

# Über die quantitative Auswertung von Elektrophoresediagrammen auf Filtrierpapier.

II. Mitteilung<sup>1</sup>.

Von  
H. Michl.

Aus dem II. Chemischen Laboratorium der Universität Wien.

Mit 6 Abbildungen.

(Eingelangt am 22. Aug. 1951. Vorgelegt in der Sitzung am 17. Jan. 1952.)

Die Erfolge, die mit Hilfe der Elektrophorese auf Filtrierpapier in der letzten Zeit erzielt wurden<sup>2-6</sup>, erwecken das Bedürfnis nach einem einfachen Verfahren zur quantitativen Auswertung der dabei erhaltenen Diagramme. Bisher wurden 4 Verfahren beschrieben. Diese sind:

1. Die Methode von *Turba* und *Enenkel*<sup>7</sup>. Hier werden die einzelnen bei der Papierelektrophorese erhaltenen und durch Anfärben sichtbar gemachten Eiweißfraktionen durch Zerschneiden des Filtrierpapierstreifens isoliert und nach dem Eluieren kolorimetrisch bestimmt.

2. Das Verfahren von *Cremer* und *Tiselius*<sup>8</sup>. Dieses ist eine Verfeinerung der obigen Methode. Der Filtrierpapierstreifen wird normal zu seiner Längsrichtung in zahlreiche schmale Streifen zerschnitten und deren Farbstoffgehalt bestimmt. Aus den erhaltenen Extinktionswerten läßt sich punktweise eine Kurve konstruieren, die einer bei der freien Elektrophorese erhaltenen entspricht.

3. Die Auswertung nach *Wieland* und *Wirth*<sup>9</sup>. Diese erfolgt auf Grund der Retentionsanalyse.

<sup>1</sup> H. Michl, Mh. Chem. **82**, 944 (1951).

<sup>2</sup> Th. Wieland, E. Fischer und L. Wirth, Liebigs Ann. Chem. **564**, 152 (1949).

<sup>3</sup> K. Wallenfels und E. Pechmann, Angew. Chem. **63**, 44 (1951).

<sup>4</sup> H. Michl, K. Riedl und F. Wessely, Mh. Chem. **82**, 539 (1951).

<sup>5</sup> W. Grassmann, K. Hannig und M. Knedel, Dtsch. med. Wschr. **76**, 333 (1951).

<sup>6</sup> W. Maurer und K. T. Schild, Klin. Wschr. **29**, 514 (1951).

<sup>7</sup> F. Turba und H. J. Enenkel, Naturwiss. **37**, 93 (1950).

<sup>8</sup> H. D. Cremer und A. Tiselius, Biochem. Z. **320**, 273 (1950).

<sup>9</sup> Th. Wieland und L. Wirt, Angew. Chem. **62**, 473 (1950).

4. Die Bestimmung nach *Grassmann* und *Hannig*<sup>10</sup>. Diese erfolgt durch Ausmessen des mit Monobromnaphthalin lichtdurchlässig gemachten Filtrierpapierstreifens mit einem lichtelektrischen Spaltkolorimeter.

Alle diese Verfahren gestatten vorerst nur eine *punktweise* Auswertung der Diagramme. Das Verfahren von *Grassmann* und *Hannig* läßt sich durch Anwendung einer selbsttätigen Registriereinrichtung<sup>10</sup> zwar ohne weiteres in ein kontinuierliches Verfahren umwandeln, doch ist dafür schon ein gewisser Aufwand erforderlich.

Die vorliegende Arbeit beschreibt nun I. ein einfaches, *kontinuierliches, selbstregistrierendes* Verfahren und gibt II. eine eingehende Behandlung der Fehlerquellen, die bei der quantitativen Papirelektrophorese auftreten können.

### I. Die quantitative Auswertung.

Man benötigt hierzu einen normalen photographischen Vergrößerungsapparat, dessen Objektiv durch eine Zylinderlinsenoptik (Periskop), die leicht angefertigt werden kann, ersetzt ist. Ferner braucht man Graukeile, die nach dem Verfahren von *Goldberg*<sup>11</sup> hergestellt werden können. Die Diagramme sind in kurzer Zeit und sehr einfach anzufertigen. Abb. 1 zeigt das Prinzip des Verfahrens. Im Vergrößerungsapparat befindet sich der bei der Elektrophorese z. B. nach<sup>12</sup> erhaltene, angefärbte und durchsichtig gemachte Filtrierpapierstreifen oder besser dessen photographisches Negativ. Das Brechungsgefälle der Zylinderlinse liegt in der Richtung des Filtrierpapierstreifens, es gelangen also nur dessen Querstreifen zur Abbildung. Ohne Graukeil würde man auf dem photographischen Papier eine Folge langer, streng paralleler Lichtstreifen bekommen, die in ihren Helligkeitswerten den ursprünglichen farbigen Querstreifen entsprechen. Ein Graukeil, dessen Gefälle nun in der Richtung dieser Lichtstreifen liegt, bewirkt eine verschiedene Schwächung des durchgehenden Lichtes. An den dunklen Stellen zwischen den einzelnen Lichtstreifen wird, wenn der Graukeil entsprechend abgestimmt ist, kein Licht durchgelassen, bei den Lichtstreifen je nach ihrer Helligkeit Licht bis zur entsprechenden Höhe des Keiles. Man

