Wärmeaustauschern. Es muss erst die dünne Luftschicht zwischen dem Streifen und der Kühlfläche, dann die Isolierschicht und eventuell noch eine Metallschicht überwunden werden, ehe das kühlende Wasser oder die Sole die Wärme aufnimmt. Jede Unregelmässigkeit in der Wärmeableitung verursacht Verzerrungen der Substanzzonen, 1° Temperaturunterschied bewirkt einen Unterschied von etwa 3% in der Wanderungsgeschwindigkeit²⁶. Der Filtrierpapierstreifen muss also sehr sorgfältig auf die Kühlfläche aufgelegt und fixiert werden. In den meisten Fällen genügt dazu eine plan geschliffene Glasplatte (Spiegelglas); bei manchen Apparaten ist eine eigene Spannvorrichtung vorgesehen^{133, 134}.

Apparate für spezielle Zwecke

(a) *für grosse oder kleine Substanzmengen.* Die im Bisherigen geschilderten Methoden und Apparate gestatten Trennungen von Substanzmengen, die in der Grössenordnung von 10^{-6} bis 10^{-3} g liegen. Grössere Mengen kann man, wie in dem Kapitel über Proteine kurz geschildert werden wird, durch HVE in dünnen Platten z.B. aus Stärke^{84, 140} oder durch freie Zonenelektrophorese⁸⁵ trennen. Für die Untersuchung kleinerer Substanzmengen, etwa 10^{-9} – 10^{-7} g sind eigene Apparate erforderlich (z.B. ^{31, 93, 127}). Als Träger für den Puffer werden dabei gequollene Fäden oder dünne Flüssigkeitsfilme verwendet. Da sich diese sehr leicht kühlen lassen, kann man sehr hohe Spannungsgefälle anlegen⁸⁷.

(b) *für Elektrophorese und Chromatographie.* Durch die Verknüpfung der Hochvoltelektrophorese mit chromatographischen Verfahren kann das Auflösungsvermögen stark gesteigert werden. Der allgemein anwendbare aber mühevollere Weg ist der, dass man die Substanzen nach jedem Arbeitsgang isoliert und dann neu aufträgt. Einfacher ist es, ein zweidimensionales Diagramm dadurch herzustellen, dass man in der einen Richtung die Elektrophorese, am besten mit einem flüchtigen Puffer, durchführt und nach dem Trocknen in der zweiten Richtung nach den Regeln der Papierchromatographie entwickelt^{56, 62}. Natürlich kann man, wie es DURRUM schon vor längerer Zeit gezeigt hat²⁹, auch in der zweiten Richtung bei einem anderen pH Wert elektrophoretisch trennen.

(c) *für isoelektrische Trennungen.* Gewöhnlich trennt man die Substanzen auf Grund ihrer verschiedenen elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeiten im Papierstreifen. Sie lassen sich aber auch auf Grund ihrer verschiedenen isoelektrischen Bereiche oder allgemein durch eine pH Abhängigkeit ihrer Wanderungsgeschwindigkeit trennen (z.B. ¹¹⁰). Dazu ist es notwendig, einen pH-Gradienten in der Richtung des elektrischen Feldes aufzubauen und zeitlich konstant zu halten. Ersteres gelingt relativ leicht z.B. durch Diffusion zweier Puffer mit verschiedenem pH, durch Elektrolyse an einem Halbleiter usw.; die zeitliche Konstanz erreicht man nur sehr schwer und das ist wohl auch der Grund, warum trotz einer Anzahl hier nicht näher besprochener Versuche nicht das Auflösungsvermögen einer normalen Hochvoltelektrophorese erreicht werden konnte, zumindest nicht bei niedermolekularen Stoffen.

PUFFER UND LÖSUNGSMITTEL FÜR DIE HOCHVOLTELEKTROPHORESE (HVE)

Die Wahl des richtigen Lösungsmittels bzw. Puffers ist für eine gute Auftrennung ebenso wichtig, wie die Apparatur selbst. Es genügt nicht immer, den pH Wert des Puffers zwischen die pK -Werte der zu untersuchenden Substanzen zu legen²³ bzw. bei einer Komplexbildung die analogen Funktionen zu berücksichtigen, man müsste auch u.a. Adsorptions- und Verdrängungserscheinungen in Rechnung stellen. Am leichtesten gelingt das noch bei den Adsorptionserscheinungen. Das Untersuchungsmaterial wird mit dem zur Elektrophorese bestimmten Puffer papierchromatographiert. Schweifbildung und R_F -Werte kleiner als 1 lassen bei der Elektrophorese ebenfalls eine Schweifbildung in der Richtung zum Auftragungsort und langsame Wanderung erwarten. Das ist vor allem bei basischen organischen Stoffen, etwa Alkaloiden und Farbstoffen, sehr ausgeprägt. Auch das scheinbar paradoxe Verhalten von Arginin bei der Papierionophorese—es wandert trotz eines höheren isoelektrischen Punktes oft langsamer als Lysin—kommt so zustande. Manchmal erhält man zwar Trennungen gerade durch solche Adsorptionserscheinungen, meist sind sie aber sehr unerwünscht. Eine Therapie im Falle von echter Adsorption an die Zellulosefaser ist schwierig; sie gelingt oft nur bei der Verwendung wasserarmer oder nicht-wässriger Lösungsmittel oder durch die Benützung von Kunststoffpapier, z.B. dem aus PVC-Fasern bestehendem "Rhovylpapier" 1001 der Fa. Schleicher und Schüll^{87, 116}. Im letzteren Fall muss man allerdings wegen der ungleichmässigen Textur des Papiers gewisse Verzerrungen der Bande in Kauf nehmen. Ist die Adsorption durch Ionenaustausch (freie Carboxylgruppen in der Zellulose) bedingt, so genügt oft die Verwendung von Erdalkalitionen-hältigen Puffern^{80, 81, 87}; im übrigen treten oft, besonders bei anorganischen Ionen, Verdrängungserscheinungen ein, die eine Auftrennung eher fördern.

Niedermolekulare Stoffe, die nicht adsorbiert werden, zeigen meist eine Schwanzbildung in der Wanderungsrichtung. Diese wird vor allem bei einer zu starken Beladung des Papiers mit Untersuchungsmaterial deutlich. An den Stellen grösserer Konzentration wandert nämlich die Substanz langsamer, als an den Stellen kleinerer und zwar deshalb, weil dort die Feldstärke durch die grössere Leitfähigkeit herabgesetzt wird. Kleinere Konzentrationen sind an der Front und an der Rückseite der Zone und hier wandert auch die Substanz schneller. An der Front wandert sie in den Puffer hinein, verteilt sich auf eine grössere Fläche und macht damit die Grenze zwischen der Substanzzone und dem Puffer unscharf. Auf der Rückseite wird sie wieder in die Zone hereingezogen, diese bleibt daher scharf. Die analogen Erscheinungen sind von der freien Elektrophorese her wohl bekannt und mathematisch behandelt^{119, 120, 131}.

Bequemer als salzhältige Puffer sind vielfach Lösungsmittel mit flüchtigen Bestandteilen, da sie durch einfaches Trocknen oder Absublimieren aus dem Streifen entfernt werden können. Bisher bewährten sich vor allem Lösungen mit Ameisensäure-Essigsäuregemischen (um pH 2)⁶²; Pyridin-Essigsäure (pH 3.5–6)^{51, 79, 102}; Ammoniak-Ameisensäure bzw. Essigsäure (pH 6–10)^{54, 88}; Trimethylamin-Ameisensäure-Essigsäure und Kohlensäure (pH 3–6 und 7–12)⁹⁶; Collidin-Essigsäure (um

pH 7)⁹²; Ammoncarbonat (um pH 8)²⁴; weniger Erfahrung liegt noch mit Collidin-Salzsäure (pH 6.5–8.3)⁹⁹, Mono- bzw. Triäthanolamin-Salzsäure (pH 6.5–11)¹²⁰ und ähnlichen Gemischen vor.

Wie bereits erwähnt, ist es in manchen Fällen günstiger, von Wasser als Hauptbestandteil des Lösungsmittels abzugehen und andere Flüssigkeiten zu verwenden. In solchen Systemen tritt oft eine Verringerung störender Adsorptionserscheinungen ein und es können auch wasserunlösliche Stoffe untersucht werden. Nachteilig macht sich oft die geringe Leitfähigkeit dieser Lösungsmittel und auch der Umstand, dass Filtrierpapier nicht in ihnen quillt, bemerkbar. Ferner können für diese Versuche nur Apparate, die Kühlflächen aus Glas besitzen, Verwendung finden.

DURRUM UND PAUL zeigten z.B., dass eine Anzahl organischer Farbstoffe, die in wässrigen Puffern stark adsorbiert werden, in hochprozentigem Alkohol noch befriedigend wandern³⁰. Kristallviolett, ein Farbstoff, der von gequollener Zellulose stark zurückgehalten wird und deshalb bei einem normalen Papierelektrophoreseversuch nicht wandert, bewegt sich sehr deutlich in verschiedenen organischen Lösungsmitteln (Tabelle IV).

TABELLE IV⁹⁴

Lösungsmittel	Dielektrizitätskonstante	Viskosität in Zentipoise 20°	Wanderungsweg in cm bei 90 V/cm und 20 min Versuchsdauer
Äthylenglykol	41.2	19.9	0.7
Nitromethan	39.4	0.66	3.8
Dimethylformamid	36.7	3.76	6.0
Nitrobenzol	35.7	2.01	3.2
Äthanol	28.8	1.19	4.2
Isopropanol	26.0	2.39	5.0
n-Butanol	19.2	2.95	2.5
Pyridin	13.6	0.95	4.0
Äthylendichlorid	10.5	0.83	0.7

Bei der Wahl des Lösungsmittels sollte man erwarten, dass nach der Coehnschen Regel und dem Stokeschen Gesetz solche mit hoher Dielektrizitätskonstante und niedriger Viskosität am besten geeignet sein müssten. Aber auch hier gibt es, wie man in der Tabelle am Beispiel des Dimethylformamides sehen kann, Ausnahmen.

