

Die Papierelektrophorese

Methoden und Ergebnisse

Von CH. WUNDERLY

Medizinische Universitätsklinik, Zürich

I. Einleitung

Da in den Körperflüssigkeiten stets Gemische von Proteinen vorliegen, mußte es für die biologischen Wissenschaften von größter Wichtigkeit werden, als TISELIUS¹ (1937) mit der Elektrophorese eine Methode angab, welche es gestattete, die einzelnen Komponenten quantitativ zu analysieren. Dabei stützt sich die Trennung der Proteinfractionen auf ihre verschiedene Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld. In der Folge ist die Methode insbesondere für die Grundlagenforschung der inneren Medizin ein wertvolles Hilfsmittel geworden, da ihre Ergebnisse wesentlich genauer waren als die bisher üblichen Aussalzungsverfahren (vgl. WUHRMANN-WUNDERLY², ANTWEILER³). In der Ausführungsform, wie sie ihr TISELIUS, Philpott⁴ und SVENSSON⁵ gegeben haben, blieb die Elektrophorese stets eine rein wissenschaftliche Methode, deren Anwendung den großen Kliniken oder theoretischen Instituten vorbehalten war. Die Ergebnisse weckten jedoch ein ständig größeres Interesse an Eiweißproblemen, und es wurde der Wunsch nach einer einfacheren Technik ganz allgemein.

Die ersten Versuche in dieser Richtung behielten die Refraktionsmessungen auf Grund des TOEPLERSchen Schlierenprinzips, jedoch versuchten sie durch rationale Führung des lichtoptischen Strahlenganges die Apparatur zu vereinfachen (MOORE und WHITE⁶, 1948; MÜLLER⁷, 1950); einen geringeren Serumverbrauch und kürzere Analysendauer brachte die Apparatur von ANTWEILER⁸ sowie die interferometrisch messende Anordnung von LABHART und STAUB⁹ mit LOTMAR¹⁰ (1949). Die entscheidenden Vorarbeiten für die Papierelektrophorese kamen indessen von anderer Seite. Während

die optischen Meßmethoden stets die Trennung des Proteingemisches in homogener Lösung durchführen, haben v. KLOBUSITZKY und KÖNIG¹¹ (1939) Farbstoffgemische getrennt auf Filterpapier, welches mit Pufferlösung befeuchtet und von einem Gleichstrom durchflossen war. Jedoch wurde damals nicht nur Papier, sondern auch Glaswolle (COOLIDGE¹²), feingesiebte Glasperlen (SVENSSON und BRATTSSEN¹³), Asbestfasern (BUTLER und STEPHEN¹⁴), Silikagel (CONSDEN, GORDON und MARTIN¹⁵) und Agar (PENISTON, AGAR und MCCARTHY¹⁶; GORDON et al.¹⁷; GORDON und REICHARD¹⁸) als Trägermedium in Vorschlag gebracht. Etwa gleichzeitig berichteten HAUGAARD und KRÖNER¹⁹ (1948), WIELAND²⁰ (1948) sowie BISERTE²¹ (1950) über die zweidimensionale Papierchromatographie von Aminosäure- und Peptidgemischen unter Zuhilfenahme von Gleichstrom. Hier war die entscheidende Kombination von Papierchromatographie und Elektrophorese geschaffen worden. Es ist das Verdienst von DURRUM²² (1950), TURBA und ENENKEL²³ (1950) sowie von CREMER und TISELIUS²⁴ (1950), das Verfahren alsbald auf Proteine angewandt zu haben. Damit war der Weg vorgezeichnet zu einer Entwicklung der Papierelektrophorese, die ebenso nutzbringend und vielfältig zu werden verspricht wie jene der Papierchromatographie. Da bereits Arbeiten vorliegen aus den verschiedensten Stoffgruppen, war eine Übersicht angezeigt, um die bedeutenden Möglichkeiten dieser neuen Mikromethode für die Naturwissenschaften aufzuzeigen.

¹ v. KLOBUSITZKY und P. KÖNIG, *Nannyn-Schmidberg's Arch. exp. Pathol-Pharmacol.* 192, 271 (1939).

² T. B. COOLIDGE, *J. Biol. Chem.* 127, 551 (1939).

³ H. SVENSSON und L. BRATTSSEN, *Ark. Kemi* 1, 401 (1949/50).

⁴ J. A. BUTLER und J. M. STEPHEN, *Nature* 160, 469 (1947).

⁵ R. CONSDEN, A. GORDON und A. MARTIN, *Biochem. J.* 40, 33 (1946), 46, 10 (1950).

⁶ Q. PENISTON, H. AGAR und J. MCCARTHY, *Anal. Chem.* 23, 994 (1951).

⁷ A. GORDON, B. KEIL, K. SEBESTA, O. KNESSL und F. SOHM, *Czech. Chem. Comm. Coll.* XV, 1 (1950).

⁸ A. GORDON und P. REICHARD, *Biochem. J.* 48, 569 (1951).

⁹ G. HAUGAARD und T. KRÖNER, *J. Amer. Chem. Soc.* 70, 2135 (1948).

¹⁰ T. WIELAND, *Angew. Chemie* 60, 313 (1948); F. FISCHER, *Naturwiss.* 35, 29 (1948).

¹¹ E. BISERTE, *Biochim. Biophysic. Acta* 4, 416 (1950).

¹² E. L. DURRUM, *J. Amer. Chem. Soc.* 72, 2943 (1950).

¹³ F. TURBA und H. ENENKEL, *Naturwiss.* 37, 93 (1950).

¹⁴ D. CREMER und A. TISELIUS, *Biochem. Z.* 320, 273 (1950).

¹ A. TISELIUS, *Trans. Faraday Soc.* 33, 524 (1937).

² F. WUHRMANN, und CH. WUNDERLY, *Die Bluteiweißkörper des Menschen*, 2. Auflage, Basel 1952.

³ H. J. ANTWEILER, *Die quantitative Elektrophorese in der Medizin*, Berlin 1952.

⁴ Philpott J. St. *Nature* 141, 283 (1938).

⁵ H. SVENSSON, *Kolloid-Z.* 87, 181 (1939), 90, 141 (1940).

⁶ D. H. MOORE und J. U. WHITE, *Rev. Sci. Instr.* 19, 700 (1948).

⁷ R. H. MÜLLER, *Anal. Chem.* 22, 70 (1950).

⁸ H. J. ANTWEILER, *Ref. Angew. Chem.* 59, 33 (1947); *Kolloid-Z.* 115, 130 (1949), 117, 110 (1950).

⁹ H. LABHART und H. STAUB, *Helv. Chim. Acta* 30, 1954 (1947).

¹⁰ W. LOTMAR, *Helv. Chim. Acta* 32, 1847 (1949).

II. Methoden

a) In feuchter Kammer

Bereits DURRUM^{25, 26} (1950) und etwa gleichzeitig TURBA und ENENKEL²⁶ hatten erkannt, daß es notwendig ist, den mit Pufferlösung befeuchteten Filterpapierstreifen, in welchem das Protein während des Stromdurchganges wandert, in einem geschlossenen System frei aufzuspannen; damit wurde ein Antrocknen verhindert und ebenso durch Stauung verursachte Unregelmäßigkeiten an Stellen, wo das Papier aufliegt. Weiter war darauf Bedacht zu nehmen, daß das Filterpapier in feuchtem Zustande nur eine geringe Zerreißeigenschaft besitzt²⁷ und daß während der Elektrophorese erhebliche Elektrolytverschiebungen auftreten, welche pH-Änderungen zur Folge haben. Diesen verschiedenen Faktoren trägt die untenstehende mit Laboratoriumsmitteln aufgebaute Anordnung von MACHEBŒUF et al.²⁸ (1951) gut Rechnung.

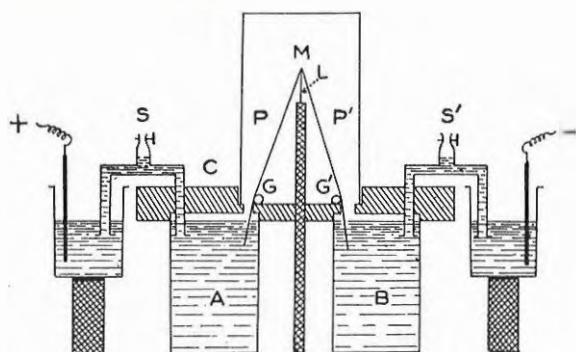


Abb. 1. Schema der Papierelektrophorese in feuchter Kammer nach MACHEBŒUF, REBEYROTTE und BRUNERIE²⁸ (1951). $P P'$ der Papierstreifen, wie er über der Glaskante L gefaltet ist und am Punkte M die Proteinlösung enthält. A und B Gefäße mit Pufferlösung. C Hohlleitenaufsatz, der die beiden Heber S und S' eingelassen hat. Rechts Anode, links Kathode aus Kohle. Über dem Papier die Glocke aus Glas oder Celluloid

Um eine gute Differenzierung zu erlangen, ist die Qualität des Papiers, als Trägermedium, von besonderer Wichtigkeit. Eine dichte Textur ist einer losen vorzuziehen; durch das langsamere Vorfließen der Front bleibt der einzelne Proteinfleck enger umschrieben, schärfer konturiert und eignet sich deshalb, nach stattgehabter Färbung, besser zur quantitativen Auswertung. Das zumeist benutzte Papier ist Whatman Nr. 1 und 2, neuerdings auch die extra dicke Qualität 3MM; in Schweden wird das Munktell-Papier Nr. 20/150 (Cryeksho, Schweden) viel benutzt^{29, 30, 31}; seine ausgezeichnete Eignung

²⁵ E. L. DURRUM, J. Amer. Chem. Soc. 73, 4875 (1951); Science 113, 66 (1951); J. Coll. Sci. 6, 274 (1951).

²⁶ F. TURBA und H. J. ENENKEL, Naturwiss. 37, 93 (1950).

²⁷ Vgl. C. T. MILLS und F. E. SMITH, Biochem. J. 49, Proc. VI (1951).

²⁸ M. MACHEBŒUF, P. REBEYROTTE und M. BRUNERIE, Bull. Soc. Chim. Biol. 33, 1543 (1951).

²⁹ I. BRATTSTEN und I. NILSSON, Ark. Kem. Mineral. Geol. 3, 337 (1951).

³⁰ G. SCHNEIDER, Acta Chem. Scand. 5, 1020 (1951).

³¹ H. KUNDEL und A. TISELIUS, J. Gen. Physiol. 35, 49 (1951).

wird von BLOCK³² hervorgehoben und kann durch eigenen, jahrelangen Gebrauch bestätigt werden; in Deutschland wird von Schleicher & Schüll das Papier Nr. 2043a sowie jenes von Macherey, Nagel & Co., Nr. 819 verwendet. Neben einer dichten Textur ist eine der Hauptanforderungen, daß das Papier kein Protein adsorbiert. Das Aufbringen der gelösten Substanzen, die analysiert werden sollen, geschieht aus einer Mikropipette mit Hundertstelteilung; die Flüssigkeit wird als möglichst dünner Querstrich von 3–4 cm Länge aufgebracht, der vom Rand des Papierstreifens mindestens 5 mm entfernt bleiben muß, sonst sind Randverzerrungen unvermeidlich. Von Blutserum wird 0,015 bis 0,020 cm³ aufgetragen; MACHEBŒUF²⁸ empfiehlt die vorherige Verdünnung des Serums, 1 : 1 mit NaCl physiol.; die optimale Proteinmenge liegt bei 1–2 mg. Stets wird auf mittlerer Höhe des Papierstreifens quer aufgetragen, somit an der Stelle, welche in der Apparatur auf die Glaskante L zu liegen kommt. Um Strömungsanomalien zu vermeiden, ist es notwendig, daß diese Glaskante genau horizontal gelagert ist. Nach dem Auftragen und kurzem Antrocknen wird der Papierstreifen so durch die Pufferlösung gezogen, daß er gleichmäßig befeuchtet ist. Überflüssige Pufferlösung wird mit einem Glasstab vom Papierstreifen abgestrichen oder durch kurzes Auflegen auf trockenes Filterpapier abgetupft, denn ein Fließen der Pufferlösung könnte den aufgetragenen Strich verzerren. Nun wird der Papierstreifen so aufgelegt, daß er gleichmäßig in die Gefäße A und B hinabreicht. Diese Gefäße sind genau gleichhoch angefüllt mit Veronal/Natriumacetat-Puffer von der Ionenstärke $\mu = 0,1$ und pH 8,6; dazu werden 29,34 g Veronal-Natrium, 19,42 g Na-Acetat, 3 H₂O und 180 cm³ n/10 HCl auf 3 l gelöst. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, ist es zweckmäßig, den Puffer jedesmal zu erneuern. Soll die Elektrophorese bei pH 6,4 vorgenommen werden, so dient 0,033-

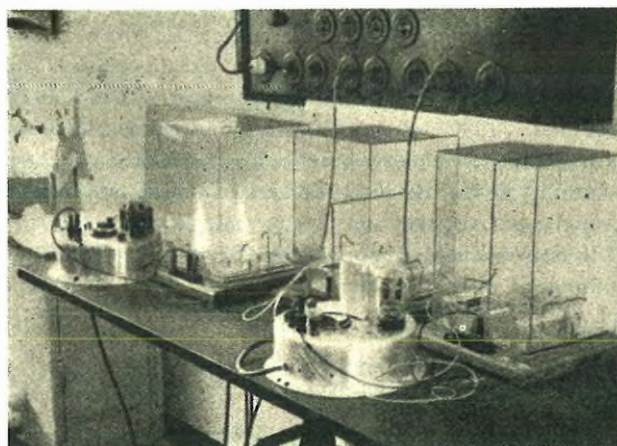


Abb. 2. Einige Apparate in der von uns entwickelten Ausführung für die Papierelektrophorese in feuchter Kammer. Vorn das Netzanschlußgerät mit der Gleichrichterröhre und dem Milliamperemeter (aus WUNDERLY, SCHNEIDER und HUGENTOBLE³³, 1951)

³² R. BLOCK, Paper Chromatography, New York 1952, S. 76.