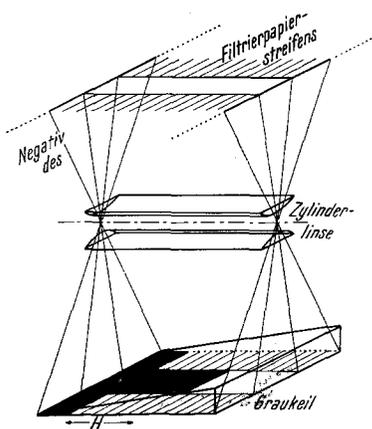


Abb. 1.

<sup>10</sup> *W. Grassmann* und *K. Hannig*, *Naturwiss.* **37**, 496 (1950).

<sup>11</sup> *E. Goldberg* in *F. Weigert*, *Optische Methoden der Chemie*, S. 59 ff. Leipzig. 1927.

<sup>12</sup> *H. Michl*, *Mh. Chem.* **82**, 489 (1951).

erhält so *Schattenkurven* (Abb. 2), die nichts anderes als eine Umwandlung der Folge von starken und schwachen Lichtstreifen in größere und kleinere Hügel sind. Die jeweilige Höhe dieser Hügel ist ein Maß für die Extinktionsdifferenz zwischen den angefärbten und nicht angefärbten Stellen des Papierstreifens und damit für die Eiweißkonzentration an der betreffenden Stelle. Die *Gesamtkonzentration* an einer Eiweißkomponente ist proportional der *Fläche* eines Hügel, ganz analog, wie das bei der *freien* Elektrophorese bei dem Verfahren von *Philpot*<sup>13</sup> und *Longsworth*<sup>14</sup> der Fall ist.

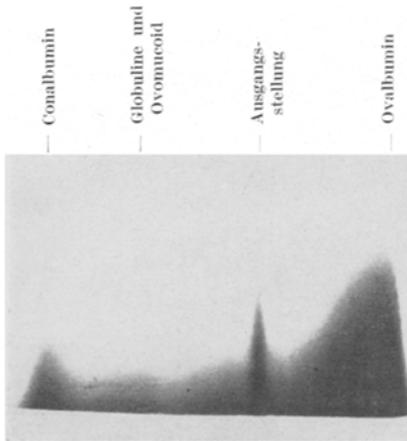


Abb. 2.

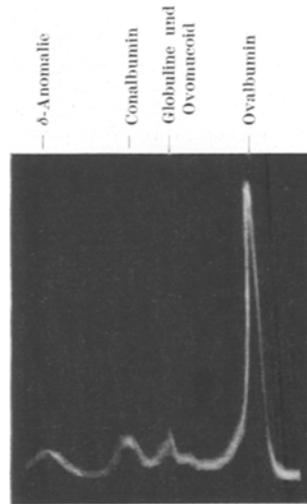


Abb. 3.

Für das Zustandekommen einer gut auswertbaren Schattenkurve ist die Verwendung des richtigen Keiles von großer Bedeutung. Die Höhe der Hügel ist nämlich der Keilkonstanten — das ist die Änderung der Extinktion des Keiles pro Zentimeter in der Keilrichtung<sup>11</sup> — verkehrt proportional. Es gilt (vgl. Abb. 1):

$$H = E/K.$$

*E* ... Differenz der Extinktionen am Filtrierpapierstreifen bzw. dessen Negativ.

*H* ... Höhe der Hügel der Schattenkurve in cm.

*K* ... Keilkonstante.

Man kann nun die Keilkonstante nicht beliebig klein machen wie es zur Erzielung hoher Hügel günstig wäre, da sonst die Konturen der Schattenkurve zu unscharf werden. An der Grenze derselben werden ja alle Tonwerte des photographischen Papiers vom reinen Weiß bis

<sup>13</sup> *J. St. L. Philpot*, Nature (London) **141**, 283 (1938).