Da die Dissoziation in den organischen Lösungsmitteln meist geringer als im Wasser ist, muss das Untersuchungsmaterial genügend leicht in einen ionisierten Zustand übergehen. Bei an sich nicht ionisierbaren Stoffen gelingt dies durch Einbau entsprechender funktioneller Gruppen. HASHIMOTO⁴⁹ führte zum Beispiel Triterpene durch Behandeln mit Schwefeltrioxyd in Sulfosäuren über, die er dann in Butanol-Essigsäure weitgehend auftrennen konnte.

In jüngerer Zeit wurden auch geschmolzene anorganische Salze als Elektrolyten verwendet, als Träger diente Asbestpapier²¹. In einem solchen System gelang, wie von den Autoren an einer anderen Stelle dieser Zeitschrift ausführlich berichtet wird, die Trennung von Isotopen.

TABELLE V

EINIGE BEI DER HOCHVOLTELEKTROPHORESE AUFTRETENDE FEHLER UND DEREN BEHEBUNG⁸⁷

<i>Symptom</i>	<i>Ursache</i>	<i>Behebung</i>
Substanzzonen sind deutlich begrenzt, aber verzerrt	Ungleichmässige Erwärmung, Ionenstärke, pH oder Feuchtigkeit; ungleichmässige Textur des Papiers; ungleichmässiges Trocknen	Streifen muss überall gleichmässigen Kontakt mit Kühlfläche haben, gleichmässig feucht sein usw. Gleichgewicht nach dem Einlegen abwarten, ev. Entsalzen.
Substanzzone bildet Halbmond	Kühlung am Streifenrand ist stärker als in der Streifenmitte	Seitlich Streifen auflegen ^{88, 133, 134} .
Substanzzone erscheint marmoriert und verwaschen	Kühlung reicht nicht aus, Kühlfläche zu nass	Wärmeentwicklung vermindern, Kühlfläche hydrophob und trocken halten, eventuell senkrechten Wärmegradienten anlegen ¹³² .
Abnormale Wanderungsgeschwindigkeiten	Dochteffekt ⁸¹ . Strom setzt aus. Elektroosmose (bes. bei hohen pH Werten und in Glaspapier), Puffer gefroren	Zellophanbarrieren überprüfen, Stromstärke kontrollieren, nicht wandernde Substanz zur Erkennung des Ausgangspunktes zugeben.
Papier trocknet und verglimmt an scharf begrenzten Streifen oder wird bei flüss. Wärmeaustauschern durchsichtig	Papier ist schlecht abgedeckt (bes. in der Nähe der Puffergefässe), in Puffergefässen und Streifen sind nicht die gleichen Puffer, pH-Verschiebungen, Kühlmittel ist nicht mit Puffer gesättigt	Ergibt sich aus Ursache.
Schweifbildung <i>in</i> der Wanderungsrichtung	Zu hohe Konzentration an Untersuchungsmaterial, seltener: pH Effekt ²²	Ergibt sich aus Ursache, Ionenstärke des Puffers erhöhen.
Schweifbildung <i>entgegen-</i> gesetzt der Wanderungsrichtung	Adsorption, seltener: pH Effekt ²²	Bei möglichst niedrigen pH Werten arbeiten, organische Lösungsmittel zum Puffer geben, Puffer mit organischen Basen oder Erdalkalitionen verwenden, Glasfaser- oder Kunststoffpapier benutzen ^{11, 87, 110} .
Untersuchungsmaterial bildet Streifen bis zum Start zurück	Material war nicht ganz gelöst, Papier wurde angeritzt ¹⁴⁰	Ergibt sich aus Ursache.
Schrumpfung der Substanzzone	Substanz wurde mit einem anderen Lösungsmittel aufgetragen (z.B. aus Alkohol) ¹⁴⁰	Ergibt sich aus Ursache.

UNTERSUCHTE SUBSTANZKLASSEN

Aminosäuren

Aminosäuregemische sind schon oft mittels der Hochvoltelektrophorese (HVE) untersucht worden^{1, 2, 45, 50, 51, 62, 79, 89, 102, 115, 133, 134, 140, 141}. Mit ihr konnte sogar eine *Literatur S. 119/121*.

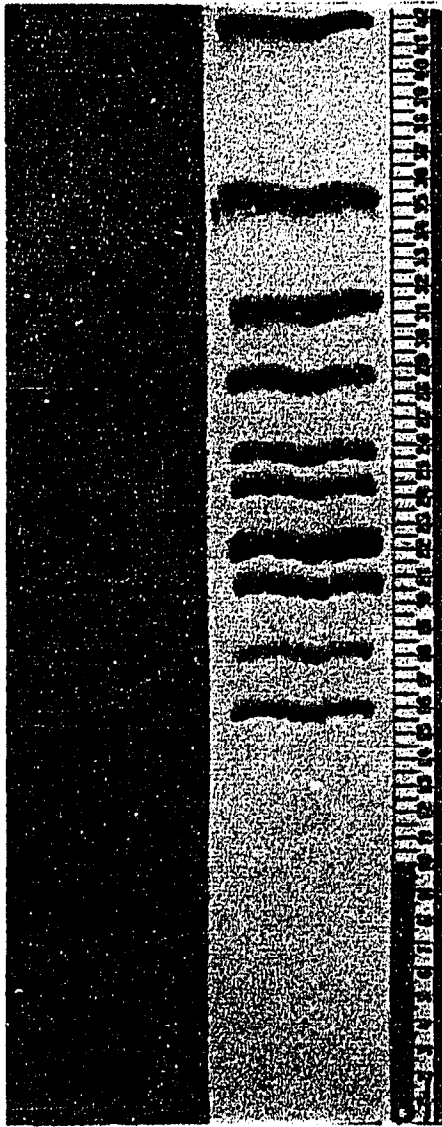


Fig. 5.

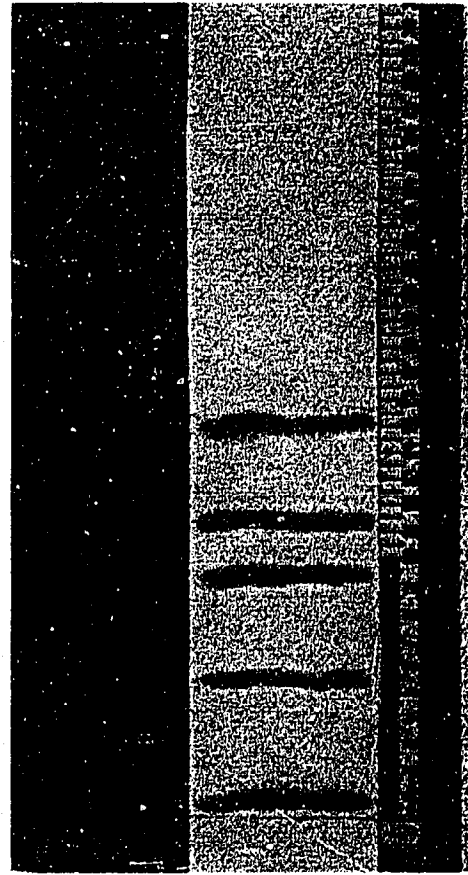


Fig. 6.

Fig. 5. Apparat nach Fig. 3; 40 V/cm, 2 mA/cm Streifenbreite; 120 min; 10°. Lösungsmittel: 3 ml 80% Ameisensäure, 12 ml Eisessig, 15 ml Aceton auf 100 ml mit Wasser aufgefüllt (pH 1.9). Anfärbung: 0.2% Ninhydrin in Butanol.

Fig. 6. Apparat nach Fig. 3; 33.5 V/cm, 3.7 mA/cm Streifenbreite; 90 min; 10°. Lösungsmittel: 2 ml Pyridin, 4 ml Eisessig, 15 ml Aceton auf 100 ml mit Wasser aufgefüllt (pH 4.4). Anfärbung: 0.2% Ninhydrin in Butanol.

neue Aminosäure(δ -Oxyleucenin) im Hydrolysat des Knollenblätterpilzgiftes nachgewiesen werden¹⁴².

Die Zerlegung eines Gemisches der natürlichen Aminosäuren, etwa eines Proteinhydrolysates, gelingt am besten bei pH Werten um 2^{45, 62, 89, 115, 133, 134}. Wie Fig. 5 zeigt, entspricht dabei die Auftrennung etwa der eines guten eindimensionalen Papierchromatogrammes. Einige Zahlen für die Wanderungsgeschwindigkeit gibt Tabelle VI.

Will man eine bestimmte Gruppe von Aminosäuren genauer untersuchen, so bietet die HVE der Papierchromatographie gegenüber Vorteile. Es lassen sich z.B. viele nicht α -Aminosäuren in Pyridin-Eisigsäurepuffern von pH Werten um 4.5

leicht neben den anderen Aminosäuren erkennen und auftrennen; sie wandern dann zwischen den Monoaminomonokarbonsäuren und den Hexonbasen⁸⁹ (Fig. 6). Auch die saueren Aminosäuren (z.B. Cystinsäure, Asparaginsäure und Glutaminsäure) werden innerhalb von wenigen Minuten bei diesem pH getrennt^{79, 89}. Eine Trennung der basischen Aminosäuren, besonders von Arginin und Lysin wird durch Adsorptions-

TABELLE VI
QUOTIENT DER WANDERUNGSWEGE VON AMINOSÄURE/ALANIN¹⁴¹ ZU KATHODE
Ameisensäure-Essigsäuregemisch⁸² von pH 1.9

<i>Aminosäure</i>	<i>Quotient</i>
Lysin	1.4
Histidin	1.29
Arginin	1.27
Glycin	1.15
Alanin	1.00
Serin	0.84
Valin	0.82
Leucin	0.77
Isoleucin	0.77
Methionin	0.72
Glutaminsäure	0.69
Asparaginsäure	0.64
Tyrosin	0.55

erscheinungen stark behindert. Sie ist auf Zellulosepapier oft nur bei höheren pH-Werten (z.B. in 0.1 N Sodalösung) möglich⁸⁷. Der Nachweis erfolgt dann zweckmäßigerweise mit 1,4-Naphthochinonsulfonsaurem Natrium (Folins-Reagenz) an Stelle des sonst üblichen Ninhydrins.

