

$$k_2 = 7,0 \text{ ((Mol/l)}^{-1}; \text{ min}^{-1}; 25^\circ \text{ C});$$

der Temperaturkoeffizient (per 10°) wurde zu 1,8 ermittelt, so daß, behufs Vergleiches auf 0° C umgerechnet,

$$(k_2)_{0^\circ} = \frac{7,0}{4,3} = 1,6.$$

Dieser Zahlenwert ist von dem von k_1 ($\doteq 55$) so sehr verschieden, daß der Wirkungsweise der Salpetrigsäure bei den beiden in Rede stehenden Umsetzungen nicht die gleiche Salpetrigsäurereaktion zugeschrieben werden kann.

Da es nun im Hinblick auf die leichte Oxydierbarkeit von NO sehr naheliegend ist, daß es der Schritt (A) und nicht der Schritt (B) ist, über den die HNO_2 -Oxydation verläuft⁵, wie dies auch von *Reinders* und *Vles* angenommen wird, so muß dem Diazotierungsvorgang der Schritt (B) zugeordnet werden.

Die Entscheidung fällt mithin zugunsten desjenigen Mechanismus, der von *E. D. Hughes*, *C. K. Ingold* und *J. H. Ridd* und von *H. Schmid* und Mitarbeitern entwickelt worden ist.

Zur Kenntnis der Elektrophorese.

1., kurze Mitteilung: Apparative Schwierigkeiten und Fehlerquellen der Papierelektrophorese.
Trennung von organischen Säuren.

Von

H. Berbalk.

Aus dem Institut für Organische Chemie der Technischen Hochschule Wien.

(Eingelangt am 17. November 1954.)

In neuester Zeit hat die von *Th. Wieland* und *E. Fischer*¹ entwickelte Papierelektrophorese (PE) als Modifikation der seit langem bekannten Elektrophorese allgemeine Beachtung als selbständiges Verfahren sowie als wertvolle Ergänzung der Papierchromatographie gefunden. Die PE benützt die Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Potentialfeld zur Auftrennung und Analyse von Substanzgemischen, wobei Filterpapier als Stabilisator der erreichten Endlage der Stoffe Verwendung findet.

Daß die PE trotz großer Vorteile bisher nur auf relativ wenigen Gebieten eine vorherrschende Stellung gewinnen konnte, ist vor allem auf apparative Unzulänglichkeiten und die oftmals falschen Vorstellungen über ihre Grundlagen zurückzuführen.

¹ *Th. Wieland* und *E. Fischer*, *Naturwiss.* **35**, 29 (1948).

In dem Bestreben, die PE auf alle dissoziierenden oder geladenen Substanzen allgemein anwendbar zu machen, haben wir zu Beginn unserer Arbeiten, welche den Gegenstand mehrerer folgender Mitteilungen bilden werden, jene Bedingungen untersucht, die zur Durchführung exakter elektrophoretischer Messungen und Analysen notwendig sind. Auf Grund verschiedener Versuchsreihen haben sich folgende Punkte als, apparativ und methodisch gesehen, wichtig erwiesen:

1. *Temperatur*. Zum Erhalt reproduzierbarer Werte ist während der gesamten Versuchsdauer Temperaturkonstanz notwendig. Die Gefahr einer Erwärmung der Papierstreifen ist besonders bei Verwendung höherer Spannungen oder besser leitender Grundlösungen sehr groß.

Nur bei geringfügiger Erwärmung genügt das Einstellen der Anlage in einen Thermostaten bzw. Kühltisch². Die Verwendung organischer Medien als Einbettungs- und Kühlflüssigkeiten^{3, 4} führt durch Lösung zu zahlreichen unerwünschten Nebenerscheinungen. Eine gleichmäßige, gute Kühlung läßt sich erreichen, wenn der Papierstreifen direkt an der Fläche eines Kühlers anliegt⁵.

Unsere Versuche zeigen durchwegs einen Anstieg der Stoffbeweglichkeit bei höherer Temperatur.

2. *Streifenfeuchtigkeit*. Unabhängig von dem absoluten Benetzungsgrad des Streifens bedeutet jeder Feuchtigkeitsunterschied in der Nähe der aufgetragenen Substanz eine weitere Geschwindigkeitskomponente, da sich der Stoff — zusätzlich zur Elektrophorese — mit der in der Richtung des Feuchtigkeitsgradienten wandernden Grundlösung bewegt. Die Wanderungsweite ergibt sich dann als Resultante beider Bewegungen, der untersuchte Stoff folgt nur teilweise der Richtung der elektrischen Feldlinien und kann unter Umständen an einer der elektrophoretischen Bewegung direkt konträren Stelle aufgefunden werden.

