

Über Fortschritte mit Papierelektrophorese

Von Dr. CH. WUNDERLY

Medizinische Universitätsklinik Zürich

Seitdem wir in dieser Zeitschrift über Papierelektrophorese¹ (P. E.) berichtet haben, sind über die Methode und ihre vielfältigen Anwendungen mehrere Bücher geschrieben worden. MACHEBEUF, REBEYROTTE, DUBERT und BRUNERIE² machten den Anfang mit praktischen Angaben zur Technik. Wir folgten mit einer Übersicht, welche auch die Ergebnisse miteinbezieht³. In einem Gemeinschaftswerk, in welchem BLOCK und ZWEIG die Papierchromatographie beschreiben, gibt DURRUM⁴ einen interessanten Bericht über die Entwicklung der P. E. aus ihren frühesten Anfängen. McDONALD folgt mit einem Buch⁵, das er mit *Ionography* überschreibt und dem Untertitel: Elektrophorese an festen Träger-substanzen; die Bibliographie umfaßt 865 Arbeiten. Etwa gleichzeitig erschien das Buch von LEDERER⁶ über P. E. und verwandte Gebiete; dasselbe gibt eine klare Anleitung für den Gebrauch der P. E. bei verschiedensten Anwendungen. Schließlich liegt die Neuerscheinung vor von ENSELME und DREYFUS⁷, worin über die P. E. berichtet wird in Ausrichtung auf klinisch-chemische Probleme. Diese rasche Folge von Publikationen zeigt eindrucklich, wie groß das Interesse wurde an den stetig zunehmenden Meßmöglichkeiten und Meßkombinationen moderner Papiermethoden. Für eine umfassende Darstellung wird auf obige Bücher verwiesen, während vorliegende Arbeit einen Fortschrittsbericht darstellt⁸.

I. Methoden

a) Hochspannungs-Papierelektrophorese

Die verschiedenen Apparaturen zur P. E., wie sie in den obengenannten Monographien beschrieben sind, gestatten eine befriedigende Auftrennung hochmolekularer Stoffe. Weniger gut gelingt darin die Trennung von Substanzen von kleinem Molekulargewicht (Größenordnung: Aminosäuren, niedere Peptide, Hexosen, anorganische Ionen). Im niedergespannten elektrischen Feld der gebräuchlichen Apparate ist die Wanderungsgeschwindigkeit nicht genügend groß gegenüber der Diffusion; diese ist bei den genannten Stoffklassen sehr erheblich und hat zur Folge, daß Konzentrationsunterschiede ausgeglichen werden und die Trennzonen sich verwischen. Diesem störenden Effekt kann man begegnen, indem man ein hohes elektrisches Potential anlegt und damit die Wanderungsgeschwindigkeit entsprechend beschleunigt. Allerdings muß gleichzeitig die Stromwärme gut abgeführt werden, da sie mit steigender Spannung quadratisch anwächst. Dazu werden die Papierstreifen zwischen den beiden Elektrolytgefäßen in ein inertes Medium gelegt; MARKHAM und SMITH⁹ verwenden Tetrachlorkohlenstoff, HEILMEYER und Mitarbeiter¹⁰ Hexan. Überdies wird das Versuchsgefäß von außen zusätzlich mit Wasser gekühlt; der Netzstrom wird in Gleichstrom umgewandelt und gleichzeitig auf 1500 bis 6000 Volt transformiert. Platinelektroden sind Zinkelektroden vorzuziehen, da sie Oxydationseffekten weniger Vorschub leisten. Im übrigen ist die verwendete Apparatur¹⁰ jener von MICHL¹¹ sowie CANNON *et al.*¹² nachgebildet, wo in der Glaswanne 50 l Toluol enthalten sind. In einer anderen Ausführungsform wird der zwischen dünnen Glas- oder Kunstharzplatten eingelegte Papierstreifen durch beidseitig aufliegende Metallgefäße mit Wasser gekühlt (GROSS¹³). Eine erwünschte Erhöhung der Durchschlagsfestigkeit bringt die Anordnung von WERNER¹⁴. Hier liegt der elektrolytgetränkte Papier-

¹ CH. WUNDERLY, *Chimia* 7 (1953) 145-60.

² M. MACHEBEUF, P. REBEYROTTE, J. M. DUBERT und M. BRUNERIE; *La Microelectrophorèse*, Editions de l'Expansion Scientifique, Paris 1954.

³ CH. WUNDERLY, *Die Papierelektrophorese*, Verlag H. R. Sauerländer & Co., Aarau und Frankfurt am Main 1954; italienische Ausgabe: ed. «Il pensiero scientifico», Roma 1955; französische Ausgabe: Vigot Frères, éditeurs, Paris 1955; spanische Ausgabe: Editorial Científico-Médica, Barcelona 1955.

⁴ R. J. BLOCK, E. L. DURRUM und G. ZWEIG, *A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis*, Academic Press Inc., New York 1955.

⁵ H. J. McDONALD, *Ionography. Electrophoresis in Stabilized Media*, Year Book Publishers, Chicago 1955.

⁶ M. LEDERER, *An Introduction to Paper Electrophoresis and Related Methods*, Elsevier Publishers Co., Amsterdam und New York 1955.

⁷ J. ENSELME und J. CL. DREYFUS, *Sémiologie électrophorétique des Protéines du Plasma sanguin*, Cnavigli Editeur, Lyon 1955.

⁸ Es werden nur Arbeiten der letzten Jahre angeführt und solche, die damit in unmittelbarem Zusammenhang stehen.

⁹ R. MARKHAM und J. D. SMITH, *Nature* 168 (1951) 406.

¹⁰ L. HEILMEYER, R. CLOTTEN, J. SANO, A. STURM und A. LAPP, *Klin. Wschr.* 32 (1954) 831.

¹¹ H. MICHL, *Mh. Chem.* 82 (1951) 489, ferner abgebildet in F. TURBA, *Chromatographische Methoden in der Protein-Chemie*, Berlin 1954, S. 334.

¹² J. R. CANNON und A. GILSON, *Chem. Ind.* 1954, 120.

¹³ D. GROSS, *Nature* 172 (1953) 908, 173 (1954) 487.

¹⁴ G. WERNER, *Trav. Chim. Pays-Bas* 74 [5] (1955) 613.

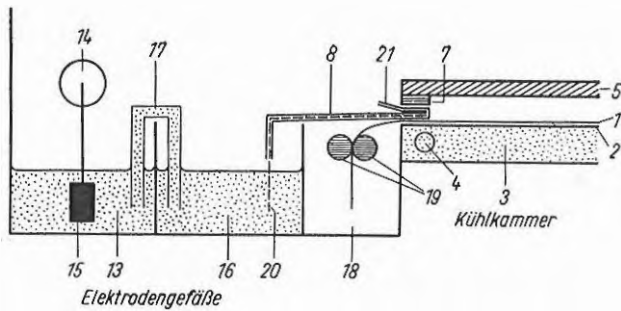


Abb. 1. Schematische Darstellung der Stromzuführung in der Hochspannungsgarapparatur (Längsschnitt)¹¹

streifen auf einer Kunststoffplatte, welche von unten durch eine strömende Kühlsole (Glycin/Wasser-Gemisch, s. 3 in Abb. 1) auf einer bestimmten Temperatur gehalten wird. Die Temperaturregelung sorgt dafür, daß der stromdurchflossene Papierstreifen (1 auf Abb. 1) nicht wärmer wird als die Außentemperatur und mithin kein Kondenswasser an die darüber gedeckte Glasplatte (5 auf Abb. 1) abgibt. Die Glasplatte (5) liegt auf Schaumgummibändern (7) und bildet eine gut isolierte, geschlossene «feuchte Kammer».

In äußeren Abteil (13) der Elektrodengefäße mündet die Stromzuführung (14) zur Platinelektrode (15). Als Sicherung gegen die Diffusion von Elektrolysenprodukten ist der Heber (17) vor dem inneren Abteil (16) zwischengeschaltet. Die Zuleitungszunge (8) besteht aus Filterpapier, das in einen Dialysierschlauch (21) eingeschoben ist. Um die Papierstreifen, welche je nach Trennungsabsicht 30, 60 oder 100 cm lang sind, gleichmäßig und reproduzierbar anzufeuchten, wird eine Walzenpresse benutzt; dadurch wird eine gleichmäßige Wanderungsgeschwindigkeit über die ganze Streifenbreite erreicht. Auf die 15 cm breiten Streifen von Schleicher-&Schüll-Papier Nr. 2043a MG1 wird die Testlösung aufgebracht, indem man ein damit getränktes Teststreifenchen von 1 mm Breite auslegt. Eine Spannvorrichtung sorgt für gleichmäßigen Kontakt des Papierstreifens mit der Kühlfläche und verhindert so das Auftreten von bevorzugt gekühlten «Strömungsstraßen». Während des Stromdurchgangs muß die Temperatur des Streifens so geregelt werden, daß er den kältesten Teil innerhalb der feuchten Kammer darstellt, jedoch auf der Kühlplatte nicht anfriert.

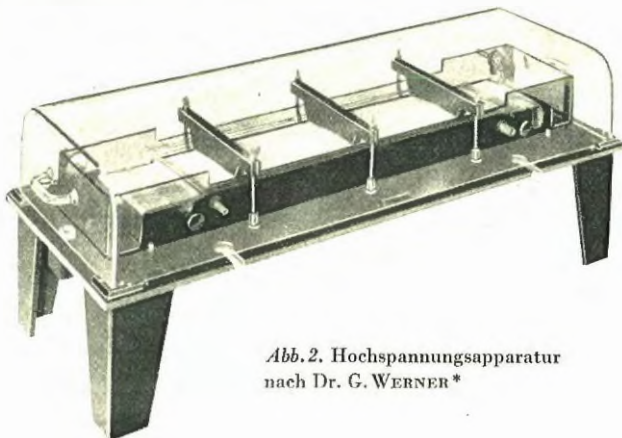


Abb. 2. Hochspannungsgarapparatur nach Dr. G. WERNER*

Die abgebildete Apparatur* ermöglicht einen Arbeitsbereich von 1000 bis 10000 Volt sowie eine Kühlung von 0 bis auf -15°C . Über Ergebnisse mit Hochspannung-P. E. siehe Abschnitt Vb 2, b 4. Verschiedentlich wurde auch versucht, in käuflichen Apparaturen zur P. E. höhere Spannungen^{15, 16} anzulegen, um dadurch die Trennzeit herabzusetzen¹⁷. Dieselbe beträgt bei Routine-Untersuchungen mit einer Feldstärke von 3 V/cm etwa 10 Std. BERG¹⁸ und Mitarbeiter konnten die Trennzeit bei einer angelegten Spannung von 400 bis 600 Volt auf 2 Std., bei 700 bis 800 Volt auf 1 1/2 Std. herabsetzen; im benutzten «Elphor V»-Apparat war keine besondere Kühlung vorgesehen. Der MICHAELIS-Puffer hatte eine Ionenstärke von 0,05 bis 0,03. Die Feldstärke von 15 V/cm wurde als optimal gefunden. Bei Apparaturen, die nicht eigens für höhere Spannungen entwickelt wurden, ist auch an die Gefährdung des Laborpersonals durch Kriechströme zu denken.

Um präparative Trennungen¹⁹ zu erhalten, benutzen PFEIL und KANNEGIESSER²⁰ die Pappe Nr. 5703 von Schleicher & Schüll; zwischen dieser und den Elektroden ist ein dicker Wattestreifen eingeschoben, der die Elektrodenprodukte abhält; mit 300 V Klemmspannung sind die Trennungen nach 2 Std. Laufzeit beendet. BURKE und FOSTER²¹ gelingt die Trennung von Adenosinphosphaten mit 900 V und 40 mA; bei pH 10 zeigt Adenosin-5-phosphat eine höhere Wanderungsgeschwindigkeit als Adenosin-2-phosphat und Adenosin-3-phosphat. GROSS²² führt die Trennung von Oligopeptiden und Aminosäuren mit Potentialgradienten bis zu 200 V/cm und 0,7 Watt/cm² durch; basische Aminosäuren können schon innerhalb 30 Min. befriedigend getrennt werden. TURBA, PELZER und SCHUSTER²³ verwenden zur Trennung von Nukleinsäureabkömmlingen neben Ionenaustauschern und Papierchromatographie auch die Hochspannung-Ionophorese in Filterpapier; dazu werden zwei Papiere Nr. 2043b Schleicher & Schüll über Glasstäbe frei aufgehängt und tauchen an ihren unteren Enden in längliche Porzellanschalen, die mit *n*/10-Pyridinacetatpuffer gefüllt sind; an die Kohlelektroden wird ein Gleichstrom von 7000 bis 8000 V und 20 bis 60 mA angelegt; mit einem Potentialgradienten von 65 V/cm gelingt die Fraktionierung von Adenosin-Nukleotiden innerhalb von 2 1/2 Std. Die Apparatur steht in einer 40 l Toluol fassenden Glaswanne, welche noch von außen eisgekühlt wird. Entsprechend ihrem stärker sauren Charak-

* Herstellerfirma: Dr. Virus KG, Bonn (Deutschland).

¹⁵ H. STERZ und W. KLEMENTSCHITZ, *Wiener Klin. Wschr.* 1952, 103.

¹⁶ S. VESSELINOVITSCH und H. FUNNEL, *Canad. J. Biochem. Physiol.* 32 (1954) 567.

¹⁷ J. C. VERSCHUERE und I. HOMSMIT, *Nederl. Tijdschr. Geneeskunde* 98 (1954) 3410.

¹⁸ G. BERG, H. GÖTZ und F. SCHEIFFARTH, *Klin. Wschr.* 33 (1955) 447.

¹⁹ A. FISCHER und M. BEHNENS, *Z. physiol. Chem.* 291 (1952) 14.

²⁰ E. PFEIL und W. KANNEGIESSER, *Z. physiol. Chem.* 296 (1954) 79.

²¹ D. C. BURKE und A. B. FOSTER, *Chem. & Ind.* 1955, 94.

²² D. GROSS, *Nature* 173 (1954) 487, 176 (1955) 72.

²³ F. TURBA, H. PELZER und H. SCHUSTER, *Z. physiol. Chem.* 296 (1954) 97.

ter wandert die Inosin-triphosphorsäure weiter anodisch als die Adenosin-triphosphorsäure.

In neuartiger Anwendung eines geschlossenen Systems von Glasschliffen (*bridge unit*) trennt KAWERAU²⁴ Serum- und Uroprotein mit 200 bis 600 V. Da der verwendete Streifen von Whatman-Papier Nr. 100, 120 oder 3 MM 2 cm breit ist, wird während der ersten 3 Std. nur ein Temperaturanstieg von etwa 3°C beobachtet; später bleibt die Temperatur ohne Kühlung konstant. Die besten Trennungen (bis zu acht Fraktionen) werden mit dem extra dicken Whatman-Papier Nr. E17 gefunden; nach 16 bis 18 Std. beträgt die Trennstrecke insgesamt etwa 15 cm. Es wird somit keine Beschleunigung erreicht gegenüber den üblichen Methoden, und zudem kann pro Apparat nur ein Papierstreifen verwendet werden. Für die präparative Auftrennung von 1 cm³ Serum wird pufferhaltiges Agargel als Trägermedium verwendet; mit 400 V benötigt ein Arbeitsgang 10 Std. Schließlich haben auch SCHEFFER und Mitarbeiter²⁵ auf die Abhängigkeit der Laufstrecke von der angelegten Feldstärke hingewiesen; sie erlangen bessere Trenneffekte von künstlichen Huminsäuren mit 50 V/cm nach 3 Min. als mit 10 V/cm nach 45 Min.

b) Kontinuierliche Papierelektrophorese

Das Prinzip der kontinuierlichen P. E. besteht bekanntlich darin, daß auf beiden Seiten eines hochgestellten Papiers Elektroden angebracht sind; von oben her strömt die Pufferlösung langsam durch das Papier, während die Kraftlinien des elektrischen Feldes sich quer dazu bewegen. Nun wird an der oberen Kante die Lösung des zu trennenden Stoffgemisches in feinem Strahl einfließen gelassen; auf ihrem Wege werden die elektrisch geladenen Teilchen aus der Strömungsrichtung des Puffers um den Winkel α abgelenkt und tropfen am unteren Ende des Papiers (s. Abb. 3) aus den entsprechenden Papierzacken. Während bei der ursprünglichen Anordnung von DURRUM²⁶ die Feldlinien das quadratische Papier halbmondförmig überquerten, haben die längsseitigen Elektroden bei GRASSMANN und HANNIG²⁷ wie bei STRAIN und SULLIVAN²⁸ ein gleichmäßig ausgerichtetes Feld zur Folge. Immerhin werden auch hier die Trennzonen gestört durch das Hineindiffundieren von Elektrodenprodukten. Wird als Elektrolyt 0,1 mol. Ammoniumnitrat verwendet, so entsteht längs der Kathode eine basische Region und längs der Anode eine saure Region²⁹, während die neutrale Reaktion nur in einem relativ schmalen mittleren Abschnitt gewährleistet ist. Um ein homogenes elektrisches Feld mit konstantem pH über den ganzen Trennbereich zu erzeugen, haben DICASTRO und SAN MARCO²⁹ dem Papier

die untenstehende Form gegeben (s. Abb. 3). Die beidseitigen Zungen tauchen je in einen puffergefüllten Behälter aus Perspex-Kunstglas; in jeden der sechs Behälter fließt pro Stunde etwa 40 bis 50 cm³ frische Pufferlösung und verdrängt die bereits verbrauchte Pufferlösung durch ein Überlaufsystem. Während 40 bis 48 Std. tritt keine Verschiebung der ablaufenden Fraktionen ein.