Peptide

Die erste systematische Untersuchung von niedrigen Peptiden mittels HVE führten KICKHÖFEN UND WESTPHAL⁶³ durch. Bei Verwendung einer einfachen Apparatur mit

TABELLE VII
TRENNUNG VON PEPTIDEN

Wanderung zur Kathode in cm, 70 V/cm, 1.1 mA/cm Streifenbr. Ameisensäure-Essigsäuregemisch von pH 1.9, 60 min.

<i>Peptide</i>	<i>Wanderung cm</i>
Alanylglycin	22.8
Glutathion	5.6
Glutaminylglycin	18.3
Glycin	16.4
Glycylglycin	23.9
Glycylglycylglycin	21.4
Glycylleucin	19.7
Glycylleucylalanin	18.3
Glycylvalylalanin	18.8
Glycyltyrosin	16.5
Leucylglycin	19.4
Leucylglycylglycin	17.9
Leucyltyrosin	15.6

flüssigem Wärmeaustauscher konnten sie eine Anzahl Di- und Tripeptide auftrennen. (s.a. Tabelle VII)

Ähnliche Trennungen von synthetisch hergestellten Gemischen niedriger Peptide^{45, 133, 134} wurden seither wiederholt beschrieben und ebneten damit den Weg zur Trennung von partiellen Proteinhydrolysaten. Hier erwies sich die HVE oft als Methode der Wahl^{1, 108}. So verwendeten sie SANGER und Mit. bei der Festlegung der Schwefelbrücken des Insulins¹⁰² und bei der Untersuchung von Schweine- und Schafinsulin^{18, 50}. REDFIELD UND ANFINSEN benützten sie zur Zerlegung der beim enzymatischen Abbau von Ribonuklease erhaltenen Peptidgemische^{100, 101}. Diese Autoren beschrieben auch die Trennung von DNP-Peptiden mittels HVE. Um die bei diesen Verbindungen auftretenden Adsorptionserscheinungen zu bekämpfen und um die Löslichkeit zu erhöhen, empfehlen sie dem Puffer reichlich Harnstoff zuzusetzen. Bei den gewöhnlichen Peptiden ist jedoch von so einem Zusatz abzuraten, da die desorbierende Wirkung hier gering ist und die Ninhydrinreaktion gestört wird. TURBA UND ESSER¹²³ verfolgten den zeitlichen Einbau von ¹⁴C in Aminosäuren, Peptide und Proteine bei Zugabe von markiertem Acetat zu Torulahefe und trennten die dabei anfallenden, sehr komplexen Gemische mittels HVE und Papierchromatographie.

Auch zur Untersuchung höherer Peptide, wie sie in verschiedenen Proteohormonen vorliegen, konnte die HVE verwendet werden. So wurde mit ihrer Hilfe Choriongonadotropin aus Urin⁹¹, Oxytozin und Vasopressin aus Hypophysenextrakten^{87, 121}, sowie ein oxytozisch wirkendes Peptid aus partiell hydrolysiertem Serumeiweiss¹²⁴ isoliert.

Schon KICKHÖFEN UND WESTPHAL zeigten, dass sich die im Urin vorkommenden Peptide gut mittels HVE untersuchen lassen⁹³. HEILMEYER und Mit. bauten diese Methode aus und führten ausserordentlich umfangreiche Untersuchungen der im menschlichen Serum (Rest-Stickstoff) und anderen Körperflüssigkeiten vorhandenen Aminosäuren, Peptide und biogenen Amine durch^{51, 52}. Es ist hier nicht möglich auf diese Arbeiten und ihre klinischen Aspekte einzugehen, sie sollen einer Monographie dieser Autoren vorbehalten bleiben.

Proteine

Für die Trennung von Proteinen ist die HVE in der beschriebenen Form wenig geeignet. Nur in günstigen Fällen wurden Ergebnisse erhalten, die mit denen der normalen Niedervoltelektrophorese konkurrieren können^{81, 109, 118}. Ansonsten tritt besonders in halbfuchten Streifen meist ein Verschmieren und Verzerren der Bande ein. Gute Trennungen in Zellulosepapier sind nur dann zu erwarten, wenn dieses sehr nass (Trockengewicht:Puffer wie 1:2.0–2.5) zur Anwendung gelangt und gasförmige Wärmeaustauscher verwendet werden. Es ist allerdings in diesem Fall nicht leicht, eine ausreichende Kühlung zu erreichen. Von den bisher untersuchten Möglichkeiten (z.B. Abgabe der Wärme an gut leitende Gase wie Wasserstoff oder Helium⁷⁸, Abgabe durch Strahlung⁸⁴, Einhängen in eine stehende Nebelkammer^{55, 84}) ist es noch immer am einfachsten, eine Kühlung durch Verdunsten des Puffers, bzw. dessen

Lösungsmittel zu erreichen. Die dabei auftretenden Dochteffekte^{97,98} lassen sich durch eine entsprechende Form des Filtrierpapiere (Trapez- oder Kreisform^{13,84}) zu einer Verbesserung der Trennwirkung ausnützen. Die dabei erreichbaren Spannungsgefälle liegen um 20 V/cm.

Man kann auch auf die Verwendung von Zellulosepapier überhaupt verzichten und andere Stoffe oder Versuchsanordnungen zur Stabilisierung des Puffers heranziehen. Solche sind z.B. Kunststoffpapier¹¹⁰, Stärke oder ähnliche hydrophile Pulver^{84, 139}, Gele aus Stärke oder ähnlichem Material¹¹³ und geeignet geformte Elektrophoresekammern⁸⁵. In allen diesen Fällen ist ein Arbeiten mit Spannungsgefällen von 20–50 V/cm möglich, sofern man für eine wirksame Kühlung sorgt (Apparat mit festem Wärmeaustauscher) und die Versuchsanordnung möglichst flach baut⁸⁷. Erfahrungen liegen vor allem für das Arbeiten in dünnen Stärkeschichten vor, es konnten in ihnen Gemische empfindlicher Enzyme weitgehend zerlegt und untersucht werden (z.B.^{83, 141}). Als sehr erfolgreich erwies sich die von SMITHIES eingeführte Elektrophorese in konzentrierten Stärkegelen¹¹³. In diesen Gelen tritt neben der elektrophoretischen Auftrennung durch eine Art Ultrafiltration auch eine Fraktionierung nach der Teilchengröße ein. Unter diesen Versuchsbedingungen konnten menschliche^{113, 114, 111} und tierische Sera⁵ weiter als mit irgend einer anderen elektrophoretischen Methode zerlegt werden.

Biogene Amine

In Elektropherogrammen von biologischem Material findet man häufig zwischen den basischen Aminosäuren und der Kathode einige nur zart mit Ninhydrin angefärbte Bande. Es handelt sich hier meist um biogene Amine.

Ihr Vorkommen im Harn untersuchte eingehend WEBER¹³⁰ und später HONEGGER⁵⁶. Es wurden unter anderem Ammoniak, Methylamin, Dimethylamin, Äthylamin, Colamin, Pyrrolidin und Piperidin durch Papierionophorese in Citratpuffer von pH 3.8 und durch nachfolgende Papierchromatographie⁵⁶ getrennt. Eine Anzahl der von HEILMEYER und Mit.^{51, 52} im enteweißten Serum (Rest-Stickstoff) nachgewiesenen Amine konnte von GAYER⁴² identifiziert werden. Diese Amine wurden aus dem sehr komplexen Gemisch mit Natriumtetraphenylborat (Kalignost, Tetragnost) gefällt, der Niederschlag mit Salzsäure zersetzt und durch Ausschütteln mit Äther vom

TABELLE VIII⁴²

QUOTIENT DER WANDERUNGSWEGE DES AMINS/ARGININ

Pyridin–Essigsäure–Wasser–80% Ameisensäure wie 1 : 10 : 89 : 13,5; pH 2,3; Kühlung mit Heptan; etwa 60 V/cm.

<i>Amin</i>	<i>Quotient</i>	<i>Ninhydrinfarbe</i>
5-Hydroxytryptamin	0.65	blaugrau
Adrenalin	0.75	—
Tryptamin	0.87	blauviolett
Tyramin	0.97	blassviolett
Arginin	1.00	blauviolett
Histamin	1.66	violett

überschüssigen Reagenz getrennt; nach dem Einengen wurden sie mittels HVE untersucht. Die Tabelle VIII gibt über die Beweglichkeit einiger dieser Stoffe Auskunft. Dieses Verfahren eignete sich auch gut zum Nachweis biogener Amine in tierischen Giften⁸⁷.

Recht gut lassen sich auch mit der HVE eine Anzahl von Guanidinderivaten

TABELLE IX

TRENNUNG VON GUANIDINDERIVATEN⁷³

Wanderung zur Kathode in cm; 15 V/cm; 0.4 mA/cm Streifenbr.; Veronalpuffer pH 8.6; $\mu = 0.1$; 120 min; 10°. Anfärbung mit α -Naphthol-Diacetyl-Reagenz.

Guanidinderivat	Wanderung cm
Citrullin	3.2*
Glycocyamin	3.85
Creatin	4.00
γ -Guanidinobuttersäure	4.00
Arginin	8.05
Arcaïn	10.70
Dimethylguanidin	12.85
Agmatin	13.00
Methylguanidin	13.90
Guanidin	14.90

* Mit Ehrlichs Reagenz nachgewiesen.

trennen, die man dann spezifisch am Papier nachweisen kann. Einen Anhaltspunkt für die zu erwartende Wanderungsgeschwindigkeit gibt die Tabelle IX⁷³.

Kohlenhydrate und mehrwertige Alkohole

Die Fähigkeit von Kohlenhydraten und mehrwertigen Alkoholen mit Borsäure Komplexe zu bilden, ist seit langem bekannt (vergl. die zusammenfassenden Darstellungen von BÖSEKEN¹⁵ und ZITTLE¹⁴⁶). Erst seit Ende 1952 aber begann man diese Eigenschaft zur Trennung von Kohlenhydratgemischen mittels elektrophoretischer Methoden auszunützen^{25, 32, 48, 59, 82}. So konnte vom Verfasser gezeigt werden⁸², dass man mittels HVE in einer 0.08 molaren Boraxlösung eine Anzahl Zucker, mehrwertige Alkohole und Phenole trennen und Zusammenhänge zwischen Wanderungsgeschwindigkeit und Struktur erkennen kann. Diese Versuche wurden in der Folge bestätigt und erweitert. So untersuchten WERNER UND WESTPHAL^{133, 134, 135} Kohlenhydrate, die in Pyrogenen vorkommen; GROSS^{43, 44} beschäftigte sich u.a. mit Disacchariden und einem neuen Trisaccharid, der Kestose. Er trennte ferner ein Gemisch von Glykol, Glycerin, Erythrit, Sorbit, Mannit und Dulcit in einer 0.05 M Boraxlösung⁴⁰.