Ein durch ungleichmäßiges Befeuchten erzeugter Unterschied kann durch ungeeignete Apparaturen noch erheblich verstärkt werden. Trockene Stellen sind durch erhöhten elektrischen Widerstand ausgezeichnet; wird die hier verstärkt auftretende *Joulesche* Wärme nicht abgeführt, so vermehrt sie den Feuchtigkeitsunterschied noch durch erhöhte Verdampfung usw. Wenn z. B. *R. Weber*⁶ schon bei Versuchen mit Wechselstrom von Wanderungen über einige Zentimeter berichtet, so ist dies keineswegs zu verwundern, da die Verdunstung weder durch Kühlung noch durch direktes Auflegen einer Deckplatte verhindert wird. Wenn er weiter erwähnt, daß bei mehrstündiger Versuchsdauer gelegentliches

² *W. Boguth*, Naturwiss. **40**, 22 (1953).

³ *H. Michl*, Mh. Chem. **82**, 489 (1951).

⁴ *H. Cremer* und *A. Tiselius*, Biochem. Z. **320**, 273 (1950).

⁵ *H. Michl*, Mh. Chem. **83**, 737 (1952).

⁶ *R. Weber*, Helv. Chim. Acta **34**, 2031 (1951).

neues Besprühen des Streifens mit Grundlösung notwendig wurde, so kann man eine Reproduzierbarkeit derartiger Messungen nicht erwarten.

Unsere Versuche ergaben unter diesen Bedingungen Streuungen, die für eine analytische Methode völlig untragbar sind.

Es ist daher notwendig, durch geeignete Vorrichtungen während der gesamten Versuchsdauer eine gleichmäßige Feuchtigkeit auf dem ganzen Streifen zu erzielen und zu erhalten. Man besprüht zu diesem Zwecke das Papier sehr gleichmäßig mit der Grundlösung und preßt oberflächlich mit Filterpapier ab. Geringe Feuchtigkeitsunterschiede zu Beginn sind zu vernachlässigen, wenn man vermeidet, daß — wie oben beschrieben — die Stromwärme diese Unterschiede übermäßig vergrößert. Das gelingt durch Kühlung (Punkt 1) nur teilweise. Die Verdunstung läßt sich aber unterdrücken, wenn man von vornherein in einer dampfgesättigten Kammer arbeitet^{1, 7, 8, 9} oder den Streifen zwischen zwei anliegenden Glas- oder Kunststoffplatten auflegt. Die Nachteile der Kammerapparatur liegen zunächst darin, daß sie eine gute Kühlung des frei hängenden Streifens unmöglich machen; das einseitige Aufliegen des Streifens auf einer Kühlfläche verhindert nämlich durch ständige Kondensation des Dampfes auf dem Papier eine Stabilisierung der Substanzverteilung. Die zweite Anordnung ist daher vorzuziehen; bei höhermolekularen Substanzen ist allerdings im Zweifelsfalle zu überprüfen, inwieweit die aufliegende Deckplatte eine zusätzliche Adsorption hervorruft.

3. *Diffusion.* Während der Konzentrationsgradient zwischen Substanz und Grundmedium eine nicht zu ändernde Größe darstellt, ist die vorhandene Menge an Grundlösung — als Träger der Diffusion — für deren Ausmaß bestimmend. Mit steigendem Benetzungsgrad wird die lagestabilisierende Wirkung des Filterpapiers überwunden, die Diffusion nimmt zu. (In der oben erwähnten Kammerapparatur erreicht durch die ständige Sättigung des Papiers der Benetzungsgrad sein Maximum.) Die Diffusion kann jedoch weitgehend zurückgedrängt werden, wenn man den Benetzungsgrad von Beginn an möglichst gering wählt. Da die Diffusion zeitabhängig ist, kann sie bei Verkürzung der Elektrophoresezeit durch Anlegen entsprechend hoher Spannungen sehr klein gehalten werden. Die meisten heute verwendeten Anlagen arbeiten mit einem Potentialgefälle von nur 4 bis 8 V/cm; zu einer Eiweißanalyse sind daher Laufzeiten von 10 bis 30 Stdn. erforderlich.