³³ CH. WUNDERLY, G. SCHNEIDER und F. HUGENTOBLE, C. R. 3, Congrès International et Européen d'Hématologie, Rome 1951.

Tab. 1

Autor	Papier	Abmessungen des Papier- streifens cm	Potential- differenz Volt	Strom- stärke mA	Dauer Std.	Länge der größten Wegstrecke cm
DURRUM ²²	Whatman 2	1 × 32	220–320	0,5	3	ca. 3,5
MACHEBOEUF et al. ²⁸	Whatman 1 und 2	6 × 32	320–340	3	6	16–18
FLYNN und DE MAYO ³⁴	Whatman 1 und 3MM	6 × 36	120	1,5	20	16–18
WUNDERLY, SCHNEIDER und HUGENTOBLE ³³	Munktell 20/150	7 × 40	135 *	6–7	9	8–9
GRASSMANN und HANNIG ³⁵	Whatman 1	4 × 40	110	4	14	9–10

* Der am Papierstreifen wirksame Spannungsabfall beträgt 95 Volt

mol-SERRENSSEN-Phosphat-Puffer und für pH 3,7 der 0,1-mol-Na-Acetat/Essigsäure-Puffer.

Nachdem der oder die Papierstreifen richtig aufliegen, wird die Glocke aus Plexiglas aufgesetzt, die beiden Heber *S* und *S'*, welche mit Filterpapierschneitzel vollgestopft sind, durch Anlegen von etwas Unterdruck mit Pufferlösung vollgesaugt und die Elektroden eingehängt. Diese sind zumeist aus Kohle oder Platin.

Wird nun Gleichstrom eingeschaltet so entscheidet der Spannungsabfall pro Zentimeter Wegstrecke auf dem Papier über die von der aufgetragenen Substanz pro Zeiteinheit zurückgelegte Distanz. Dabei ist die Stromdichte nach oben begrenzt durch die ungünstigen Folgen einer im Papierstreifen entwickelten Wärme. Tab. 1 gibt eine Übersicht dieser Abhängigkeit bei den verschiedenen Ausführungen in feuchter Kammer, wenn Serumprotein analysiert wird.

Da Unregelmäßigkeiten auf Grund von Verdunstung durch die Temperatur eines beheizten Raumes gefördert werden, ist die Ausführung der Papierelektrophorese im kühlen Raume vorzuziehen. Nach Beendigung der Papierelektrophorese werden die Papierstreifen vorsichtig herausgehoben und, im Wärmeschrank hängend, während 10 Minuten bei 100° getrocknet. Die anschließende Färbung wird unter *d* besprochen.

Schließlich sei noch jene Apparatur erwähnt, welche seit Jahresfrist kommerziell* hergestellt wird und bereits in zahlreichen Kliniken und Instituten Eingang gefunden hat. Die methodischen Vorarbeiten leisteten GRASSMANN und HANNIG^{35, 36, 37, 38}, während KNEDEL über die klinische Anwendbarkeit berichtete.

Wie Abb. 3 der Elektrophoresekammer zeigt, wird der feuchte Filterpapierstreifen *F* so über die flachen Teile der Brücke *R* gelegt, daß er durch Adhäsion in

seiner Lage gehalten wird. In den beiden äußeren Kammeranteilen befinden sich die Platinelektroden *E*₁ und *E*₂; sie tauchen in ein Labyrinthsystem, das eine Sicherung bietet gegen Elektrolytverschiebungen. Während des

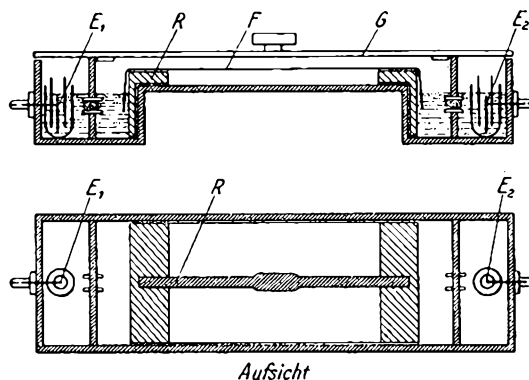


Abb. 3. Elektrophoresekammer nach GRASSMANN und HANNIG³⁵. G Glasdeckel; *E*₁ und *E*₂ Elektroden; *F* Filterpapierstreifen; *R* Kunststoffrahmen

Versuches wird ein Glasdeckel *G* so aufgelegt, daß über dem Raum, wo der Filterpapierstreifen liegt, eine feuchte Kammer entsteht, während in den äußeren Kammeranteilen gebildete gasförmige Elektrolysenprodukte nach außen entweichen können. Die Verbindung der beiden Kammerpaare geschieht durch eingelassene Glasröhrchen, die mit Glaswolle gefüllt sind. Wird Whatman-1-Papier verwendet (zwei Streifen pro Arbeitsgang) und eine Kleinspannung von 110 V angelegt, dann wird am Papierstreifen eine Potentialdifferenz von 80 V wirksam. Die optimale Serummenge beträgt hier 0,005 bis 0,010 cm³, insofern der Proteingehalt des Serums im Bereich von 6,5 bis 8,0 g % liegt.

b) Mit Kühlung

Da CREMER und TISELIUS²⁴ (1950) von Anbeginn höhere Spannungen anlegten, mußten sie dafür sorgen, daß die beim Stromdurchgang erzeugte Wärme gut abgeleitet wird. Lokale Erhitzung konnte Abdunsten der

* Firma Bender & Hobein, München 15.

²⁴ F. FLYNN und P. DE MAYO, *Lancet* 1951, 235.

²⁵ W. GRASSMANN und K. HANNIG, *Z. Physiol. Chem.* 290, 1 (1952).

²⁶ W. GRASSMANN und K. HANNIG, *Naturwiss.* 37, 496 (1950).

²⁷ W. GRASSMANN, *Naturwiss.* 38, 200 (1951).

²⁸ W. GRASSMANN, K. HANNIG und M. KNEDEL, *Dtsch. med. Wschr.* 76, 333 (1951).

Pufferlösung und gar Denaturierung der Proteine zur Folge haben. Die genannten Forscher versenken deshalb den feuchten, zwischen Glasplatten eingelegten Papierstreifen in ein Chlorbenzollbad (s. Abb. 4) und erreichen auf diese Weise eine Kühlung.

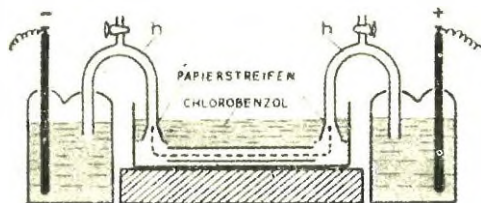


Abb. 4. Schematische Darstellung der Apparatur zur Papierelektrophorese mit Kühlung (aus WUHRMANN-WUNDERLY⁴⁰). *h* die beiden Heber, links und rechts davon die Kohleelektroden, in der Mitte das Chlorbenzollbad

In der Folge wurde die Überführung des Stromes von der Elektrodenflüssigkeit auf die Filterpapierstreifen durch SCHNEIDER³⁰ (1951) verbessert; er legt dazu die Papierstreifen von 40×4 cm Munktell Nr. 20/150 nach Aufbringen von $0,025 \text{ cm}^3$ Serum und Befeuchten mit $0,05 \text{ mol}$ Veronallösung ($102 \text{ g Na-diäthylbarbituricum}$ auf 101 destilliertes Wasser) einzeln zwischen Glasplatten von $25 \times 4,5$ cm. Dabei sollen die markierten Startpunkte, welche sich 10 cm vom kathodischen Ende befinden, genau übereinanderzuliegen kommen. Die Glasplatten werden durch Stablklammern so gegeneinander gepreßt, daß die zwischen Platten und Papierstreifen befindliche Luft verschwindet und das Glasplattenpaket verschiebungssicher fixiert ist (vgl. MITCHL³⁹). Die Papierstreifen ragen beidseitig etwa $2-3 \text{ cm}$ aus dem Paket heraus; diese Papierenden werden nach dem Einlegen in das Chlorbenzollbad so aufgestülpt, daß sie Platz finden in den trichterartig erweiterten Enden der Heber *L* (s. Schema auf Abb. 4 sowie Abb. 5). Nachdem man die beiden Elektrodengefäße entsprechend mit Veronallösung aufgefüllt hat, saugt man aus dem Hebersystem durch den angebrachten Hahn die Luft langsam ab; nun steigen in den Heberarmen (von $15 \text{ mm } \varnothing$) beidseitig die Flüssigkeiten hoch und vereinigen sich am höchsten Punkte des Hebers. Um einen stabilen Kontakt zu erreichen, wird in das Elektrodengefäß soviel Veronallösung nachgefüllt, bis die Papierenden in ihrer ganzen Breite von der Elektrodenflüssigkeit umspült sind. SCHNEIDER³⁰ findet bei drei eingelegten Papierstreifen den Gesamtwiderstand zwischen den Elektroden 73000Ω ; die an den Streifen wirksame Potentialdifferenz beträgt 190 V bei einer Stromstärke von $2,6 \text{ mA}$. Nach einer Versuchsdauer von 14 Stunden beträgt die Wanderungsstrecke des Serumalbumin 14 cm . Die Färbung der Streifen und ihre kolorimetrische Auswertung sind gleich wie bei der Methode in feuchter Kammer (s. unter *d*).

³⁹ H. MITCHL, *Mh. Chem.* **82**, 489, 944 (1951), **83**, 210 (1952).

In der Folge gelang es SCHNEIDER und WUNDERLY⁴⁰ (1952) die Versuchsdauer auf $3-4$ Stunden herabzusetzen und gleichzeitig neun Serumproben aufzutrennen. Es war beabsichtigt, der Papierelektrophorese eine Form zu geben, damit sie als Schnellmethode routinemäßig im klinisch-chemischen Laboratorium angewendet werden kann. Dazu werden auf drei $29 \times 9 \text{ cm}$ große Munktell-Papierstreifen je drei Serumproben von $0,02$ bis $0,03 \text{ cm}^3$ aufgebracht, die Streifen werden mit Veronallösungspuffer von der Ionenstärke $\mu = 0,6$ und $\text{pH } 8,9$ befeuchtet und zwischen $10 \times 15 \text{ cm}$ große Glasplatten eingelegt. Vier Metallklammern halten das Paket dicht gepreßt zusammen (s. Abb. 5). In üblicher Weise wird der Flüssigkeitskontakt hergestellt und an den Kohleelektroden eine Gleichspannung von 300 V angelegt. Bei einer Stromstärke von 20 mA hat sich das Serumprotein nach $3 \frac{1}{2}$ Stunden Versuchsdauer auf einer Wegstrecke von 10 cm in seine Hauptfraktionen aufgetrennt.



Abb. 5. Apparatur für Papierelektrophorese mit Kühlung nach SCHNEIDER und WUNDERLY⁴⁰. Vorn Netzanschlußgerät, dahinter das Chlorbenzollbad mit den beiden Elektrodengefäßen

Wie die Erfahrung zeigt, ist die Fertigstellung des Plattenpaketes, zu welcher einige Übung erforderlich ist, ziemlich zeitraubend; ebenso will die Auftrennung in die Globulinunterfraktionen α_1 und α_2 nicht sauber gelingen. Diese Nachteile überwiegen den Vorzug der kurzen Elektrophoresedauer, so daß die Methode mit Kühlung ziemlich allgemein aufgegeben wurde. Selbst in Schweden berichten neuerdings KOIW, WALLENIUS und GRÖNWALL⁴¹ (1952) über eine Apparatur mit feuchter Kammer, wo die Papierstreifen waagrecht zwischen Glasplatten eingeklemmt sind, ohne diese zu berühren.

c) Für präparative Zwecke

Von den Arbeiten, welche zum Ziele hatten, die klassische Elektrophorese für präparative Proteintrennung

⁴⁰ G. SCHNEIDER und CH. WUNDERLY, *Schweiz. med. Wschr.* **82**, 445 (1952).