Quantitative Angaben über die Beweglichkeiten von Kohlenhydraten und mehrwertigen Alkoholen wurden mehrfach gemacht^{25, 48, 82, 117}. Die Verschiedenheit der Versuchsmethodik—vor allem in Hinblick auf den Puffergehalt des Filtrierpapiers und der Berücksichtigung des Dochteffektes—macht einen direkten Vergleich dieser Angaben nicht durchführbar. Das bei weitem umfangreichste Material stammt von FOSTER³²⁻³⁹ und die Tabelle X ist nach seinen Angaben zusammengestellt.

TABELLE X

QUOTIENT DER WANDERUNGSWEGE SUBSTANZ/GLUCOSE

Apparatur nach FOSTER³²; 15–22 V/cm^{34,9}; Boratpuffer etwa pH 10 (7.44 g Borsäure in 1 l N/10 Natronlauge—vom Autor manchmal irrtümlich als 0.2 M bezeichnet)³⁷.

Kohlenhydrat	Quotient	Literatur
Amylopectin	0.25 *	37
Amylose	0.18 **	37
1,4-Anhydro-D-dulcitol	0.47	35
1,5-Anhydro-2-desoxysorbit	0.20	39
1,6-Anhydro-β-D-glucopyranose	0.00	39
2,5-Anhydro-D-mannit	0.04	9
1,5-Anhydro-D-xylit	0.00	39
L-Arabinose	0.96	17
D-Arabit	0.90	17
Äthyl-2-desoxy-α-D-glucopyranosid	0.17	39
Äthyl-2,3-didesoxy-α-D-glucopyranosid	0.10	39
Äthyl-α-D-glucofuranosid	0.70	39
Äthyl-β-D-glucofuranosid	0.65	39
Äthyl-α-D-glucopyranosid	0.17	39
Cellobiose	0.28	34
1-Desoxy-D-arabinose	0.41	36
1-Desoxy-D-glucose	0.20	36
2-Desoxy-D-ribose	0.33	17
1,3-Dihydroxyacetone	0.78	17
2,3-Dimethyl-D-glucose	0.12	34
2,4-Dimethyl-D-glucose	0.05	34
3,4-Dimethyl-D-glucose	0.31	34
2,3-Dimethyl-L-rhamnose	0.023	32
2,4-Dimethyl-L-rhamnose	0.046	32
3,4-Dimethyl-L-rhamnose	0.36	32
Dulcitol (Galactitol)	0.98	17
meso-Erythrit	0.75	17
D-Fructose	0.90	17
L-Fucose	0.89	17
D-Galactose	0.93	17
L-Galaheptulose	0.89	17
Gentiobiose	0.75	34
	0.72	17
D-Glucose	1.00 ***	9, 17, 32–35, 37, 39
D-Glucose-1-phosphat	1.10	17
D-Glucuronsäure	1.20	17
DL-Glycerinaldehyd	0.79	17
Glycerin	0.44	17
D-Glycero-D-galaheptit	1.00	17
D-Glycero-D-mannoheptit	0.92	6
Glycogen	0.31 §	37
Lactose	0.38	34
Laminaribiose (3-(β-Glucosido)-glucose)	0.69	34
D-Lyxose	0.67	91
Maltose	0.36 §§	37
iso-Maltose	0.69	34
D-Mannit	0.90	17
D-Mannoheptulose	0.87	17
D-Mannose	0.72	17
Melezitose	0.22	17

(Fortsetzung S. 110)

* Scheinb. Ionenbeweglichkeit (Def. bei 130) $0.51-69 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ (Ref. 37).** Scheinb. Ionenbeweglichkeit $0.35-57 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ (Ref. 37).*** Scheinb. Ionenbeweglichkeit $2.26-2.74 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ (Ref. 37).§ Scheinb. Ionenbeweglichkeit $0.61-0.90 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ (Ref. 37).§§ Scheinb. Ionenbeweglichkeit $0.81-1.08 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ (Ref. 37).

TABELLE X (Fortsetzung)

Kohlenhydrat	Quotient	Literatur
Melibiose	0.80	34
Methyl- α -D-arabofuranosid	0.035	9
Methyl- α -L-arabofuranosid	0.035	9
Methyl- β -D-arabofuranosid	0.035	9
Methyl- α -D-arabopyranosid	0.40	36
Methyl- β -D-arabopyranosid	0.40	36
Methyl- α -D-fructofuranosid	0.60	35
Methyl- β -D-fructofuranosid	0.04	35
Methyl- α -D-fructopyranosid	0.71	35
Methyl- β -D-fructopyranosid	0.59	35
Methyl- α -D-galactofuranosid	0.41	35
Methyl- β -D-galactofuranosid	0.31	35
4-Methyl-D-galactose	0.27	34
Methyl- α -D-glucofuranosid	0.73	35, 39
Methyl- α -D-glucopyranosid	0.09	34
	0.11	39
Methyl- β -D-glucopyranosid	0.19	39
2-Methyl-D-glucose	0.23	34
3-Methyl-D-glucose	0.82	34
4-Methyl-D-glucose	0.24	34
6-Methyl-D-glucose	0.82	34
Methyl- β -D-gulopyranosid	0.72	35, 37
Methyl- α -D-lyxopyranosid	0.45	36
Methyl- β -D-lyxopyranosid	0.26	36
Methyl- α -D-mannopyranosid	0.42	35
Methyl- β -D-mannopyranosid	0.31	36
Methyl-(4-O-methyl)- β -D-glucopyranosid	0.00	39
Methyl- α -D-xylofuranosid	0.30	39
Methyl- β -D-xylofuranosid	0.30	39
Methyl- α -D-xylopyranosid	0.00	39
Methyl- β -D-xylopyranosid	0.00	39
<i>myo</i> -Inosit	0.53	17
Nigerose	0.69	17
1,2-O-Isopropyliden- α -D-glucofuranose	0.73	9, 35, 39
Raffinose	0.28	17
L-Rhamnose	0.52	17
D-Ribose	0.77	17
Saccharose	0.18	17
	0.17	39
α -Schardinger Dextrin	0.14	37
β -Schardinger Dextrin	0.12	37
Sophorose (2-(β -Glucosido)-D-glucose)	0.33	17
Sorbit (Glucitol)	0.89	17
α,α -Trehalose	0.19	17
α,β -Trehalose	0.23	39
β,β -Trehalose	0.20	39
2,3,4-Trimethyl-D-glucose	0.00	34
2,3,6-Trimethyl-D-glucose	0.00	34
3,5,6-Trimethyl-D-glucose	0.71	34
D-Xylose	1.00	17

Es wurden auch Betrachtungen über Zusammenhänge zwischen der Anordnung der Hydroxylgruppen und der Wanderungsgeschwindigkeit der Boratkomplexe angestellt^{6, 34, 82}. Am wirksamsten sind, wie man auch schon aus Leitfähigkeitsmessungen wusste^{15, 146}, *cis*-ständige OH-Gruppen am C₁ und C₂ der Zucker. Blockiert man die glykosidische Hydroxylgruppe etwa mit einer Methylgruppe, so zeigt dieses

Literatur S. 119/121.

Glykosid meist eine viel geringere Beweglichkeit, als der freie Zucker. Daneben sind aber auch, wie die merkliche Beweglichkeit des Methylgalaktosides zeigt, benachbarte alkoholische OH-Gruppen des Ringes wirksam. In einigen Fällen (Methylxylosid) muss man sogar eine Komplexbildung an nicht *cis*-ständigen Hydroxylgruppen oder wie bei dem Glukose-2-methyläther ("2-Methylglucose") eine Beteiligung von Aldehydstrukturen in Erwägung ziehen³¹.

Eine andere Möglichkeit, Kohlenhydrate zur Wanderung im elektrischen Feld zu bringen, besteht in einer geeigneten Substitution der Carbonylgruppe, was z.B. durch Verwendung von einer 0.4 M Natriumbisulfitlösung als Puffer⁴¹ oder durch die Umwandlung in die N-Benzylglycosylammonium Verbindung⁶ eintritt. Besonders im ersten Fall besteht ein deutlicher Zusammenhang zwischen der Wanderungsgeschwindigkeit und der Teilchengrösse⁴¹.

Eine Wanderung tritt auch bei einigen mehrwertigen Alkoholen in Bleiacetat oder Natriumarsenit enthaltenden Puffern auf⁴⁰.

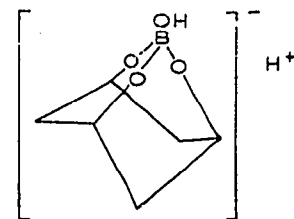
Cyclite

Zahlreiche mehrwertige cyclische Alkohole wandern in Boratpuffern mit unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten^{3, 33, 38}. Für das Zustandekommen der Komplexbildung mit Borsäure und damit der Wanderung im elektrischen Feld können zwei strukturelle Eigenschaften von Bedeutung sein³:

(1) *Cis*-ständige Hydroxylgruppen ("Böesekenkomplexe"¹⁵), das ist der häufigste und der nach den bisherigen Anschauungen zu erwartende Fall.

(2) "Tridentat-Komplexe" (s. nebenstehende Formel).

Die Bildung einer solchen Verbindung erfolgt in Sechseringen mit 1,3,5 ständigen Hydroxylgruppen in achsialer Stellung. Sie erklärt (s. Tabelle XI) unter anderem die Beweglichkeit des *cis*-Phloroglucites, des *scyllo*-Quercites und den nur geringen Verlust an Beweglichkeit bei in 2 und 4 O-methyliertem *myo*-Inosit.



Tridentat-Komplex des *cis*-Phloroglucites

Purine, Nucleoside und Nucleotide

Diese Stoffklasse wurde häufig mit papierelektrophoretischen Methoden untersucht, wobei aber meist nur verhältnismässig niedrige Spannungsgefälle zur Anwendung kamen^{19, 20, 60, 77, 112, 128, 132}, weitere Angaben in den Monographien^{14, 72, 78, 122, 143, 144}.