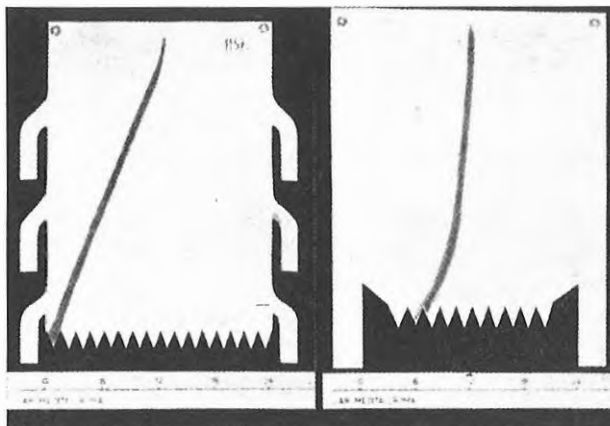


Abb. 3. Beispiel für die verbesserte kontinuierliche P. E.²⁹ Wegspur von Bromphenolblau

Abgebildet ist die Ablenkung von Bromphenolblau in Phosphatpuffer vom pH 5,3 und $\mu = 0,4$ in der neuen Anordnung (links) und in jener von DURRUM (rechts); der Fortschritt liegt darin, daß die Ablenkung stärker ist und linear verläuft. Zur Trennung gelangten Gemische von Aminosäuren in 0,04-molarer Lösung sowie 300 mg Serumweiß innert 12 Std. mit 450 Volt (vgl. HOLDSWORTH³⁰, POULIK³¹ sowie LARSON und FEINBERG³¹). Die Erfahrung hat gezeigt, daß mit Papier als Trägermedium nur kleinpräparative Trennungen durchgeführt werden können; so konnten im «Elphor V» nach GRASSMANN und HANNIG mit 170 Volt 3 cm³ Blutserum innerhalb 73 Std. aufgetrennt werden; dieselben haben eine nach gleichem Prinzip arbeitende Apparatur für großpräparative Trennungen entwickelt. Als poröses Medium dient hier Seesand, Glaspulver oder Edelmetallkorund; durch Variation der Spannung (500 bis 1200 Volt) und der Durchlaufzeit der Trennstrecke (3 Min. bis 6 Std.) lassen sich für Trennschärfe und Umsatzmenge optimale Bedingungen einstellen (vgl.³²). Für Versuche dieser Größenordnung ist die Naßfestigkeit von Papier als Trägermedium nicht mehr ausreichend. Neuerdings hat HOLDSWORTH³⁴ eine Apparatur entwickelt, wo das Papier auf wassergekühlten Plasticstützen aufliegt und die störenden Elektrodenprodukte durch Beriesung mit frischer Pufferlösung weggewaschen werden. Elektroden und Papier sind durch eine

²⁴ E. KAWERAU, *Analyst* 79 (1954) 681.

²⁵ F. SCHEFFER, W. ZIECHMANN, H. BECKER und H. SCHLÜTER, *Naturwiss.* 42 (1955) 71.

²⁶ E. L. DURRUM, *J. Amer. Chem. Soc.* 73 (1951) 4877.

²⁷ W. GRASSMANN und K. HANNIG, *Naturwiss.* 37 (1950) 397.

²⁸ H. H. STRAIN und J. C. SULLIVAN, *Anal. Chem.* 23 (1951) 816.

²⁹ G. DICASTRO und M. SAN MARCO, *J. Chem. Soc.* 1954, 4157.

³⁰ E. S. HOLDSWORTH, *Biochem. J.* 55 (1953) XIV.

³¹ D. L. LARSON und R. FEINBERG, *Science* 120 (1954) 426.

³² E. GRANZER, *Orion* 9 (1954) 594.

³³ D. POULIK, *Canad. J. Med. Sci.* 31 (1953) 485.

³⁴ E. S. HOLDSWORTH, *Biochem. J.* 59 (1955) 340.

Cellophan-Membran getrennt; an Papier mit dichter Textur können innerhalb von 24 Std. 4 cm³ einer 5-prozentigen Proteinlösung getrennt werden.

c) Säulen-Elektrophorese

In präparativer Hinsicht sind die neueren chromatographischen Methoden mit Säulen der P. E. mit beweglichen Fronten überlegen. Der Vorteil liegt in der größeren Trennschärfe sowie der Möglichkeit der Verarbeitung von größeren Mengen. Um dies auch für hochmolekulare Stoffgruppen ausnützen zu können, war es notwendig, ein kapillares System mit geringer Adsorption für die zu trennenden Stoffe zu schaffen; als solches kommt Cellulosepulver oder Stärke in Anwendung. Für die Säulenverteilungschromatographie haben sich die Whatman-Cellulosepulver «ashless» und «B», beide von einheitlicher Faserlänge (150 Maschen), gut bewährt; ihre Kapazität ist höher als jene von Stärke, und es gelingt Säulen herzustellen mit einem Wassergehalt von bis 30%.

Für niedermolekulare Substanzen kann mit Vorteil ein kapillares System mit selektiv adsorbierenden Eigenschaften (Ionenaustauscher) verwendet werden. Durch die Kombination der Effekte entsteht so die Elektro-

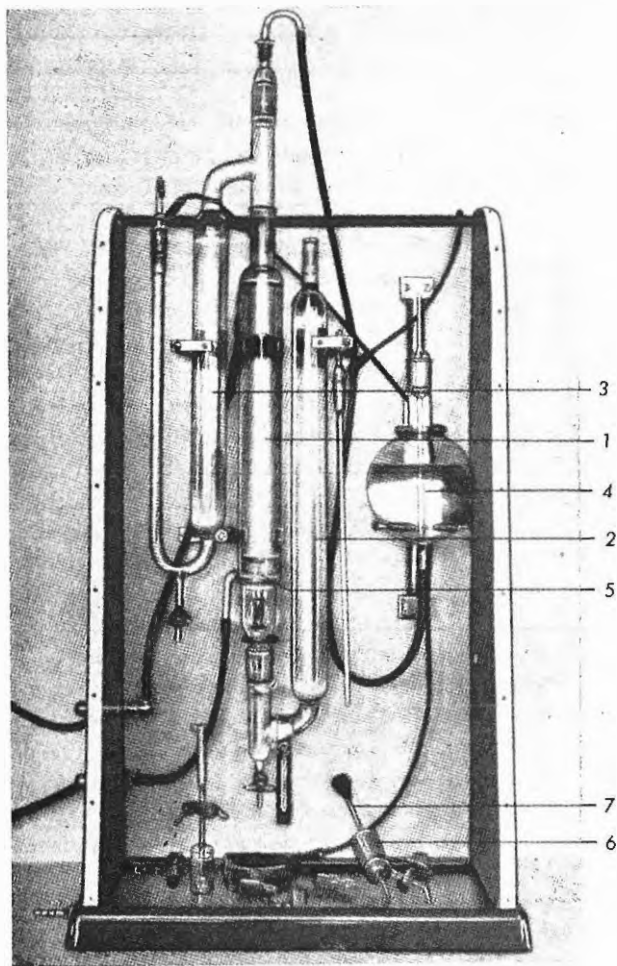


Abb. 4. Apparatur für Säulen-Elektrophorese³⁵

chromatographie. Als Beispiel einer Säulenapparatur beschreiben wir jene, wie sie PORATH und FLODIN³⁵ entwickelt haben (s. Abb. 4). An einem Holzrahmen sind befestigt: die wassergekühlte Säule (1), die Anode (2) und Kathode (3) sowie das Mariottesche Gefäß (4) zum Regulieren der Geschwindigkeit der durchströmenden Pufferflüssigkeit. Das eigentliche Gefäß der Säule (1) ist von einem Mantel in der Art eines Liebigkühlers umgeben; es enthält das poröse Material, welches nach der Technik der Säulenchromatographie in homogener Weise eingefüllt wird; eine eingeschmolzene Glasfritte (5) bildet den unteren Abschluß der Säule.

Von der Elektroden, die aus Platindraht geformt sind, befindet sich die Anode unten an der Säule, die Kathode oben. Die zu trennende Lösung gelangt mit der Pufferflüssigkeit an das obere Ende der Säulenpackung und lagert sich dort als gleichmäßige Schicht ab. Nun wird der Gleichstrom eingeschaltet und gleichzeitig das Kühlwasser. Nach vollendeter Trennung werden die Elektroden abgeschaltet und die Elution mittels Pufferflüssigkeit begonnen. Dabei wird durch das Mariottgefäß ein konstanter hydrostatischer Druck gewährleistet. Das Eluat fließt durch den kapillar gebildeten Teil (7) des Gefäßes (6) aus; dasselbe ist so gestaltet, daß es mit einem Fraktionensammler in Verbindung gebracht werden kann. SILIPRANDI *et al.*³⁶ haben die Cellulosesäule dazu benutzt, um Thiaminester der Phosphorigensäure zu trennen; in einem Acetatpuffer vom pH 5,44 und $\mu = 0,05$ konnten 35 mg der Estermischung mit 30 mA innert 15 Std. getrennt werden. Die Strömungsgeschwindigkeit betrug 25 cm³ pro Std. und eine einzelne Fraktion 3 cm³.

Eine mit Laboratoriumsmitteln gestaltete Säule wurde von DUMAZERT und Mitarbeitern³⁷ entwickelt. Die Säule ist 15 cm lang bei 2,6 cm Durchmesser. Um eine homogene Fällung zu erhalten, wird das Cellulosepulver langsam mit Veronalpuffer eingeschwemmt und sedimentieren gelassen. Es wird mit Gleichstrom von 400 V und 5 mA gearbeitet, wobei die Stromdichte abgestuft wird. Die Anode befindet sich am oberen Ende der Säule und in Verbindung mit einer Kapillarvorrichtung³⁸ zur kontinuierlichen Elution. Die ersten getrennten Proteinanteile erscheinen erst 12 bis 15 Std. nach Stromdurchgang, was auf eine langsame Strömung in der Säule schließen läßt.

d) Die Kombination von Papierelektrophorese und Chromatographie

Auch mit dieser Meßkombination sind wertvolle Erfahrungen gesammelt worden, seitdem DURRUM³⁹ (1951) mit der *strip transfer method* den Vorteil zweidimensio-

³⁵ P. FLODIN und J. PORATH, *Biochem. Biophys. Acta* 13 (1954) 175.

³⁶ D. SILIPRANDI und N. SILIPRANDI, *Biochim. Biophys. Acta* 14 (1954) 52.

³⁷ C. DUMAZERT, C. GIUGLIONE und M. BOZZI, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 37 (1955) 123.

³⁸ C. DUMAZERT und M. BOZZI, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 37 (1955) 169.

³⁹ E. I. DURRUM, *J. Colloid Sci.* 6 (1951) 274.

nalere Ionophorese bei variiertem pH-Wert bewiesen hat. So hat URBIN⁴⁰ den Versuch gemacht, die angelegte Potentialdifferenz kreuzweise wirken zu lassen, indem er an den vier Seiten eines quadratischen, waagrecht liegenden Papiers (Eaton & Dikeman Nr. 613) Elektroden anlegte; es wurden die Dinitrophenylderivate von Alanin, Serin, Leucin, Methionin und Phenylalanin aufgetragen, deren Bewegung dank ihrer Färbung gut beobachtet werden kann; als Puffer diente Veronal/Veronal-Na mit dem pH und $\mu = 0,025$. Mit einer Spannung von 200 V ergaben sich nach 2 Std. (Temp. 25°C) gute Trennungen, wobei die zurückgelegte Wegstrecke in einfacher Relation zum Molekulargewicht steht. Nach dem Vorschlag von BURMA⁴¹ kann die Stromzuführung an das Papier erleichtert werden, wenn man auf beiden Seiten 2 cm breite Streifen von kolloidalem Graphit aufmalt und diese mit den Elektroden verbindet.

Um in rascher Folge zwei Ionophoresen bei verschiedenem pH-Wert vornehmen zu können, hat MEAD⁴² eine umfangreiche Apparatur entwickelt. In einer Richtung wird 0,02-mol. Phtalsäurepuffer vom pH 2,5 verwendet und eine Spannung angelegt, welche an zwei Fronten des quadratischen Papiers (46 × 46 cm, Whatman Nr. 20) 740 V beträgt. Eine Wasserkühlung hält die Temperatur des Apparates 0,5°C unter Raumtemperatur. Nach etwa 150 Min. wird das feuchte Papier Ammoniakdämpfen ausgesetzt, indem Ammoniaklösung zum Phtalsäurepuffer zugesetzt wird, bis sich ein pH von 10,6 einstellt. Darauf wird ein Gleichstrom von 600 V und 50 mA während weiteren 150 Min. wirken gelassen; dabei sind die Elektroden um 90° gegenüber dem ersten Lauf gedreht. Es werden die durchschnittlichen Wegstrecken von 17 Aminosäuren mitgeteilt, bei pH 2,5 und pH 10,6; Leucin und Isoleucin lassen sich nicht trennen, dagegen dauert die gesamte Trennung und Färbung 9 Std.

Öfter gebraucht als die zweidimensionale P.E. wird ihre Kombination mit Chromatographie; dabei ist die Reihenfolge dem Untersuchungsgut angepaßt. VERHELLE und MERLEVEDE⁴³ nehmen erst mit 21 Aminosäuren eindimensionale Papierchromatographie vor und schneiden anschließend diejenigen Bezirke aus dem Papier, wo Aminosäuren sich ungenügend getrennt haben; diese letzteren werden der P.E. unterworfen. Auf diese Weise läßt sich Lysin von Serin bei pH 4,6 und 350 V innert 2 Std. trennen, ebenso Arginin und Threonin. Die P.E. wird hier lediglich auswählend gebraucht zur Verbesserung des Trenneffektes. LOCKHART und ABRAHAM⁴⁴ haben erst die Aminosäurebausteine von Bacitracin A (Molekulargewicht des freien Peptids 1310) mit Butanol/Eisessig papierchromatographisch getrennt und an-

schließend das Papier gesamthaft der P.E. bei pH 7 unterworfen. Dabei bleiben Aminosäuren, wie Histidin, welche bei pH 7 keine Nettoladung besitzen, an Ort stehen.

Wird die P.E. mit flüchtigen Puffersystemen vorgenommen, wie etwa Essigsäure oder die Kombination von Essigsäure und Pyridin, so kann der getrocknete Streifen auf ein entsprechend großes Papier aufgefaltet werden und ist auf diese Weise für Papierchromatographie vorbereitet. Diesen Weg benutzten MARINI-BETTOLO⁴⁵ und Mitarbeiter für die Trennung der Alkaloide in *Strychnos tomentosa* (Curare). Die P.E. wurde in 25prozentiger Essigsäure vorgenommen und anschließend die Chromatographie auf dem 90° gedrehten Papier mit Methyläthylketon, dem 1prozentiges Methanol beigemischt war. Für manche Problemstellung ergänzen sich so P.E. und Papierchromatographie in vorteilhafter Weise.

II. Verbesserungen der Technik

a) Apparatur, Papiersorte u. a.

Ohne Zweifel hat die oft gerühmte Einfachheit der P.E.-Methode zur Folge gehabt, daß man mancherorts bei der Ausführung nicht jene Exaktheit walten ließ, wie sie etwa bei der TISELIUS-Elektrophorese absolute Voraussetzung war. Denn wo die P.E. immer noch eine Auftrennung liefert, wenn auch mit krummen oder ausgefranzten Fronten, ergeben sich bei der freien Elektrophorese, insofern auch nur eine der zahlreichen Fehlermöglichkeiten unberücksichtigt bleibt, überhaupt keine Gradienten! Dies ist der Grund, warum die Ausführung der freien Elektrophorese nur in Ausnahmefällen medizinischem Hilfspersonal überlassen wurde. Wie notwendig es aber ist, auch den kleinen, technischen Einzelheiten der P.E. volle Aufmerksamkeit zu widmen, haben VALMET und SVENSSON⁴⁶ aus ihrer großen Erfahrung heraus trefflich hervorgehoben. Solchem Gedankengang entsprechend werden nachfolgend Verbesserungen erwähnt, welche geeignet sind, die Technik im Sinne einer zweckmäßigen Vereinfachung zu standardisieren.

In dieser Hinsicht bringt die von WILLIAMS, PICKELS und DURRUM⁴⁷ entwickelte Apparatur einen wesentlichen Fortschritt der Methode mit frei hängenden Papierstreifen. Auf dem ausklappbaren Gestell G (s. Abb. 5) werden acht Papierstreifen H ausgespannt, indem man sie auf die Dorne I von Plastic-Material preßt. In Wanne A sind Schikanen C eingebaut, um eine Diffusion der Elektrolyseprodukte hintanzuhalten. Die äußerste der Schikanen trägt die Halter D für Streifen von dickem Schleicher-&Schüll-Papier Nr. 470; wird das Gestell G für die Elektrophorese in entsprechendem Winkel an-

⁴⁰ M.C. URBIN, Diss. Loyola University, Chicago 1954; vgl. Mc DONALD, l. c.⁵.

⁴¹ D.P. BURMA, *Anal. Chim. Acta* 9 (1953) 518.

⁴² T.H. MEAD, *Biochem. J.* 59 (1955) 534-43.

⁴³ O. VERHELLE und E. MERLEVEDE, *II^e Coll. Lab. Hôp. St-Jean, Bruges, 1954*, 181.

⁴⁴ I.M. LOCKHART und E. ABRAHAM, *Biochem. J.* 58 (1954) 633.

⁴⁵ G.B. MARINI-BETTOLO, M. LEDEBER, M. JORIO und A. PIMENTON, *Gazz. Chim. Ital.* 84 (1954) 1155.

⁴⁶ E. VALMET und H. SVENSSON, *Sci. Tools* (Stockholm) 1954 (April) 1.

⁴⁷ F. WILLIAMS, E. PICKELS und E. DURRUM, *Science* 121 (1955) 829.

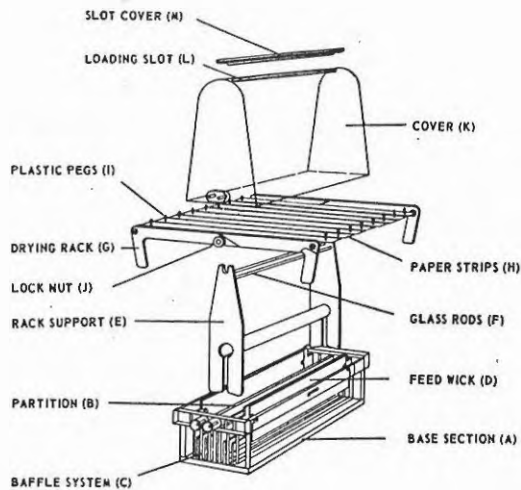


Abb. 5. Einrichtung für frei hängende Papierstreifen und abnehmbares Gestell zum Trocknen derselben⁴⁷

A aufgesetzt, so berühren die aufgespannten acht Papierstreifen die beiden erwähnten dicken Streifen D; diese gehen, wenn der Trog A mit Pufferlösung gefüllt ist, als Folge einer Dochtwirkung (deshalb die Bezeichnung: *feed wick*) die letztere gleichmäßig ab an die herabhängenden acht Papierstreifen. Im Deckel K befindet sich ein Schlitz L, längs welchem die zu prüfende Flüssigkeit auf die Papiere gebracht wird.