<sup>14</sup> *L. G. Longsworth*, Chem. Reviews **30**, 323 (1942).

zum tiefen Schwarz durchlaufen. Diese *Verlaufbreite*<sup>15</sup> soll möglichst schmal gehalten werden. Hierzu gibt es folgende Möglichkeiten:

1. Die Verwendung möglichst hart arbeitender Papiere und Entwickler. Die so erreichbare Verlaufbreite war bei einer Keilkonstanten von 0,56 — wie in Abb. 2 — 1,7 cm.

2. Das Mitkopieren eines Gazeetzes, wie von *Goldberg*<sup>16</sup> beschrieben.

3. Das Abschwächen mit dem *Farmerschen* Abschwächer (einer Lösung von Kaliumferrizyanid und Natriumthiosulfat)<sup>17</sup>. Hier wird vor allem die Schwelle deutlicher sichtbar. Jedoch ist bei dieser Methode einige Vorsicht geboten, da unter Umständen Verzerrungen eintreten können.

4. Das Umkopieren. Dieser Weg ist der *wirksamste*. Bei einem einmaligen Umkopieren wird die Verlaufbreite auf etwa ein Fünftel eingengt.

Im allgemeinen sind Keile mit einer Konstanten von 0,5 bis 0,6 am universellsten verwendbar. Die unter Punkt 1 bis 3 beschriebenen Methoden reichen dann bei weitem aus.

## II. Die Fehlerquellen bei der quantitativen Auswertung.

Für eine exakte quantitative Auswertung müssen folgende Voraussetzungen erfüllt sein:

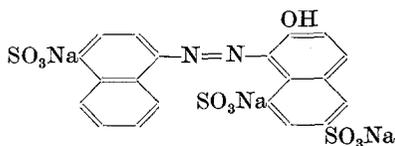
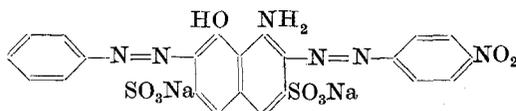
1. Die Intensität der Farbe auf dem Papierstreifen soll möglichst stark und vor allem proportional der Konzentration des untersuchten Stoffes sein. So kann z. B. der Nachweis von Eiweiß durch Anfärben mit sauren Wollfarbstoffen — wie erstmalig von *Turba*<sup>7</sup> vorgeschlagen — erfolgen. Das von diesem Autor verwendete Azokarmin B färbt aber nicht besonders stark an und zeigt außerdem nur ein verhältnismäßig geringes Absorptionsvermögen für photographisch wirksame Strahlen. Als wesentlich besser geeignet fand ich das *Neucoccin* (einen in der Photographie vielfach verwendeten Farbstoff der Agfa: I). Dieses färbt stärker an und absorbiert vor allem sehr kräftig die photographisch wirksamen Strahlen. Die Proportionalität der Anfärbung mit der Konzentration wurde durch Vergleich der quantitativ ausgewerteten Diagramme (Abb. 2) mit Diagrammen meiner Elektrophoreseeinrichtung<sup>15</sup> (Abb. 3) in zahlreichen Versuchen erwiesen. Als Untersuchungsmaterial diente hierbei vor allem Hühnerereiweiß. Bei Arbeiten mit geringen Substanzmengen bzw. im Fall extrem niedriger Konzentrationen einzelner Kompo-

<sup>15</sup> *H. Michl*, Mh. Chem. **82**, 23 (1951).

<sup>16</sup> *E. Goldberg* in *F. Weigert*, Optische Methoden der Chemie, S. 627. Leipzig. 1927.

<sup>17</sup> *G. I. Higson* in *A. Hay*, Die Photographie in Wissenschaft und Praxis, S. 184. Wien und Leipzig. 1929.

nenten im Eiweißgemisch kann man die Intensität der Anfärbung nach folgenden Verfahren weiter steigern:

I<sup>18</sup>II<sup>19</sup>

a) Man verwendet zum Anfärben Farbstoffgemische. So bewährte sich ein Gemisch von Neucoecin und Naphtholblauschwarz B (II)<sup>20, 21</sup> in trichloressigsaurer Lösung. Mit dieser Färbemethode kann man noch etwa 1  $\gamma$  Eiweiß/cm Streifenbreite bestimmen.

b) Man fügt dem Farbbad Cu- oder auch Ni-Azetat zu. Bei Eluieren des überschüssigen Farbstoffes gehen auch die Schwermetallsalze an den nicht von Eiweiß bedeckten Stellen in Lösung, das Eiweiß hält neben dem Farbstoff noch Schwermetallionen zurück. Legt man nun den Filtrierpapierstreifen in eine alkohol. Lösung von Rubeanwasserstoffsäure, so tritt an den schwermetallsalzhaltigen Stellen eine zusätzliche Blauschwarzfärbung auf.