Bei hohen Spannungsgefällen trennten zuerst TURBA und Mit.¹²⁵ die drei Adenosinphosphorsäuren und einige Nucleoside in einem Pyridin-Essigsäurepuffer von pH 6.45. CRESTFIELD UND ALLEN untersuchten verschiedene Nucleotide in Phosphat und Boratpuffern; durch die verschiedenen Möglichkeiten der Komplexbildung mit Borsäure versuchten sie 3' und 5' phosphorylierte Verbindungen zu trennen²⁸.

Mittels HVE, spektralanalytischen Methoden und Farbreaktionen bestimmten MICHL UND HABERLER den Gehalt verschiedener Drogen an Purinen und methylierten Xanthinen⁸⁸. Adenin und Guanin liessen sich dabei leicht bei pH 3.6 trennen und mit einem Bromphenolblau-Reagenz⁸⁸ anfärben. Die Xanthinderivate trennte man bei pH 10.6 (s. Tabelle XII).

TABELLE XI⁸

QUOTIENT DER BEWEGLICHKEITEN DES CYCLITES/GLUCOSE
Apparatur nach FOSTER³²; etwa 20 V/cm; 0.012 M Boraxlösung.

<i>Cyclit</i>	<i>Stellung der OH-Gruppen</i>	<i>Quotient</i>
Inosite:		
<i>scyllo</i> -Inosit	(1:3:5/2:4:6)	0.02
(+)-Inosit	(1:2:4/3:5:6)	0.28
<i>neo</i> -Inosit	(1:2:3/4:5:6)	0.30
<i>myo</i> -Inosit	(1:2:3:5/4:6)	0.30
<i>muco</i> -Inosit	(1:2:4:5/3:6)	0.87
<i>allo</i> -Inosit	(1:2:3:4/5:6)	0.54
<i>epi</i> -Inosit	(1:2:3:4:5/6)	1.50
<i>cis</i> -Inosit	(alle <i>cis</i>)	1.60
Quercite:		
<i>scyllo</i> -Quercit	(1:3:5/4:6)	0.05
<i>proto</i> -Quercit	(1:3:4/2:5)	0.05
<i>vibo</i> -Quercit	(1:2:4/3:5)	0.07
<i>epi</i> -Quercit	(1:2:3:5/4)	1.17
<i>cis</i> -Quercit	(alle <i>cis</i>)	1.60
Methyläther des Inosites:		
1-Methyl- <i>myo</i> -inosit (Bornesit)		0.02
2-Methyl- <i>myo</i> -inosit		0.29
4-Methyl- <i>myo</i> -inosit (Ononit)		0.45
5-Methyl- <i>myo</i> -inosit (Sequoyit)		0.05
2-Methyl(—)-inosit (Quebrachit)		0.14
3-Methyl(+)-inosit (Pinit)		0.23
1:3-Dimethyl- <i>myo</i> -inosit (Dambonit)		0.00
Cyclohexantrirole:		
1:3/2 Cyclohexantriol		0.00
1:2/3 Cyclohexantriol		0.08
<i>cis</i> -1:2:3-Cyclohexantriol		0.05
<i>cis</i> -1:3:5-Cyclohexantriol (Phloroglucit)		0.11
Cyclohexandiole:		
<i>trans</i> -1:2-Cyclohexandiol		0.00
<i>cis</i> -1:2-Cyclohexandiol		0.01
<i>trans</i> -1:3-Cyclohexandiol		0.00
<i>cis</i> -1:3-Cyclohexandiol		0.00

TABELLE XII⁸⁸

QUOTIENT DER WANDERUNGSWEGE DER SUBSTANZ/XANTHIN
In 1 N NH₃; 1 N Essigsäure etwa 20:1; pH 10.6; 40 V/cm.

<i>Substanz</i>	<i>Quotient</i>
Coffein	0.00
Theobromin	0.44
Hypoxanthin	0.83
Xanthin	1.00
Theophyllin	1.14

TABELLE XIII¹²⁸

QUOTIENT DER WANDERUNGSWEGE DES NUCLEOTIDES/ORTHOPHOSPHAT

1 l Puffer enthält 92 ml Buttersäure (etwa 1 N) und 1 g NaOH (0.025 N), pH etwa 6.4; 10 V/cm.

<i>Nucleotid</i>	<i>Quotient</i>
Adenosin-2'-phosphat	0.23
Adenosin-3'-phosphat	0.23
Adenosin-5'-phosphat	0.21
Adenosin-5'-diphosphat	0.58
Adenosin-5'-triphosphat	0.86
Cytidin-2'-phosphat	0.13
Cytidin-3'-phosphat	0.13
Dihydrodiphosphopyridinnucleotid	0.48
Diphosphopyridinnucleotid	0.13
Flavin-Adenin-Dinucleotid	0.36
Flavinmononucleotid	0.36
Guanosin-2'-phosphat	0.42
Guanosin-3'-phosphat	0.42
Orthophosphat Ionen	1.00
Uridin-2'-phosphat	0.55
Uridin-3'-phosphat	0.55
Uridin-5'-phosphat	0.55

TABELLE XIV¹⁰

SCHEINBARE IONENBEWEGLICHKEIT VON ORGANISCHEN SÄUREN

In cm² V⁻¹ sec⁻¹ (Def. bei ¹⁹⁰) in verdünnter Ameisensäure pH 2.0; Apparatur nach Ref.¹⁰.

<i>Säure</i>	<i>K · 10⁴</i>	<i>Scheinbare Ionenbeweglichkeit</i>
Pikrinsäure	3810	6.1
Oxalsäure	650	9.0
Dichloressigsäure	330	6.5
Maleinsäure	120	6.7
Brenztraubensäure	30	3.7
Monochloressigsäure	15	2.9
Aconitsäure	15	2.4
Fumarsäure	10	2.2
Weinsäure	9.8	2.3
Citronensäure	8.3	1.9
Sulfanilsäure	6.2	1.6
Äpfelsäure	3.8	1.4
Glycerinsäure	2.3	1.2
Glykolsäure	1.5	0.7
Itaconsäure	1.5	0.7
Milchsäure	1.4	0.7
Bernsteinsäure	0.64	0.2
Glutarsäure	0.47	0.1
Adipinsäure	0.33	0.1
Valeriansäure	0.16	0.05

In der Literatur und in den oben angegebenen Referaten finden sich weitere quantitative Angaben über die Wanderungsgeschwindigkeiten verschiedener hierher gehörender Verbindungen, die bei der HVE eine schnelle Orientierung gestatten. Nur bei Verbindungen, die leichter von Filtrierpapier adsorbiert werden, etwa Guanidin-derivaten, ist manchmal die Wanderungsgeschwindigkeit herabgesetzt. Auch die in der Tabelle XIII angegebenen Werte von WADE UND MORGAN¹²⁸ liessen sich unter den Bedingungen der HVE reproduzieren.

Organische Säuren

Wasserlösliche organische Säuren lassen sich, soferne nur ihre Dissoziationskonstanten

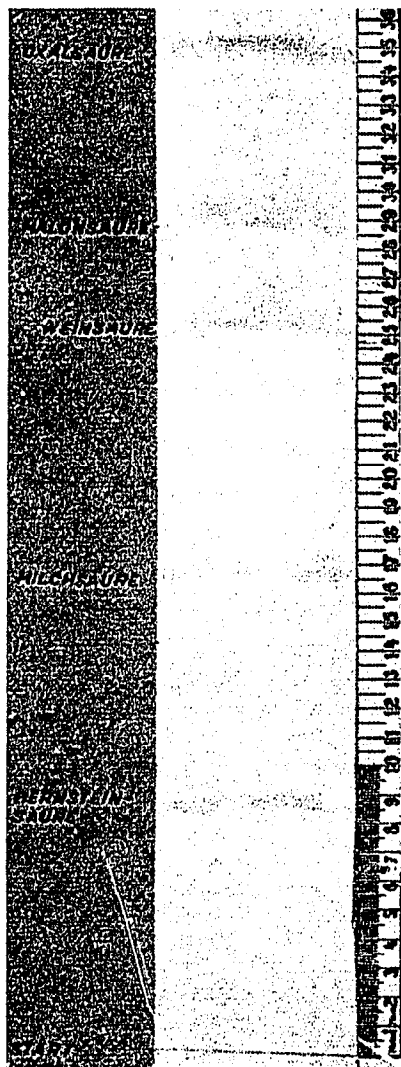


Fig. 7.

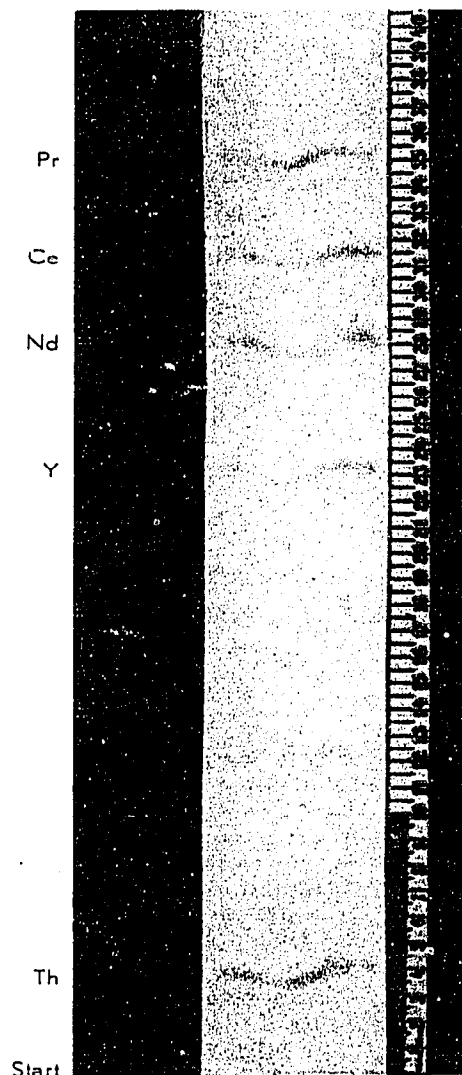


Fig. 8.