⁴¹ E. KOIW, G. WALLENIUS und A. GRÖNWALL, *Scand. J. Clin. Lab. Inv.* **4**, 47 (1952).

gen heranzuziehen, sind jene von MACHEBŒUF⁴² (1941) und SVENSSON⁴³ (1942, 1946) am bekanntesten geworden. Mit dem Aufkommen der Papiermethoden haben GRASSMANN und HANNIC⁴⁴ (1950) ein Verfahren beschrieben, wo das Proteinsol kontinuierlich in eine langsam fließende Pufferlösung einströmt; die Pufferlösung bewegt sich, der Schwerkraft gehorchend, längs einem senkrecht gestellten, extra dicken Filterpapier von oben nach unten; das quadratisch geschnittene Filterpapier (Macherey, Nagel & Co. Nr. 819; Schleicher & Schüll Nr. 589 g oder

von Puffer und gelöster Substanz, so wie es nach Durchfließen der Papierlänge von oben nach unten hingelangt; während dieser Fließbewegung werden die elektrisch geladenen Teilchen je nach ihrem Ladungssinn gegen Anode oder Kathode abgelenkt und trennen sich dementsprechend von elektrisch neutralen Teilchen, die einfach der Strömungsrichtung der Pufferlösung folgen. Die einzelnen Bahnen der getrennten Komponenten lassen sich mit den Färbemethoden der Chromatographie leicht sichtbar machen.

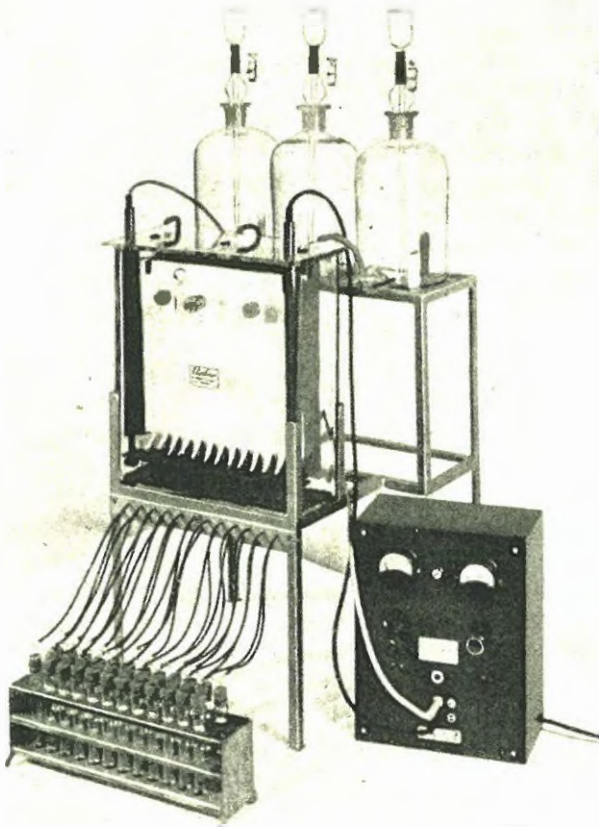


Abb. 6. «Elphor V»-Apparatur nach W. GRASSMANN und K. HANNIC

602 h) ist längs beider Seiten zwischen Platinelektroden eingespannt. An die letzteren wird eine Gleichspannung von 110 V angelegt, wobei eine Stromstärke von 20–30 mA registriert wird. Papier und Elektroden sind in einem Glasgefäß aufgehängt, dessen Abmessungen 200 × 26 × 7 cm betragen und welches gleichzeitig als feuchte Kammer dient. Auf Abb. 6 ist die Apparatur abgebildet, wie sie auf Grund dieser Vorarbeiten geschaffen wurde und unter der Bezeichnung «Elphor V» zum Verkauf gelangt*.

Es ist gut sichtbar, wie am unteren Rande das aufgespannte Filterpapier in etwa zwei Dutzend Spitzen ausmündet. Diesen entlang tropft das Flüssigkeitsgemisch

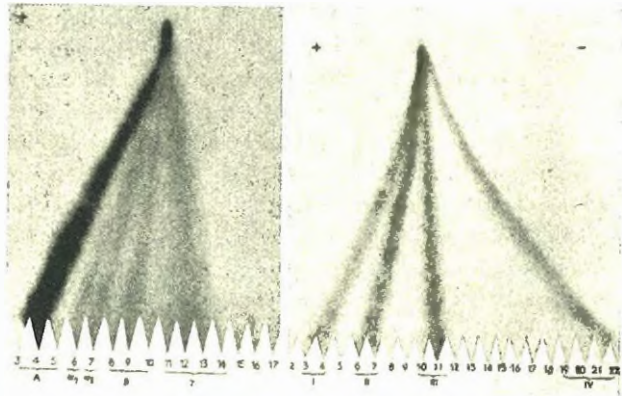


Abb. 7. Links: Strömungsbild während der Auftrennung von Serum im «Elphor V»-Apparat (Amidoschwarz-Färbung). Rechts: Trennung von Aminosäuren (Ninhydrin-Färbung)

Durch geeignete Variation des Puffer-pH, ferner der Konzentration von Puffer und Substanzgemisch läßt sich diejenige Trennung herbeiführen, wie sie für die betreffende Stoffmischung optimal ist. Da die Trennung kontinuierlich erfolgt, sollte die Ausbeute genügen, um die Komponenten auch chemisch analysieren zu können. Für eigentliche mikroanalytische Methoden, wie Papierchromatographie, Ultravioletabsorption, serologische Methoden, genügt schon die Ausbeute, wie sie in unserer Apparatur (s. Abb. 2) erzielt werden kann, wenn man 58 × 7 cm große Papierstreifen von extra dickem Munktell Nr. 20/350 verwendet und je 0,4 cm³ Serum aufbringt. Der fertig beschickte Apparat wird alsbald in eine Tiefkühltruhe gestellt, welche auf +2°C eingestellt ist; diese leitet sogleich die JOULEsche Wärme ab und bedingt eine feuchte Atmosphäre (die Plexiglasglocke ist hier überflüssig). Wenn an den Papierstreifen eine Potentialdifferenz von 285 V wirksam ist, bei einer Stromstärke von 13–15 mA, so ist die Auftrennung nach 24 Stunden vollkommen. Eine einfache Vorrichtung gestattet das Absaugen der Pufferlösung und ihre Erneuerung aus Abfüllbüretten (vgl. die Abbildung in WUNDERLY⁴⁵). Nach vollendeter Papierelktrophorese wird ein kleiner Längsstreifen von einem der Papiere abgeschnitten und gefärbt, dadurch gibt sich die genaue Position der Unterfraktion zu erkennen; nun werden entsprechend die noch feuchten, ungefärbten Papierhanden quer geschnitten, das Protein mit NaCl physiol.

* Dr. Bender & Dr. Hobein, Zürich 6.

⁴² M. MACHEBŒUF, C. R. Soc. Biol. 135, 1241 (1941).

⁴³ H. SVENSSON, Ark. Kem. Mineral. Geol. 15 B, 19, 17 A, 5, 22 A, 10.

⁴⁴ W. GRASSMANN und K. HANNIC, Naturwiss. 37, 397 (1950).

⁴⁵ CH. WUNDERLY, Ann. Biochim. Méd. XIV, 173–87 (1952).

eluiert und gegen Wasser dialysiert. Wir erhalten auf diese Weise bei der Papierelektrophorese eines normalen Serums aus den zwei Streifen eines Arbeitsganges: 27 mg Albumin, 1,8 mg α_1 -Globulin, 3,2 mg α_2 -Globulin, 5 mg β -Globulin und 7,4 mg γ -Globulin. Für ein zweidimensionales Papierchromatogramm genügt das Hydrolysat von 160 γ Protein; wir haben auf diesem Wege die Aminosäurebausteine von Serumalbumin dargestellt (HUGENTOBLER, WUNDERLY und SCHNEIDER⁴⁶, 1951). HARTMANN und MÜLLER⁴⁷ (1952) verwenden zur präparativen Papierelektrophorese 50 × 15 cm große Streifen eines 2 mm dicken Spezialpapieres von Schleicher & Schüll Nr. 2071; es können darauf 2–3 cm³ Serum innert 24 Stunden auf 12 cm aufgetrennt werden, bei 110 V und 1–5 mA; die Lage der isolierten Fraktionen wird an den Rändern mit Ninhydrin sichtbar gemacht. KUNKEL und SLATER⁴⁸ richten sich ein Filterstreifenpaket aus drei bis neun Streifen 35 × 10 cm vom extra dicken Whatman-Papier Nr. 3 MM; es gelangen 3–5 cm³ Serum zur Auftrennung; die Filterpapiere bilden einen feuchten Block zwischen zwei Glasplatten mit Metallklammern; um Verdunstung zu vermeiden, werden die Seiten mit Silikonfett verstrichen. Die Ausbeute dürfte noch gesteigert werden durch die Entwicklung von Spezialpapieren, wobei an die dicken Whatman-Papiere Nr. 3 und Nr. 100 erinnert sei, da hier die Fließgeschwindigkeit von oben nach unten wie von links nach rechts dieselbe ist (keine bevorzugte Richtung durch Walzenzug).

Die präparative kontinuierliche Papierelektrophorese steht noch ganz in ihren Anfängen, jedoch erscheinen die Möglichkeiten ausgezeichnet, da eine vollständige Trennung der Komponenten erreicht wird, während bei der klassischen Elektrophorese die Proteingradienten stets überlappen; ebenso ist die Variationsbreite der aufgetragenen Substanzmenge wesentlich größer.

d) Färbung und Auswertung

Die Färbung der kurz bei 100° getrockneten Papierstreifen geschieht unabhängig von der vorausgegangenen Elektrophoretetechnik. Da bisher das Hauptanwendungsgebiet der Papierelektrophorese in der Trennung von Proteingemischen bestand, wird hier auf deren Färbung eingegangen, während diejenige der übrigen Stoffgruppen unter den betreffenden Ergebnissen erfolgt.

1. *Azokarmin B*. Die trockenen Papierstreifen werden nach der Vorschrift von TURBA und ENENKEL²³ (1950) für 10 Minuten in eine Mischung von 50% (Volumprozent) Methanol, 10% Essigsäure von 85% und 40% einer gesättigten, wässrigen Lösung von Azokarmin B gelegt. Nachfolgend werden die Streifen erst für 5 Minuten mit Methanol, sodann für weitere 5 Minuten mit

10% Essigsäure gewaschen. Es gelingt in dieser kurzen Zeit, das nichtproteinhaltige Papier reinweiß zu erhalten; ebenso hat sich ergeben, daß Azokarmin B die einzelnen Proteinfractionen gegenüber anderen Farbstoffen am gleichmäßigsten anfärbt, weshalb wir diese Färbung besonders empfehlen (vgl. KÖRVER⁴⁹).

2. *Bromphenolblau*. Nach DURRUM²² werden die Papierstreifen für 5 Minuten in eine gesättigte Lösung von HgCl₂ in Methanol gelegt, das 0,1% Bromphenolblau enthält. Anschließend werden die Papiere für 10 Minuten im fließenden Wasser gewaschen und getrocknet. CREMER und TISELIUS²⁴ tauchen die Papiere zum Auswaschen des überschüssigen Farbstoffes erst in Methanol, das 1% HgCl₂, dann in Äthanol, das 1% HgCl₂ enthält; schließlich wird mit Methanol solange nachgewaschen, bis das Papier weiß erscheint; ein kurzes Durchziehen in Äther erleichtert das Trocknen. KUNKEL und TISELIUS²¹ waschen mit viermal erneuerter Lösung von 0,5% Essigsäure während je 20 Minuten, wobei die Säure die Bromphenolblau/Protein-Bindung wesentlich erhöht; wird anschließend die Elution des Farbstoffes mit 0,01 n-NaOH ausgeführt, so schlägt die gelbe Farbe in Blau um.

3. *Amidoschwarz* (Bezeichnung in England: Naphtalene-Black 12 B 200). Nach GRASSMANN und HANNIC^{26,28} gelangen die Streifen für 10 Minuten in ein ständig leicht bewegtes Färbbad von gesättigter Lösung von Amidoschwarz 10B in Methanol/Eisessig wie 9:1. Das Auswaschen erfolgt in Bädern aus Methanol/Eisessig wie 9:1, die mehrfach innerhalb von etwa 4 Stunden zu wechseln sind. Nach unserer Erfahrung gelingt die Entfärbung von Amidoschwarz nur teilweise, weil die Affinität dieses Farbstoffes zur Cellulosefaser besonders groß ist.

Für die Auswertung der gefärbten und getrockneten Papierstreifen mit den Mitteln des Laboratoriums schneidet man den Streifen quer in 5 mm breite Streifchen; dabei achtet man darauf, daß das erste und das letzte Papierstreifchen keine Proteinfärbung enthält, und gewinnt auf diese Weise zwei Leerwerte. Jedes Streifchen kommt in ein Reagenzglas und wird mit 3 cm³ einer 5%-Sodalösung in 50% Methanol für 2 Stunden überschichtet. Nach beendeter Elution wird im BECKMAN-Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 5950 Å kolorimetriert. Die Extinktionswerte werden in üblicher Form als Kurve aufgetragen; bei Färbung mit Bromphenolblau wird die Extinktion der globulinhaltigen Streifchen – es sind dies im allgemeinen die kathodischen zwei Drittel des gesamten angefärbten Bezirkes – mit dem Korrekturfaktor 1,6 multipliziert; auf diese Weise wird der stärkeren Anfärbung des Albumins Rechnung getragen. Dieselbe wurde von KUNKEL und TISELIUS²¹ für Bromphenolblau gemessen (s. Abb. 8a), von GRASSMANN und HANNIC für Amidoschwarz und von SOMMERFELT⁵⁰ für beide Farbstoffe.

⁴⁶ F. HUGENTOBLER, CH. WUNDERLY und G. SCHNEIDER, *Klin. Wschr.* 29, 705 (1951).