Ist die P. E. beendet, so wird erst K abgehoben, dann das Gestell G wieder waagrecht aufgeklappt und zum Trocknen der Streifen für 10 Min. in den Ofen bei 120°C gestellt. Dank den Streifen D sind die unteren Enden der acht Papierstreifen nicht so mit Pufferflüssigkeit voll-

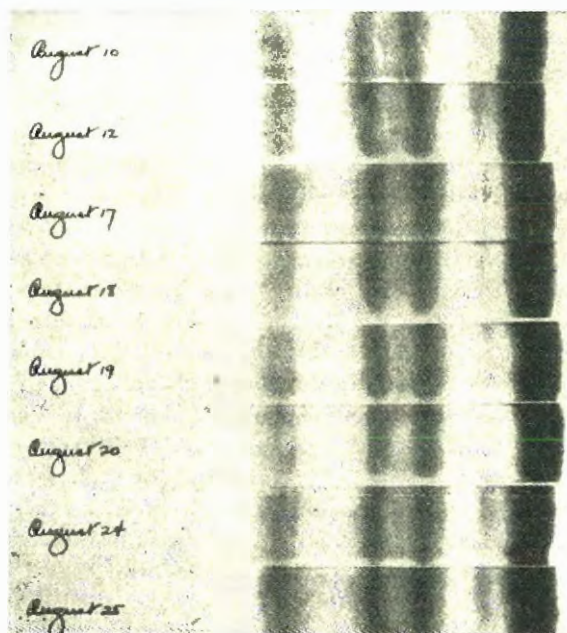


Abb. 6. Eine gute Auftrennung mit geraden Fronten gewährleistet die wünschbare Reproduzierbarkeit. Acht P. E. auf Whatman Nr. 3 MM mit 0,01 cm³ Serum und Veronalpuffer von pH 8,6 und $\mu = 0,075$ nach 16 Std. mit 8 mA⁴⁷

gesogen, daß nun durch Flüssigkeitsbewegung eine Verzerrung der Fronten verursacht werden kann. Ebenso wichtig ist ein rasches Trocknen in genau horizontaler Lage.

Abb. 6 zeigt den Erfolg der Anordnung in acht Auftrennungen auf Whatman Nr. 3 MM von je 0,01 cm³ Serum mit Veronalpuffer von pH 8,6 und $\mu = 0,075$ nach 16 Std. bei 8 mA. Um stabile Bedingungen im Papierstreifen und darüber zu erhalten, haben ebenfalls FRANGLÉN, MARTIN und TREHERNE⁴⁸ einen Apparat gebaut. An Stelle mehrerer Streifen ist hier ein Papier von 20 cm Breite von einer nachstellbaren Spannvorrichtung in horizontaler Lage gehalten; als Elektroden stehen Rollen von Silberdraht von 0,1 cm \varnothing in Verbindung mit AgCl/KCl. Auch wenn über Nacht eine Feldstärke von 10 V/cm angelegt wird, erhöht sich die Temperatur nur um 0,3°C; mit kleinem Abstand befindet sich über und unter dem *working strip* je ein weiteres Papier, das für den Ausgleich der Feuchtigkeit sorgt und allfällige Tropfen auffängt. Ebenfalls stabile Verhältnisse sind in der Anordnung von CHRESTFIELD und ALLEN⁴⁹ verwirklicht; zum Nachweis dient die Kontrolle der Flüssigkeitsbewegung in Papierstreifen mittels Coffein; dasselbe wird erst aus gesättigter Lösung in Chloroform an bezeichneten Stellen aufgetropft und nach P. E. vor der Ultraviolettanalysenlampe festgestellt. Untenstehend sind die Beweglichkeiten von Pikrat-Ion bei variiertem Puffersystem und pH' mit und ohne Bezug auf Elektrosmose wiedergegeben.

Tab. 1

pH	Puffer-Ion	Pikrat-Ion ^a	Coffein ^b	Pikrat-Ion ^c
3,6	Formiat . . .	10,2	1,0	11,2
4,6	Acetat . . .	10,1	1,7	11,8
6,8	Phosphat . . .	8,3	2,6	10,9
9,2	Borat . . .	7,5	4,2	11,7
9,9	Carbonat . . .	8,9	3,4	12,3

^a = Messungen des zurückgelegten Weges von der Auftragsstelle
^b = Flüssigkeitsbewegung zufolge der Elektrosmose
^c = Wegstrecke unter Berücksichtigung der Elektrosmose

Auf diese Weise wurde im pH-Bereich von 3,6 bis 9,9 die mittlere Beweglichkeit von Pikrat-Ion mit $11,6 \frac{\text{cm}^2}{\text{V} \cdot \text{Sek.}} \cdot 10^{-5}$ gemessen; der Koeffizient der Variation beträgt 4,3%.

Ein Mehrzweckapparat ist mit dem «Reco E-800-2»^{*} verwirklicht. Er ist mit Wasserkühlung ausgestattet, so daß bis zu 750 Volt angeschaltet werden können, was etwa einer Feldstärke von 20 V/cm entspricht, die Papierstreifen können liegend oder frei hängend angeordnet

* Research Equipment Corporation, Oakland 20 (Cal., USA).

⁴⁸ G. T. FRANGLÉN, N. MARTIN und J. TREHERNE, *J. Clin. Pathol.* 8 (1955) 144.

⁴⁹ A. CHRESTFIELD und F. W. ALLEN, *Anal. Chem.* 27 (1955) 422.

Tab. 2²⁴

Nr.	Gewicht mg/cm ²	Oberfläche, Naßfestigkeit	Trennvermögen
E 17	47,8	geringe Naßfestigkeit	ausgezeichnet, insbesondere γ -Globulin-Region
E 13	43,5	ähnlich wie E 17, etwas fester	sehr gut
E 12	20,5	weiche Oberfläche	sehr gut, jedoch E 13 unterlegen
120	29,0	glatte Oberfläche, gute Naßfestigkeit	gut
3 MM	17,5	gute Naßfestigkeit	gut
100	19,0	gute Naßfestigkeit	gut
20	9,4	gute Naßfestigkeit	ordentlich; für 0,02 cm ³ Serum schon zu dünn
5	10,1	ausgezeichnete Naßfestigkeit	ordentlich; für 0,02 cm ³ Serum schon zu dünn
40	9,3	ausgezeichnete Naßfestigkeit	ordentlich; für 0,02 cm ³ Serum schon zu dünn

werden, ferner ist die Verwendung von Stärkegel oder Silikagel vorgesehen. Als gut geeignete Papiersorten werden vorgeschlagen: Whatman 3 MM, Schleicher & Schüll 598 sowie Eaton-Dikeman Nr. 301, 320 und 613.

Um auch den Einfluß des Molekulargewichtes (30 bis 15000) sowie der chemischen Zusammensetzung zu prüfen, haben WOOD und STRAIN⁵⁰ mit folgenden ungeladenen und nichtadsorbierten Testsubstanzen die *Elektroosmose* bestimmt; Formaldehyd, H₂O₂, Thioacetamid, Allylthioharnstoff und Hydrochinon wurden hinterher kenntlich gemacht durch die Reduktion von Silberionen; ferner wurden radioaktiver Rohrzucker und Dextran verwendet. Die Erscheinung der Elektroosmose wird von DARMOIS⁵¹ als eine Folge der verschiedenen Hydratation der Ionen erklärt, indem die positiv geladenen Ionen im allgemeinen stärker hydratisiert sind als die negativ geladenen; damit würde die Flüssigkeitsbewegung in Richtung der Kathode⁵² verständlich, sowie die Rolle der Pufferionen. Ein weiterer Faktor ist die *Feuchtigkeit des Papierstreifens*, wobei die Verdunstung von der Temperatur abhängig ist⁵³. Um die Verdunstung zu erniedrigen und die Viskosität zu erhöhen, hat DURRUM⁴ (1951) einen Zusatz von Glycerin oder Propylglykol zum Puffer empfohlen; mit der Mischung von 5 bis 15% bleibt die Feldstärke während der Dauer der P.E. konstant⁵⁴, und die Trennstrecke kann entsprechend verlängert werden. Die Verwendung von Boratpuffer ist hier ausgeschlossen wegen der Komplexbildung mit Glycerin. Wenn die genannten Faktoren berücksichtigt und während der P.E. konstant gehalten werden, dann ist die *Messung der Wanderungsgeschwindigkeit* mit größerer Genauigkeit möglich, als dies früher der Fall war.

Wie allseitig hervorgehoben wird, spielt die *Papiersorte* eine besonders wichtige Rolle für die Flüssigkeitsbewegung. Um eine Papiersorte zu charakterisieren, kann nebst dem *Gewicht die Saugleistung⁵⁵ pro Zeit-*

einheit, der Elutionseffekt⁵⁶ sowie die >C=O-Gruppen⁵⁶ bestimmt werden. Obenstehende Tabelle vereinigt die Erfahrungen von KAWERAU²⁴ (1954) mit verschiedenen Whatman-Papieren.

Das von Schleicher & Schüll herausgebrachte Papier Nr. 2043a ist nunmehr dem Whatman-Papier Nr. 1 etwa ebenbürtig geworden. Für Trennungen mit präparativen Absichten bringen Schleicher & Schüll neuerdings Nr. 2230 sowie Macherey & Nagel (Düren, Rheinland) Nr. 866 in den Handel.

Bei dem zumeist gebrauchten pH von 8,6 sind sowohl Cellulose wie Proteine gegenüber der Pufferlösung negativ aufgeladen; davon wird die stets vorhandene Adsorption einer geringen Menge von Protein am Papier beeinflusst. Die Größe⁵⁷ dieser Adsorption (etwa 7 γ Albumin/cm² Whatman Nr. 1) kann kenntlich gemacht werden, indem man umpolt und dadurch eine Umkehr der Wanderungsrichtung bewirkt; zurückbleibendes Protein zeigt die Adsorption an⁵⁸. Da die letztere bei präparativen Arbeiten ungünstig ist, hat man das Papier mit Perjodsäure behandelt. Daraufhin wurden die Dialdehyd-Gruppen mit Hydrazinderivaten gekuppelt und auf diese Weise die Papieroberfläche zu einer überwiegend positiven Ladung gebracht. Denselben Zweck verfolgt die Behandlung der Papieroberfläche mit *Gentiana Violett⁵⁹*, *Cetyl-trimethyl-Ammoniumbromid⁶⁰* sowie 0,1- bis 0,2prozentige Lösungen von Gelatine, Serumalbumin und Serumglobulin⁶¹, jedoch haben diese Vorschläge keine breitere Anwendung erfahren.

Die *Wanderungsgeschwindigkeit* der zu trennenden Substanzen ist stark abhängig von der Ionenstärke des Puffersystems; mit geringerer Ionenstärke nimmt die Wanderungsgeschwindigkeit mehr zu als linear. Für die Messung der Wanderungsgeschwindigkeit wird deshalb eine Ionenstärke von 0,005 oder darunter empfohlen.

⁵⁰ S. F. WOOD und H. STRAIN, *Anal. Chem.* 26 (1954) 1869.

⁵¹ E. DARMOIS, *C. R. Acad. Sci.* 227 (1948) 339.

⁵² J. I. ENGELKE, H. STRAIN und S. WOOD, *Anal. Chem.* 26 (1954) 1864.

⁵³ Z. PUCAR, *Arh. Kem.* 26 (1954) 29, 41.

⁵⁴ H. J. McDONALD, *Science* 121 (1955) 403.

⁵⁵ CH. WUNDERLY, *Plasma* 2 (1954) 143.

⁵⁶ A. ULTEE und J. HARTEL, *Anal. Chem.* 27 (1955) 557.
⁵⁷ F. P. MERKLEN und R. MASSEYEFF, *C. R. Soc. Biol.* 146 (1952) 1905.

⁵⁸ H. KUNKEL, in *Methods of Biochemical Analysis*, herausgegeben von D. GLICK, 1. Band, New York 1954.

⁵⁹ E. A. HAUSER und J. LYNN, *Experiments in Colloid Chemistry*, New York 1950, S. 42.

⁶⁰ J. RUTTER, *Nature* 166 (1950) 273.

⁶¹ E. KATLER, *Z. Naturforsch.* 7b (1952) 661.

Um die Leitfähigkeit nicht unnötig zu erhöhen, soll das Puffersystem keine starken Elektrolyte enthalten. Auf der Suche nach Puffersystemen, welche das Trennvermögen verbessern, ist wiederum 0,2-mol. Boratpuffer in Vorschlag gebracht worden^{62, 63}; er setzt sich zusammen aus 3,5 Vol. 0,2-mol. Borsäure und 1 Vol. 0,2-n NaOH. Es soll damit gelingen, das β -Globulin⁶² und öfter auch das α_2 -Globulin⁵⁰ in je zwei Unterfraktionen aufzutrennen. Dem steht jedoch der Nachteil gegenüber, daß sich das α_1 -Globulin nicht richtig vom Albumin abtrennt. DURRUM⁴ hat dies in einer Abbildung gezeigt, und es entspricht auch unseren eigenen Erfahrungen. Für eine saubere Auftrennung von Proteingemischen ist der von MICHAELIS angegebene *Veronal/Acetat-Puffer* noch unübertroffen; wir geben deshalb seine Zusammensetzung: 29,43 g Veronal-Natrium und 11,71 g wasserfreies Natriumacetat werden in frisch destilliertem Wasser gelöst; nach Zufügen von 180 cm³ 0,1-n Salzsäure wird auf 3 l aufgefüllt. In den gebräuchlichen Apparaten zur P. E. kann man diesen Puffer für fünf Elektrophoresen benutzen, wenn man jedesmal umpolt. Etwa gleichwertig ist die Mischung von 45,32 g Veronal-Natrium und 8,08 g Veronal gelöst in 4 l destilliertem Wasser. Die besondere Eignung dieser Puffersysteme liegt nicht in einer höheren Pufferkapazität, vielmehr muß sie chemisch bedingt sein.

b) Praktische Angaben zur Technik

Mitfolgend sollen praktische Einzelheiten zur Sprache kommen, so wie sie sich aus eigener Erfahrung im täglichen Gebrauch ergeben haben. Für das Auftragen benutzen wir Mikropipetten, welche an der Ausflußstelle nicht spitzig, sondern stumpf sind; damit wird vermieden, daß die Papierfaser angeraut wird. Soll über eine Strecke aufgetragen werden, die länger ist als 3 cm, so ist es zweckmäßig, die Pipette längs einem Lineal zu führen. Beim Auftragen soll man dem Papierrand nie näher kommen als 10 mm, da sonst Randverzerrungen fast unvermeidlich sind. Nachdem auf die vorbezeichnete Stelle auf das trockene Papier aufgetragen wurde, läßt man einige Minuten antrocknen, dann wird der Streifen an beiden Enden erfaßt und erst vom einen Ende her so mit Pufferflüssigkeit benetzt, daß die Flüssigkeitsfront bis auf wenige Millimeter an die Auftragsstelle heranreicht. Dieselbe wird nun durch Diffusion rasch mit Pufferflüssigkeit durchtränkt. Die feuchte Hälfte des Streifens wird mit sauberem Flißpapier leicht abgetupft, worauf mit der anderen Seite gleich verfahren wird. Man verhindert damit eine *unerwünschte Diffusion* der aufgetragenen Lösung und schafft eine bessere Ausgangslage für die Auftrennung. Will man das Pipettieren vermeiden, so kann man ein kleines Whatman-1-Papierstreifen sich erst mit Serum vollsaugen lassen und

⁶² R. CONSDEN und M. N. POWELL, *J. Clin. Pathol.* 8 (1955) 150.

⁶³ E. WAHAB, G. ADJUTANTIS und D. LAWRENCE, *Biochem. J.* 60 (1955) xiii.

dieses dann auf die Auftragsstelle legen^{4, 64}. Will man das Streifen nicht liegen lassen, so kann man es zwischen zwei Objektträgergläsern einklemmen; läßt man die eine Längsfront des Streifens etwas vorstehen, so kann damit die Auftragsstelle betupft werden. Um das *Vorrücken der Albuminfront* jederzeit kontrollieren zu können, legt man auf die Auftragsstelle einen Baumwollfaden⁶⁴, den man vorgängig in Bromphenolblaulösung getränkt hat; die Färbung mit Amidoschwarz wird davon nicht beeinflusst.

Nach beendeter P. E. werden erst die Papierenden, welche unmittelbar mit der Pufferlösung in Kontakt standen, mit der Schere abgetrennt; dann die Streifen sogleich in waagrecht Lage für 30 Min. im Ofen von 110°C gehalten. Diese Ratschläge verfolgen in erster Linie *das Ziel, eine Auftrennung mit geraden Fronten* zu erreichen, denn dies ist die Vorbedingung jeder quantitativen Auswertung.

Für die Färbung beläßt DURRUM⁴ die Streifen während 16 Std. in einer Lösung, welche im Liter 0,1 g Bromphenolblau, 50 g Zinksulfat und 50 cm³ Eisessig enthält. Um aus den gezeichneten Kurven rasch die zugehörige Proteinkonzentration auffinden zu können, hat LATNER⁶⁴ ein einfaches Hilfsmittel vorgeschlagen; es besteht aus einem rechtwinkligen Dreieck aus Perspex; dasselbe wird hochgestellt und soweit an die größte Ordinate eines Proteingradienten herangeschoben, bis diese die Hypotenuse schneidet. Vom Schnittpunkt wird eine Senkrechte gezogen auf den unteren Schenkel und dort die Proteinkonzentration abgelesen.