Fig. 7. Apparat nach Fig. 3; 40.3 V/cm, 2.3 mA/cm Streifenbreite; 90 min; 10°. Lösungsmittel: 1.5 ml Pyridin, 5.5 ml Eisessig, 15 ml Aceton auf 100 ml mit Wasser aufgefüllt (pH 4.1). Anfärbung: 10 mg Glucose, 5 mg Arabinose in 3 ml Äthanol lösen und mit 0.5 ml Anilin und 3 ml Butanol versetzen; nach Besprühen auf 140° erhitzen⁸⁷.

Fig. 8. Apparat nach Fig. 3; 46 V/cm, 1.1 mA/cm Streifenbreite; 90 min; 10°. Lösungsmittel: 15 ml Aceton auf 100 ml mit 0.1 N Milchsäure aufgefüllt. Anfärbung: 0.2% Brenzkatechinviolett in 2 N Ammoniak, nach Besprühen Überschuss mit dest. Wasser auswachen⁸⁷.

genügend verschieden sind, gut elektrophoretisch trennen^{70, 138}. Besonders Gemische von schwer oder nicht flüchtigen Oxy- und Dicarbonsäuren sind leicht zu untersuchen. Für stärkere Säuren wurden als Lösungsmittel verdünnte Ameisensäure (etwa 0.55 N; pH 2.0¹⁰), für schwächere Pyridin-Essigsäure (pH 4.1)⁸⁷ verwendet. Der Nachweis kann dann nach dem Abdunsten des Puffers leicht mittels Indikatoren oder anderen in der Papierchromatographie üblichen Methoden erfolgen. Haltbare Anfärbungen (s. Fig. 7) bekamen wir mit einer Art umgekehrten Zuckernachweis⁸⁷. Tabelle XIV und Fig. 7 zeigen einige Beispiele.

Weitere Untersuchungen vor allem mit den in biologischen Materialien häufig vorkommenden Säuren stellte GROSS⁴⁷ an. Eine Trennung höherer Fettsäuren in 2 N NH₃, wie sie BARNETT UND SMITH beschrieben haben⁷, ist mittels HVE wegen zu starker Adsorptionserscheinungen in Filtrierpapier nicht gelungen. Die Auftrennung

TABELLE XV⁷⁵

ALKALOIDE, WANDERUNG ZUR KATHODE IN CM

LKB-Apparat, 8 V/cm, Whatman No. 1 Papier, Versuchsdauer 180 min. Universalpuffer nach BRITTON UND ROBINSON, 1:4 verdünnt⁶⁹. Nachweis: UV-Licht, Dragendorffs Reagenz, K-Jodoplatinat.

Verbindungen	pH 6.4	pH 10.5
Arecolin	13.6	2.8
Aspidospermin	8.7	0
Atropin (DL-Hyoscyamin)	10.7	8.0
Berberin	2.0	1.05
Bicucullin	6.2	0
Boldin	3.0	0
Brucin	6.9	2.1
Bulbocapnin	3.3	0.6
Calebassin	8.0	7.8
Chelidonin	5.8	0
Chinin	7.6	2.5
Cinchonin	8.0	3.0
Cinchonidin	9.3	3.2
Cocain	11.0	5.3
Colchicin	2.1	1.7
Coniin	13.0	10.0
Corlumin	5.9	0
Corydin	7.1	1.4
Curarin	11.0	—
N-Dichlormethyl-dimethylberberin	10.4	7.8
Dimethyltubocurarin	9.9	8.7
Emetin	8.5	—
Ephedrin	10.0	10.6
Ergometrin	3.8	1.3
Eserin	10.5	—
Fluorocurin	8.0	8.0
Galegin	11.8	10.8
Glaucin	3.8	0.3
Harmin	2.6	0
Heroin	9.5	2.85
Homatropin(Mandelsäuretripylester)	10.4	10.0
L-Hyoscyamin	10.3	6.9
Hydrastin	6.1	0
Hydrastinin	13.2	11.3

(Fortsetzung S. 116)

TABELLE XV (Fortsetzung)

Verbindungen	pH 6.4	pH 10.5
Jervin	5.3	0
Kotarnin	12.5	10.8
Lupanin	10.6	8.7
Lupinin	12.1	10.5
Mezcalin	10.2	8.2
Morphin	10.0	2.85
Narcein	2.6	1.65
Narcotin	5.4	0
Nicotin	12.3	4.5
Papaverin	3.0	0
Pilocarpin	10.6	1.95
Piperin	0.4	0
Protopin	7.7	3.9
Protoveratrin	6.5	—
Sanguinarin	1.1	0.0
Scopolamin	10.4	3.3
Sempervirin	0.5	0.0
Sparteïn	10.8	9.9
Strychnin	8.5	0.0
Tetrahydropalmatin	4.1	0.0
Tropacocain(Benzoessäurepseudotropylester)	10.2	8.8
Tropin	14.5	0.0
Tubocurarin	8.4	4.7
Veratrin	6.2	1.4
Yohimbin	6.8	1.0

von Huminsäuregemischen, die sonst recht schwierig ist, gelang SCHEFFER *et al.* mittels HVE und Kühlung mit Chlorbenzol¹⁰⁶.

Alkaloide

Auch Alkaloide, sofern sie genügend wasserlöslich sind, lassen sich gut papier-elektrophoretisch untersuchen. Es liegen auch zahlreiche Untersuchungen (s. in den Monographien^{14, 72, 78, 143, 144}) vor, die aber meist bei niedrigen Spannungsgefällen durchgeführt worden sind. Von diesen Arbeiten soll nur eine von MARINI-BETTOLO^{75, 76} angeführt werden, weil dort eine grössere Anzahl von Alkaloiden unter den gleichen Versuchsbedingungen und bei verschiedenen pH-Werten untersucht wurden. Einen Ausschnitt davon gibt die Tabelle XV.

Mittels Hochvoltelektrophorese wurde von KUHN UND MICHL eine systematische Untersuchung der Tabakalkaloide durchgeführt, die dabei gefundenen Wanderungsgeschwindigkeiten zeigt die Tabelle XVI.

Aus diesen Zahlen lassen sich gewisse Zusammenhänge zwischen der elektrischen Wanderungsgeschwindigkeit und der chemischen Konstitution erkennen. So wandern Verbindungen, bei denen ein N-Atom sekundär gebunden ist (Nor-Verbindungen) schneller, als die entsprechende Verbindung mit einem dreifach substituiertem N-Atom: Nornikotin ist schneller als Nikotin, Anabasin geschwinder als N-Methylanabasin und so fort. Ferner wandern auch die mit einer aliphatischen Seitenkette versehenen Verbindungen Metanikotin und N-Methylmetanikotin schneller als die entsprechenden cyclischen Derivate. Tabakalkaloide mit Doppelbindungen im zweiten

TABELLE XVI⁰⁰
SCHEINBARE IONENBEWEGLICHKEIT

Alkaloid	Scheinbare Ionenbeweglichkeit (Def. ¹⁰⁰) in $\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{sec}^{-1}$ bei 10°	
	pH 5.0 K-Biphthalat Puffer ⁴	pH 5.2 0.025 M Benzylösung
Metanikotin	12.7	7.7
Methyl-metanikotin	12.5	7.0
Nornikotin	12.2	7.0
Anabasin	10.7	6.1
Nikotin	12.1	2.5
Anatabin	10.5	2.3
N-Methylanabasin	10.1	0.8
N-Methylanatabin	10.0	0.8
Myosmin	8.0	0.8
Oxynikotin	3.9	0.7
Nikoton	3.4	0.7
Nikotyryl	3.2	0
Nornikotyryl	1.5	— 0.7

Ring—der erste ist ja hier auf alle Fälle ein Pyridinring—zeigen eine geringere Beweglichkeit, als solche mit gesättigten Systemen, so ist etwa Anatabin (Piperiden-Ring) langsamer als Anabasin (Piperidin-Ring).

Das abweichende Verhalten von Nikotyryl und Nornikotyryl ist durch Adsorptionserscheinungen bedingt. Unterwirft man sie nämlich mit dem zur HVE verwendeten Puffern einer Papierchromatographie, so findet man R_F Werte von 0.66 (Nikotyryl) bzw. 0.37 (Nornikotyryl) gegen etwa 0.9 der anderen Stoffe; es scheint daher verständlich, dass ihre Wanderungsgeschwindigkeit entsprechend kleiner sein wird. Diese Erscheinung ist übrigens auch bei anderen Alkaloiden relativ häufig anzutreffen. So wanderte bei einer Untersuchung von Suchtmitteln¹⁰⁴ Cocain zwischen Codein und Morphin, während man auf Grund der Dissoziationskonstanten eine schnellere Wanderung erwarten sollte.

Anorganische Ionen

Über die Untersuchung anorganischer Stoffe mittels HVE liegen nur vereinzelte Mitteilungen vor. Der Verfasser⁷⁹ trennte seinerzeit Cu^{+2} von Cd^{+2} , wobei das Cu^{+2} -Ion wider Erwarten langsamer als das Cd^{+2} -Ion wanderte. WERNER UND WESTPHAL erhielten verschiedene Wanderungsgeschwindigkeiten für Fe^{+2} , Co^{+2} , Cd^{+2} , Pb^{+2} , Cu^{+2} und Fe^{+3} in einem Ameisensäure-Essigsäuregemisch¹³⁴. SCHIER konnte ein Gemenge von Li^+ , Na^+ - und K^+ -Ionen zerlegen und die einzelnen Ionen quantitativ bestimmen¹⁰⁷. WIELAND UND PFLEIDERER untersuchten eine Anzahl von Derivaten der Phosphorsäure¹⁴¹.

Die meisten der zahlreichen, bei niederen Spannungsgefällen durchgeführten Untersuchungen (vergl. Monographien, besonders die von LEDERER⁷²) lassen sich auch mit der HVE machen, wobei die Trennwirkung oft beträchtlich gesteigert werden kann. Ein Gemisch einiger seltener Erden konnte z.B. mühelos nach den in der Literatur^{70, 71, 105} beschriebenen Verfahren aufgetrennt werden (Fig. 8).