c) Eine zusätzliche Anfärbung ist auch durch *Folins* Aminosäure-reagens<sup>22</sup> (Na-Salz der 1,2-Naphthochinon-4-sulfonsäure) möglich. Dieses und das unter b) beschriebene Verfahren eignet sich vor allem zum Nachweis von Eiweißarten, die sich mit Wollfarbstoffen nur schlecht anfärben lassen.

d) Auch auf rein photographischem Wege läßt sich eine Kontraststeigerung — die sich ja praktisch wie eine stärkere Anfärbung auswirkt — erreichen. So liefert ein einfaches Kopieren des angefärbten und durchsichtig gemachten Filtrierpapierstreifens auf eine phototechnische Platte eine bis 4,5fache Kontraststeigerung.

<sup>18</sup> I. Matsuo, Biologische Untersuchung der Farbstoffe, S. 85. Kyoto. 1933.

<sup>19</sup> H. E. Fierz-David und L. Blangly, Grundlegende Operationen der Farbenchemie, S. 274. Wien. 1947.

<sup>20</sup> Ich danke der Fa. G. Oltag, Wien, für die Überlassung einer Probe dieses Farbstoffes.

<sup>21</sup> Naphtholblauschwarz ist möglicherweise dem von Grassmann empfohlenen Amidoschwarz 10 B ähnlich oder identisch.

<sup>22</sup> O. Folin, J. biol. Chemistry 51, 377 (1922).

e) Eine weitere Kontraststeigerung erhält man, wenn man hinter dem durchsichtig gemachten Filtrierpapierstreifen eine reflektierende Wand anbringt und diese von vorne durch den Filtrierpapierstreifen beleuchtet. Das Licht passiert so zweimal die nicht angefärbten bzw. angefärbten Stellen, wodurch sich die Extinktionsdifferenzen nahezu verdoppeln.

Bei den Anfärbemethoden muß man noch berücksichtigen, daß sich der Farbstoff an den eiweißfreien Stellen leicht auswaschen läßt. Das ist — wie weiter unten unter Punkt 3 gezeigt werden wird — sehr stark von der Art des verwendeten Filtrierpapiers abhängig.

2. Recht unangenehm kann bei der Papierelektrophorese ein Vorgang werden, den ich als „Dochteffekt“ bezeichnen möchte. Darunter sind die durch Kapillarkräfte bewirkten Strömungen der Pufferlösung im Filtrierpapierstreifen zu verstehen. Diese Pufferströmungen, die sich ja nicht, wie etwa die elektroosmotische Strömung, gleichmäßig über den ganzen Filtrierpapierstreifen erstrecken, können überhaupt jede Trennung verhindern. Der Dochteffekt tritt vor allem dann auf, wenn ein Filtrierpapierstreifen direkt in die Pufferlösung taucht. Experimentell wird er dadurch bestimmt, daß man auf dem Filtrierpapierstreifen normal zu seiner Längsrichtung Striche mit einer Zuckerlösung, die ja im elektrischen Feld nicht wandert, anbringt. Die Verschiebung der einzelnen Zuckerstriche gegen ihre ursprüngliche Stellung zeigt sehr deutlich alle Pufferströmungen an. Den Dochteffekt kann man dadurch verhindern, daß man den Puffer in den Elektrodenräumen von einem Filtrierpapierbrei aufsaugen läßt, der den gleichen Feuchtigkeitsgehalt aufweist wie der Filtrierpapierstreifen selbst. Außerdem sollen nur solche Anordnungen verwendet werden, bei denen das Wasser vom Filtrierpapierstreifen während des Versuchs nicht verdunsten kann, da sonst weitere Störungen auftreten können<sup>23</sup>.

3. Ein sehr wichtiger Punkt ist die *Wechselwirkung* des Untersuchungsmaterials mit dem *Filtrierpapier*. Bei Aminosäuren, Polypeptiden usw. ist diese meist nur gering. Bei Eiweiß aber kann das Versuchsergebnis oft durch Adsorptionserscheinungen erheblich verfälscht werden. Diese Störung kann sich auf zwei verschiedene Arten auswirken.