III. Quantitative Betrachtungen

a) Färbung und Auswertung

Die Erfahrung hat gezeigt, daß die Färbung und anschließende Auswertung den schwierigsten Abschnitt der P. E.-Technik darstellen. Farbstoffe, die der Einheitlichkeit entbehren, Proteine, welche sich verschieden stark anfärben, und Auswertverfahren, deren Ergebnisse sich nicht decken, bringen Schwierigkeiten, welche durch FRANGLER und MARTIN⁶⁵ eingehend erörtert wurden. Der für Proteinfärbung am meisten gebrauchte Farbstoff ist Amidoschwarz 10 B, dem mit Abstand Bromphenolblau⁶⁶ und Azokarmin folgen. Nach GRASSMANN und HANNIG⁶⁷ ist die Anfärbbarkeit⁶⁸ der verschiedenen Serumproteine mit Amidoschwarz (englisch: Naphthalene Black 12 B 200) besser verwirklicht als mit den übrigen Farbstoffen⁶⁹. Es geht dies aus den unten wiedergegebenen Extinktionskurven hervor, wo die Färbungen von Albumin, α -Globulin und γ -Globulin mit

⁶⁴ A. L. LATNER, *J. Lab. Clin. Med.* 45 (1955) 147.

⁶⁵ G. FRANGLER und N. MARTIN, *Biochem. J.* 57 (1954) 626; *J. Clin. Pathol.* 7 (1954) 87.

⁶⁶ R. GOULLEN und C. HERMANN, *Z. Naturforsch.* 10b (1955) 206; *Naturwiss.* 42 (1955) 72.

⁶⁷ W. GRASSMANN und K. HANNIG, *Klin. Wschr.* 32 (1954) 838.

⁶⁸ S. H. BLONDHEIM, *J. Lab. Clin. Med.* 45 (1955) 740.

⁶⁹ R. A. NEELY und F. NEILL, *Nature* 176 (1955) 33.

den genannten drei Farbstoffen spektrophotometrisch wiedergegeben sind.

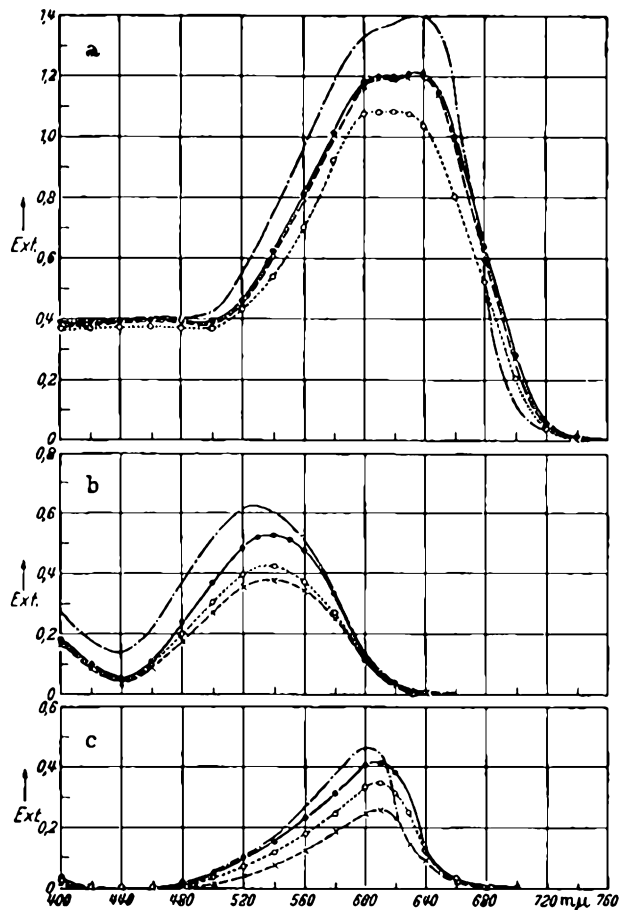


Abb. 7. Extinktionskurven, ermittelt auf dem mit gleichen Eiweißmengen beladenen und angefärbten Streifen für verschiedene Farbstoffe⁶⁷. a Anfärbung mit Amidoschwarz 10B: ●—●—● Albumin; x—x—x α -Globulin; ○—○—○ γ -Globulin; — — — Kurve des reinen Farbstoffs auf Papier. b Anfärbung mit Azokarmin: ●—●—● Albumin; x—x—x α -Globulin; ○—○—○ γ -Globulin; — — — Kurve des reinen Farbstoffs auf Papier. c Anfärbung mit Bromphenolblau: ●—●—● Albumin; x—x—x α -Globulin; ○—○—○ γ -Globulin; — — — Kurve des reinen Farbstoffs auf Papier

Wie die Kurvenhöhe zeigt, ist bei Amidoschwarz auch die absolute Höhe der Extinktion den anderen Farbstoffen überlegen. Beide Faktoren bilden für die quantitative Auswertung eine wichtige Voraussetzung. Demgegenüber besteht der Nachteil bei Amidoschwarz, daß es sich mit Methylalkohol + 10prozentigem Eisessig nur langsam vom Papier auswaschen läßt; nach 4 Std. Auswaschzeit verhalten sich die Extinktionswerte eines Blindstreifens mit Bromphenolblau, Azokarmin und Amidoschwarz wie 0,005 zu 0,02 zu 0,07. Zusätze zur Auswaschflüssigkeit, wie etwa Phenol, können nicht empfohlen werden, da darin auch Lipoproteine löslich werden; um die Pufferflüssigkeit auszuwaschen, kann der Papierstreifen vor der Färbung erst 5 Min. in eine 5prozentige Sublimatlösung zwecks Proteinfixation eingelegt und anschließend ausgiebig gewässert werden⁷⁰.

⁷⁰ R. WOLFF und P. MAGNIN, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 36 (1954) 92.5.

*Neucocin*⁷¹ (Acylanscharlach) verhält sich ähnlich wie Azokarmin; ebenso die Färbung mit 0,5 % Lichtgrün S. R.⁷² (Farbindex Nr. 669), das in 25 % Äthanol und 5 % Eisessig gelöst ist; nach einer Färbzeit von 10 Min. wird in Wasser, das mit 2 % Eisessig angesäuert ist, ausgewaschen. Für die Auftrennung von Fibrinogen⁷³ dient ein Phosphatpuffer vom pH 9,2; für jene von Aminosäuren ein Phthalatpuffer vom pH 5,9, wozu 5,1 g saures Kaliumphthalat und 0,86 g Natriumhydroxyd zu einem Liter Wasser gelöst werden. Unabhängig von der Wahl des Farbstoffs gilt stets die Notwendigkeit, *Trocknung, Färbung und Entfärbung genau zeitgerecht nach Vorschrift auszuführen*. Versuche, die darauf abzielten, die Färbung zu umgehen und die Ultraviolettabsorption⁷⁴ der Proteine auszuwerten, haben bisher nicht zum Ziele geführt, da die Proteinabsorption klein ist gegenüber jener des Papierstreifens.

Die gefärbten und getrockneten Papierstreifen müssen für die Auswertung mittels Direktkolorimetrie noch durchsichtig gemacht werden. Dafür ist Glycerin vorgeschlagen worden⁷⁵, welches die Leeraufnahme des Papiers auf einen Zehntel erniedrigt; ferner reiner Benzylalkohol²⁴ mit dem Brechungsindex n_D 1,5396 sowie Methylsilyl⁷⁷ mit n_D 1,535 bis 1,538. Gegenüber paraffinhaltigen Flüssigkeiten hat Anisol (n_D 1,518) die Vorteile⁷⁸, daß sich beim Einlegen der Papierstreifen Luftblasen viel leichter vermeiden lassen und daß es leicht abdunstet, so daß die Papiere sauber aufbewahrt werden können. In Fällen, wo die Serumproteinfraktionen sich nicht sauber aufgetrennt haben, besteht oft die Schwierigkeit, wo man vorgängig der Elution die Papierstreifen durchschneiden will; eine Direktkolorimetrie des trockenen Streifens gibt zumeist Anhaltspunkte für die sachgerechte Einteilung. Die Elutionsmethode wird weiterhin mit gutem Erfolg angewendet, wo für wissenschaftliche Bearbeitung nur eine beschränkte Zahl von P.E. benötigt werden. Die Auslage für ein lichtelektrisches Auswertgerät erscheint erst gerechtfertigt, wenn die P.E. routinemäßig ausgeführt wird⁷⁶. Die neueren Modelle der «Densitometer»⁷⁹ erlauben monochromatisches Arbeiten mit Filterwahl. Die Wichtigkeit derselben hat DURRUM⁴ nachgewiesen; er erhält in relativen Prozenten für die Fraktionen Alb, α_1 , α_2 , β und γ eines normalen Serums (Bromphenolblaufärbung) auf Wellenlänge 575 m μ 61,7, 5,9, 10,5 und 21,9 gegen 54,0, 7,3, 13,1 und 25,7 auf 660 m μ . Das Maximum der Absorption einer wässrigen, auf pH 8,6 gepufferten Bromphenolblaulösung liegt bei 591 m μ gegenüber 604 m μ , wenn

• W. M. Welch Scientific Co., Chicago (USA).

⁷¹ H. MICH, *Mh. Chem.* 83 (1952) 210.

⁷² W. DANGERFIELD und E. SMITH, *J. Clin. Pathol.* 8 (1955) 132.

⁷³ I. BERKES und V. KARAS, *Biochem. Z.* 324 (1953) 499.

⁷⁴ C. L. HANDERS, *Chem. Weekblad* 49 (1953) 246.

⁷⁵ K. H. KIMBEL, *Naturwiss.* 40 (1953) 200.

⁷⁶ L. PINTERIC und M. D. POULIC, *Canad. J. Publ. Health* 1954, 163.

⁷⁷ A. LATNER, *Biochem. J.* 52 (1952) xxxii.

⁷⁸ I. PIEFER und V. KARAS, *Biochem. Z.* 324 (1953) 499.

⁷⁹ Photovolt Corp., New York (USA).

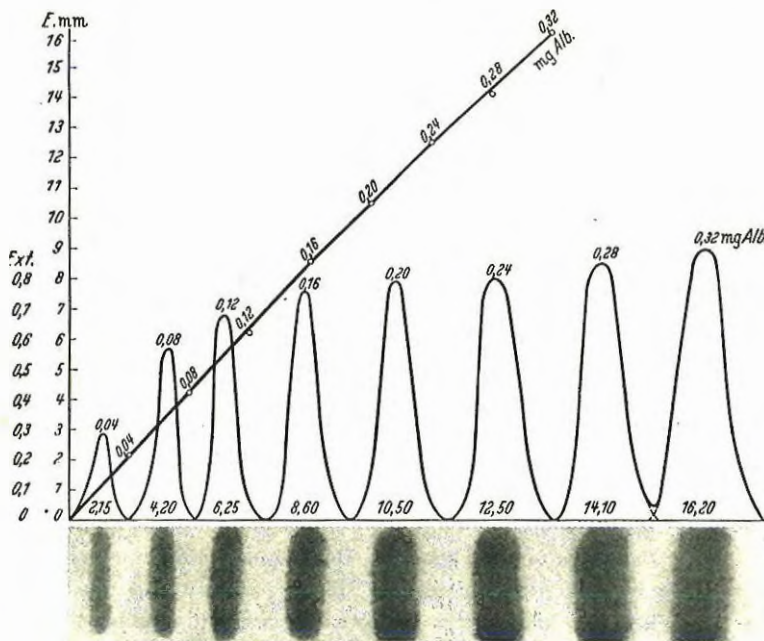


Abb. 8. Beispiel zur Ermittlung von Eichkurven⁶⁷. Unten: Mit steigenden Mengen Albumin beschickter und mit Amidoschwarz 10 B angeführter Streifen; darüber photometrische Auswertung des Streifens. (Zahlen innerhalb der GAUSS-Kurven: Die durch Planimetrierung erhaltenen Flächenintegrale $E \cdot \text{mm}$.) $\circ-\circ-\circ$ aus den Flächenwerten ermittelte Eichkurve (Auswertgerät nach EDELMANN/EBERLE)

eine Bindung an Protein vorliegt⁴. Eigene Erfahrung hat uns gezeigt, daß eine elektronische Verstärkung⁷⁰ die Empfindlichkeit wesentlich steigert; es kann damit eine ordentliche Übereinstimmung erzielt werden mit der Auswertung von transparent gemachten Streifen. In dem für Papiermethoden entwickelten Zusatzgerät zum Photometer «Eppendorf»* wird das Licht einer Quecksilberspektrallampe so ausgefiltert, daß die Linie 578 $m\mu$ zur Verwendung gelangt (Amidoschwarz, Bromphenolblau) oder 546 $m\mu$ (Azokarmin, Ninhydrin). Auch im automatischen Auswertgerät nach EDELMANN und EBERLE** wird das Licht der Quecksilberspektrallampe praktisch monochromatisch gefiltert; dasselbe gilt für die als Lichtquelle dienende Wolframlampe des «Extinktionsschreibers» der Firma C. Zeiß. Die Ausschläge von solchen automatisierten Zeigergeräten sind der durchgehenden Lichtintensität proportional; nun steht aber der gemessene Photostrom zur Extinktion nicht in einer linearen, sondern in einer logarithmischen Beziehung (LAMBERT-BEERSches Gesetz). Wenn somit nicht Absorptionskurven***, sondern Extinktionskurven verlangt werden, so ist eine entsprechende logarithmische Umformung notwendig. Die technische Gestaltung derselben erschwert und verteuert die Konstruktion der «Extinktionsschreiber».

Um die Anfärbbarkeit festzustellen, d. h. die Menge Farbstoff zu bestimmen, welche von der bestimmten

* Nethler & Hinz GmbH, Hamburg-Eppendorf.

** Bender & Hobein, München (Deutschland).

*** Firma Jouan, Paris: Enregistreur automatique de la densité optique.

Menge einer rein isolierten Proteinfraction gebunden wird, ermittelt man die Eichkurven. Dazu bringen GRASSMANN und HANNIG⁶⁷ abgestufte Mengen von 1prozentigen Lösungen reiner Fraktionen als Querstrich auf feuchte Filterpapierstreifen und lassen diese für 24 Stunden, jedoch stromlos, in der feuchten Kammer des Elektrophoresesapparates. Zufolge von Diffusion findet in den feuchten Streifen eine der GAUSS-Kurve entsprechende Konzentrationsverteilung statt. Das Eiweiß wird in üblicher Weise mit Amidoschwarz angefärbt und die mit Auswertgerät erhaltenen GAUSS-Kurven (s. Abb. 8) planimetriert.

Beim Vergleich von vier Auswertgeräten verschiedener Konstruktion wurde, insbesondere bei den monochromatisch arbeitenden, eine gute Linearität des Kurvenverlaufes gefunden. Die Eichkurven für Albumin, α - und γ -Globulin, wie sie z. B. im «Elphor-H»-Auswertgerät ermittelt wurden, liegen für 0,2 mg Eiweiß und Amidoschwarzfärbung um 1 Skalenteil auseinander, mit Bromphenolblau um etwa 0,7 und mit Azokarmin um etwa 1,5 Skalenteile, wobei freilich die Extinktion von Amidoschwarz um ein Mehrfaches größer ist. Bei einer Prüfung der

färberischen Genauigkeit finden DRABBE und REINHOLD⁶⁰ die Aufnahme von Amidoschwarz durch Albumin 1,28 mal größer als jene von γ -Globulin; um den Einfluß der absoluten, aufgetragenen Proteinmenge kennenzulernen, tragen sie in Doppelversuchen die folgenden abgestuften Mengen auf (Amidoschwarzfärbung, «Elphor-H»-Gerät):

Tab. 3⁶⁰

Lösung von Serumprotein cm ³	Protein γ	Albumin rel. %	Globuline			
			α_1 rel. %	α_2 rel. %	β rel. %	γ rel. %
0,008	624	55,2	5,1	9,2	11,2	19,6
0,005	390	55,9	4,7	10,0	9,5	19,9
0,003	234	56,3	4,7	7,6	12,1	19,5
0,001	78	etwa 53	nicht bestimmbar			

Sollen noch kleinere Eiweißmengen aufgetrennt werden, so muß man sich der *Fadenelektrophorese* bedienen. NÖLLER⁶¹ hat auf einem Kunstseidenfaden von 0,1 bis 0,2 mm Stärke in feuchter Kammer mit 10 V/cm innert 8 bis 20 Std. etwa 50 γ eiweißhaltiger Lösung elektrophoretisch getrennt. Die darin enthaltenen 1 bis 0,1 γ Proteine waren mit Erythrosin (Tetrajodfluorescein) angefärbt, welches seinerseits mit J¹³¹ markiert war; durch punktweises Vorbeiführen am Bleischlitz des abgedeckten GEIGER-Zählrohres konnten die Impulse gezählt werden.

⁶⁰ F. DRABBE und J. REINHOLD, *Anal. Chem.* 27 (1955) 1090.

⁶¹ N. C. NÖLLER, *Klin. Wschr.* 32 (1954) 988.

Zu der *planimetrischen Auswertung* hat WALLNER⁸² ausführlich Stellung genommen. Liegen die Fraktionen als gut getrennte Gipfel vor, so kann man die Flächeninhalte der einzelnen Diagrammabschnitte bestimmen, indem man von dem tiefsten Punkt zwischen zwei Gipfeln eine Senkrechte zur Abszissenachse zieht und die so gewonnenen Flächen planimetriert. Für größeren Genauigkeitsanspruch wird ein Verfahren angegeben, wo erst das Diagramm so vergrößert dargestellt wird, daß die größte Spitze mindestens 300 mm hoch ist⁸³; darauf kann man aus den Spitzenanteilen der Einzelkurven, welche noch der Häufigkeitsverteilung entsprechen, Rückschlüsse auf die Flächeninhalte der vollständigen Kurven ziehen. Überdies wird die rechnerische Extrapolation und Ermittlung der *Flächenwerte Gaußscher Kurven* dargelegt. Für eine einfache Berechnung von Fraktionen, welche im Diagramm nicht mit einem selbständigen Gipfel erscheinen, wird der folgende Vorschlag gemacht. Man verlängert die beiden Nachbarcurven bis zur Abszissenachse durch Extrapolation der GAUSSschen Kurvenform (s. Abb. 9).