Es wurde auch versucht, Isotope mit diesem Verfahren zu trennen⁵⁸. BONNIN *et al.*¹⁶ gelang auf diese Weise eine teilweise Entmischung von ²³Na und ²⁴Na.

AUSBLICK

Wie schon mehrfach betont worden ist, beschränkt sich der Anwendungsbereich der HVE keineswegs nur auf die hier besprochenen Substanzklassen; ihre Einführung dürfte bei den meisten der bisher papierelektrophoretisch untersuchten niedermolekularen Stoffen eine Verbesserung und Beschleunigung der Auftrennung mit sich bringen.

Recht angenehm ist es dabei, dass man bei Stoffen deren Dissoziationskonstanten bekannt sind, die Wanderungsgeschwindigkeit im Vorhinein abschätzen kann. Umgekehrt ist es aber auch ohne weiteres möglich, unbekannte Dissoziationskonstanten durch Vergleich mit bekannten Stoffen ungefähr zu bestimmen, wozu man nur sehr wenig Substanz benötigt. Man kann auch die Dissoziationskonstante eines zunächst nicht identifizierten Stoffes schätzen und dann dazu passende Substanzen—die Substanzklasse ist ja aus der angewendeten Farbreaktion bekannt—in Tabellenwerken suchen. Es konnten zum Beispiel nach dieser Methode im hiesigen Institut wiederholt organische Säuren, wie sie beim Abbau von Naturstoffen mit Kaliumpermanganat entstehen, erkannt werden⁸⁷.

Im übrigen gestattet schon die Wanderungsrichtung bei unbekanntem organischen Stoffen Rückschlüsse auf das Vorhandensein oder Fehlen von Carboxyl- oder Aminogruppen. Benachbarte Hydroxylgruppen lassen sich durch ihre Reaktion mit Borat erkennen⁵⁹ und Carbonylgruppen in manchen Fällen durch die Wanderung in bisulfithaltigen Puffern.

Die HVE wurde auch schon oft bei organisch synthetischen Arbeiten eingesetzt. So treten beispielsweise bei der Synthese von Tosylargininmethylester aus Arginin vier Reaktionsprodukte auf und zwar Arginin, Argininmethylester, Tosylarginin und Tosylargininmethylester; KICKHÖFEN⁶⁴ trennte diese vier Substanzen innerhalb von 50 min bei pH 7.3 und 60 V/cm. In einem anderen Fall methylierte er Histidin mit Methyljodid in flüssigem Ammoniak; die drei im Reaktionsgemisch vorhandenen Produkte 1-Methylhistidin, 3-Methylhistidin und Ausgangsmaterial konnten in 2 1/2 Stunden getrennt werden⁶⁴. Bei der Kolbeschen Synthese mit β -Naphthol entsteht u.a. ein Gemisch von β -Naphthol-1-carbonsäure und β -Naphthol-3-carbonsäure, das, wie WIELAND UND PFLEIDERER zeigten¹⁴¹, innerhalb von 3 Stunden zerlegt werden konnte. Die gleichen Autoren analysierten mittels HVE auch die bei der Nitrierung von Phenolen anfallenden Produkte¹⁴¹ und mehrere andere bei Synthesen von organischen Verbindungen anfallende Stoffgemische.

Bisher wurden bei solchen Versuchen hauptsächlich wässrige Pufferlösungen verwendet. Durch die Anwendung wasserarmer oder nichtwässriger Lösungsmittel lassen sich aber viele bisher noch nicht erfasste Stoffgruppen untersuchen, doch das muss weiterer Arbeit vorbehalten bleiben.

LITERATUR

- 1 C. B. ANFENSEN UND R. R. REDFIELD, *Advances in Protein Chem.*, 11 (1956) 1.
- 2 C. B. ANFENSEN, M. SELA UND H. TRITCH, *Arch. Biochem. Biophys.*, 65 (1956) 156.
- 3 S. J. ANGYAL UND D. J. MCHUGH, *J. Chem. Soc.*, (1957) 1423.
- 4 J. D'ANS UND E. LAX, *Taschenbuch für Chemiker und Physiker*, J. Springer, Berlin, 1943.
- 5 G. C. ASHTON, *Nature*, 179 (1957) 824.
- 6 S. A. BARKER, E. J. BOURNE, P. M. GRANT UND M. STACEY, *Nature*, 177 (1956) 1125; 178 (1956) 1221.
- 7 A. J. G. BARNETT UND D. K. SMITH, *Nature*, 174 (1954) 659.
- 8 J. BARROLLIER, *Naturwissenschaften*, 42 (1955) 486.
- 9 B. C. BERA, A. B. FOSTER UND M. STACEY, *J. Chem. Soc.*, (1956) 4531.
- 10 H. BERBALK, *Monatsh. Chem.*, 85 (1954) 1314;
H. BERBALK UND O. SCHIER, *Monatsh. Chem.*, 86 (1955) 146.
- 11 E. W. BERMES, JR. UND H. J. McDONALD, *Biochim. Biophys. Acta*, 20 (1956) 416.
- 12 G. BERRAZ, *Anales assoc. quim. arg.*, 31 (1942) 96.
- 13 S. BERLINGOZZI, G. RAPI UND A. MAZZA, *Chim. e ind. (Milano)*, 37 (1955) 351; 38 (1956) 87.
- 14 R. J. BLOCK, E. L. DURRUM UND G. ZWEIG, *A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis*, Academic Press, Inc., New York, 1955.
- 15 J. BÖESEKEN, *Advances in Carbohydrate Chem.*, 4 (1949) 189.
- 16 A. BONNIN, M. CHEMLA UND P. SÜE, *Compt. rend.*, 241 (1955) 40.
- 17 E. J. BOURNE, A. B. FOSTER UND P. M. GRANT, *J. Chem. Soc.*, (1956) 4311.
- 18 H. BROWN, F. SANGER UND R. KITAI, *Biochem. J.*, 60 (1955) 556.
- 19 D. C. BURKE, *Chem. & Ind. (London)*, (1954) 1510.
- 20 D. C. BURKE UND A. B. FOSTER, *Chem. & Ind. (London)*, (1955) 94.
- 21 M. CHEMLA UND A. BONNIN, *Compt. rend.*, 241 (1955) 1288.
- 22 *Ciba Foundation Symposium on Paper Electrophoresis*, hrg. v. G. E. W. WOLSTENHOLME UND E. C. P. MILLAR, London, 1956.
- 23 R. CONSDEN, A. H. GORDON UND A. J. P. MARTIN, *Biochem. J.*, 40 (1946) 33.
- 24 R. CONSDEN, A. H. GORDON, A. J. P. MARTIN UND R. L. M. SYNGE, *Biochem. J.*, 41 (1947) 596.
- 25 R. CONSDEN UND W. M. STANIER, *Nature*, 169 (1952) 783.
- 26 H. D. CREMER UND A. TISELIUS, *Biochem. Z.*, 320 (1950) 273.
- 27 A. M. CRESTFIELD UND F. W. ALLEN, *Anal. Chem.*, 27 (1955) 422.
- 28 A. M. CRESTFIELD UND F. W. ALLEN, *Anal. Chem.*, 27 (1955) 424.
- 29 E. L. DURRUM, *J. Colloid. Sci.*, 6 (1951) 274.
- 30 E. L. DURRUM UND M. H. PAUL, *J. Am. Chem. Soc.*, 74 (1952) 4721.
- 31 J. E. EDSTRÖM, *Biochim. Biophys. Acta*, 22 (1956) 378.
- 32 A. B. FOSTER, *Chem. & Ind. (London)*, (1952) 828, 1050.
- 33 A. B. FOSTER, *Chem. & Ind. (London)*, (1953) 591.
- 34 A. B. FOSTER, *J. Chem. Soc.*, (1953) 982.
- 35 A. B. FOSTER, *J. Chem. Soc.*, (1957) 1395.
- 36 A. B. FOSTER, E. F. MARBLE UND M. STACEY, *Chem. & Ind. (London)*, (1953) 825.
- 37 A. B. FOSTER, P. A. NEWTON-HEARN UND M. STACEY, *J. Chem. Soc.*, (1956) 30.
- 38 A. B. FOSTER UND M. STACEY, *Chem. & Ind. (London)*, (1953) 279.
- 39 A. B. FOSTER UND M. STACEY, *J. Chem. Soc.*, (1955) 1778.
- 40 J. L. FRAHN UND J. A. MILLS, *Chem. & Ind. (London)*, (1956) 578.
- 41 J. L. FRAHN UND J. A. MILLS, *Chem. & Ind. (London)*, (1956) 1137.
- 42 J. GAYER, *Biochem. Z.*, 328 (1956) 39.
- 43 D. GROSS, *Nature*, 172 (1953) 908.
- 44 D. GROSS, *Nature*, 173 (1954) 487.
- 45 D. GROSS, *Nature*, 176 (1955) 72.
- 46 D. GROSS, *Nature*, 176 (1955) 362; *Chem. & Ind. (London)*, (1956) 931.
- 47 D. GROSS, *Nature*, 178 (1956) 29.
- 48 Y. HASHIMOTO, I. MORI UND M. KIMURA, *Nature*, 170 (1952) 975.
- 49 Y. HASHIMOTO, *Experientia*, 9 (1953) 194.
- 50 J. I. HARRIS, F. SANGER UND M. A. NAUGHTON, *Arch. Biochem. Biophys.*, 65 (1956) 156.
- 51 L. HEILMEYER, R. CLOTTEN, I. SANO, A. STURM, JR. UND A. LIPP, *Klin. Wochschr.*, 32 (1954) 831.
- 52 L. HEILMEYER, *Vorträge aus dem Gebiet der klinischen Chemie und Cardilogie*, Stuttgart, 1956, S. 56.
- 53 D. HENSCHLER, *Z. physiol. Chem.*, 305 (1956) 34.
- 54 C. W. H. HIRS, S. MOORE UND W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.*, 195 (1952) 669.
- 55 C. V. HOLT, K. D. VOIGT UND K. GAEDE, *Biochem. Z.*, 323 (1952) 345.
- 56 C. G. HONEGGER, *Helv. Chim. Acta*, 39 (1956) 1671; 40 (1957) 846.
- 57 National Research Council, *International Critical Tables of Numerical Data*, Bd. 3, McGraw-Hill Book Co., Inc., New York, 1928.