Die Diffusion ist naturgemäß bei derartig langer Versuchsdauer sehr

⁷ E. Durrum, J. Amer. Chem. Soc. **72**, 2943 (1950).

⁸ W. Grassmann, K. Hannig und M. Knedel, Dtsch. med. Wschr. **76**, 333 (1951).

⁹ N. Krawchenko, O. Samarina und M. Kritsman, Biokhimiya **18**, 34 (1953).

störend und führt zu außerordentlicher Verbreiterung der Substanzstreifen, unter Umständen sogar zu einem Absinken des Konzentrationsmaximums unter die Nachweisgrenze. Besonders für geringe Substanzmengen sind derartige Laufzeiten untragbar.

H. Michl³ konnte erstmalig durch ausreichende Kühlung der Streifen zu höheren Spannungen (50 V/cm) übergehen und so die Analysenzeiten auf 20 bis 60 Min. verkürzen. Wir haben mit Vorteil bereits Spannungsfälle bis zu 200 V/cm angewandt. Versuchszeiten, die über 30 Min. hinausgehen, sind unter diesen Bedingungen kaum mehr anzutreffen. Eine gute Kühlung (Punkt 1) ist hier natürlich von besonderer Bedeutung.

4. *Konstanz der Zusammensetzung der Grundlösung.* Bei dem Grundmedium, das zum Tränken des Papiers benutzt wird, handelt es sich durchwegs um eine dissoziierende Substanz, daher ist auch hier eine elektrophoretische Bewegung der Ionen nicht zu vermeiden. Es zeigt sich das Bild einer gewöhnlichen Elektrolyse, die durch das Papier stabilisiert wird: im Fall einer Salzlösung als Grundmedium wird die Kathode als Entladungsort der Kationen von einer basischen Zone umgeben, die Anode analog von einem sauren Bereich. Beide Zonen werden während der Elektrophorese immer größer und beeinflussen früher oder später die Wanderung sehr empfindlich; bei ungünstiger apparativer Anordnung und langer Versuchsdauer erreichen sie sich schließlich. Der Effekt wird zwar durch Verwendung schlecht dissozierender Substanzen (organische Säuren und Basen) kleiner, der pH-Gradient bleibt aber bestehen und führt zu schwer reproduzierbaren Wanderungsweiten. Außerdem verfälschen diese Zonen durch ihren gegenüber dem restlichen Streifen veränderten Widerstand die genaue Messung des Spannungsabfalles pro Zentimeter.

Versuchsanordnungen, bei denen die Elektroden direkt am Papier aufliegen¹⁰, sind vollkommen abzulehnen, aber auch ein direktes Eintauchen des Papiers in den Elektrodenraum ist (besonders bei kleinen Elektrodengefäßen) kein sicheres Gegenmittel. Der Effekt läßt sich aber völlig ausschalten, wenn man die Streifenenden in Schalen eintauchen läßt, die mit dem zum Tränken benützten Grundmedium gefüllt sind, und erst diese über diaphragmenverschlossene Heber mit den eigentlichen Elektrodengefäßen verbindet^{5, 6}.

5. *Lösungseinwanderung.* Diese zuletzt beschriebene Anordnung birgt aber eine weitere Fehlermöglichkeit in sich. Da der Papierstreifen mit beiden Enden in die Lösung eintaucht, ergibt sich ein von diesen Punkten aus abfallender Feuchtigkeitsgradient, der eine Einwanderung der Lösung in das Papier bewirkt. Die Wanderung des Grundmediums

¹⁰ H. Strain und J. Sullivan, *Analyt. Chemistry* **23**, 816 (1951).

wirkt als zusätzliche Geschwindigkeitskomponente, die auf der einen Seite des Elektropherogramms verstärkend, auf der anderen abschwächend auf die Elektromigration wirkt. Da sich diese Größe addiert, sind auch die Wanderungsrelationen zwischen verschiedenen Substanzen verändert. Für genaue Messungen muß daher an mehreren Punkten des Pherogramms eine elektrisch nicht wandernde Substanz (z. B. Fructose bei saurem Medium, jedoch nicht bei Boratpuffer) aufgetragen werden, um die Komponente der Lösungswanderung zu ermitteln. Die Einwanderung ist besonders stark, wenn die Randgefäße in der Höhe des Streifens stehen; sie wird überdies ungleichmäßig, wenn die Flüssigkeitsspiegel in den beiden Gefäßen verschiedene Höhe zeigen.