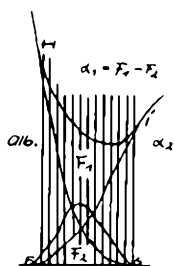


Abb. 9. Zur rechnerisch-graphischen Ermittlung einer Unterfraktion, welche im Pherogramm nicht als gesonderter Gipfel erscheint⁸²

Es entstehen so die einem Dreieck ähnlichen Flächen F_1 und F_2 ; die Differenz dieser Flächen ist diejenige der gesuchten Komponente α_1 . Für die genaue Aufzeichnung des Kurvenzuges der α_1 -Komponente ist eine Vergrößerung des Diagrammes unumgänglich; die Bemessung des Kurvenzuges ist in der Originalliteratur einzusehen.

b) Reproduktionsfähigkeit der Auswertung

Nachdem die P.E. für klinische Belange routinemäßig eine so breite Anwendung erlangt hat, ist es wichtig, die *Streuung der Methode*⁸⁴ zu kennen, wie sie durch Ablesen, Zeichnen und Ausmessen an verschiedenen Instituten bedingt ist. Dazu wurde an sechs Ablesegeräten ein Elektrophoresestreifen (Methode GRASSMANN und HANNIG⁸⁵) je zehnmal in einem anderen Institut ausgemessen. Tab. 4 vereinigt die statistisch ermittelte Streuung⁸⁶.

Tab. 4. Streuung bei zehnfacher Ableseung eines Streifens an sechs verschiedenen Geräten⁸⁶

Bearbeiter	Albumin %	Globuline			
		α_1 %	α_2 %	β %	γ %
Medizinische Klinik .	0,81	0,62	0,46	0,44	0,41
Pathologisches Institut	0,40	0,22	0,33	0,30	0,39
Physiologisch-chemisches Institut	0,44	0,47	0,22	0,22	0,42
Frauenklinik	0,39	0,51	0,22	0,54	0,17
Hygiene-Institut . . .	0,36	0,48	0,26	0,24	0,42
Pharmakologisches Institut	0,28	0,28	0,14	0,37	0,59
Mittelwert	0,45	0,43	0,27	0,35	0,40
Nach GRASSMANN und HANNIG ⁸⁵ . .	0,40	0,30	0,30	0,30	0,40

Wenn es auch vorteilhaft gewesen wäre, die Ausführung der P.E. mit in den Kreis der Betrachtung zu ziehen, so läßt die gefundene Streuung dennoch erkennen, daß die Auswertung der P.E. in der gegenwärtigen Form für serienmäßige Untersuchungsreihen durchaus geeignet ist⁸⁷; dies insbesondere mit Hinsicht auf die erhebliche physiologische Schwankungsbreite biologischer Flüssigkeiten. Wie die von BELK und SUNDERMAN⁸⁸ geleitete Prüfung der gleichzeitigen Untersuchungen klinischen Materials in 59 Laboratorien ergab, übertreffen 50 bis 70 % der Bestimmungen den mittleren experimentellen Fehler. Ähnliche Zahlen ergab auch die Prüfung von 21 englischen Kliniklaboratorien durch WOOTTON und KING⁸⁹.

IV. Vergleich der Ergebnisse von Papierelektrophorese mit freier Elektrophorese und Aussalzungskurven

a) Vergleich mit freier Elektrophorese

Die früheren Vergleiche (1951–1952) der Ergebnisse von freier Elektrophorese und P.E. waren schwierig auszudeuten, weil damals die P.E.-Technik noch ungenügend standardisiert war; so konnte es nicht ausbleiben, daß die Meinung über die Zuverlässigkeit der P.E. geteilt war. Heute, wo die freie Elektrophorese in ihrer jetzigen Ausführungsform seit neunzehn Jahren und die P.E. seit sechs Jahren in Gebrauch sind, zeigen die Werte, wie sie an normalen, menschlichen Sera gewonnen wurden, eine erfreulich gute Übereinstimmung⁹⁰.

⁸² A. WALLNER, *Ärztl. Forsch.* 9 (1955) 332.

⁸³ A. WALLNER und R. ULKE, *Z. physiol. Chem.* 290 (1952) 81.

⁸⁴ M. J. SCHULTE, *Pharmaceut. Weekblad* 89 (1954) 849.

⁸⁵ W. GRASSMANN und K. HANNIG, *Z. physiol. Chem.* 290 (1954) 1.

⁸⁶ J. PIEFER und H. MOLINSKI, *Klin. Wschr.* 32 (1954) 985.

⁸⁷ B. DREVON und R. DONIKIAN, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 37 (1955) 605.

⁸⁸ W. P. BELK und F. SUNDERMAN, *Amer. J. Clin. Pathol.* 17 (1947) 853.

⁸⁹ I. WOOTTON und E. KING, *Lancet* I (1953) 470.

⁹⁰ W. SCHWARTZKOPFF, H. REMMER und E. HÜBNER, *Ärztl. Wschr.* 9 (1954) 1229.

Von den Bearbeitern haben RIVA und MARTINI⁹¹ nach GRASSMANN und HANNIG im «Elphor»-Apparat gearbeitet, während MIETTINEN und MOSIO⁹² teilweise eine eigene Konstruktion benutzten; auch die verwendeten Puffer hatten eine verschiedene Zusammensetzung.

Tab. 5^{91,92}

	RIVA und MARTINI ⁹¹			MIETTINEN und MOSIO ⁹²		
	Freie E. rel. %	P. E. rel. %	F./P.	Freie E. rel. %	P. E. rel. %	F./P.
Albumin . . .	63,5	65,2	0,90	59,1	57,5	1,03
Globulin: α_1 .	2,0	4,1	0,50	3,9	3,5	1,11
α_2 .	7,3	6,7	1,09	8,3	8,9	0,93
β .	11,3	9,8	1,15	14,3	12,1	1,18
γ .	15,9	14,1	1,13	14,4	18,0	0,80
Albumin-Globulin-Quotient	1,74	1,92	0,91	1,44	1,35	1,07
Anzahl der geprüften Sera .	30	12		10	10	

Wenn ein solcher Vergleich bei Sera, die krankheitshalber in ihrer Zusammensetzung stark verändert sind, weniger günstig ausfällt, so ist es bei der Verschiedenheit des Meßvorganges beinahe zu erwarten; denn während das TISELIUS-Verfahren auf die Refraktion der einzelnen Gradienten abstellt, ist die P. E. abhängig von der Affinität der Proteinfractionen zu Amidoschwarz bzw. weiteren Farbstoffen; so ist es gegeben, daß ein erhöhter Gehalt an Lipoprotein für die beiden Messungen

Beta-Anomalie⁹⁴ in Erscheinung treten. Diese Fragestellungen haben eine eingehende Bearbeitung erfahren durch DRABBE und REINHOLD⁹⁵, wobei in der Schlußfolgerung festgestellt wird, daß die Präzision der P. E. der freien Elektrophorese mindestens ebenbürtig, wenn nicht überlegen ist.

b) Vergleich mit Fällungsmethoden

An 60 Sera hat OOSTERHUIS⁹⁶ die von GLEISS und HINSBERG⁹⁷ ausgearbeitete Aussalzung mit Neutralsalzen neben P. E. verwendet. Für die Ausführung der letzteren benutzt er eine Eigenkonstruktion, in welcher nach 5 Std. mittels 240 V eine Auftrennung der Serumproteine über 9 bis 10 cm erreicht wird; die mit Amidoschwarz gefärbten Streifen werden erst mit Direktkolorimetrie ausgemessen und auf die vergrößerten Diagramme (GAUSSsche Kurven) projiziert⁹⁸, darauf wird nach Fraktionen aufgeschnitten und eluiert.

Die drei herausgegriffenen Beispiele (s. Tab. 6) zeigen, wie mit der Ausfällung eine Unterteilung der α -Globuline nicht gelingt; die mittlere Streuung der Salzfällung ist 5,2%, gegenüber P. E. / W. 4,1 % und P. E. / El. 2,7 %. Besonders beachtenswert erscheint die Tatsache, daß die Summe der Fehlerbreite bei der Untersuchung pathologisch veränderter Sera nicht ansteigt. Die Schlußfolgerung der Arbeit erwähnt die Überlegenheit der P. E. auf Grund besserer Differenzierung⁹⁹.

Gestützt auf die guten Erfahrungen von ARDRY¹⁰⁰ haben BLANQUET, CUVELIER und BERGER¹⁰¹ die Serumproteine mit abgestuften Lösungen von Natriumsulfid

Tab. 6. Resultate in relativen Prozenten⁹⁶

Serum	Alb. Δ	α_1 Δ	α_2 Δ	β Δ	γ Δ	Σ Δ	Methode
Normal	55,5 \pm 1,0		11,8 \pm 1,3	14,7 \pm 1,6	18,0 \pm 0,5	4,4	Ch.
	49,1 \pm 1,0	4,5 \pm 0,1	11,1 \pm 0,8	17,7 \pm 1,4	17,6 \pm 1,6	4,9	P. E. / W.
	59,4 \pm 0,7	3,5 \pm 0,1	6,7 \pm 0,2	11,7 \pm 0,3	18,7 \pm 0,1	1,4	P. E. / El.
Pathol.	41,4 \pm 0,6		21,4 \pm 1,1	9,1 \pm 1,2	28,1 \pm 0,6	3,5	Ch.
	40,2 \pm 0,3	5,5 \pm 1,0	16,9 \pm 0,6	19,5 \pm 0,1	17,9 \pm 1,5	4,2	P. E. / W.
	49,7 \pm 0,3	5,2 \pm 0,4	16,0 \pm 0,8	9,7 \pm 0,1	19,4 \pm 0,8	2,4	P. E. / El.
Pathol.	35,3 \pm 0,7		12,3 \pm 1,2	12,2 \pm 1,3	40,2 \pm 0,4	3,6	Ch.
	39,2 \pm 1,0	3,4 \pm 0,4	9,3 \pm 0,3	15,1 \pm 0,2	33,0 \pm 1,1	3,0	P. E. / W.
	41,9 \pm 0,5	1,5 \pm 0,2	6,7 \pm 0,1	9,1 \pm 0,6	40,8 \pm 0,1	1,5	P. E. / El.

Ch. = Chemische Aussalzung

P. E. / W. = Papierelektrophorese, nach WIEDEMANN ausgewertet

P. E. / El. = Papierelektrophorese, mit Elution und Kolorimetrie ausgewertet

eine recht verschiedene Ausgangslage schafft; dadurch kann bei der P. E. die Anfärbung⁹³ modifiziert werden, und bei der freien Elektrophorese kann die sogenannte

⁹¹ G. RIVA und V. MARTINI, *Schweiz. med. Wschr.* 83 (1953) 73.

⁹² J. K. MIETTINEN und T. MOSIO, *Acta Chem. Scand.* 7 (1953) 1225.

⁹³ E. KÖIV, G. WALLENUS und A. GRÖNWALL, *Scand. J. Clin. Lab. Inv.* 4 (1952) 47.

⁹⁴ R. TRAUTMAN, *Arch. Biochem. Biophys.* 53 (1954) 85.

⁹⁵ TH. A. LANGAN, E. L. DURRUM und W. P. JENCKS, *J. Clin. Invest.* 34 (1955) 1427, 1437 (s. Abschnitt V b 7).

⁹⁶ H. K. OOSTERHUIS, *J. Lab. Clin. Med.* 44 (1954) 280.

⁹⁷ J. GLEISS und K. HINSBERG, *Z. exp. Med.* 116 (1951) 599; K. HINSBERG, *Ärzt. Forsch.* 6 (1952) 145.

⁹⁸ E. WIEDEMANN, *Helv. Chim. Acta* 30 (1947) 892.

⁹⁹ Vgl. P. POLIMENI und P. TURITO, *Riv. Ist. Sierotecap. Ital.* 29 (1954) 225; W. SCHWARTZKOPFF, H. REMMEN und E. HÜBNER, *l.c.*⁹⁰.

¹⁰⁰ R. ARDRY, *Amer. Biol. Clin.* 7 (1949) 407; *Bull. Soc. Chim. Biol.* 32 (1950) 237.

¹⁰¹ L. BLANQUET, R. CUVELIER und J. BERGER, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 36 (1954) 641.

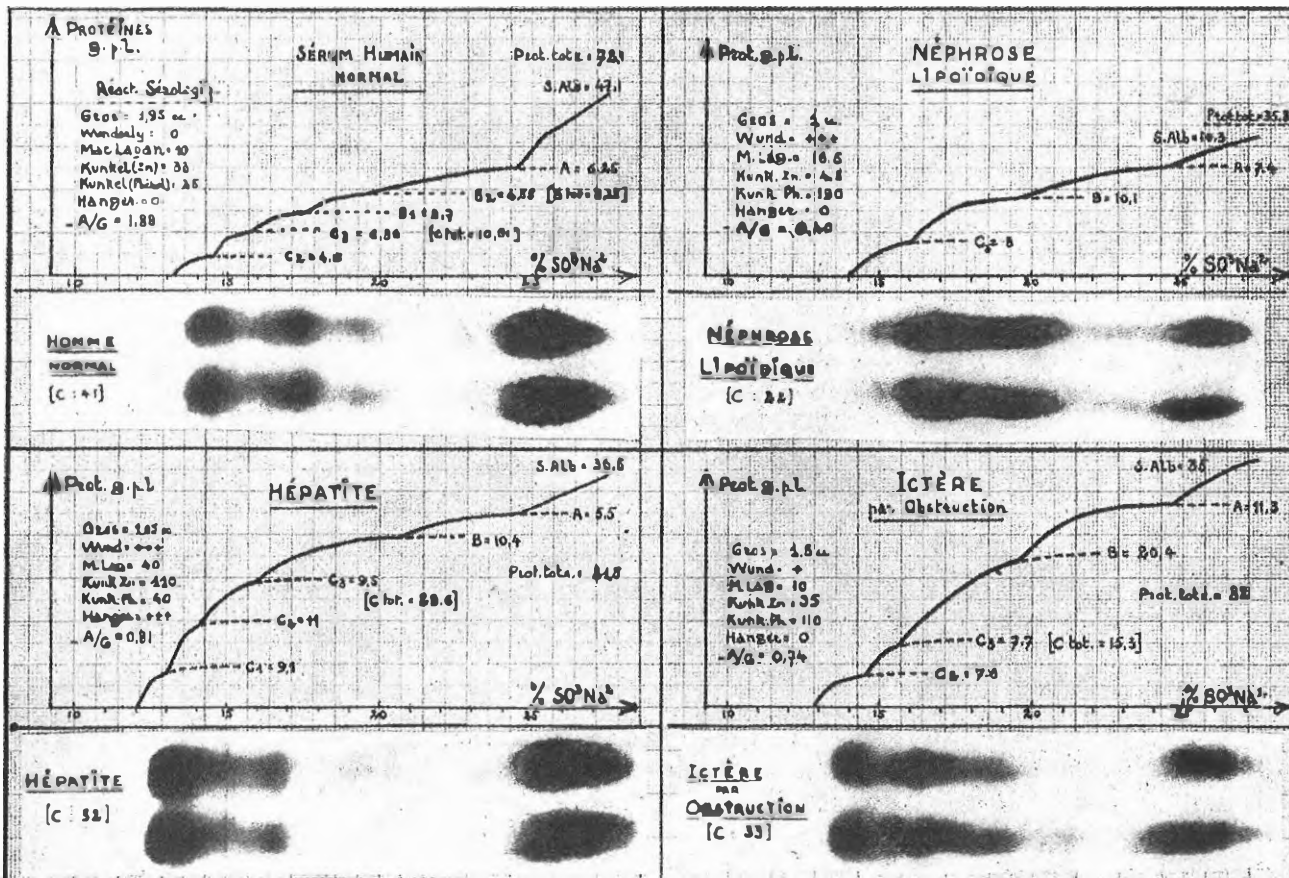


Abb. 10. P.E.-Streifen und darüber die entsprechenden Aussatzkurven mit Na₂SO₃.
 Normale Serumzusammensetzung sowie jene bei Nephrose, Hepatitis und Okklusionsicterus¹⁰⁰

ausgefällt und in der überstehenden Lösung das noch gelöste Protein mit Biuret-Reaktion bestimmt. Auf Abb. 10 sind die Proteine von links nach rechts gewandert; über dem Albuminflucken befindet sich der Bereich hoher Na₂SO₃-Konzentrationen, wie es zur Ausfällung des hydrophilen Serumalbumins notwendig ist.

Beim Normalserum (oben links) gibt das starke Ansteigen des rechten Abschnittes der Ausfällungskurve den hohen Albumingehalt von 63,6 rel. % zu erkennen, während bei Nephrose (rechts oben) dieser Kurvenast nur flach verläuft (Albumingehalt 40,1 rel. %). Die gelungenere Superposition veranschaulicht den Zusammenhang von Salz-fällung und P.E.

Tab. 7¹⁰²

	Albumin		(α + β)-Globulin		γ-Globulin	
	P.E. rel. %	T.F. rel. %	P.E. rel. %	T.F. rel. %	P.E. rel. %	T.F. rel. %
Mittelwert. .	66,6	69,8	18,7	16,6	14,6	13,7
σ	5,5	6,9	3,6	4,7	3,1	4,4

P. E. = Papierelektrophorese, T. F. = Natriumthiosulfatfällung

¹⁰² J. GRAS und M. SALAZAR, *Plasma* 2 (1954) 1.

Mit gleicher Absicht wurde von GRAS und SALAZAR¹⁰² die fraktionierte Fällung der Serumproteine durch Na₂S₂O₃ verfolgt. Dazu wurden die ausgefällten Fraktionen in wenig Wasser aufgenommen und nach Dialyse der P.E. unterworfen; auf diese Weise konnten die Fraktionen Albumin, (α + β)-Globulin und γ-Globulin erhalten werden; die P.E. brachte somit eine Prüfung der Einheitlichkeit dieser Fällungen. In Tab. 7 sind die Mittelwerte von 26 untersuchten Normalsera vereinigt.

Eine ähnliche Kontrolle der Säurefällung der Serumproteine hat SIMON¹⁰³ beschrieben; hier werden die Proteine, so wie sie von einer HCl-Verdünnungsreihe ausgefällt werden, nach ihrer Lyophilisierung mittels P.E. auf ihre Zusammensetzung geprüft.