a) Bei *kurzen* Versuchszeiten wird das Eiweiß an der Ausgangsstellung mehr oder minder stark zurückgehalten, was sich nach der Anfärbung zu erkennen gibt. Bei *längeren* Versuchszeiten verteilt sich die adsorbierte Substanz über eine größere Fläche und das Ergebnis kann ganz normal aussehen. Für qualitative Untersuchungen ist diese Störung vielleicht weniger wichtig, sie kann bei kurzen Versuchszeiten höchstens eine Komponente mehr — die Ausgangsstellung — vortäuschen oder eine

<sup>23</sup> E. L. Durrum, Science (New York) 113, 66 (1951).

solche überdecken. Eine Ignorierung dieser Störung bei der quantitativen Auswertung wäre jedoch sehr bedenklich, da manche Eiweißarten, etwa das Serumalbumin, bevorzugt adsorbiert werden und man daher zu wenig findet.

b) Weit ernster ist eine Erscheinung, die eine gewisse Ähnlichkeit mit den bei der freien Elektrophorese auftretenden Anomalien hat<sup>14</sup>. Sie kann vor allem bei hohen Spannungsgefällen und bei Verwendung bestimmter Filtrierpapiersorten auftreten. Mit fortschreitender Versuchsdauer beobachtet man eine Verlangsamung der Wanderungsgeschwindigkeit, ja sogar einen Stillstand. Es treten an den Eiweißlinien starke

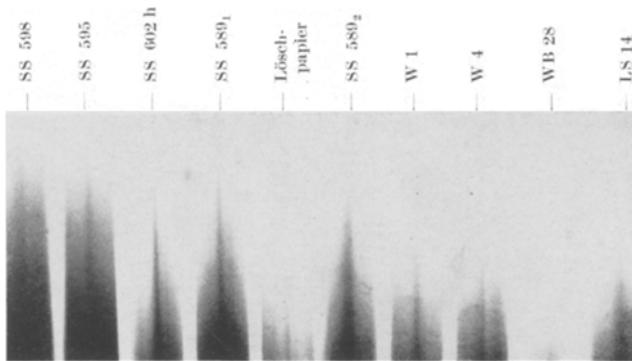


Abb. 4.

Leitfähigkeitsverminderungen auf, die eine lokale Erhitzung zur Folge haben. Diese führt zu einer Denaturierung des Eiweißes am Streifen bzw. zu einer Austrocknung des Streifens an den betreffenden Stellen.

Zum Studium dieser Erscheinung wurden eine Anzahl Filtrierpapiersorten auf ihr Adsorptionsvermögen für Eiweiß geprüft. Für diese Untersuchung brachte man auf die gleich großen, mit Puffer getränkten Streifen der verschiedenen Filtrierpapiere in der Mitte gleiche Eiweißmengen in Form von Strichen auf. Nach einer bestimmten Zeit wurden die Streifen ausgewässert und getrocknet. Je nach der Adsorptionsfähigkeit der Filtrierpapiersorte hielt dieses mehr oder weniger Eiweiß zurück. Das Eiweiß wurde nun durch Anfärben sichtbar gemacht und nach der oben beschriebenen Zylinderlinsen-Keilmethode bestimmt. In Abb. 4 bedeuten die 10 Streifen 10 Sorten Filtrierpapier. Die Höhe der einzelnen Streifen gibt die zurückgehaltene Menge Eiweiß und Farbstoff an. Der dunkle Kern in der Mitte eines Hügels entspricht der zurückgehaltenen Menge Eiweiß und die seitlichen Hügel, rechts und links davon dem vom Papier zurückgehaltenen Farbstoff. Je niedriger die einzelnen Hügel sind, desto weniger Eiweiß und auch Farbstoff werden von dem Filtrierpapier zurückgehalten, desto besser ist es also für die Papierelektrophorese geeignet. Nach diesem Kriterium sind die links angeführten Sorten, wie Schleicher und Schüll (abgekürzt S. S.) Nr. 598 oder 595, kaum, die rechts stehenden — besonders das W. B. 28 — gut

geeignet. Leider mußte aber immer wieder festgestellt werden, daß die Adsorptionsfähigkeit mancher Papiere, z. B. gerade vom W. B. 28, Schwankungen unterworfen ist, so daß eigentlich jeder Bogen auf seine Eignung untersucht werden sollte.

Die Adsorptionsfähigkeit schwankt ferner — wie schon erwähnt — innerhalb der Eiweißarten. Abb. 4 entspricht etwa der durchschnittlichen Adsorption des dort jeweils angegebenen Papiers für Hühner- und Serumeiweiß.