⁴⁷ F. HARTMANN und H. J. MÜLLER, *Naturwiss.* 39, 282 (1952).

⁴⁸ H. KUNKEL und R. J. SLATER, *J. Clin. Invest.* 31, 677 (1952).

⁴⁹ G. KÖRVER, *Klin. Wschr.* 28, 693, (1950).

⁵⁰ S. SOMMERFELT, *Scand. J. Clin. Lab. Inv.* 5, 106 (1953).

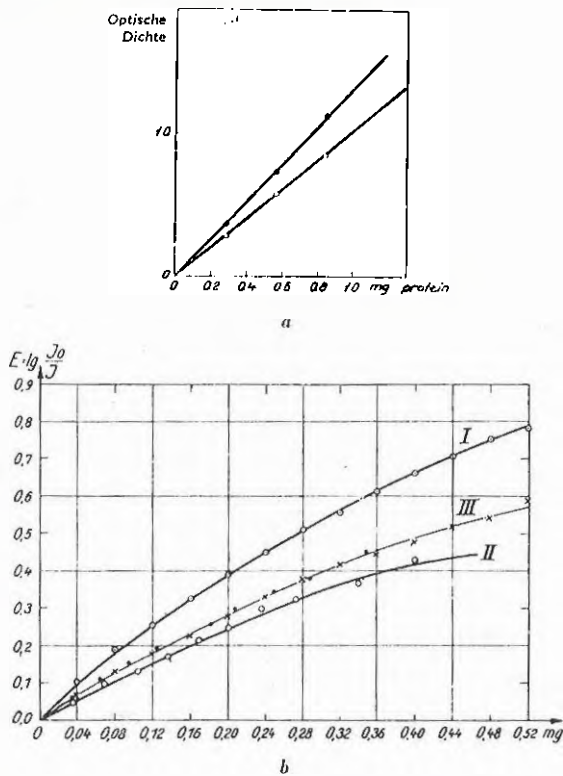


Abb. 8. a) Farbintensität von Albumin* und von γ -Globulin^o mit Bromphenolblau nach KUNKEL und TISELIUS²¹. - b) Farbintensität von Albumin I, β -Globulin II und α -Globulin sowie γ -Globulin III bei Variation der Konzentration der Proteinlösungen von 0,1 bis 1,3 g %, nach GRASSMANN und HANNIG²⁵. Färbung mit Amidosewarz

Wenn hier gezeigt wurde, daß das β -Globulin am schwächsten angefärbt wird, so dürfte dies mit der Lipoidkomponente zusammenhängen, welche einen wesentlichen Teil des β -Globulins ausmacht. Diese Verschiedenheiten der Anfärbung treten noch stärker in Erscheinung, wenn krankheitshalber in ihrer Zusammensetzung stark veränderte Sera ausgemessen werden. KÖIW, WALLENIUS und GRÖNWALL⁴¹ haben zwanzig solche Sera mit Bromphenolblau gefärbt und die jeweiligen Korrekturfaktoren bestimmt; sie finden für die Gesamtglobuline eine Schwankung von 1,1 bis 2,9 (im normalen Serum verhält sich der Färbindex von Albumin zu Globulin wie 1 : 1,6) für α_1 -Globulin 0,9 bis 5,5, für α_2 -Globulin 1,3 bis 4,5, für β -Globulin 1,3 bis 8,1 und für γ -Globulin 1,1 bis 2,0, somit zeigen die lipoidtragenden α - und β -Globuline die größte Variationsbreite. Dies geht auch aus den Faktoren hervor, wie sie ESSER et al.⁵¹ ermittelt haben; sie finden, wenn der Färbindex von Serumalbumin als 1 gesetzt wird, für α_1 den Faktor 2,36, für α_2 2,09, für β 2,20 und für γ -Globulin 1,62. Durch diese unterschiedliche Anfärbbarkeit wird die Auswertung mit einem Unsicherheitsfaktor belastet, und es ist zu wünschen, daß Farbstoffe oder Farbstoffgemische gefunden werden, welche eine gleichmäßigere Anfärbbarkeit der Proteinfractionen erzielen lassen.

⁵¹ H. ESSER, H. HEINZLER, F. KAZMEIER und W. SCHOLTAN, *Ärztl. Forsch.* 6, 1/156 (1952).

Die aus den Extinktionswerten entstandene Kurve kann, nach der auf den photographischen Diagrammen der TISELIUS-Elektrophorese erprobten Methode, planimetrisch ausgewertet werden. Dazu hat sich uns das Kompensationsplanimeter* mit Fahrlupe besonders gut bewährt. Will man auf eine Kurve verzichten, so kann man, gute Auftrennung der einzelnen Fraktionen vorausgesetzt, ganze Fraktionen ausschneiden und ihr Eluat kolorimetrisch messen.

Sodann ist, auf den Arbeiten von GRASSMANN, HANNIG und KNEDEL^{35, 36} basierend, ein Auswertgerät** geschaffen worden, welches die Färbung unmittelbar am Streifen mißt. Dazu werden die trockenen Papierstreifen erst für einige Stunden in eine Transparenzlösung (1 T Bromnaphthalin und 1 T Paraffinöl; Brechungsindex $D = 1,51$) eingelegt. Das durchsichtig gewordene Papier wird blasenfrei zwischen zwei Glasplatten gelegt; diese werden in einen Schlitten eingeschoben, der mit Millimetervorschub über einen Spalt von 1 mm hinweg bewegt wird (Variation der Spaltbreite 1-2-3 und 5 mm)***.

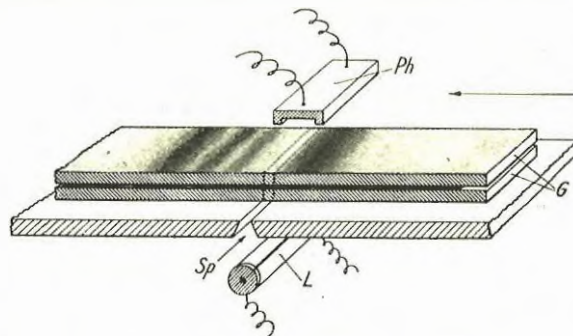


Abb. 9. Anordnung zum Photometrieren nach GRASSMANN und HANNIG³⁵. G Glasplatten; Sp Spult; Ph Photozelle; L Fadenlampe

Diese Spaltblende (Sp) wird durch die Fadenlampe L ausgeleuchtet⁶²⁻⁵⁵. Nur das durch den Papierstreifen tretende Licht gelangt in die Photozelle Ph (vgl. Abb. 8). Die abgelesenen Extinktionen werden als Funktion der Wegstrecke auf Millimeterpapier aufgetragen; die Kurve wird in üblicher Weise mit dem Planimeter ausgewertet. Die Genauigkeit dieser Direktphotometrierung sollte so verbessert werden, daß auch mittelstarke Papiere verwendet werden können. Dies muß gefordert werden, weil die direkte Ausmessung des transparenten Papierstreifens besonders hohe Anforderungen an die elektrophoretische Trennung stellt; denn die Farbfronten müssen über die ganze Spaltlänge möglichst gradlinig verlaufen, wenn eine zuverlässige Messung erfolgen soll; eine solche Fronthildung ist aber mit mittelstarkem Papier von dichter Textur besser gewährleistet. Auch

* Hersteller: Firma A. J. Amsler & Co., Schuffhausen.
 ** Hersteller: Firma Bender & Hubein, München 15; ferner Firma Evans Electroscelenium, Ltd., Harlow, Essex, England.
 *** Hersteller: Firma Kelab A. B., Stockholm (Schweden).
⁶² Vgl. E. KÖIW, *Scand. J. Clin. Lab. Inv.* 5, 99 (1953); sowie H. WEICKER, *Klin. Wschr.* 31, 161 (1953).
⁶³ L. FOSDICK und R. BLACKWELL, *Science* 109, 314 (1949).
⁶⁴ D. CLEGG, *Anal. Chem.* 22, 48 (1950).
⁶⁵ F. EISENREICH und M. EDER, *Klin. Wschr.* 29, 60 (1951).

in Amerika sind Meßgeräte entwickelt worden zur quantitativen, direkten Auswertung von Chromatogrammen; sie werden unter der Bezeichnung «Reflection Densitometer» in den Handel gebracht*.

Eine weitere Möglichkeit zur quantitativen Auswertung bildet die Retentionsanalyse nach WIELAND und WIRTH⁵⁸. Dazu wird das Protein nach der Papierelektrophorese mit Azokarmin B in Methanol und Eisessig gefärbt²³. Durch den sauren Wollfarbstoff werden die sauren Gruppen des Proteins nicht abgesättigt, so daß sie trotz der Färbung mit Kupfer reagieren können, das als Kupferacetat in einer essigsäuren Tetrahydrofuranlösung enthalten ist. Zufolge dieser Reaktion steigt die kupferhaltige Lösung an proteinfreien Flächen rascher hoch als an solchen Stellen des Papiers, wo Protein enthalten ist. Der getrocknete Papierstreifen zeigt nach geeigneter Färbung die kupferhaltigen Stellen graugrün an, wodurch ein Negativ entsteht zum Frontverlauf des Proteins (vgl. CRAMER⁵⁷).

c) Reproduzierbarkeit und Fehlerbreite

Es ist gegeben, die Genauigkeit der Bestimmungen mit Papierelektrophorese in Vergleich zu setzen mit den Erfahrungen, wie sie mit der optisch registrierenden TISELIUS-Apparatur gewonnen wurden. Bei dieser letzteren fand WIEDEMANN⁵⁸ den rein methodischen Fehler bei der von ihm entwickelten Apparatur bei $\pm 0,2\%$, so daß er gegenüber anderen Unstimmigkeiten vernachlässigt werden kann. Der eigentliche systematische Fehler, wie er durch die komplizierten Versuchsbedingungen bedingt ist, liegt wesentlich höher. Auf Grund von zwölf Doppelbestimmungen fand SCHOLTAN⁵⁹ den mittleren Fehler einer Einzelmessung bei $\pm 3\%$. Sodann ist die Messung durch den unterschiedlichen und veränderlichen spezifischen Brechwert der einzelnen Proteinfractionen belastet. ARMSTRONG et al.⁶⁰ sowie PERLMANN und LONGSWORTH⁶¹ haben solche Brechwerte für die Fraktionen des normalen Serums bestimmt und finden Abweichungen, die innerhalb von 5% bleiben. Ferner sind die planimetrisch bestimmten Flächenwerte der *rising* und der *descending boundaries* im Mittel etwa 2% voneinander abweichend (SCHOLTAN⁵⁹), so daß eine Konzentrationsbestimmung mit dieser Unstimmigkeit behaftet ist. Die Reproduzierbarkeit der

* Hersteller: W. M. Welch Mfg. Co., Chicago, Ill.; Research Equipment Corporation, Oakland, California; Photovolt Corporation, 95, Madison Avenue, New York 16.

⁵⁸ TH. WIELAND und E. FISCHER, *Naturwiss.* 35, 29 (1948); TH. WIELAND, E. FISCHER und L. WIRTH, *Z. angew. Chem.* 62, 31, 473 (1950), 63, 171 (1951).

⁵⁷ F. CRAMER, *Papierchromatographie*, 2. Auflage, Weinheim 1953, S. 48.

⁵⁸ E. WIEDEMANN, *Helv. Chim. Acta* 30, 168, 639, 648, 892 (1947), 31, 40, 2037 (1948).

⁵⁹ W. SCHOLTAN, *Ärztl. Forsch.* 6, 4, 145 (1952).

⁶⁰ S. ARMSTRONG, M. BUDKA und K. MORRISON, *J. Amer. Chem. Soc.* 69, 416, (1947).

⁶¹ G. PERLMANN und L. LONGSWORTH, *J. Amer. Chem. Soc.* 70, 272 (1948).

Ergebnisse mit Papierelektrophorese wurde nach der Methode von GRASSMANN und HANNIG³⁶ wie folgt nachgeprüft (normales Blutserum).

Tab. 2

Autoren	Zahl der Bestimmungen	Mittlere Abweichung				
		Albumin	α_1	α_2	β	γ
GRASSMANN und HANNIG ³⁶	78	1,2	0,6	0,7	0,7	1,2
SOMMERFELT ⁵⁰ . .	13	1,6	0,4	0,6	0,5	1,5

Es folgt daraus, daß bei Fraktionen mit geringer Konzentration, wie etwa dem α -Globulin, die Abweichung in Prozenten zum Gehalt doch bis 10% erreicht.