- 58 J. V. IRIBARNE, *Chemia (Buenos Aires)*, 16 (1955) 41.
59 L. JAENICKE, *Naturwissenschaften*, 39 (1952) 86.
60 A. S. JONES, D. S. LETHAM UND M. STACEY, *J. Chem. Soc.*, (1956) 2579.
61 R. KELLER UND J. GICKLHORN, in E. ABDERHALDEN, *Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden*, Abt. V/2, 1928, S. 1206.
62 B. KICKHÖFEN UND O. WESTPHAL, *Z. Naturforsch.*, 7b (1952) 655.
63 B. KICKHÖFEN UND O. WESTPHAL, *Z. Naturforsch.*, 7b (1952) 659.
64 B. KICKHÖFEN, *Ciba Foundation Symposium on Paper Electrophoresis*, 1956, S. 206.
65 D. VON KLOBUSITZKY UND P. KÖNIG, *Arch. expl. Pathol. Pharmacol.*, Naunyn-Schmiedeberg's, 192 (1939) 271.
66 P. KÖNIG, *Actas III. Congr. sudam. quim.*, 2 (1937) 334.
67 LANDOLT-BÖRNSTEIN, *Physikalisch-chemische Tabellen*, 5. Aufl., Erg. Werk II/2, Springer, Berlin, 1931.
68 G. LANGE, *Biochem. Z.*, 326 (1955) 172.
69 M. LEDERER, *Anal. Chim. Acta*, 6 (1952) 521.
70 M. LEDERER, *Compt. rend.*, 236 (1953) 200.
71 M. LEDERER, *Anal. Chim. Acta*, 11 (1954) 145.
72 M. LEDERER, *An Introduction to Paper Electrophoresis*, Elsevier, Amsterdam, London, New York, Princeton, 1957.
73 S. LISSITZKY, I. GARCIA UND J. ROCHE, *Experientia*, 10 (1954) 379.
74 W. MACH UND R. GEFFERT, *Arzneimittel-Forsch.*, 3 (1953) 534.
75 G. B. MARINI-BETTOLO UND J. A. COCH-FRUGONI, *Gazz. chim. ital.*, 86 (1956) 1324.
76 G. B. MARINI-BETTOLO UND M. LEDERER, *Nature*, 174 (1954) 133; G. B. MARINI-BETTOLO, M. LEDERER, M. A. IORIO UND A. PIMENTA, *Rend. ist. super. sanità*, 18 (1955) 898.
77 R. MARKHAM UND J. D. SMITH, *Biochem. J.*, 52 (1952) 552, 558.
78 H. J. McDONALD, *Ionography*, Year Book Pubs., Chicago, 1955.
79 H. MICHL, *Monatsh. Chem.*, 82 (1951) 489.
80 H. MICHL, *Monatsh. Chem.*, 82 (1951) 944.
81 H. MICHL, *Monatsh. Chem.*, 83 (1952) 210.
82 H. MICHL, *Monatsh. Chem.*, 83 (1952) 737.
83 H. MICHL, *Monatsh. Chem.*, 85 (1954) 1240.
84 H. MICHL, *Monatsh. Chem.*, 85 (1955) 1251.
85 H. MICHL, *Chem. Ingr. Tech.*, 27 (1955) 624.
86 H. MICHL, *Mikrochim. Acta*, (1956) 54.
87 H. MICHL, unveröffentlichte Versuche.
88 H. MICHL UND F. HABERLER, *Monatsh. Chem.*, 85 (1954) 779;
H. MICHL UND H. KUHN, *Fachliche Mitt. Österr. Tabakregie*, (1954) 14.
89 H. MICHL UND H. KUHN, *Fachliche Mitt. Österr. Tabakregie*, (1954) 10.
90 H. MICHL, H. KUHN UND H. BÜHN, *Fachliche Mitt. Österr. Tabakregie*, (1956) 1.
91 H. MICHL, K. RIEDL UND F. WESSELY, *Monatsh. Chem.*, 82 (1951) 539.
92 G. G. NEWTON UND E. P. ABRAHAM, *Biochem. J.*, 58 (1954) 103.
93 H. G. NÖLLER, *Klin. Wochschr.*, 32 (1954) 988.
94 F. OEHME UND I. RAUSCHENBACH, *Chem. Tech. (Berlin)*, 8 (1955) 1.
95 PHYWE A. G., *D.P.* 718,617 vom 3.12.1954.
96 J. PORATH, *Nature*, 175 (1955) 478; *Biochim. Biophys. Acta*, 22 (1956) 151.
97 Z. PUCAR, *Arhiv kem.*, 25 (1953) 205.
98 Z. PUCAR, *Arhiv kem.*, 26 (1954) 29, 41.
99 H. M. RAUEN, *Biochemisches Taschenbuch*, Springer Verl., Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1956.
100 R. R. REDFIELD UND C. B. ANFINSEN, *J. Biol. Chem.*, 221 (1956) 385.
101 A. P. RYLE UND C. B. ANFINSEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 24 (1957) 633.
102 A. P. RYLE, F. SANGER, L. F. SMITH UND R. KITAI, *Biochem. J.*, 60 (1955) 541.
103 H. SAECHTLING UND W. ZEBROWSKI, *Kunststoff-Taschenbuch*, 12. Aufl., Carl Hanser, München, 1956.
104 I. SANO UND H. KAJITA, *Klin. Wochenschr.*, 33 (1955) 956.
105 T. R. SATO, H. DIAMOND, W. P. NORRIS UND H. H. STRAIN, *J. Am. Chem. Soc.*, 74 (1952) 6154.
106 F. SCHEFFER, W. ZIECHMANN, H. D. BECKER UND H. SCHLÜTER, *Naturwissenschaften*, 42 (1955) 71; *Z. Pflanzenernähr., Düng. u. Bodenk.*, 70 (1955) 260.
107 O. SCHIER, *Angew. Chem.*, 68 (1956) 63.
108 L. SCHMID, H. MICHL UND G. ZWETTLER, *Monatsh. Chem.*, 82 (1951) 526.
109 G. SCHNEIDER UND G. SPARMANN, *Naturwissenschaften*, 42 (1955) 156, 391.
110 E. SCHUMACHER, *Helv. Chim. Acta*, 40 (1957) 221;
E. SCHUMACHER UND H. J. STREIFF, *Helv. Chim. Acta*, 40 (1957) 228, 234.
111 H. J. SILBERMAN, *Biochim. Biophys. Acta*, 24 (1957) 647.
112 J. D. SMITH UND R. MARKHAM, *Biochim. Biophys. Acta*, 8 (1952) 350.

- 113 O. SMITHIES, *Nature*, 175 (1955) 307; *Biochem. J.*, 61 (1955) 629.
114 O. SMITHIES UND M. D. POULIK, *Nature*, 177 (1956) 1033.
115 G. A. SPENGLER UND M. KNEDEL, *Klin. Wochschr.*, 34 (1956) 389.
116 H. STEGEMANN, *Naturwissenschaften*, 43 (1956) 518.
117 M. STEINER UND E. MAAS, *Naturwissenschaften*, 44 (1957) 90.
118 H. STERZ UND W. KLEMENTSCHITZ, *Wiener klin. Wochschr.*, 64 (1952) 103.
119 H. SVENSSON, *Arkiv Kemi, Mineral. Geol.*, A 22, No. 10 (1946).
120 H. THIES UND G. KALLINICH, *Biochem. Z.*, 324 (1953) 485.
121 H. TUPPY UND H. MICHL, *Monatsh. Chem.*, 84 (1953) 1011.
122 F. TURBA, *Chromatographische Methoden in der Protein Chemie*, Springer Verl., Berlin, Göttingen und Heidelberg, 1954, S. 334.
123 F. TURBA UND H. ESSER, *Angew. Chem.*, 65 (1953) 256; *Biochem. Z.*, 327 (1955) 93.
124 F. TURBA UND H. HETZEL, *Biochem. Z.*, 325 (1954) 524.
125 F. TURBA, H. PELZER UND H. SCHUSTER, *Z. physiol. Chem.*, 296 (1954) 97.
127 B. M. TURNER, *Nature*, 179 (1957) 964.
128 H. E. WADE UND D. M. MORGAN, *Biochem. J.*, 60 (1955) 264.
129 J. DE WAEL, *Chem. Weekblad*, 49 (1953) 229.
130 R. WEBER, *Helv. Chim. Acta*, 34 (1951) 2031.
131 R. WEBER, *Helv. Chim. Acta*, 36 (1953) 424.
132 W. C. WERKHEISER UND R. J. WINZLER, *J. Biol. Chem.*, 204 (1953) 971.
133 G. WERNER, *Rec. trav. chim.*, 74 (1955) 613.
134 G. WERNER UND O. WESTPHAL, *Angew. Chem.*, 67 (1955) 251. die hier beschriebene Apparatur wird von der Dr. Virus K.G., Bonn, in den Handel gebracht.
135 O. WESTPHAL UND O. LÜDERITZ, *Angew. Chem.*, 66 (1954) 407.
136 O. WESTPHAL, O. LÜDERITZ, B. KICKHÖFEN, E. EICHENBERGER UND W. KEIDERLING, *Rev. canad. biol.*, 12 (1953) 289.
137 T. WIELAND, *Angew. Chem.*, 60 (1948) 313.
138 T. WIELAND UND U. FELD, *Angew. Chem.*, 63 (1951) 258.
139 T. WIELAND UND E. FISCHER, *Naturwissenschaften*, 35 (1948) 29.
140 T. WIELAND UND G. PFLEIDERER, *Angew. Chem.*, 67 (1955) 257.
141 T. WIELAND UND G. PFLEIDERER, *Angew. Chem.*, 69 (1957) 199.
142 T. WIELAND UND W. SCHÖN, *Ann. Chem.*, 593 (1955) 157.
143 C. WUNDERLY, *Die Papierelektrophorese*, Verl. Sauerländer, Aarau und Frankfurt, 1954.
144 C. WUNDERLY, *Chimia (Schweiz)*, 10 (1956) 1.
145 H. ZENTNER, *Nature*, 175 (1955) 953.
146 C. A. ZITTLE, *Advances in Enzymol.*, 12 (1951) 493.

Eingegangen den 2. November 1957