In zahlreichen Experimenten wurde untersucht, ob ein unterschiedliches Verhalten zu beobachten ist, wenn der mit Eiweiß imprägnierte Filtrierpapierstreifen feuchtigkeitsgesättigter Luft ausgesetzt ist oder sich in einer anderen Umgebung befindet. Diesem Punkt wurde vor allem in Hinblick auf meine Versuchsanordnung<sup>12</sup> besondere Aufmerksamkeit geschenkt. Es ergab sich, daß Bäder aus sorgfältig gereinigten Kohlenwasserstoffen — etwa Toluol — *keinen* Einfluß auf das Adsorptionsvermögen hatten. Anders war es bei der Verwendung von Flüssigkeiten mit höheren Dielektrizitätskonstanten, etwa Nitrobenzol. Hier wurde das Eiweiß vom Filtrierpapier deutlich stärker zurückgehalten.

Das übermäßige Haften des Eiweißes am Filtrierpapier kann also durch die Wahl eines geeigneten Filtrierpapiers sowie des umgebenden Mediums günstig beeinflusst, jedoch nicht völlig verhindert werden. Für eine quantitative Auswertung ist dies aber unbedingt erforderlich. Versuche, die aktiven Gruppen des Papiers, die die Adsorption bewirken, mit anorganischen Ionen zu blockieren<sup>24</sup>, waren vollkommen erfolglos. Auf einfachste Weise gelang dies jedoch mit einem ähnlichen Eiweiß, wie es dann zur Untersuchung verwendet wird. Dies führt man derart durch, daß man zu dem Puffer, mit dem der Filtrierpapierstreifen vor der Untersuchung befeuchtet wird, eine kleine Menge Eiweiß gibt.

4. Bei Verwendung mancher harter Filtrierpapiersorten kann ein vollständiges Verschmieren der Eiweißlinien eintreten. Derartige Papiere, z. B. das nach Punkt 3 gut geeignete LS 14, sind also für die Papierelektrophorese nicht geeignet.

5. Die Störungen, die durch die Elektrosmose hervorgerufen werden, sind meist gering. Sie bewirken lediglich eine Verfälschung der Wanderungsgeschwindigkeit. Es wurde erfolglos versucht, sie durch Imprägnieren des Filtrierpapiers mit Stoffen, wie  $\text{BaSO}_4$ ,  $\text{SrSO}_4$ ,  $\text{ZnO}$ ,  $\text{Fe}(\text{OH})_3$ ,  $\text{MgO}$ ,  $\text{TiO}_2$  usw., zu beeinflussen. Auch Zusätze oberflächenaktiver Stoffe zum Puffer, z. B. Zephirol, Kristallviolett, führten nicht zum Ziel.

Eine Beeinflussung der Elektrosmose gelingt durch eine entsprechende Wahl des Filtrierpapiers, und zwar zeigen meist weiche Sorten stärkere elektroosmotische Strömungserscheinungen als harte. *Kompensieren*

<sup>24</sup> E. Broda und T. Schönfeld, Mh. Chem. 81, 459 (1950).

kann man die elektroosmotische Strömung durch den entsprechenden hydrostatischen Druck, wie er etwa in meiner Anordnung<sup>12</sup> durch das verschiedene Niveau der Elektrodengefäße auftritt.

Zur *Wahl* des *Filtrierpapiers* für papierelektrophoretische Untersuchungen von Eiweiß läßt sich Punkt 1 bis 5 zusammenfassend sagen:

Die in den Punkten 1, 3 (Adsorption) und 4 („Verschmieren“) beschriebenen Fehlerquellen lassen sich besser bei der Verwendung weicher, die unter 2 (Dochteffekt) und 5 (Elektroosmose) geschilderten Störungen durch die Verwendung harter Filtrierpapiersorten vermeiden. Da die erstgenannten Störungen viel ernsterer Natur sind und die letzteren

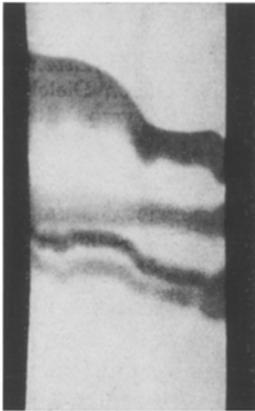


Abb. 5.

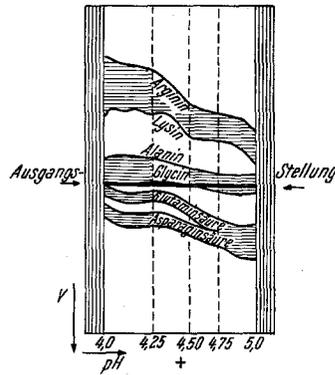


Abb. 6.

sich auch durch apparative Maßnahmen bekämpfen lassen, halte ich Filtrierpapiersorten, die *weich* und *dick* sind sowie eine glatte Oberfläche besitzen, am besten für die Elektrophorese von Eiweiß auf Filtrierpapier geeignet.