V. Ergebnisse mit Papierelektrophorese

a) Anorganische Verbindungen

Für die Trennung verschiedener Elemente der seltenen Erden verwendet LEDERER¹⁰⁴ einen Citratpuffer und legt für 45 Min. einen Gleichstrom von 300 V an;

¹⁰³ K. SIMON, *Experientia* 10 (1954) 506.

¹⁰⁴ M. LEDERER, *C. R. Acad. Sci.* 236 (1953) 200; *Anal. Chim. Acta* 11 (1954) 145.

die Wegstrecke, welche in dieser Zeitspanne zur Kathode zurückgelegt wird, beträgt für Scandium 5 mm, Samarium 26, Neodym 30, Yttrium 30, Cerium^{III} 37, Lantan 46 und Actinium 60. Nach der P. E. werden die Substanzen kenntlich gemacht durch Bestäuben mit ammoniakalischer Lösung von 8-Hydroxychinolin in Äthanol. Mit 0,5-n HCl als Elektrolyt gelingt (mit 150 V) innerhalb von 2 Std. die Trennung von Selenit (Kation) und Tellurit, ebenso jene von Ferrocyanid und Ferricyanid¹⁰⁵. Für die Auftrennung von Li, Na, Rb und Mg in NH₄OH als Elektrolyt werden Spannungen von 225 bis 500 V angelegt¹⁰⁶. Die seltenen Erden konnten auch in 0,1-mol. milchsaurer Lösung mit 400 V und 200 mA getrennt werden (s. Abb. 11); dabei findet eine selektive Sorption durch das Papier statt, welche mit abnehmender Säurekonzentration zunimmt. SATO, NORRIS und STRAIN¹⁰⁷ gelang die Trennung von Cupri-Ion von alkalischen Erden, indem durch die Bildung von Komplexionen die Wanderungsrichtung umgekehrt und die völlige Abtrennung gewisser Kationen erreicht wird; die Möglichkeit der Trennung von Silber-, Nickel- und Kupfer-Ionen wurde in den verschiedensten Elektrolyten untersucht und die Sorption der Ionen am Papier mittels Chromatographie bestimmt.

Bei der Prüfung der Beweglichkeit von Phosphationen^{108, 110} zeigten sich H₂PO₄⁻ und HPO₄⁻ nahezu gleich beweglich, dagegen PO₄³⁻ etwa viermal rascher. Da man weder voraussehen kann, welche Ionengruppierungen gute Trenneffekte ermöglichen, noch die dazu notwendigen physikalisch-chemischen Gegebenheiten kennt, zeitigt dieses Anwendungsgebiet der P. E. nur allmähliche Fortschritte.

b) Organische Verbindungen

1. Organische Säuren

Organische Säuren mit der Kettenlänge C₁₀, C₁₂, C₁₄, C₁₆ und C₁₈ lassen sich nach BARNETT und SMITH¹¹² in 3-n-Ammoniaklösung und 6 V/cm auf Papier trennen; die Wegstrecken pro Std. sind 4,5, 1,5, 0,33, 0,07 und 0,0017 cm. Die gewanderten Säureflecken werden durch Bestäuben mit einem Gemisch von Methylrot und Bromthymolblau sichtbar gemacht. Die Trennung ungesättigter und gesättigter Säuren von derselben Kettenlänge mißlang; dagegen ist die Trennung der Laurinsäure und Myristinsäure von Ölsäure möglich.

TAUBER¹¹² zeigte einen Weg, um Brenztraubensäure und α -Ketoglutarensäure zu trennen und quantitativ zu

¹⁰⁵ M. LEDERER, *Chem. & Ind.* 1954, 1481.

¹⁰⁶ S. HIRASAWA und T. SAKAMOTO, *J. Chem. Soc. Jap.* 74 (1953) 862.

¹⁰⁷ T. R. SATO, W. NORRIS und H. H. STRAIN, *Anal. Chem.* 26 (1954) 267.

¹⁰⁸ Vgl. H. H. STRAIN, *Anal. Chem.* 24 (1952) 356; H. H. STRAIN und G. MURPHY, *Anal. Chem.* 24 (1952) 50.

¹⁰⁹ J. L. ENGELKE und H. H. STRAIN, *Anal. Chem.* 26 (1954) 1872.

¹¹⁰ Vgl. Acetalphosphatide: F. LEUPOLD, H. FRANK und H. BÜTTNER, *Z. physiol. Chem.* 296 (1954) 55.

¹¹¹ A. BARNETT und D. K. SMITH, *Nature* 174 (1954) 659.

¹¹² H. TAUBER, *Anal. Chem.* 27 (1955) 287.

bestimmen. Dazu werden die genannten Ketosäuren erst in die 2,4-Dinitrophenylhydrazone übergeführt und davon etwa je 4 γ auf Whatman-1-Streifen gebracht.

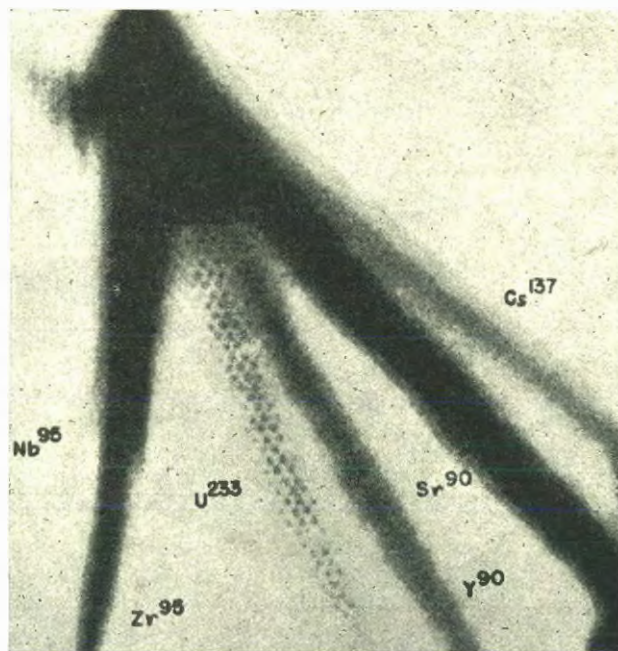


Abb. 11. Beispiel für kontinuierliche Elektrochromatographie. Die getrennten Wegspuren von Cäsium, Strontium, Yttrium, Uranium, Zirkonium und Niob¹⁰⁸

Im Veronalpuffer vom pH 8,45 dauert die Trennung bei 150 V und 11 mA 3 Std. Als Blutgehalte (γ in 10 cm³ Blut) werden gefunden: beim Menschen 78,8 Brenztraubensäure und 19,5 α -Ketoglutarensäure, beim Kaninchen lauten die Werte 234,0 und 44,3, beim Meer-schweinchen 93,7 und 9,2.

2. Aminosäuren

Die neueren Arbeiten über die P. E. von Aminosäuregemischen befassen sich in erster Linie mit der Trennung von Eiweißhydrolysaten; hier wurde die P. E. entweder vor oder nach Papierchromatographie durchgeführt, mit der Absicht, Aminosäuren mit ähnlichen R_f-Werten noch besser aufzutrennen. BLASS, MACHEBOEUF und REBEYROTTE¹¹³ führten erst auf Papier Arches 301, mit der Feldstärke von 10 V/cm und in Veronalpuffer vom pH 8,6 innerhalb von 3 Std. 30 Min. die Trennung durch von [Äthanolamin, Lysin, Arginin, Glucosamin, Serin], Methionin, Cystin und [Asparaginsäure]⁺. In einer späteren Arbeit führten BLASS, LECOMTE und POLONOVSKI¹¹⁴ erst mit essigsäurem Butanol Papierchromatographie durch und anschließend P. E. nach Drehen des Papieres um 90°. Auf diese Weise wurde das Hydrolysat von *Cholera-Vibrionen*, von *Brucella Abortus* sowie die

¹¹³ J. BLASS, M. MACHEBOEUF und P. REBEYROTTE, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 35 (1953) 953.

¹¹⁴ J. BLASS, O. LECOMTE und J. POLONOVSKI, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 36 (1954) 627.

freien Aminosäuren des Blutserums getrennt. GRASSMANN, HANNIG und PLÖCKL¹¹⁵ stellen die P.E. voran und trennen bei pH 3,9 in der kontinuierlichen Anordnung in die vier Hauptgruppen: basische Aminosäuren¹¹⁰, neutrale Aminosäuren, Glutaminsäure und Asparaginsäure; Auftrennung und quantitative Bestimmung der einzelnen Komponenten erfolgt dann unter besonders angepaßten Bedingungen. Die P.E. leistet hier eine Vortrennung. Bearbeitet wurden die Hydrolysate von Casein, Kollagen, Prokollagen und Insulin mit einem mittleren Fehler von etwa 3%. Ferner haben BISENTE und OSTEUX¹¹⁷ auf besonders langen Papierstreifen in mol/30-Phosphatpuffer vom pH 7,0 mit 400 V während 22 bis 24 Std. DNP-Aminosäuren getrennt; so DNP-Asparaginsäure von Glutaminsäure, DNP-monoamino-monocarboxylsäuren; ε-di-DNP-lysin von di-DNP-histidin und ε-DNP-lysin von α-DNP-arginin. WILLIAMSON und PASSMANN¹¹⁸ trennten DNP-amino-Alkohole von den Reaktionsprodukten des reduzierten und hydrolysierten Pepsins; es gelang eine Gruppentrennung von Dinitrophenol, Dinitroanilin und DNP-Aminosäuren.

LISSITSKY, GARCIA und ROCHE¹¹⁹ trennten Guanidinverbindungen in Veronalpuffer vom pH 8,6 mit 300 V auf Papier Arches 302 innert 2 Std. Sie stellten folgende Wegstrecken fest:

Citrullin 3,20 cm	Arkain 10,70 cm
Glycocyamin . . . 3,85 cm	Dimethylguanidin 12,85 cm
Kreatin 4,00 cm	Agmatin 13,00 cm
γ-Guanido-butter-säure 4,00 cm	Methylguanidin . 13,90 cm
Arginin 8,05 cm	Guanidin 14,90 cm

Die Anwendung erhöhter Feldstärke erlaubt die Trennzeit abzukürzen; die Erfahrung zeigte, daß dadurch die einzelnen Flecken (Ninhydrin usw.) besser beisammenbleiben und die Bildung von Schwänzen zu meist ausbleibt.

Sodann brachte die Hochspannungs-P.E. (siehe Ia, HEILMEYER und Mitarbeiter¹⁰) eine beträchtliche Erweiterung unserer Kenntnisse von den ninhydrinpositiven Fraktionen des Serumreststickstoffs. Während die Schwachstromelektrophorese nur die drei Hauptgruppen unterscheiden läßt: basische, neutrale und saure Bestandteile, gelingt mit einem Spannungsgefälle bis 120 V/cm die Trennung einer größeren Zahl von Aminosäuren, Peptiden, die Vitamine B₁, B₆ und Pantothen-säure, ferner Harnstoff, Isoamylamin u. a., somit von Substanzen der verschiedensten Stoffklassen (s. Abb. 12).

¹¹⁵ W. GRASSMANN, K. HANNIG und M. PLÖCKL, *Z. physiol. Chem.* 299 (1955) 258.

¹¹⁶ H. HARRIS und F. WARREN, *Biochem. J.* 57 (1954) xxxii.

¹¹⁷ G. BISENTE und R. OSTEUX, *C. R. Acad. Sci.* 230 (1950) 1404.

¹¹⁸ M. B. WILLIAMSON und J. M. PASSMANN, *Biochim. Biophys. Acta* 15 (1954) 246.

¹¹⁹ S. LISSITSKY, I. GARCIA und J. ROCHE, *Experientia* 10 (1954) 379; ferner: S. LISSITSKY, *C. R. Acad. Sci.* 230 (1954) 1167.

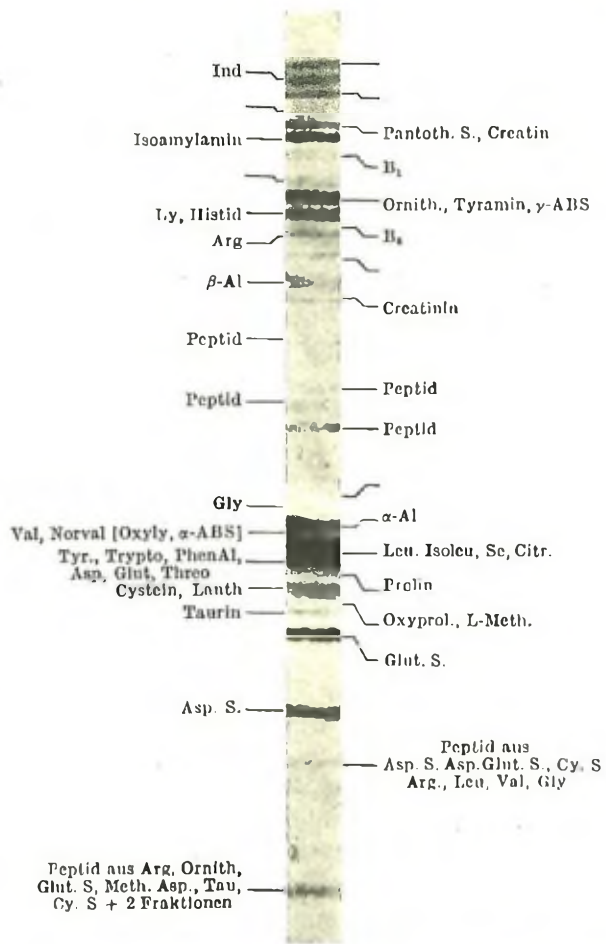


Abb. 12. Durch Hochspannungs-P. E. getrennte Substanzen des Serumreststickstoffs. 60 V/cm während 45 Min. Ninhydrinfärbung¹⁰

Diese neue Meßmöglichkeit schafft erhebliche Weiterungen für Physiologie und Medizin.

3. Amine

Auf einem horizontalen Papierstreifen von 150 cm Länge bestimmte WEBER¹²⁰ die relative Wanderungsgeschwindigkeit von Aminen im Verhältnis zu jener von K⁺ und NH₄⁺; mit 1300 V und Citratpuffer vom pH 3,8 erhält er folgende Verhältniszahlen:

Tab. 8¹²⁰

Harnstoff 0	Kreatin 0,37
Glycin 0,04	Phenyläthylamin . 0,41
Mezcalin 0,24	Histamin 0,58
Arginin 0,25	Propylamin 0,61
Histidin 0,26	Cadaverin 0,64
Lysin 0,26	Putrescin 0,67
Gramin 0,27	Äthylamin 0,72
Ornithin 0,28	Dimethylamin . . . 0,81
Tyramin 0,29	Methylamin 0,92
Ephedrin 0,32	NH ₄ ⁺ , K ⁺ 1,00

¹²⁰ R. WEBER, *Helv. Chim. Acta* 34 (1951) 2031.

4. Kohlenwasserstoffe

Um den Mono- und Disacchariden im elektrischen Feld eine Beweglichkeit zu erteilen, bildet man entsprechende Zucker-Borat-Komplexe¹²¹. Für ein pH von 8,6 benützt man den Puffer aus 0,05-mol. Na-tetraborat, 0,2-mol. Borsäure und 0,05-mol. NaCl; jedoch sind auch weitere Substanzen mit zwei benachbarten OH-Gruppen, wie Polyphenole und ihre Polymerisationsprodukte, zur Komplexbildung befähigt. FOSTER¹²² verwendet «Whatman Nr. 3 MM» Papier mit 0,2-mol. Borat/0,1-mol. NaOH-Puffer vom pH 10 sowie 900 V.

Tab. 9¹²²

Substanz	W _G	Substanz	W _G
D-Glukose	1,00	Melibiose .	0,80
3-Methyl-D-Glukose . . .	0,82	Gentiobiose	0,75
3,5,6-Trimethyl-D-Glukose	0,71	Isomaltose.	0,69
3,4-Dimethyl-L-Rhamnose	0,36	Lactose . .	0,38
4-Methyl-D-Galaktose . .	0,27	Maltose . .	0,32
2,3-Dimethyl-D-Glukose .	0,12	Cellobiose .	0,23

Die zurückgelegte Wegstrecke W_G ist relativ mit Bezug auf jene von Glukose, sowie korrigiert für den Einfluß von Elektroosmose durch die Beobachtung der Bewegung von 2,3,4,6-Tetramethylglukose, welche mit Boration keine Komplexe bildet.

Die Zucker werden nach der P. E. kenntlich gemacht, indem das Papier mit Anilin-phtalat-Lösung besprüht wird, dem einige Tropfen Eisessig zugefügt worden. Nach kurzem Erhitzen bei 100 bis 110°C zeigen die Stellen mit Zucker eine intensive Fluoreszenz. In ähnlicher Weise wurden Glycopyranoside¹²³ auf ihre Beweglichkeit untersucht. Für saure Mucopolysaccharide verwendet RIENITS¹²⁴ Whatman Nr. 3 MM und trennt Modellmischungen von Hyaluronsäure, Chondroitinsulfat und Heparin in 0,1-mol. Na-Phosphat-Puffer bei pH 6,7 mit der Feldstärke von 5 V/cm innert 4 Std. Auch neutrale Polysaccharide¹²⁵ wurden aufgetrennt sowie Oligosaccharide¹²⁶, wie sie von Hefeinvertase aus Rohrzucker synthetisiert werden. Für die Trennung von Galaktogen und Glykogen wurde als Trägersubstanz enggewobene Seide¹²⁷ vorgeschlagen.

Die unmittelbare Färbung der Glykoproteidkomponenten des Serumproteins auf dem Papierstreifen nach P. E. ist mit wechselndem Erfolge versucht worden. Die auf Vorschlag von KÖIV und GRÖNWALL¹²⁸ verwendete

¹²¹ Übersicht bei C. A. ZITTE, *Advances in Enzymologia* 12 (1951) 493.

¹²² A. B. FOSTER, *J. Chem. Soc.* 1953, 982, A. B. FOSTER und M. STACEY, *J. Appl. Chem.* 3 (1953) 19.

¹²³ A. B. FOSTER, E. F. MARLEW und M. STACEY, *Chem. & Ind.* 1953, 825.

¹²⁴ K. G. RIENITS, *Biochem. J.* 53 (1953) 79.

¹²⁵ D. H. NORTHCOPE, *Biochem. J.* 58 (1954) 353.

¹²⁶ D. GROSS, *Nature* 173 (1954) 487.