Entsprechend ihrer einfachen Versuchstechnik bietet die Papierelektrophorese für routinemäßige Ausführungen weniger Fehlermöglichkeiten, dagegen erfordert sie als Mikromethode ein genaues Einhalten der Vorschriften. Wie es bei dem verschiedenen Meßvorgang nicht anders zu erwarten ist, haben TISELIUS-Elektrophorese und Papierelektrophorese auch verschiedene Fehlerquellen; es ist deshalb nur bedingt möglich, ihre Ergebnisse miteinander zu vergleichen oder gar die Werte der einen oder anderen Methode als absolut anzusehen. Wenn dies gelegentlich übersehen wird, so dürfte es damit zusammenhängen, daß oft frühe Ergebnisse kritiklos aufgenommen werden, bevor nur die theoretischen Grundlagen der Methode richtig abgeklärt sind. ESSER und Mitarbeiter⁵¹ haben vierundzwanzig Sera mit beiden Elektrophoresemethoden parallel durchgemessen und finden die folgenden mittleren Abweichungen der Relativprozente: Albumin + 2,6; $\alpha_1 \pm 9,4$; $\alpha_2 \pm 8,0$; $\beta \pm 10,0$; $\gamma \pm 4,1$. In einer Arbeit, welche die verschiedensten Dysproteinämien berücksichtigt, haben OTT, HUBER und KÖRVER⁶² die Ergebnisse paralleler Messungen (jedoch mit verschiedenen Puffersystemen bei der Makro- und der Mikroelektrophorese) nach TISELIUS¹, TURDA²³, ANTWEILER⁸, MAJLOOR⁶³ und HOWE⁶⁴ verglichen; Tab. 3 zeigt die mittlere Differenz in Prozenten des Serumeiweißes vom TISELIUS-Wert für vierundzwanzig Seren mit krankheitshalber veränderter Zusammensetzung.

Tab. 3

Methode	Mittlere Differenz vom TISELIUS-Wert				
	Albumin	α_1	α_2	β	γ
ANTWEILER	-0,53	-3,0	-2,5	+0,4	+5,5
TURDA . .	+7,0	-1,1	-2,2	-5,2	+1,2

⁶² H. OTT, H. HUBER und G. KÖRVER, *Klin. Wschr.* 30, 34 (1952).

⁶³ C. L. MAJLOOR, *J. Biol. Chem.* 169, 583 (1947).

⁶⁴ P. HOWE, *J. Biol. Chem.* 49, 93, 109 (1921).

Somit bringen auch hier die lipoidtragenden α - und β -Fraktionen die größte Differenz und werden mit der Papicrnmethode kleiner gefunden als im TISELIUS-Apparat; dafür wird Albumin durchwegs merklich höher gemessen. Ähnliche Erfahrungen brachten die Nachprüfungen durch KUNKEL und TISELIUS³¹, SCHNEIDER³⁰, KÖRW et al.⁴¹ und CASPANI⁶⁵. Zweckmäßiger als der Vergleich von Ergebnissen mit optisch registrierender Methode und Papicrelektrophorese erscheint die Bestimmung der Abweichung vom Normal-Standardwert der betreffenden Methode.

III. Ergebnisse mit Papicrelektrophorese

a) Protein

Obwohl die meistgeübte Analyse von Proteingemischen klinisch-chemischen Zielen dient, soll hier nicht auf die krankheitsbedingten Verschiebungen (vgl. KÖRW, WALLENUS und GRÖNWALL⁶⁶) in der Proteinzusammensetzung von Körperflüssigkeiten eingegangen werden, sondern das Grundsätzliche zur Darstellung gelangen. An der Stromleitung beteiligen sich, gleich wie in der freien Elektrophorese, die freien basischen Gruppen des Proteins, nämlich die ϵ -Aminogruppe des Lysins, die Imidazolgruppe des Histidins sowie die Guanidogruppe des Arginins; ferner auch die freien sauren Gruppen, wie die Carboxylgruppen der Asparaginsäure und Glutamin-

säure. Dagegen schafft das Filterpapier als Trägermedium andere Verhältnisse; so wird bei der Anordnung in feuchter Kammer (s. Abb. 2) das an der Kante oben befindliche Protein etwas gegen die Kathode hinunter bewegt; von dieser elektroosmotisch bedingten Bewegung werden die γ -Globuline erfaßt, was ihre Trennung vom β -Globulin noch verbessert. Als Beispiel für eine gute Auftrennung der Serumproteine bringt Abb. 10 einige Ergebnisse von FLYNN und DE MAYO³⁴.

Hier sind die Farbfronten größtenteils gradlinig in der Querrichtung und ermöglichen dadurch eine fehlerfreie Auswertung; nachdem die Wanderungsrichtung von rechts nach links verläuft, befindet sich außen links das Albumin; dasselbe zeigt im Streifen *d* etwelche Krümmung der Front als Folge des gestörten Stromflusses am Papierrand. Die verschieden starke Ausfärbung der Banden zeigt dem Geübten in einprägsamer Darstellung, in welchen Fraktionen die Konzentrationsverschiebungen hauptsächlich eingetreten sind, wobei stets die visuelle Vergleichsmöglichkeit besteht mit Streifen von Normalserum, das zur Kontrolle parallel mitgelaufen ist. Der geringe Bedarf an Serum gestattet die häufige Wiederholung der Papicrelektrophorese und gibt dadurch einen klaren Gradmesser therapeutischer und prognostischer Abläufe (KAUTSCH et al. und GRIFFITHS⁶⁷) Tab. 4 vereinigt sechs Untersuchungsreihen mit TISELIUS-Apparatur, zwei mit ANTWEILER- und sieben mit Papicrelektrophorese an normalem menschlichem Serum.

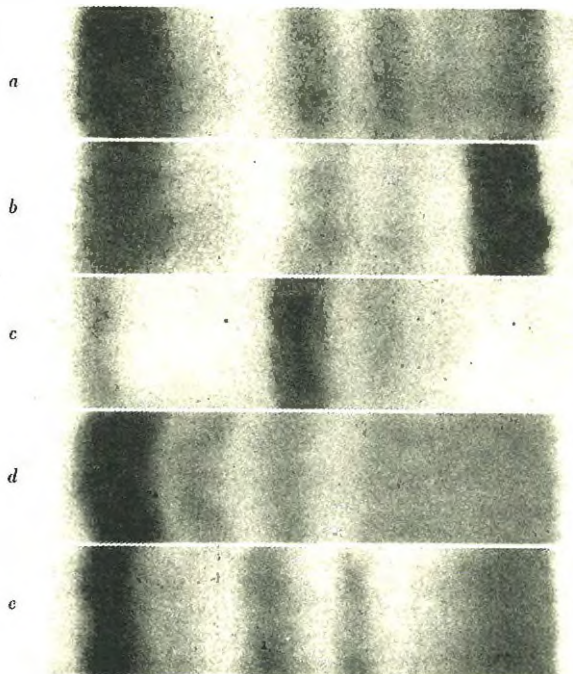


Abb. 10. Aus FLYNN und DE MAYO³⁴ (1951). a normales, menschliches Blutserum; b γ -Myelom; c nephrotisches Syndrom; d Leber-Cirrhose; e Lupus erythematosus

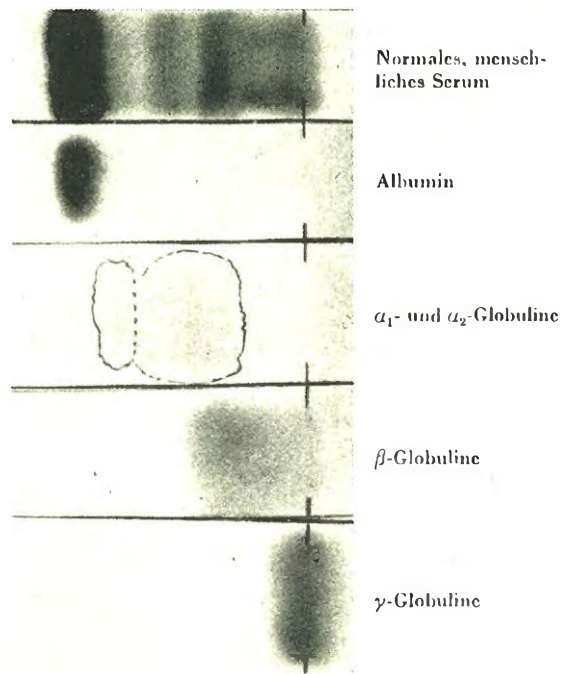


Abb. 11. Prüfung der Einheitlichkeit isolierter Serumproteinfraktionen mittels Papicrelektrophorese (aus WUNDERLY⁶⁸, 1952)

⁶⁵ R. CASPANI, *Progr. Med.* VIII (16), 494 (1952).

⁶⁶ E. KÖRW, G. WALLENUS und A. GRÖNWALL, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 33, 1940 (1951).

⁶⁷ E. KAUTSCH, A. OSWALD und G. HOFMANN, *Münchn. med. Wschr.* 94, 18 (1952); L. L. GRIFFITHS, *J. Lab. Clin. Med.* 41, 188 (1953).

⁶⁸ CH. WUNDERLY, *Nature* 169, 932 (1952).

Tab. 4

Untersucher	Plasma P Serum S	Anzahl Fälle	Alter Jahre	Elektro- phorese- methode	Albu- min	α_1	α_2	β	γ	φ (Fibri- nogen)
SEIBERT und Mitarbeiter ⁶⁹	S	43	18-55	TISELIUS- Philpott- SVENSSON	53,3	8,0	10,4	13,8	14,2	-
RAFSKY, BRILL, STERN und COREY ⁷⁰ (1952)	P	13	3-8		57,7	6,3	10,6	10,3	9,7	5,2
	S + P	30	9-16		58,8	4,9	9,5	12,6	9,5	5,3
	P	15	19-25		60,3	4,6	7,2	12,1	11,0	5,1
	S	80	18-55		56,0	7,2	8,8	13,1	14,7	-
	S	31	65-95		48,6	8,5	10,2	16,7	15,9	-
HARTMANN und SCHUMACHER ⁷¹ (1950) .	S	130		ANTWEILER	63,3	6,0	5,8	13,1	11,5	-
EVERBECK ⁷² (1950)	S	20		»	63,2	9,0		13,7	14,1	-
GRASSMANN und HANNIC ³⁵ (1952)	S	25		Papier	61,3	4,1	8,1	11,0	15,5	-
PLÜCKTHUN und GÖTTING ⁷³ (1951) . . .	S	15		»	59,0	4,2	8,0	10,6	18,2	-
KÖIW, WALLENIUS GRÖNWALL ⁶⁰ (1952) .	S	10		»	72,9	1,4	3,5	8,6	13,6	-
GRAS ⁷⁴ (1952)	S	26		»	66,6	10,1		8,7	14,6	-
CASPANI und BERNASCONI ^{75,76} (1952) . .	S	11		»	62,7	3,9	7,5	10,7	14,9	-
SOMMERFELT ⁵⁰ (1952)	S	13		»	55,4	4,4	8,1	10,0	22,2	-
GOA ⁷⁷ (1952)	S	17		»	59,2	3,8	6,0	11,1	19,6	-
BRANTE ⁷⁸ (1952)	S	39		»	64,9	7,6		11,1	16,4	-

Die Ergebnisse obiger Altersstufung zeigt deutlich, wie erst die Reihenuntersuchung imstande ist, die Zufälligkeit der physiologischen Schwankungsbreite zu überwinden und einen brauchbaren Mittelwert zu liefern. Ebenso geht deutlich hervor, wie die Papierelektrophorese etwas größere Albumingehalte und entsprechend kleinere Globulingehalte vermittelt. Wie eine Reinheitsprüfung isolierter Fraktionen mittels Papierelektrophorese aussieht, zeigt Abb. 11. Hier ist oben das aufgetrennte Normalserum sichtbar, dessen einzelne Fraktionen durch präparative Papierelektrophorese gewonnen wurden (vgl. IIc).

Zahlreich sind schon die Arbeiten, welche aus der Papierelektrophorese Nutzen gezogen haben, um die proteinarmen Körperflüssigkeiten und Punktate zu charakterisieren; so der Liquor cerebrospinalis durch EVERBECK⁷² (1950), SCHNEIDER und WALLENIUS⁸⁰ (1951), CASPANI⁸¹ (1952), WALLENIUS⁸² (1952); BÜCHER et al.⁸³; MIES⁸⁴ (1953); das Kammerwasser des mensch-

lichen Auges durch WITMER⁸⁵ (1951) sowie WUNDERLY und CAGIANUT⁸⁶ (1952); Cantharidenblaseninhalte, Pleurapunktat und Ascites durch JASINSKI et al.⁸⁷ (1953); WUHRMANN⁸⁸ und WÜNSCHE⁸⁹; Ödemflüssigkeit durch WUNDERLY, HÄSSIG und LOTTENBACH⁹⁰; Uroprotein durch SUENDERHAUF und WUNDERLY⁹¹. Eine Übersicht dieser letzteren Arbeiten, wobei die Ergebnisse in Beziehung gebracht wurden zum Permeabilitätsproblem, boten letzthin WUNDERLY und WUHRMANN⁹² (1953). Eine besondere Bedeutung hat sodann die Papierelektrophorese für tierexperimentelle Untersuchungen erlangt. Während früher (TISELIUS-Apparat) stets mehrere Tiere (Ratte, Maus, Meerschweinchen) geopfert werden mußten, um eine einzelne Auftrennung der Serumproteine zu erlangen, genügt es für die Ausführung der Papierelektrophorese, Ratten und Mäusen aus der Schwanzvene, Kaninchen aus der Ohrvene 0,5 cm³ Blut zu entnehmen. Auf diese Weise konnten SCHEIFFARTH und BERG⁹³ (1952) bei der normalen Versuchsratte die fünf Einzelfractionen Albumin / α_1 / α_2 / β / γ -Globulin und beim Kaninchen dazu noch ein β_2 -Globulin regelmäßig erfassen. Diese Anwendung auf die tierexperimentelle Technik hat insbesondere SCHNEIDER⁹⁴ ausgebaut und

⁶⁹ F. SEIBERT, M. SEIBERT, A. ATNO und H. CAMPBELL, J. Clin. Invest. 26, 90 (1947).