6. Von größter Bedeutung für die optimale Auftrennung bei der Elektrophorese ist die Wahl des *günstigsten pH-Wertes*. Man kann diesen selbstverständlich durch eine Anzahl Versuche bei verschiedenen pH-Werten suchen, braucht aber hierfür entsprechend mehr Material und Zeit. Außerdem besteht von Versuch zu Versuch immer ein pH-Sprung und die Kenntnis von der pH-Abhängigkeit der Wanderungsgeschwindigkeit bleibt dementsprechend lückenhaft. Den günstigsten pH-Wert in *einem* Versuch und in einem *kontinuierlichen* pH-Gefälle festzustellen, gelang erstmalig dadurch, daß man normal zur Längsrichtung des Filtrierpapierstreifens ein pH-Gefälle erzeugt und dann die Elektrophorese durchführt (Abb. 5 und 6). Diese Methode bewährt sich besonders in den Fällen, bei denen sich die Wanderungsgeschwindigkeit einzelner Komponenten

innerhalb eines kleinen pH-Bereiches stark ändert. Abb. 5 und 6 beweist dies für ein Gemisch der sechs Aminosäuren Asparaginsäure, Glutaminsäure, Glycin, Alanin, Lysin und Arginin in dem pH-Bereich zwischen 4 und 5. Erwartungsgemäß sieht man, daß die Wanderungsgeschwindigkeit der Monoaminodikarbonsäuren mit steigendem pH zunimmt und die der Hexonbasen sich vermindert. Die Monoaminomonokarbonsäuren zeigen nur eine geringe kathodische Wanderung. Die beste Auftrennung tritt etwa bei pH 4,25 ein.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß man mit der beschriebenen Methode zur quantitativen Bestimmung von Elektrophoresediagrammen auf Filtrierpapier — untersucht wurden hauptsächlich Hühnereiweiß und auch Blutserum — leicht eine Genauigkeit von  $\pm 2\%$  (vom Gesamteiweiß) für das Albumin und von  $\pm 1\%$  für die Globuline erzielt. Der Materialbedarf für eine Untersuchung liegt bei 30 bis 40  $\gamma$  pro Zentimeter Streifenbreite; er ist also um nahezu 2 Zehnerpotenzen niedriger als bei der derzeit empfindlichsten Apparatur für *freie* Elektrophorese<sup>25</sup>.

### Experimenteller Teil.

Durchführung einer Bestimmung der quantitativen Zusammensetzung von Hühnereiweiß.

*Elektrophorese*<sup>12</sup>. Ein Filtrierpapierstreifen W. B. 28 (tschechoslowakischer Herkunft),  $2,5 \times 16$  cm, wurde nach einer deutlichen Markierung der Ausgangsstellung 5 Min. lang mit einem Veronalpuffer von pH 8,5 und  $\mu = 0,1$ , der 0,5% frisches Hühnereiweiß enthielt, getränkt. Dann preßte man ihn zwischen Filtrierpapier ab und brachte etwa 10  $\mu$ l frisches Hühnereiweiß, das vorher mit Puffer im Verhältnis 1 : 4 verdünnt worden ist, auf die Ausgangsstellung. Nach Einlegen in die von mir beschriebene Apparatur<sup>12</sup> — die Elektrodenräume waren mit pufferfeuchtem Filtrierpapier W. B. 28 ausgelegt — wurden 5 Min. lang 100 V und dann 500 V (5 MA) an die Elektroden gelegt. Nach 40 Min. wurde abgeschaltet, der Filtrierpapierstreifen herausgenommen und bei 100° getrocknet.

*Anfärben*. Das Farbbad enthielt 50 ml Äthanol, 25 ml Eisessig, 25 ml Wasser und war mit Neucocin kalt gesättigt. Der Streifen blieb 5 Min. im Farbbad und wurde dann 5 Min. mit 96%igem Äthanol gewaschen. Dann wurde er 30 Min. lang in einer Waschflüssigkeit, die aus 50 (Vol.-%) Äthanol, 40% Wasser und 10% Eisessig bestand, „gewässert“. Zum Schluß behandelte man nochmals mit 96%igem Äthanol und trocknete.

*Herstellung des Negativs*. Der so erhaltene, angefärbte Filtrierpapierstreifen wurde mit  $\alpha$ -Bromnaphthalin getränkt und blasenfrei zwischen eine Glas- und eine weiße Porzellanplatte gepreßt. Die Aufnahme erfolgte auf eine phototechnische Platte (Aktophot), entwickelt wurde in einem Metol-Hydrochinonentwickler unter Zusatz von 0,2 g/1000 ml 6-Nitrobenzimidazol.