¹²⁷ M. GELDMACHER und H. WEINLAND, *Z. physiol. Chem.* 292 (1953) 65.

¹²⁸ E. KÖIV und A. GRÖNWALL, *Scand. J. Lab. Inv.* 4 (1952) 244.

Färbung nach HOTCHKISS¹²⁹ besitzt den Nachteil, die Cellulose des Papierstreifens ebenfalls stark anzufärben, und ist oft noch nach dem Auswaschen einer unkontrollierbaren Rekoloration unterworfen.

Die Erfahrung zeigte, daß es günstig ist, die Streifen nach kräftigem Auswaschen in salzsaurer Kaliummetabisulfatlösung¹³⁰ durch absoluten Alkohol zu ziehen und nach raschem Trocknen bei 110°C gleich in elektronisch verstärkten Densitometer die Lichtschwächung abzulesen; auf diese Weise kann die relative Verteilung der Glukoproteide auf das Eiweißspektrum des Serums gewonnen werden. Tab. 10 vereinigt die Ergebnisse von BISERTE und GUERRIN¹³¹ durch Färbung mittels basischem Fuchsin, von BJÖRNESJÖ¹³² die Mittelwerte von 30 ebensolchen Untersuchungen und schließlich die mikrochemischen Bestimmungen von SEIBERT und Mitarbeitern¹³³ mittels Perchlorsäure (Tryptophan-Reaktion).

Tab. 10^{131, 132, 133}

Serumprotein-fraktion	BISERTE und GUERRIN ¹³¹ mg %	BJÖRNESJÖ ¹³² mg %	SEIBERT et al. ¹³³ mg %
Albumin	4,3	14,4	5,04
Globuline α_1	20,5	14,7	9,51
α_2	33,8	27,9	44,30
β	25,8	22,3	26,80
γ	16,0	20,6	16,3

Für die ungenügende Übereinstimmung mag teilweise die verschiedene Abtrennung des α_1 -Globulins vom Albumin verantwortlich sein. Vergleichbare Arbeiten mit teilweise modifizierter Färbetechnik wurden ausgeführt durch POLLAK¹³⁴, ROMANI¹³⁵, RAYNAUD¹³⁶, ANDREANI et al.¹³⁷ und BENHAMOU¹³⁸. BAUDOIN und Mitarbeiter¹³⁹ führten Bestimmungen der Glykoproteine nach P. E. des Liquors aus.

Für eine quantitative Bestimmung der proteingebundenen Kohlehydrate des Serumweißes ist es vorläufig zuverlässiger, die Fraktionen nach der P. E. zu eluieren und im Eluat die Hexosen und das Glucosamin getrennt zu bestimmen. Dieser Weg wurde von KNEDEL¹⁴⁰, BOAS und FOLEY¹⁴¹ u. a. beschrritten; ersterer fand den Gehalt an Galakto-Mannosid im Albumin 0,45 % pro g Eiweiß und an Glucosamin 0,35 % pro g Eiweiß, im α_1 -Globulin

¹²⁹ R. HOTCHKISS, *Arch. Biochem.* 16 (1948) 131.

¹³⁰ G. GOMORI, *Amer. J. Clin. Pathol.* 22 (1952) 277.

¹³¹ G. BISERTE und F. GUERRIN, *II^e Coll. Lab. Hôp. St-Jean, Bruges*, 1954, 185.

¹³² K. B. BJÖRNESJÖ, *Scand. J. Clin. Lab. Inv.* 7 (1955) 153.

¹³³ F. S. SEIBERT, M. PFAFF und M. V. SEIBERT, *Arch. Biochem.* 18 (1948) 279.

¹³⁴ L. R. POLLAK, *Delaware Med. J.* 26 (1954) 299.

¹³⁵ J. D. ROMANI, *Presse Méd.* 62 (1954) 1578; *C. R. Soc. Biol.* 148 (1954) 1069.

¹³⁶ D. ANDREANI und B. GRASSI, *Rass. Fisiopat. Clin.* 26 (1954) 767.

¹³⁷ R. RAYNAUD, *Ann. Biol. Clin.* 11 (1953) 377.

¹³⁸ E. BENHAMOU und G. PUGLIESE, *Presse Méd.* 62 (1954) 651.

¹³⁹ A. BAUDOIN, J. LEVIN und P. MILLION, *C. R. Soc. Biol.* 148 (1954) 1033.

¹⁴⁰ M. KNEDEL, *Verh. dtsh. Ges. inn. Med.* 61 (1955) 277.

1,88 % und 1,59 g %; im α_2 -Globulin 2,55 % und 2,77 %; im β -Globulin 3,21 % und 1,88 % und im γ -Globulin 1,31 % und 1,12 %. Hierfür wurden 20 normale Sera präparativ durch P.E. getrennt. In einem kritischen Vergleich der Farbreaktionen zwecks Bestimmung der Hexosen haben SÜDHOF, KELLNER und SCHULTE¹⁴¹ den Wert der Orcinmethode hervorgehoben. Für die Bestimmung von Hexosen im Eluat wird viel die Anthron-Methode¹⁴² benutzt oder eine Modifikation¹⁴³ derselben, für Glucosamin zumeist eine von ELSON und MORGAN abgeleitete Methode^{144, 145}. Ein biologisch interessantes Mucoprotein wurde von JAYLE und BOUSSIER¹⁴⁶ aus dem Blutserum und Urin von Patienten isoliert; es wandert in der P.E. mit dem α_2 -Globulin und enthält neben 11,3 % Galacto-Mannosid 5,7 % Glucosamin. Die Proteinbindung dieses *Haptoglobin*¹⁴⁶ genannten Mucoproteins wurde von WIEME¹⁴⁷ mit jener von Hämoglobin an α_2 -Globulin verglichen. Auch das thyroxinbindende Protein¹⁴⁸ hat einen isoelektrischen Punkt bei pH 4,0 und wandert im Bereich des α -Globulins (Serum, Mensch).

PUTNAM und BOWLES¹⁴⁹ bestimmten in Borat/Phosphat- und Borat/Carbonat-Puffern die Wanderungsgeschwindigkeit von *Gambier*-, *Mangrove*- und *Quebracho-Tannin*; in den Extrakten dieser Gerbmittel waren fluoreszierende Verunreinigungen von kleinerer Beweglichkeit enthalten.

5. Farbstoffe

Für die Prüfung der Einheitlichkeit von Farbstoffen hat sich die P. E. vielfach bewährt. Bei der Untersuchung von Acridinfarbstoffen fand LEDERER¹⁵⁰ in 0,1-n HCl als Elektrolyt und 8 V/cm nach 1 1/2 Std. folgende Reihe abnehmender Wanderungsgeschwindigkeit: Atebrin, 5-Amino-Acridin, Acriflavin und Proflavin. MORI und KIMURA¹⁵¹ untersuchten Farben, wie sie in der Nahrungsmittelindustrie verwendet werden, PATTI¹⁵² die Beweglichkeit von Eosinabkömmlingen. FRANGLER¹⁵³ hat die Beweglichkeit $\frac{\text{cm}^2}{\text{V} \cdot \text{Sek.}} \cdot 10^{-5}$ von je 5 γ Sulfophtalcin-farbstoffen auf Whatman Nr. 4 bei pH 8,6 und 8 V/cm

nach 3 Std. gemessen; er findet für Phenolrot 13,8 (3 Komponenten), Chlorphenolrot 14,4 (3), Kresolrot 12,2 (3), Bromphenolrot 13,8, Thymolblau 9,0, Metakresolpurpur 12,2, Bromthymolblau 11,9, Bromkresolgrün 13,5 und Bromphenolblau 12,8.

6. Alkaloide, Fermente, Hormone und Toxine

Für den Nachweis von Alkaloiden im Papierstreifen nach P.E. wird zumeist die starke Fluoreszenz dieser Stoffklasse benutzt. KARIYONE und Mitarbeiter¹⁵⁴ haben in 5-n Essigsäure mit 750 V und 0,5 mA/cm eine große Anzahl wandern lassen; nach 2 Std. ergaben sich die folgenden Wegstrecken: Atebrin 50, Aneurin 72, Atropin 45, Benadryl 46, Berberin 41, Brucin 40, Coffein 5, Emetin 46, L-Ephedrin 52, Lobelin 46, Nicotin 99, Procain 47, Chinin 74 und Strychnin 48. Manche der wichtigsten Alkaloide zeigen ähnliche Wanderungsgeschwindigkeiten, die sich auch bei Variation des pH-Wertes wenig verändern.

BAKER und PELLEGRINO¹⁵⁵ haben mittels P.E. eine Anzahl Enzyme im Blutserum getrennt und lokalisiert; alkalische Phosphatase wird an der Stelle von α_2 -Globulin gefunden, *ali-Esterase* und *pseudo-Cholinesterase* zwischen α_2 - und β -Globulin; dagegen *Amylase* am Ort von γ -Globulin. Bei der Fermentation durch *Aspergillus Niger* wurden mittels P.E. *Carbohydrasen*¹⁵⁶ nachgewiesen; dazu wurden 50 γ Rohmaterial in Phosphatpuffer vom pH 6,9 und $\mu = 0,1$ auf Whatman 3 MM getrennt. Ebenso gelang die Trennung von zwei *Desoxyribonukleasen*¹⁵⁷, die im Urin enthalten sind, sowie die Bestimmung der Wanderungsgeschwindigkeit von kristallisiertem *di-Isopropyl-phosphoryl-Trypsin*¹⁵⁸. Aus Schweineniere wurde nach vielfacher Fraktionierung eine 1600fache Reinigung von *Leucin-Aminopeptidase*¹⁵⁹ erzielt; das Enzym wurde schließlich durch P.E. auf Whatman 3 MM mit 150 V bei 0,23 mA/cm nach 16 Std. im Eluat isoliert. Ähnlich wurde *Hexokinase*¹⁶⁰ mittels P.E. in Veronalpuffer von pH 8,6 isoliert und durch Leukofuchsinfärbung nachgewiesen; das Enzym ist ein Glykoprotein, das zu 52 % aus Mannosebausteinen besteht. Auch das *S-Alanyl-Coenzym A*, wie es in den Mitochondrien und Mikrosomen der Leber vorkommt, konnte mittels Hochspannungselektrophorese bei 50 V/cm aufgetrennt und gereinigt werden¹⁶¹, der neutrale Puffer von Pyridin/Essigsäure/Wasser (= 10 : 1 : 89) wurde hinterher durch Gefriertrocknung entfernt.

¹⁴¹ H. SÜDHOF, H. KELLNER und N. SCHULTE, *Z. physiol. Chem.* 300 (1955) 68, 82.

¹⁴² K. B. BJÖRNESJÖ, *Scand. J. Clin. Lab. Inv.* 7 (1955) 147; M. GRAFF, M. GREENSPAN, I. LEHMAN und J. HOLECHEK, *J. Lab. Clin. Med.* 37 (1951) 736.

¹⁴³ V. KAPUSCINSKI und B. ZAK, *Amer. J. Clin. Path.* 23 (1953) 784.

¹⁴⁴ N. F. BOAS und J. FOLEY, *Endocrinology* 56 (1955) 474.

¹⁴⁵ N. F. BOAS, *J. Biol. Chem.* 204 (1953) 553.

¹⁴⁶ M. F. JAYLE und G. BOUSSIER, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 36 (1954) 959; M. F. JAYLE, G. BOUSSIER und J. BADIN, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 34 (1953) 1063.

¹⁴⁷ R. J. WIEME, *Rev. Belge Pathol. Méd. Exp.* 23 (1954) 321.

¹⁴⁸ J. ROBBINS, M. PETERMANN und J. E. RALL, *J. Biol. Chem.* 212 (1955) 403.

¹⁴⁹ R. PUTNAM und A. BOWLES, *J. Amer. Leather Chem. Ass.* 48 (1953) 343.

¹⁵⁰ M. LEDERER, *Anal. Chim. Acta* 6 (1952) 267.

¹⁵¹ I. MORI und M. KIMURA, *J. Pharm. Soc. Jap.* 74 (1954) 179.

¹⁵² F. PATTI, *J. Chim. Physique* 52 (1955) 77.

¹⁵³ G. T. FRANGLER, *Nature* 175 (1955) 134.

¹⁵⁴ T. KARIYONE, Y. HASHIMOTO, I. MORI und M. KIMURA, *J. Pharm. Soc. Jap.* 73 (1953) 805.

¹⁵⁵ R. W. BAKER und C. PELLEGRINO, *Scand. J. Clin. Lab. Inv.* 6 (1954) 94.

¹⁵⁶ L. WETTER und J. CORRIGAL, *Nature* 174 (1954) 695.

¹⁵⁷ T. KOSZALKA, K. SCHREIER und K. I. ALTMAN, *Biochem. Biophys. Acta* 15 (1954) 194.

¹⁵⁸ L. W. CUNNINGHAM, *J. Biol. Chem.* 211 (1954) 13.

¹⁵⁹ D. SPACKMAN, E. SMITH und D. BROWN, *J. Biol. Chem.* 212 (1955) 255.

¹⁶⁰ H. BOSER, *Z. physiol. Chem.* 300 (1955) 1.

¹⁶¹ CH. STEWART und TH. WIELAND, *Nature* 176 (1955) 316.

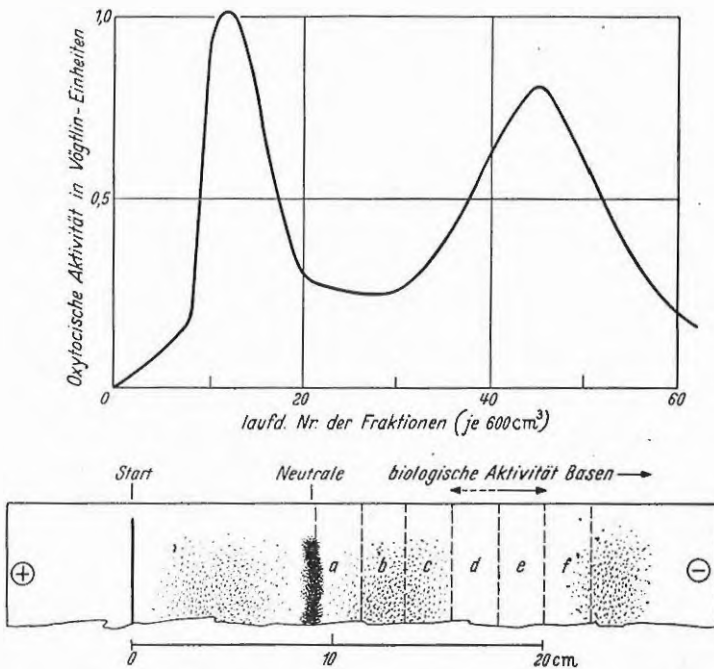
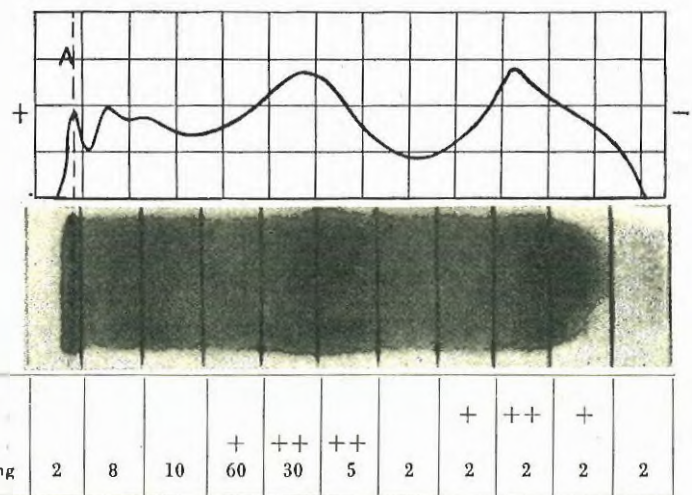


Abb. 13. a) Oben: Verteilung der oxytoxischen Aktivität auf die einzelnen Fraktionen des Eluates nach Chromatographie an der Papiersäule. – Unten: P. E.-Streifen mit den Substanzen des Maximums links (s. obenstehende Kurve). Ninhydrinführung¹⁰⁵

Eine Studie zeigte das verschiedene elektrophoretische Verhalten von kristallisiertem *Insulin*¹⁰² sowie amorphen Präparaten von verschiedenem Zinkgehalt; die P. E. wurde in Veronalpuffer von pH 8,6 auf Whatman 1 mit 145 bis 310 V und 2 bis 10 mA vorgenommen. Aus dem menschlichen Urin wurden mittels P. E. *Gonadotropine*¹⁰³ isoliert; ebenso an der Stelle von β -Globulin (Serumprotein) das *thyreotrope Hormon*¹⁰⁴ lokalisiert. Durch Fraktionierung mit Äthanol und Pyridin, Verteilungschromatographie an Papiersäulen, Hochspannungs-Ionophorese und Papierchromatographie wurde von TURBA und HETZEL aus 100 l Blutserum (etwa 7000 g Protein) 0,8 mg eines *Peptids* mit *oxytoxischen Eigenschaften* gewonnen¹⁰⁵; die Lösung der Substanzen wurde auf einen Bogen von Schleier- & Schüll-Papier 2043 b, 30 × 60 cm, aufgetragen; als Puffer diente ein Gemisch von Pyridin/Eisessig/Wasser wie 90 : 5 : 905 (Vol.) mit dem pH 6,4; bei einer angelegten Gleichspannung von 6000 V (50 V/cm) im eisgekühlten Bad

Abb. 13. b) P. E. von Bienentoxin. Unter dem Pherogramm die Ergebnisse der Aktivitätsbestimmung in den Eluaten der einzelnen Fraktionen¹⁰⁶

Direkte Hämolyse +
 Lecithinase-A-Aktivität +
 Hemmung der Eidottergerinnung



von 40 l Toluol dauerte die Trennung 2 ½ bis 3 ½ Std. Abb. 13 a zeigt unten ein Ionophogramm vom Eluat des ersten Maximums der darüber abgebildeten Aktivitätskurve nach Säulenchromatographie; die Unterabschnitte a bis f wurden nach Hydrolyse der zweidimensionalen Papierchromatographie unterworfen. Im Streifen e war schließlich die Substanz mit der höchsten oxytoxischen Aktivität enthalten und verhielt sich bei Papierchromatographie aus verschiedenen Lösungsmittelsystemen einheitlich.