⁷⁰ H. RAFSKY, A. BRILL, K. STERN und H. COREY, Am. J. Clin. Scie. 224, 522 (1952).

⁷¹ F. HARTMANN und G. SCHUMACHER, Z. Naturforschg. 5b, 361

⁷² H. EVERBECK, Klin. Wschr. 28, 692 (1950).

⁷³ H. PLÜCKTHUN und H. GÖTTING, Klin. Wschr. 29, 415 (1951).

⁷⁴ J. GRAS, Rev. Espan. Fisiol. 8, 59 (1952)

⁷⁵ R. CASPANI und A. BERNASCONI, Minerva Med. 43 [1], 1289 (1952).

⁷⁶ R. CASPANI, Progr. Med. VIII, 494 (1952).

⁷⁷ J. GOA, Scand. J. Clin. Lab. Inv. 4, 310 (1952).

⁷⁸ G. BRANTE, Scand. J. Clin. Lab. Inv. 4, 293 (1952).

⁸⁰ G. SCHNEIDER und G. WALLENIUS, Scand. J. Clin. Lab. Inv. 3, 145 (1951).

⁸¹ R. CASPANI, Minerva Med. 43, 749, 1346 (1952).

⁸² G. WALLENIUS, Acta Soc. Med. Upsala 57, 314 (1952).

⁸³ TH. BÜCHER, D. MATZELT und D. PETTE, Naturwiss. 39, 114

⁸⁴ H. MIES, Klin. Wschr. 31, 159 (1953).

⁸⁵ R. WITMER, Experimentia VII, 347 (1951).

⁸⁶ CH. WUNDERLY und B. CAGIANUT, Ann. Oculist. 185, 414 (1952).

⁸⁷ B. JASINSKI, G. STIEFEL, H. MÄRKI und F. WUHRMANN, Klin. Wschr. 31, 252 (1953).

⁸⁸ F. WUHRMANN, Schweiz. med. Wschr. 82, 937 (1952).

⁸⁹ H. WÜNSCHE, Klin. Wschr. 31, 170 (1953).

⁹⁰ CH. WUNDERLY, A. HÄSSIG und F. LOTTENBACH, Klin. Wschr. 31, 49 (1953).

⁹¹ H. SUENDERHAUF und CH. WUNDERLY, Gynaecologia 135, 101 (1953).

⁹² CH. WUNDERLY und F. WUHRMANN, Plasma 1, 27 (1953).

⁹³ F. SCHEIFFARTH und G. BERG, Z. exp. Med. 119, 550 (1952).

⁹⁴ G. SCHNEIDER, Virchows Arch. 317, 26 (1949).

zusammen mit LOTTENBACH und WUHRMANN⁹⁵ angewendet zur Beobachtung des Ablaufes experimentell gesetzter Störungen des Eiweißstoffwechsels; dabei konnte den einzelnen Versuchsratten innerhalb von fünf Monaten bis zu achtmal die Zusammensetzung ihres Serumproteins kontrolliert werden.

b) Aminosäuren

Bereits HAUGAARD und KRONER¹⁰ haben 1948 Gemische von zehn Aminosäuren aufgetrennt, indem sie neben der üblichen chromatographischen Anwendung von Phenol einen Gleichstrom von 100–105 V anlegten; das Whatman-Papier Nr. 1 war mit mol/15-Phosphat-Puffer vom pH 6,2 (vgl. GOODALL und LEVI⁹⁶) befeuchtet und wurde vor Gebrauch getrocknet; als Elektroden waren seitlich Ni-Streifen in das Papier eingeflochten. Die beiden negativ geladenen Aminosäuren – Asparagin- und Glutaminsäure – wanderten zur Anode; die basischen Aminosäuren – Lysin und Arginin – zur Kathode, während die neutralen Aminosäuren einen R_f -Wert erhielten, wie ihn die Phenolfront erzeugt.

Diese Stromwirkung, welche hier erstmalig zur Verbesserung des chromatographischen Effektes verwendet wurde, hat später durch McDONALD und Mitarbeiter^{97–99} eine eingehende Bearbeitung erfahren. Die dafür entwickelte Apparatur wird Ionograph genannt; es wurde die Abhängigkeit der Wanderungsgeschwindigkeit von der angelegten Potentialdifferenz, vom pH der Pufferlösung und ihrer Ionenstärke, von Temperatur und Elektroosmose sowie von Adsorption und Papierqualität bestimmt. Auf Abb. 12 sind einige Ionogramme schematisch wiedergegeben.

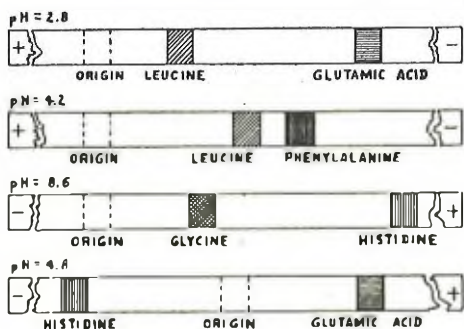


Abb. 12. Schematische Wiedergabe einiger Ionogramme von Aminosäure-Trennungen (aus H. J. McDONALD⁹⁹, 1952)

Um den Einfluß des Papiers als Trägermedium kennenzulernen, wurden sechs verschiedene Papierqualitäten von Eaton & Dickman (Amerika) untersucht; ob-

⁹⁵ G. SCHNEIDER, K. LOTTENBACH und F. WUHRMANN, Z. exp. Med. 118, 377 (1952).

⁹⁶ R. GOODALL und A. LEVI, Nature 158, 675 (1946).

⁹⁷ H. J. McDONALD, M. URBIN und M. WILLIAMSON, J. Coll. Sci. 6, 236 (1951).

⁹⁸ H. J. McDONALD, J. Chem. Educat. 29, 428 (1952).

⁹⁹ H. J. McDONALD, M. URBIN und M. WILLIAMSON, Amer. Chem. Soc. 73, 1893 (1951).

wohl sie verschieden waren in der Dicke, in der Filtrationsgeschwindigkeit, Glätte der Oberfläche und Zerreißfestigkeit in feuchtem Zustand, wurde dieselbe Wanderungsgeschwindigkeit gefunden, zumindest in der Anordnung des frei hängenden Papierstreifens.

c) Lipide

Nachdem im Blutserum Anteile der α - und β -Globuline lipidtragend sind, mußte es eine willkommene Erweiterung der Charakterisierung von Serumbestandteilen bieten, wenn es gelang, mittels Papierelektrophorese neben dem Protein auch die Lipide anzufärben. Hierfür hat SWAHN¹⁰⁰ (1952) eine Methode angegeben, wonach erst auf Whatman-1-Papier die Papierelektrophorese von Serum in der Apparatur von Körw et al.⁴¹ vorgenommen wird; die getrockneten Streifen werden alsbald in einer halbgesättigten Lösung von Sudan-schwarz in 50% Äthanol für 30–45 Minuten gebadet; darauf wird der überschüssige Fettfarbstoff mit 50% Äthanol in 3–4mal gewechselten Bädern herausgelöst.

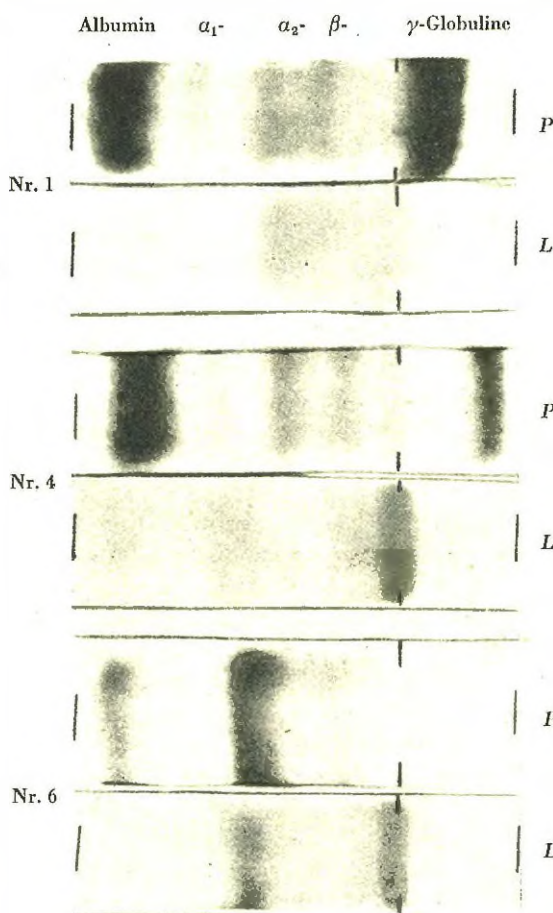


Abb. 13. Vergleich der Ergebnisse von Papierelektrophorese mit Proteinfärbung (Bromphenolblau), mit P bezeichnet, und Lipidfärbung (Cibachlor/Sudanschwartz), mit L bezeichnet. Nr. 1 Serum: γ -Myelom, Nr. 4 Serum: Coma hepaticum, Nr. 6 Serum: Lipoid-Nephrose (aus WUNDERLY, GLOOR und HÄSSIG¹⁰¹, 1953)

¹⁰⁰ B. SWAHN, Scand. J. Clin. Lab. Inv. 4, 98 (1952).

¹⁰¹ CH. WUNDERLY, E. GLOOR und A. HÄSSIG, J. Exp. Path. 34, 81 (1953).

Für die Auswertung werden die trockenen Papiere in 10 mm breite Querstreifen geschnitten und der Farbstoff in Äthanol, welcher 25 % Eisessig enthält, während einer halben bis einer Stunde eluiert. Die Extinktion der Eluate wird auf Wellenlänge 590 m μ gemessen und dient bei der graphischen Darstellung als Ordinate. Die direkte Kolorimetrierung im durchsichtig gemachten Streifen wird ebenso gut befunden. Die Kurven werden im selben Maßstab gezeichnet wie die zugehörige Protein-zusammensetzung und lassen erkennen, welche Fraktionen die eigentlichen Lipoidträgerproteine darstellen. Besonders eindrucklich werden die Verschiebungen in den Gehalten von Protein und Lipoid, wenn krankheits-halber veränderte Sera zur Messung gelangen (MALMROS und SWAHN¹⁰²). Im aufgetrennten Normalserum lassen sich vier Fraktionen von Lipoiden unterscheiden; eine mittelgroße wandert mit dem α_1 -Globulin, eine kleine mit α_2 -Globulin, eine große mit β -Globulin und ein weiterer Anteil verbleibt an der Stelle, wo man das Serum aufgetragen hat; der letztere wird aus Chylomikronen gebildet und besteht größtenteils aus Neutralfett; seine geringe Kolloiddispersion sowie die mangelnden polaren Gruppen erklären die fehlende Beweglichkeit. Auf Abb. 13 ist das gefärbte Neutralfett auf den Streifen Nr. 4 Coma hepaticum und Nr. 6 Lipoid-Nephrose gut sichtbar; es bedeckt in beiden Fällen genau die Auftragsstelle.

Für die Kennzeichnung der Lipide auf Filterpapier haben wir folgende Kombinationsfärbung entwickelt: je 20 mg Sudanschwarz und Cibablau (WUNDERLY und PEZOLD¹⁰³ 1952) werden in 40° warmem Äthanol gelöst und alsbald unter Rühren 40 cm³ 2-%-Sodalösung allmählich zufließen gelassen; es wird warm filtriert und das Filtrat sogleich zum Färben von sechs bis acht Streifen verwendet. Nach 6 Minuten wird abgegossen und durch kaltes, 50-%-Äthanol ersetzt; nach 20 Minuten wird dasselbe durch neues ersetzt und nach 30 Minuten nochmals gewechselt. Zeitweises Schaukeln hilft der Entfärbung von überflüssigem Fettfarbstoff; nach 1 Stunde sind die nicht lipoidhaltigen Teile des Papierstreifens reinweiß. Der Streifen wird in üblicher Weise querschnitten und die Streifen mit 3 cm³ 96-%-Äthanol, das 10 % Eisessig enthält, eluiert. Diese Lösungen werden im BECKMAN-Apparat auf Wellenlänge 595 m μ kolorimetriert. Es bleibt zu prüfen, ob einzelne Lipoidanteile sich stärker anfärben als andere.

Um Ausgangsmengen an Lipoid zu erhalten, welche die quantitative chemische Analyse gestatten, führten KUNKEL und SLATER⁴⁸ die Papierelektrophorese in einem Paket von drei bis neun Papieren Whatman 3MM aus; es gelang mit dieser Anordnung, innerhalb von 24 Stunden im Kühlraum 2–5 cm³ Serum aufzutrennen; aus den einzelnen, herausgeschnittenen Papiersegmenten wurden die Lipide mit Äthanol/Äther-Mischung (3 : 1) herausgelöst und darin Cholesterin, Phospholipide und Gesamtlipide bestimmt.

¹⁰² H. MALMROS und B. SWAHN, Nordisk Med. 48, 1028 (1952).