Der Effekt läßt sich weitgehend ausschalten, wenn man die Entfernung zwischen Lösung und eigentlicher Meßstrecke so groß wählt, als mit Rücksicht auf den dadurch bedingten Spannungsabfall noch tolerierbar ist. Durch senkrechte Führung dieser Verbindungsstreifen läßt sich außerdem die Schwerkraft zur Verminderung der Flüssigkeitswanderung ausnützen.

6. *Endosmose*. Unter Endosmose versteht man die Wanderung einer Flüssigkeit im elektrischen Feld als Folge eines Potentialunterschiedes, der sich zwischen ihr und einer fixierten festen Phase einstellt. Obwohl in zahlreichen Veröffentlichungen die verschiedensten Erscheinungen, Störungen und Abweichungen als „Endosmotischer Effekt“ beschrieben werden, ist sowohl aus theoretischen Erwägungen wie auch nach unseren experimentellen Ergebnissen eine meßbare Endosmose bei der Elektrophorese mit großer Wahrscheinlichkeit auszuschließen.

Verwendete Apparatur. Die angefeuchteten Filterpapierstreifen liegen zwischen zwei Glasplatten auf und werden durch Kühlung während der gesamten Versuchsdauer auf konstanter Temperatur gehalten. Die Kühlung erfolgt über eine Metallwanne, die mit Gummidichtungen an der unteren Glasplatte anliegt. Das Anpressen erfolgt durch das Durchsaugen des Kühlwassers. Im Gegensatz zu *H. Michl*⁵ ist bei den angewandten hohen Spannungen ein geschlossener Metallkühler mit Lackabdeckung gegen den leitenden Papierstreifen nicht mehr möglich¹¹.

Die Verbindung zwischen dem Meßstreifen und den Lösungsgefäßen erfolgt durch getränktes Filterpapier, das zwischen zwei Glasplatten von dem waagrecht liegenden Meßtisch senkrecht nach unten geführt wird.

An den Enden der zur Wanderungsmessung benützten Papierfläche legt man flache Graphitstäbe unter das feuchte Papier (zur Vermeidung von Verdunstung müssen diese Stellen durch gesonderte Glasplättchen

¹¹ Herrn Dr. *H. Michl* sind wir für wertvolle Ratschläge zu Beginn unserer Arbeiten zu besonderem Dank verpflichtet.

oder mit einer angefeuchteten Cellophanmembrane überdeckt werden). Diese Stäbe bewirken eine Homogenisierung des elektrischen Feldes und können gleichzeitig durch Anschluß an ein Hochspannungsvoltmeter als Meßsonden benützt werden. Eine Skizze der verwendeten Apparatur folgt in der nächsten Mitteilung.

Wenn man die hier erörterten Fehlerquellen so weit als möglich ausschaltet, lassen sich Meßergebnisse erhalten, die keine größere Streuung zeigen, als die der Papierchromatographie.

Wir haben, auf die obigen Überlegungen aufbauend, versucht, zunächst Carbonsäuren, Sulfosäuren und stark saure Phenole zu trennen. Aus Gründen, die in der folgenden Mitteilung¹² erörtert werden sollen, verwenden wir zu diesem Zweck eine saure Grundlösung. Da die getrennten Säuren bzw. gewanderten Säureanionen am einfachsten mit Hilfe eines Indikators (Nachweis der H-Ionen) am Papier sichtbar gemacht werden, muß die überschüssige Säure der Grundlösung völlig entfernbar sein, so daß zunächst nur eine flüchtige Säure, wie Ameisen- oder Essigsäure, in Frage kommt. Über eine andere Nachweismöglichkeit in einer anderen Grundlösung werden wir gesondert berichten.

Es wurde eine größere Zahl organischer Säuren untersucht, wobei sich, wie von uns erwartet, gezeigt hat, daß die Wanderungsweiten weniger von den Ionenbeweglichkeiten als vom Dissoziationsgrad abhängig sind. Eine genaue Beschreibung der Methodik und die erhaltenen Meßergebnisse nebst ihrer Deutung werden in der folgenden Mitteilung¹² gegeben werden.

¹² H. *Berbalk* und O. *Schier*, *Mh. Chem.*, im Druck.