

Über die quantitative Auswertung von Elektrophoresediagrammen auf Filtrierpapier.

(Kurze Mitteilung.)

Von

H. Michl.

Aus dem II. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

(Eingelangt am 22. Aug. 1951. Vorgelegt in der Sitzung am 11. Okt. 1951.)

Die bisher beschriebenen Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Elektrophoresediagrammen auf Filtrierpapier gestatten nur eine *punktweise*, also diskontinuierliche Auswertung¹⁻⁴. Im folgenden wird nun kurz ein einfaches, *kontinuierliches* und *selbstregistrierendes* Verfahren beschrieben. Dieses erreicht bei einem Materialaufwand von 30 bis 40 γ für die Papierelektrophorese von Eiweiß eine Genauigkeit von ± 1 bis 2%.

Das Prinzip der Methode ist folgendes:

Ausgewertet wird ein Filtrierpapierstreifen, der normal zu seiner Längsrichtung verschieden stark angefärbte Querstreifen trägt. Jedem dieser Querstreifen entspricht eine Komponente des Gemisches; seine Farbintensität ist proportional der Konzentration derselben. Eine Zylinderlinse bildet den lichtdurchlässig gemachten Filtrierpapierstreifen in seiner Längsrichtung auf einem photographischen Papier ab. Dadurch wird erreicht, daß aus den öfter etwas verzerrten Querstreifen lange parallele Lichtstreifen werden. Diese Folge von hellen und dunklen Lichtstreifen wird von einem Graukeil in eine Folge von größeren und kleineren Hügeln einer Schattenkurve verwandelt. Die Anzahl der Hügel entspricht der Anzahl der Querstreifen auf dem Filtrierpapier und damit der der Komponenten des Gemisches. Die *Fläche* eines Hügels ist proportional der Farbintensität des Querstreifens und damit der *Konzentration* der jeweiligen Komponente. Die weitere Auswertung erfolgt analog den Verfahren von *Philpot*⁵ und *Longsworth*⁶ bei der *freien* Elektrophorese durch Planimetrieren bzw. Ausschneiden und Wägen der Hügelflächen.

Für eine verlässliche quantitative Bestimmung müssen eine Anzahl Voraussetzungen erfüllt und vor allem mehrere, bisher in der Literatur nicht behandelte Fehlerquellen ausgeschaltet werden:

¹ H. D. Cremer und A. Tiselius, Biochem. Z. **320**, 273 (1950).

² W. Grassmann und K. Hannig, Naturwiss. **37**, 496 (1950).

³ F. Turba und H. J. Enekel, Naturwiss. **37**, 93 (1950).

⁴ Th. Wieland und L. Wirth, Angew. Chem. **62**, 473 (1950).

⁵ J. St. L. Philpot, Nature (London) **141**, 283 (1938).

⁶ L. G. Longsworth, Chem. Reviews **30**, 323 (1942).

1. Die Intensität der Farbe auf dem Filtrierpapierstreifen muß proportional der Konzentration des untersuchten Stoffes sein.

2. Die Anfärbung muß möglichst intensiv sein, um Arbeiten mit geringen Substanzmengen zu ermöglichen.

Erfüllt werden die Forderungen 1 und 2 für die Bestimmung von Eiweiß durch Anfärben mit Neucoccin, Nickelrubeanat und *Folins* Aminosäurereagens⁷ bzw. einer Kombination aller drei.

3. Zu den häufigsten Fehlerquellen bei der Papierelektrophorese gehören die durch Kapillarkräfte bewirkten Strömungen im Filtrierpapierstreifen. Sie können durch eine geeignete Versuchsanordnung überwunden werden.

4. Weitere schwerwiegende und trotzdem wenig berücksichtigte Fehler werden durch die Wechselwirkung der untersuchten Substanz mit dem Filtrierpapier verursacht. So wird z. B. Eiweiß oft teilweise an der Ausgangsstellung zurückgehalten und täuscht eine nicht vorhandene Komponente vor. Es kann sich ferner über die ganze gewanderte Strecke verteilen und so die quantitative Zusammensetzung verfälschen. Diese und ähnliche Störungen konnten nach einer eingehenden Untersuchung ihrer Abhängigkeit von der Art und Vorbehandlung des Filtrierpapiers, der Versuchsanordnung, des Spannungsgefälles und der Versuchsdauer sowie der Art des Eiweißes völlig ausgeschaltet werden.

5. Da die optimale Auftrennung eines Eiweißgemisches stark pH-abhängig ist, mußte eine Methode zur Feststellung des günstigsten pH-Wertes gefunden werden. Dies gelang bei der Papierelektrophorese durch Überlagerung eines kontinuierlichen pH-Gefälles normal zur Richtung der elektrophoretischen Wanderung.

Eine genaue Beschreibung der hier nur kurz angeführten Methoden, die Besprechung der Störungen und ihre Vermeidung sowie die genauen technischen Details werden in einer folgenden Arbeit beschrieben.

⁷ O. Folin, J. biol. Chem. 51, 377 (1922).