¹⁰³ CH. WUNDERLY und F. PEZOLD, Naturwiss. 39, 493 (1952).

d) Kohlehydrate

Seit den Arbeiten von PARTRIDGE¹⁰⁵ (1948) und JERMYN¹⁰⁶ (1949) hat sich die Papierchromatographie für die Mikrobestimmung von Kohlehydraten, wenn solche im Gemisch nur in Mengen von 20–40 γ einzeln vorhanden sind, vielfach eingeführt. In gleicher Weise lassen sich auch die Disaccharide trennen, während die Polysaccharide, Hemicellulosen, Cellulose und Stärke erst durch Hydrolyse in n/10 HCl aufgespalten werden müssen. CONSDEN und STANIER¹⁰⁷ (1952) zeigten die elektrophoretische Trennung von Zucker-Borsäure-Estern auf Filterpapierstreifen. MICHEEL und KAMP¹⁰⁸ lassen die Zucker als Borsäurekomplexe auf dem Papier von oben nach unten fließen, während sie gleichzeitig einem horizontalen elektrischen Felde ausgesetzt sind; das Zuckergemisch (Hydrolysat) wird in n/30 Borsäure gelöst und mit Natronlauge auf pH = 9,2 gebracht; es gelingt so, 50–60 mg Zuckergemisch pro Tag in drei- und zwanzig Fraktionen aufzutrennen, die sich durch verschiedene Wanderungsgeschwindigkeit auszeichnen. Zur Analyse der einzelnen Fraktionen werden diese erst mit dem Kationenaustauscher Wofatit 4 vom Na⁺ befreit, im Vakuum eingedampft und durch öfteres Aufnehmen in absolutem Methanol und Abdampfen des Methylrestes die Borsäure entfernt. Darauf werden die einzelnen Zucker, welche in den Fraktionen enthalten sind, in üblicher Weise auf dem Papierchromatogramm identifiziert; dazu dient Butanol/Pyridin/Wasser wie 3 : 1 : 1 als Lösungsmittel sowie Anilinphtalat als Entwickler. Der letztere besteht aus 930 mg Anilin und 1,6 g Phtalsäure, die zu 100 cm³ wassergesättigtem n-Butanol gelöst sind; er ist spezifisch für reduzierende Zucker. JAENICKE¹⁰⁹ verwendet für die Papierelektrophorese von Zuckern und Zuckerderivaten einen Boratpuffer (mol/5-Borsäure + mol/5-KOH wie 1 : 1) vom pH 9,2, er besprüht mit mol/5-AgNO₃-Lösung und legt die Streifen für kurze Zeit in siedendes Wasser; anschließend Fixation der dunkelbraunen Flecken mit Na-Thiosulfat.

Für Ketosen dient Naphtoresorcin/Trichloressigsäure (FORSYTH)¹¹⁰ als Entwickler³². Während obige Kombination von Papierelektrophorese und Papierchromatographie sich für die Analyse von Hydrolysaten eignet, haben PASTERNAK und KENT¹¹¹ die Papierelektrophorese saurer Polysaccharide/Chondroitin-Sulfate, Heparin, synthetische sulfonierte Polysaccharide und ebensolche Polyuramide in Veronal-Natrium-Puffer von 0,06 mol und pH 8,5 durchgeführt; ähnlich wie RIENITS¹¹² färben sie nach erfolgter Auftrennung mit einer Lösung

¹⁰⁵ S. M. PARTRIDGE, Biochem. J. 42, 238, 251 (1948); Nature 164, 443 (1949).

¹⁰⁶ M. JERMYN und F. ISHERWOOD, Biochem. J. 44, 402 (1949).

¹⁰⁷ R. CONSDEN und W. STANIER, Nature 169, 783 (1952).

¹⁰⁸ F. MICHEEL und VAN DE KAMP F., Z. angew. Chem. 64, 607 (1952).

¹⁰⁹ L. JAENICKE, Naturwiss. 39, 86 (1952).

¹¹⁰ W. FORSYTH, Nature 161, 239 (1948).

¹¹¹ C. PASTERNAK und P. KENT, Research 5 [10], 363 (1952).

¹¹² K. G. RIENITS, Biochem. J. 35, 79 (1953).

von 0,08 % Toluidinblau in 3 : 2-Wasser/Äthanol-Mischung. Um die gemessenen Beweglichkeiten an einen bekannten Standard anzugleichen, bestimmen sie die Beweglichkeit des Serumalbumins zu $-6,43 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{sec}/v$; die Beweglichkeit von β -Lactoglobulin wird mit Papierelektrophorese zu $-5,1 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{sec}/v$ gefunden gegenüber $-5,4 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{sec}/v$ bei freier Elektrophorese.

Im Blutserum bestehen die Immunglobuline aus Glykoprotein und ebenso bestehen mehrere der Gerinnungsfaktoren aus Lipoprotein und Glucoprotein; zusammen mit dem Mucoprotein sind die Glucoproteine in allen Fraktionen des Serumproteins vorhanden. Nun sind weder die chemische Bindung an das Protein noch die Funktion dieser Kohlehydrate bekannt; die neue Methode von KÖIW und GRÖNWALL¹¹³ gestattet indes, die quantitativen Verschiebungen innerhalb der Proteinfractionen durch Papierelektrophorese zu kennzeichnen. Dazu werden die Streifen von Whatman 1 nach üblicher Papierelektrophorese des Serums in Perjodsäure, H_5IO_6 , gebadet, in 70 %-Alkohol ausgewaschen, in einer Lösung von KJ/Na-Thiosulfat reduziert und schließlich mit Fuchsin in salzsaurer Kaliumbisulfatlösung gefärbt. Die Kohlehydrate erscheinen als violettrote Bänder, während die Cellulose des Filterpapiers nur schwach angefärbt wird. Die Färbung eignet sich, um in einem photoelektrischen Kolorimeter direkt abgelesen zu werden.

e) Anorganische Ionen

Bereits 1939 hat STRAIN¹¹⁴ eine Kombination von chromatographischer Arbeitstechnik und Elektrophorese für anorganische Analysen angegeben. Die so erzielten Trenneffekte wurden später durch STRAIN und SULLIVAN¹¹⁵, SATO et al.¹¹⁶ sowie KAKIHANA¹¹⁷ Elektrophorese benannt, während LEDERER¹¹⁸ den Ausdruck Papierionophorese prägte. Die Erfahrung von McDONALD et al.¹¹⁹, KRAUS und SMITH¹²⁰ sowie LEDERER¹²¹ mit Elektrowanderung anorganischer Substanzen auf Papier ergaben brauchbare Trennungen, wenn komplexe Ionen gebildet wurden. Nach den letztgenannten Forschern können auch organische Ionen nach dieser Methode getrennt werden; wird ein Potential von 10 V/cm angelegt, so erfordert die Auftrennung eines Substanzgemisches nur den Bruchteil der Zeit, welche für Papierchromatographie gebraucht wird. Durch ent-

sprechende Variation von pH und angelegter Spannung können die Bedingungen geschaffen werden für optimalen analytischen Trenneffekt; wegen der Adsorption am Papier (etwa bei polyvalenten Anionen) ist ferner dessen Textur noch wichtig; die Adsorption kann auch verändert werden durch Behandeln des Papiers mit Aluminiumoxyd oder Chromoxyd (FLOOD¹²²). Gegenüber den genannten Faktoren ist die Ionenstärke des Puffers (zumeist nur 0,003 bis 0,013), Temperatur und elektroosmotische Effekte bei anorganischen Ionen von kleinerer Bedeutung als bei Kolloidelektrolyten. LEDERER und WARD¹²³ geben für einige Anionen die R_f -Werte (*Rate of flow*) an, wenn als Lösungsmittel $n\text{-KCl}$ dient und während 50 Minuten 3,65 V/cm angelegt werden.

Tab. 5

Anion	R_f -Wert
CrO_4^{-2}	0,9
$\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}$	1,0
$\text{Fe}(\text{CN})_6^{-1}$	1,0
I	0,8
CNS	0,82

Aus den R_f -Werten geht hervor, daß die meisten Ionen mit der Flüssigkeitsfront wandern. Wird das Potential konstant bei 135 V gehalten, dagegen die Stärke der Salzsäure variiert, so ergeben sich für Cu-, Cd-, Bi- und Hg-Ionen bei 3,9 V/cm nach 50 Minuten die folgenden Wanderungsstrecken in Millimeter.

Tab. 6

	HCl		
	0,1 n	0,5 n	1,0 n
	mm	mm	mm
Cu	+ 27	+ 44	+ 16
Cd	+ 14	+ 4	- 17
Bi	- 4	- 30	- 40
Hg	- 12	- 50	- 50

Die beste Trennung wird mit 0,5 n-HCl erreicht, wo Cu als Kation, das einwertige Bi und das zweiwertige Hg als Anion wandern, während Cd nahezu isoelektrisch erscheint.

STRAIN und SULLIVAN¹¹⁵ beschreiben die Elektrowanderung und Trennung von Metallionen als kontinuierlichen Vorgang; dazu lösen sie Kupfer- und Silbernitrate von 0,005 mol in 0,1 mol NH_4OH oder in 0,1 mol Milchsäure; Nickelnitrat und Kaliumchromat von 0,01 mol in 4 mol NH_4OH usw. Durch Anwendung von

¹¹³ E. KÖIW und A. GRÖNWALL, *Scand. J. Lab. Clin. Inv.* 4, 244 (1952).

¹¹⁴ H. H. STRAIN, *J. Amer. Chem. Soc.* 61, 1292 (1939).

¹¹⁵ H. H. STRAIN und J. SULLIVAN, *Anal. Chem.* 23, 816 (1951).

¹¹⁶ T. SATO, W. KISIELESKI, W. NORRIS und H. STRAIN, *J. Anal. Chem.* 25, 438 (1953).

¹¹⁷ H. KAKIHANA, *J. Chem. Soc. Japan.* 71, 234 (1950).

¹¹⁸ M. LEDERER, *Nature* 167, 864 (1951).

¹¹⁹ H. McDONALD, M. URBIN und M. WILLIAMSON, *Science* 112, 227 (1950).

¹²⁰ K. KRAUS und C. SMITH, *J. Amer. Chem. Soc.* 72, 4329 (1950).

¹²¹ M. LEDERER und F. WARD, *Aust. J. Science* 13, 114 (1951).

¹²² H. FLOOD, *Z. anal. Chem.* 120, 327 (1940); *Sympos. Faraday Soc.* (1949).

¹²³ M. LEDERER und F. WARD, *Anal. Chim. Acta* 6, 355 (1952).

Äthylendiamin-tetraacetat als Komplexbildner gelingt ihnen die kontinuierliche Trennung monovalenter Kationen von divalenten und polyvalenten Kationen. Da die Trennung vollständig ist, dürfte die Technik Wichtigkeit erlangen zur Reinigung von Spuren von Fremdionen (vgl. STRAIN¹²⁴) sowie zur Reinheitsprüfung. Eine Apparatur zur kontinuierlichen Trennung (Elektrochromatographie) von radioaktiven Ionen, wie $\text{Ca}^{45}\text{Cl}_2$ und $\text{H}_3\text{P}^{32}\text{O}_4$, haben SATO, NORIS und STRAIN¹²⁵ beschrieben. Für die automatische Bestimmung der Radioaktivität in Teilabschnitten von Filterpapierchromatogrammen oder Papierelektrophoresediagrammen hat ROCKLAND¹²⁶ eine Meßvorrichtung geschaffen; es gelingt damit, $85 \pm 6\%$ der auf das Papier gebrachten Radioaktivität nach vollzogener Chromatographie zu messen.

f) Weitere Substanzen

SCHILD und MAURER¹²⁷ (1951) haben menschliche Erythrocyten zusammen mit P^{32} -haltigen Phosphationen bebrütet und nach verschiedenen Zeiten mittels Papierelektrophorese eine gute Trennung der stärker P^{32} -haltigen Stoffwechselprodukte der roten Blutzellen erreicht. Für die Messung der Aktivitätsverteilung auf dem Papierstreifen befand sich zwischen GEIGER-MÜLLER-Zählrohr und Papier ein einstellbarer Spalt von 2–5 mm Breite. DEIMEL und MAURER¹²⁸ haben P^{32} Ratten subkutan gespritzt und einen Tag später in den Extrakten der Organe die P^{32} -markierten Nucleinsäuren mittels Papierelektrophorese lokalisiert. Durch den Einbau von P^{32} und von S^{35} in Eiweiß und der Papierelektrophorese unter Serumzusatz zum Puffer erreichte MAURER¹²⁹ eine Aussage zur Transportfunktion einzelner Proteinfractionen für Phosphatide. Ferner gelang es NIKLAS und MAURER¹³⁰, die Neubildung einzelner Serumweißfraktionen zeitlich zu verfolgen, durch orale Gabe von S^{35} -1-Methionin an Ratten. Nach subkutaner Injektion von NaJ^{131} an Ratten und Kaninchen, lokalisierten MAURER und REICHENBACH¹³¹ das organisch gebundene Jod an dem α -Globulin sowie zwischen dem erwähnten Globulin und Albumin. Ähnliche Bindungen ergaben die Messungen mittels Papierelektrophorese an menschlichen Seren durch GORDON et al.¹³² sowie DEISS et al.¹³³ Die J^{131} -Menge wurde so bemessen, daß die Schilddrüse etwa 100 γ aufnahm (vgl. MUNTWYLER et

al.¹³⁴; FRIERSON et al.¹³⁵). HORST und RÖSLER¹³⁶ bestimmen Stellung und Transport des proteingebundenen J^{131} und finden bei Patienten mit Schilddrüsenkarzinom die Bindung zwischen Albumin und α -Globulin wechselnd.