*Erzeugung der Schattenkurve*. Diese erfolgt in der Anordnung von Abb. 1. Zu beachten ist:

<sup>25</sup> H. J. Antweiler, Kolloid-Z. 115, 130 (1949).

1. Der Vergrößerungsapparat muß über einen Kondensator und eine genügend starke Lichtquelle (Nitraphotlampe, Uvaulunstrahler o. ä.) verfügen, da die Zylinderlinse auf 1:11 abgeblendet und eventuell ein Blaufilter verwendet werden soll.

2. Die Längsachse der Zylinderlinse muß genau senkrecht auf die Längsachse des Filtrierpapierstreifens bzw. dessen Negativ stehen. Das läßt sich mit Hilfe der markierten Ausgangsstellung leicht erreichen.

3. Es darf kein Licht seitlich vom Negativ vorbeigekommen.

4. Das verwendete Photopapier soll möglichst hart arbeiten und empfindlich (vgl. Punkt 1) sein.

*Anfärben mit Neococcin-Naphtholblauschwarz (II. Teil, Punkt 3a).* Ein Gemisch aus 50 (Vol.)% Äthanol, 25% Eisessig und 25% Wasser, das in 100 ml 2 g Trichloressigsäure enthält, wird mit beiden Farbstoffen gesättigt. Die Dauer der Anfärbung beträgt 10 Min. Ausgewässert wird wie oben.

*Anfärben mit Kupferrubeanat (II. Teil, Punkt 3b).* Das nur schwach angesäuerte Farbbad (5% Eisessig) wird 2%ig an Cu- oder Ni-Acetat gemacht. Die Badedauer und Auswässerung ist wie oben. Nach der Ausbildung der Farbe in einer 2%igen alkoholischen Rubeanwasserstoffsäurelösung entfernt man überschüssiges Reagens mit Äthanol.

*Anfärben mit Folins Aminosäurereagens (II. Teil, Punkt 3c).* Der mit 0,2 n alkohol. Kalilauge besprühte und getrocknete Filtrierpapierstreifen wird mit einer gesättigten alkohol. Lösung von 1,4-naphthochinon-6-sulfonsaurem Natrium getränkt und einige Min. in strömenden Wasserdampf gehalten. Überschüssiges Chinon entfernt man durch kurzes Auswaschen mit Äthanol.

*Papierelektrophorese im pH-Gefälle (II. Teil, Punkt 6).* Auf einem Filtrierpapierstreifen Schleicher und Schüll 602 h wurden nach der Markierung der Ausgangsstellung in etwa 4 cm Abstand parallel zu dieser — also normal zur Längsrichtung des Streifens — Striche mit einer Bromphenolblaulösung gezogen. Nach dem Trocknen stellte man den Filtrierpapierstreifen mit der einen Längskante in eine 2 mm tiefe Essigsäure-Pyridinlösung von pH 4<sup>12</sup> und wartete, bis diese bis etwa 1 cm über die Mitte aufgestiegen war. Dann wurde der Filtrierpapierstreifen herausgenommen und mit der noch trockenen Längskante in ein Essigsäure-Pyridin-Gemisch von pH 5 getaucht. Dieses Gemisch stieg bis zur Front des Gemisches von pH 4 auf und diffundierte in dieses hinein. Der am Anfang steile pH-Sprung zwischen den Gemischen von pH 4 und pH 5 verflachte sich unter der Kontrolle der Indikatorstriche bis zu der pH-Verteilung von Abb. 6. Dann nahm man den Filtrierpapierstreifen heraus, preßte ihn zwischen Filtrierpapier ab und brachte das Untersuchungsmaterial — also eine Lösung der Aminosäuren Asparaginsäure, Glutaminsäure, Alanin, Glycin, Lysin und Arginin, die beiden letzteren als Chlorhydrat — auf die Ausgangsstellung. Hierauf wurde der Streifen in die Elektrophoreseapparatur gelegt und die Aminosäuren bei einem mittleren Spannungsgefälle von 41 V/cm 20 Min. lang wandern gelassen. Nach dem Herausnehmen bestimmte man die pH-Wertverteilung durch Vergleich mit mit Puffern von den entsprechenden pH-Werten getränkten und mit dem Indikator angefärbten Filtrierpapierstreifen. Nach dem Trocknen wurde in üblicher Weise mit einer 0,2%igen butanolischen Ninhydrinlösung, der 5% Pyridin zugesetzt worden waren, entwickelt.