HENNING und KINZELMEIER¹³⁷ untersuchten mit Papierelektrophorese den menschlichen Magensaft (Leerssekret); HANSON und WENZEL¹³⁸ lokalisierten die Serumpeptidasen innerhalb der Serumweißfraktionen und finden im α_2 -Globulin eine Aminopolypeptidase und Dipeptidasewirksamkeit. Mit derselben Methode finden TOGNI und MEIER die Serumphosphatase des Pferdes im Bereich des β -Globulins¹³⁹.

MCDONALD und MARBACH¹⁴⁰ trennen auf Eaton-Dikeman-Papier-613 ACTH-Präparate in drei Fraktionen auf, wovon die eine kathodisch wandert und sich mit Bromphenolblau stark anfärbt, während eine anodisch wandernde Fraktion sich nur schwach anfärbt. NEUMANN und HABERMANN¹⁴¹ haben Schlangengifte und Bienengift mittels Papierelektrophorese charakterisiert; es gelingt, die ungefärbten Fraktionen unter der Quarzlampe zu lokalisieren. Die Serumzusammensetzung mancher Säugetiere (Pferd, Affe, Kaninchen, Meerschweinchen, weiße Ratte) untersuchten GAUZIN et al.¹⁴²

Um das Farbstoffbindungsvermögen von Serum zu untersuchen, haben KALLEE und ROTH¹⁴³ in der BENNHOLDschen Klinik die Papierelektrophorese herangezogen; dazu wird der Papierstreifen erst mit Pufferlösung befeuchtet, in welcher der zu untersuchende Farbstoff gelöst ist; die während der Papierelektrophorese langsam vorrückende Proteinfront bewirkt dann eine «fortlaufende Desorption». Unabhängig davon haben WUNDERLY und PEZOLD¹⁴⁴ (1952) lipoidlösliche, fluoreszierende cancerogene Kohlenwasserstoffe im Serum angereichert; dieselben haben 1953 die Bedingungen dieser elektrophoretischen Elution an Fettfarbstoffen (Cibablau, Sudanrot I, Sudanschwarz B) näher untersucht.

In der Fermentchemie wurde die Papierelektrophorese dazu benutzt, um den proteolytisch aktiven Bereich zu lokalisieren (WALLENFELS¹⁴⁵, WALLENFELS und v. PECHMANN¹⁴⁶). Mit einer neuen Testmethode hat HEINRICH¹⁴⁶ Pepsin untersucht und dabei Edestin als Spaltsubstrat

¹²⁴ E. MUNTWYLER, G. GRIFFIN, G. SAMUELSON und L. GRIFFITH, *J. Biol. Chem.* 185, 525 (1950).

¹²⁵ W. FRIERSON und J. JONES, *J. Anal. Chem.* 23, 1447 (1951).

¹²⁶ W. HORST und H. RÖSLER, *Klin. Wschr.* 31, 13 (1953).

¹²⁷ N. HENNING und H. KINZELMEIER, *Dtsch. med. Wschr.* 77, 998 (1952); *Münchn. Med. Wschr.* 95, 423 (1953).

¹²⁸ H. HANSON und M. WENZEL, *Klin. Wschr.* 31, 24 (1953).

¹²⁹ G. TOGNI und O. MEIER, *Experientia* IX/3, 106 (1953).

¹³⁰ M. McDONALD und E. MARBACH, *J. Amer. Chem. Soc.* 74 1619 (1952).

¹³¹ W. NEUMANN und E. HABERMANN, *Naturwiss.* 39, 286 (1952).

¹³² M. GAUZIN, M. MACHEBOUF und P. REBEYROTTE, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 34, 26 (1952).

¹³³ E. KALLEE und E. ROTH, *Z. Naturforsch.* 8b, 34 (1953).

¹³⁴ CH. WUNDERLY und F. PEZOLD, *Z. ges. exp. Med.* 120, 613 (1953); CH. WUNDERLY, *Science* 117, 248 (1953).

¹³⁵ K. WALLENFELS, *Biochem. Z.* 321, 189 (1950).

¹³⁶ K. WALLENFELS und E. v. PECHMANN, *Z. angew. Chem.* 63, 44 (1951).

¹³⁷ W. HEINRICH, *Biochem. Z.* 323, 469 (1953).

¹²⁴ H. H. STRAIN, *Frontiers in Colloid Chemistry*, VIII, 29–60 (1950).

¹²⁵ T. SATO, W. NORRIS und H. STRAIN, *J. Anal. Chem.* 24, 776 (1952).

¹²⁶ L. B. ROCKLAND, *J. Anal. Chem.* 24, 778 (1952).

¹²⁷ K. SCHILD und W. MAURER, *Naturwiss.* 38, 303 (1951).

¹²⁸ M. DEIMEL und W. MAURER, *Naturwiss.* 39, 489 (1952).

¹²⁹ W. MAURER, *Klin. Wschr.* 30, 323 (1952).

¹³⁰ A. NIKLAS und W. MAURER, *Naturwiss.* 39, 260 (1952).

¹³¹ W. MAURER und L. REICHENBACH, *Naturwiss.* 39, 261 (1952).

¹³² A. GORDON, J. GROSS, D. O'CONNOR und R. PITT-RIVERS, *Nature* 1952, 19.

¹³³ W. DEISS, E. ALBRICHT und F. LARSON, *J. Clin. Inv.* 31, 1000 (1952).

benutzt. KING und DOERY untersuchten neue Antibiotika auf ihre Einheitlichkeit im Verhältnis zu Chloromycetin^{146 a}.

g) Physiko-chemische Daten

Die Papierelektrophorese ist bisher insbesondere zur Lösung biologisch-chemischer und biologisch-klinischer Probleme herangezogen worden, während mit der Bearbeitung der exakten Grundlagen der Methode noch kaum begonnen wurde (vgl. ^{147, 147 a}). Allgemein gültige Aussagen sind schwierig zu präzisieren, denn schon die spezifischen Eigenschaften des Papiers wechseln von Sorte zu Sorte; dadurch ist die Adsorption durch das Trägermedium ungenügend definiert; ähnliches gilt für die Sorptionsverhältnisse, wenn makromolekulare Kolloidelektrolyte zur Wanderung gelangen; so haben KUNKEL und TISELIUS festgestellt, daß Albumin im isolierten Zustand eine etwas größere Beweglichkeit zeigt als im Serum. Als Index für die Größe der auftretenden Elektroosmose haben die genannten Forscher das Polysaccharid Dextran verwendet; sie finden ein konstantes Verhältnis von elektroosmotischer Strömung und dem pro Zeiteinheit zurückgelegten Weg des Proteins bei gegebener Papierqualität; aus den so gewonnenen Daten leiten sie eine Formel ab, welche die Abhängigkeit wiedergibt von der Beweglichkeit von Flüssigkeiten in hochporösen Medien. Als absolute Werte für die Beweglichkeit $\alpha \cdot 10^6$ von Serumproteinfraktionen auf Munktell-Papier 150/20 erhalten sie für Albumin 6,48; α_1 5,15; α_2 3,97; β 3,02 und γ 1,27. Unter Berücksichtigung der genannten Faktoren stimmen die mit Papierelektrophorese gemessenen Beweglichkeiten mit jenen der freien Elektrophorese recht gut überein; Abb. 14a zeigt die Verhältnisse für menschliches Serumalbumin.

SCHWARZ¹⁴⁸ findet mit Papierelektrophorese den isoelektrischen Punkt von Serumalbumin (Pferd) bei pH 4,76 und in freier Elektrophorese bei pH 4,64. Mit gleicher Technik finden McDONALD, URDIN und WILLIAMSON⁰⁰ den isoelektrischen Punkt von Histidin bei pH 7,6 und von Glutaminsäure bei pH 3,1. Abb. 14b zeigt die Anwendung dieser Technik auf das larvale Blutprotein von *Drosophila Hydei* durch WUNDERLY und GLOOR¹⁴⁹ (1953); nachdem für eine einzelne Papierelektrophorese das Blutprotein von approximativ 400 verpuppungsreifen Larven herauspräpariert werden mußte, war die Messung einer Mikromethode vorbehalten.

HOLT und Mitarbeiter¹⁵⁰ haben den Einfluß der erhöhten Spannung auf die Serumproteinauftrennung bei der Papierelektrophorese verfolgt; um mit 350 V und 1,4 mA arbeiten zu können, verwenden sie einen Puffer,

welcher in 2 l Wasser, 8,02 g Na-diäthylbarbitursäure, 4,68 g Na-Acetat + 2H₂O und 80,8 cm³ 0,1 n-Essigsäure enthält; das pH ist 8,5, die Ionenstärke $\mu = 0,045$ und die Leitfähigkeit $\kappa = 0,00226 \text{ Ohm}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Nach 2 Stunden werden bereits scharfe Trennungen erhalten, jedoch ist die Anwendung von Kühlschlangen in der feuchten Kammer notwendig. Schließlich haben MACHEBOEUF, REBEYROTTE, DUBERT und BRUNERIE¹⁵¹ die hinreichend verschiedenen Wanderungsgeschwindigkeiten

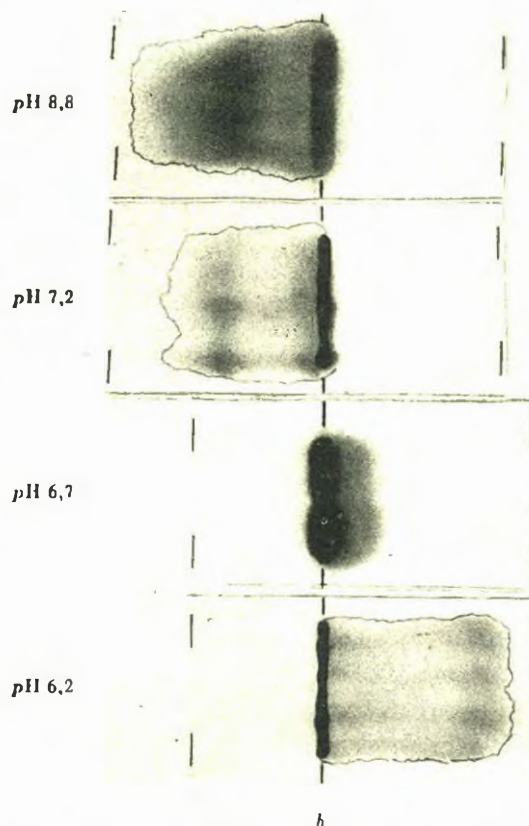
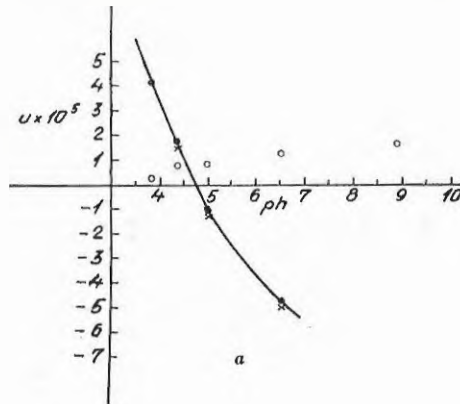


Abb. 14. a) Bestimmung des isoelektrischen Punktes von menschlichem Serumalbumin auf Filterpapier * und in freier Lösung ^x, geben die Beweglichkeiten von Dextran^o (aus KUNKEL und TISELIUS²¹). b) Wanderung der larvalen Blutproteine von *Drosophila Hydei* im pH-Bereich von 8,8 bis 6,2 (aus WUNDERLY und GLOOR¹⁴⁹, 1953).

^{146 a} K. KING und H. DOERY, Nature 171, 878 (1953).

¹⁴⁷ R. WEBER, Helv. Chim. Acta 36, 424 (1953).

^{147 a} H. RÖTTGER, Experientia IX/4, 150 (1953).

¹⁴⁸ V. SCHWARZ, Nature 167, 404 (1951).

¹⁴⁹ CH. WUNDERLY und H. GLOOR, Protoplasma, 1953 (im Druck).

¹⁵⁰ C. v. HOLT, K. VOIGT und K. GAEDE, Biochem. Z. 323, 345 (1952).

¹⁵¹ M. MACHEBOEUF, P. REBEYROTTE, J. DUBERT und M. BRUNERIE, Bull. Soc. Chim. Biol. 35, 334, 346 (1953).

von Toxin und Antitoxin (Diphtherie) dazu benutzt, um deren gegenseitige Reaktion auf dem Papier zu erreichen. Dabei wird durch Evaporation die Strömung der Pufferflüssigkeit im Papier geregelt (Elektroreophorese).

Wenige Jahre haben genügt, um der Papierelektrophorese ein außerordentlich breites Anwendungsgebiet zu sichern. Wenn bisher der biologisch-medizinische

Problemkreis im Vordergrund stand, so dürfte dies damit zusammenhängen, daß die klinische Medizin bereits von der freien Elektrophorese viel Gebrauch machte. Indessen dürfte die kleine Übersicht gezeigt haben, wie auch die Chemiker die Papierelektrophorese nutzbringend anwenden können, sei es zur Identifizierung von Substanzen während der organischen Synthese, sei es für eine Reinheitskontrolle im anorganischen Gebiet.