Anlässlich der Untersuchung von *Colubriden-* und *Viperidengiftstoffen* lokalisierten GRASSMANN und HANNIG¹⁰⁶ im Papierstreifen nach P. E. auch die Aktivität von Bienengift (siehe Abb. 13 b); im Veronal-Natriumacetat-Puffer von pH 8,6 und $\mu = 0,1$, 110 V und 1,0 mA wandern die Proteinkomponenten des *Bienengiftes* innert 14 Std. heinahe ausschließlich zur Kathode. Sie sind somit stark basisch, während die *Viperidentoxine* immer auch anodisch wandernde Eiweißfraktionen enthalten. In den Eluaten der Unterabschnitte wurde die direkte Hämolyse bestimmt an einer Erythrocyten-Aufschwemmung, ferner die Lecithinase-A-Aktivität¹⁰⁷ durch Einwirkung auf Eidotterlecithin und anschließende Hämolyse an Erythrocyten. Wie aus Abb. 13 b ersichtlich ist, liegen die Aktivitäten in den größeren Komponenten getrennt vor (Abb. 13 b). Die abgebildeten Untersuchungsergebnisse sind Beispiele für die erfolgreiche Kombination moderner Papiermethoden sowie der Lokalisierung biologischer Aktivitäten mit den verschiedenen Testmethoden. GRASSET und SCHWARTZ¹⁰⁸ haben mit P. E.

¹⁰² J. SUNDMAN und K. LINDBERG, *Pharmac. Notisbl. Finn.* 5 (1953) 91.

¹⁰³ H. STRAN und G. JONES, *Bull. John's Hopkins Hosp.* 95 (1954) 162.

¹⁰⁴ L. LAMFYED, A. KASSENAR und A. QUERIDO, *Nature* 175 (1955) 685.

¹⁰⁵ F. TURBA und H. HETZEL, *Biochem. Z.* 325 (1954) 524; vgl. F. TURBA, H. FELZER und H. SCHUSTER, *Z. physiol. Chem.* 296 (1954) 97.

¹⁰⁶ W. GRASSMANN und K. HANNIG, *Z. physiol. Chem.* 296 (1954) 30.

¹⁰⁷ Vgl. W. NEUMANN, E. HAERMANN und A. HAUSEN, *Naumy Schmieberg's Arch. exp. Path.* 217 (1953) 130.

¹⁰⁸ J. GRASSET und D. SCHWARTZ, *Ann. Inst. Pasteur* 88 (1955) 271.

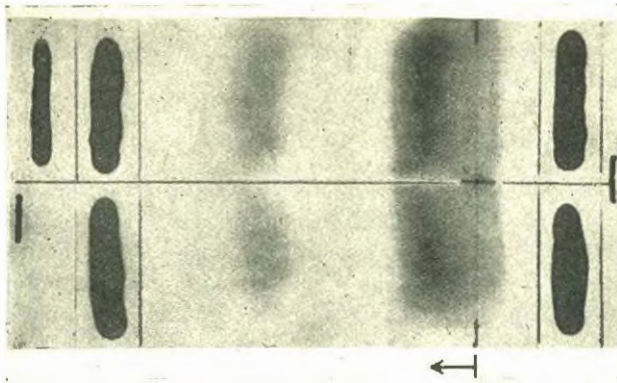


Abb. 14. Kontrolle der Lipoidfärbung mit Triglycerid-Standard¹⁷⁰

bei pH 9,3 das Toxin der *Vipera russellii* in acht Fraktionen aufgetrennt, wobei das Protein sich etwa gleichmäßig anodisch und kathodisch bewegte; in einer anodisch wandernden Unterfraktion befindet sich das Protein, welches Fibrinogen nach Zugabe von Ca⁺⁺ koaguliert und proteolytische Aktivität besitzt. WIELAND und DOSE¹⁰⁰ beobachteten im Ablauf der Latenzzeit die Änderung der Serumproteine von Maus und Ratte nach Vergiftung mit kristallisiertem Phalloidin und α -Amanitin aus dem Grünen Knollenblätterpilz (*Amanita phalloides*). Für die Isolierung des Vitamin B₁₂ bindenden Proteins der Magen-Mucosa des Schweines verwendet CRESSER¹⁷⁰ die kontinuierliche P. E. mit Phosphatpuffer von pH 6,4 und $\mu = 0,03$; auf Papier von Macherey & Nagel Nr. 214 wird bei 580 bis 600 V und 11 bis 12 mA die Trennung innert 48 Std. erreicht.

7. Lipide

Von der Möglichkeit, im Papierstreifen nach P. E. die Lipoproteide durch Fettfärbung sichtbar zu machen, ist insbesondere für klinisch-chemische Fragestellungen¹⁷¹ viel Gebrauch gemacht worden. Beinahe allgemein wird nach der Vorschrift von SWAIN¹⁷² mit Sudanschwarz gefärbt; die Öltröfärbung^{105, 173} bringt eine etwas verschiedene Farbnuance zwischen den Lipoproteiden im α -Globulin-Bereich und jenen im β -Globulin. Fettrat 7 B (Ciba)¹⁷⁴ und Osmiumsäure¹⁷⁵ färben ebenfalls gut, während das früher verwendete Blau-BZL (Ciba) nicht mehr hergestellt wird. Um eine Kontrolle zu besitzen, auf welche man das Ergebnis von Färbung und Entfärbung mittels Sudanschwarz beziehen kann, haben WUNDERLY und WIEME¹⁷⁶ den Triglycerid-Standard eingeführt; dieser stützt sich auf die Tatsache, daß Triolein, Lecithin und Corn Oil von Sudanschwarz gleich stark angefärbt werden wie die Lipoproteide des Serums. Man bereitet sich

eine Lösung von 300 mg % Triolein (Merck) und von 100 mg % Tristearat (British Drug Houses) in Chloroform; von dieser Lösung bringt man auf den trockenen Papierstreifen (nach P. E.) links und rechts (vgl. Abb. 14) je 0,01 cm³ in dünnem Strich auf. Als färberische Kontrolle der Gesamtlipide kann man noch 0,01 cm³ des Serums auftragen (s. Abb. 14, links oben).

Nach Sudanschwarzfärbung und Elution der einzelnen Abschnitte mit Äthanol und 20% Eisessig können die kolorimetrischen Werte der Lipoproteide verglichen werden mit jenen des Triglyceridstandards; die quantitative Bewertung erhält dadurch einen standardisierten Bezugswert. Derselbe ist erwünscht, weil bereits die physiologischen Schwankungen des Blutlipoidgehaltes wesentlich stärker sind als jene der Serumproteine.

BOYD¹⁷⁷ und ebenso COMFORT¹⁷⁸ bestimmen die Lipoproteidverteilung im Papierstreifen, indem sie denselben in 12 bis 20 Segmente einteilen und in jedem Segmenteluat das Cholesterin nach einer Modifikation¹⁷⁰ von LIEBERMANN-BURCHARDT bestimmen. Das Verfahren ist arbeitsreich und hat zur Voraussetzung, daß die Relation von Cholesterin zu den übrigen Lipoidbestandteilen konstant ist. Ferner ist mit Erfolg der Stärkeblock¹⁸⁰ (Kartoffelstärke) als Trägermedium angewendet worden, für die Elektrophorese von Serum-Lipoproteiden; Stärke besitzt keine Adsorption für Fette, ist jedoch schwieriger zu handhaben als Papier. Neben zahlreichen Prüfungen der Lipoproteinverhältnisse im Serum des gesunden Organismus¹⁸¹⁻¹⁸⁰ betrafen andere Arbeiten spezielle Krankheitsgebiete, wie Arteriosclerose¹⁸⁷⁻¹⁹², Hypothyreosen¹⁹³, Rheumatismus¹⁹⁴, Nephrose¹⁹⁵, Myelom¹⁹⁶, Hepatopathie¹⁹⁷⁻¹⁹⁹ u. a. Wei-

¹⁷⁷ G. S. BOYD, *Biochem. J.* 58 (1954) 680.

¹⁷⁸ A. COMFORT, *Biochem. J.* 59 (1955) x.

¹⁷⁹ I. ABELI, B. LEVY, B. BRODIE und F. KENDALL, *J. Biol. Chem.* 195 (1952) 357.

¹⁸⁰ P. ACKERMANN, G. TORO und W. B. KOUNTZ, *J. Lab. Clin. Med.* 44 (1954) 517.

¹⁸¹ N. ROSENBERG, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 80 (1952) 751.

¹⁸² R. RAYNAUD, J. D'ESTONCUES und P. PASQUET, *Sém. Hôp. Paris* 30 (1954) 4051.

¹⁸³ H. BANSI, R. GRONOW und H. REDEZKY, *Klin. Wschr.* 33 (1955) 101.

¹⁸⁴ A. SCANU und S. SCHIANO, *Riv. Ist. Sieroterap. Ital.* 29 (1954) 276.

¹⁸⁵ E. BENJAMON und J. POLONOVSKY, *Amer. Biol. Clin.* 1953, 181.

¹⁸⁶ N. ROSENBERG, S. YOUNG und S. PROGER, *Amer. J. Med.* 16 (1954) 818.

¹⁸⁷ E. RUBB, H. EDER und D. BARR, *J. Clin. Inv.* 33 (1954) 16662.

¹⁸⁸ J. P. SOULIER, D. ALACILLE und M. BURSTEIN, *Sém. Hôp. Paris* 29 (1953) 3171.

¹⁸⁹ A. SCANU und S. SCHIANO, *Riv. Ist. Sieroterap. Ital.* 29 (1954) 457.

¹⁹⁰ CH. KROETZ und F. FISCHER, *Dtsch. med. Wschr.* 1954, 653.

¹⁹¹ S. GOTTFRIED, R. POPE, N. FRIEDMAN und S. MAURO, *J. Lab. Clin. Med.* 44 (1954) 651.

¹⁹² R. ANTONINI, C. PIVA, I. SALVINIO und A. SORDI, *Giorn. Geront.* 1953, 1-95 (Suppl. 1).

¹⁹³ H. BANSI und F. FRETWURST, *Klin. Wschr.* 1954, 887.

¹⁹⁴ F. JACQUELINE, J. GRONLADE und B. DRUBOVKA, *Rev. Rhumat.* 21 (1954) 556.

¹⁹⁵ E. KLEIN und H. BRÜGEL, *Z. klin. Med.* 153 (1955) 126.

¹⁹⁶ B. SACHS, P. CADY und G. ROSS, *Amer. J. Med.* 1954, 153.

¹⁹⁷ A. NYS, *Hô Coll. hab. Hôp. St-Jean, Bruges*, 1954, 153.

¹⁹⁸ F. H. FRANKEN und E. KLEIN, *Dtsch. med. Wschr.* 80 (1955) 1074.

¹⁹⁹ E. ROBOZ, W. HESS, F. FORSTER und D. TEMPLE, *Arch. Neurol.* 72 (1954) 154.

¹⁰⁰ TH. WIELAND und K. DOSE, *Biochem. Z.* 325 (1954) 439.

¹⁷⁰ A. CRESSER, *Experientia* 11 (1955) 111.

¹⁷¹ F. HERBST, *Hautarzt* 5 (1954) 168.

¹⁷² B. SWAIN, *Scand. J. Clin. Lab. Inv.* (Suppl. 9) 5 (1953) 1.

¹⁷³ E. DURRUM, M. PAUL und E. SMITH, *Science* 116 (1952) 116.

¹⁷⁴ H. OTT und W. ROTII, *Klin. Wschr.* 32 (1954) 1099.

¹⁷⁵ W. MAW, *Science* 118 (1953) 86.

¹⁷⁶ CH. WUNDERLY und R. J. WIEME, *Arch. Int. Physiol. Biochim.* 63 (1955) 318.

ter wurde bearbeitet der Einfluß von Heparinabgaben auf die Verteilung und Konzentration der Lipoproteide des Serums²⁰⁰⁻²⁰⁶.

8. Pharmaka

Im allgemeinen werden Chemotherapeutika, welche ohne wesentliche Eiweißbindung in der Blutbahn kreisen, leichter in die Gewebe diffundieren, d. h. den Kreislauf verlassen, als solche, die von der einen oder anderen Fraktion des Serumweißes gebunden werden; Verweildauer, Inaktivierung, Ausscheidung und ähnliche Fragestellungen können sehr wohl mit P.E. bearbeitet werden. KUTZIM²⁰⁷ stellte fest, daß die elektrophoretische Wanderung von Sulfonamiden durch die Gegenwart von Serum nicht beeinflußt wird; er findet die relative Beweglichkeit bei pH 8,6 und 110 V von *Badional* gleich 1, von *Albucid* 1,0, von *Gantrisin* 0,83, von *Cibazol* 0,82, von *Globucid* 0,80 bis 0,81, von *Elkosin* 0,64, von *Eubasin* 0,37, von *Prontosil* 0,39, von *p-Aminobenzoesäure* 1,13 und von *Urea* 0,00.

Mit P.E. wurde ferner untersucht das Verhalten von *PAS* und *Isonicotinsäurehydrazid* bei Anwesenheit von Serumprotein²⁰⁸; ebenso das Verhalten der Bluteiweißkörper bei der Behandlung kindlicher Tbc mit hohen *Isoniazid*-Dosen²⁰⁹, sowie der Einfluß einer langdauernden Behandlung von Kaninchen mit *Dihydrostreptomycin* und *Neomycin*²¹⁰. Auch die Wirkung von 25 mg *Phenylbutazone*²¹¹ pro kg Körpergewicht (Kaninchen) wurde während 20 Tagen so verfolgt. Die *Penicillinbindung* an die Serumproteine konnte neben dem biologischen Nachweis in den Fraktioneneluatens auch durch Autoradiographie²¹² lokalisiert werden; die Verwendung von N-Äthyl-Piperidinsalz des S³⁵-*Penicillin-G* ergab dessen ausschließliche Bindung durch das Serumalbumin. Demgegenüber ließ sich eine Bindung von *Isoniazid*²¹³, dessen Carboxylgruppe mit C¹⁴ markiert war, nicht nachweisen. *Germanin* (Bayer 215) hat die Eigenschaft, in der P.E. als scharf abgegrenzte Bande zu wandern; mit basischem Methylenblau bildet es eine unlösliche, blaue Additionsverbindung, welche den Nachweis erleichtert²¹¹. Beim pH des Blutes werden pro Albuminmolekül etwa 1 bis 2 Moleküle *Germanin* gebun-

den, und es entsteht die Frage, ob in dieser Bindung *Germanin* intrazellulär aufgenommen wird und eiweißgebunden abgelagert.

9. Protein

Eiweiß-Eisen-Stoffwechselbeziehungen. Untersuchungen über die Wechselbeziehungen zwischen Eiweiß- und Eisen-Stoffwechsel haben sich mit Erfolg der P.E. bedient. Es konnte eine Unterteilung herausgearbeitet werden in *Funktionsproteide* (Hämoglobin, Myoglobin, Cytochrome, Katalasen), *Depotproteide* (Ferritin und Siderin) sowie *Transportproteide* (Transferrin, Siderophilin), welche letztere dieselbe Wanderungsgeschwindigkeit aufweisen wie das β_1 -Globulin des Blutserums (vgl. WUHRMANN und JASINSKY²¹⁵). Nach P. E. von Serum, welchem radioaktives *Ferrisaccharat* (Fe⁶⁵ und Fe⁵⁹) zugesetzt war, ergab die Autoradiographie, daß keine Proteinbindung eintritt²¹⁶ (vgl. Abb. 15).

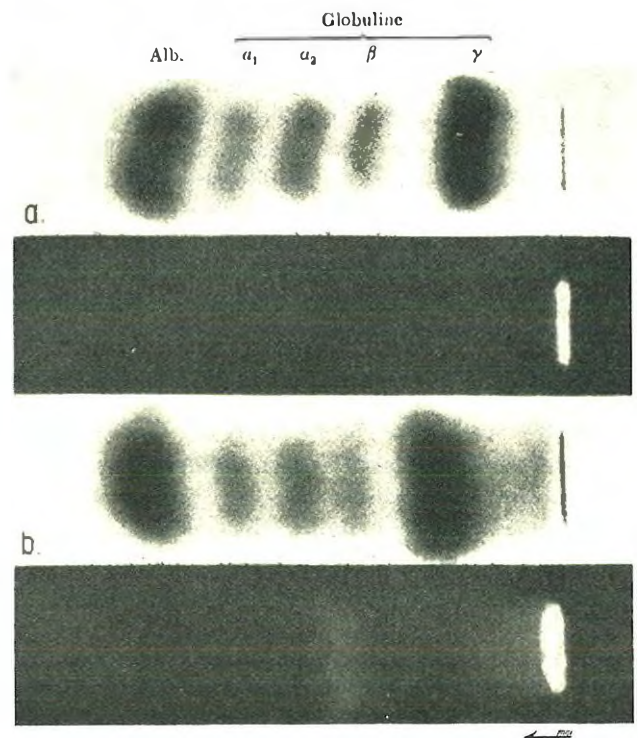


Abb. 15. P.E. und Autoradiogramm des mit radioaktivem Ferrisaccharat allein (a) oder mit einem Gemisch von Ferrisaccharat und Ferrichlorid (b) beladenen Serums eines γ -Myelom-Patienten. Das Ferrisaccharat bleibt an der Aufsatzstelle liegen, die freien Eisenionen wandern, gebunden an das Transferrin mit dem β -Globulin²¹⁶

Das Markieren des Serums mit Radioeisen zeigte bei Dysproteinämien oft eine Abnahme der Eisenbindungskapazität. Von den vielfältigen Eisenumsetzungen des Organismus ist insbesondere die Physiologie und Pathologie des *Speichereisens* (Ferritin) umfassend bearbeitet

- ²⁰⁰ A. SCANU und I. CAUSA, *Minerva Med.* 1955, 66.
²⁰¹ A. SCANU und S. SCHIANO, *Minerva Med.* 1955, 66.
²⁰² S. LAURELL, *Scand. J. Clin. Lab. Inv.* 7 (1955) 28.
²⁰³ F. HERBST und N. HURLEY, *J. Clin. Inv.* 33 (1954) 907, 34 (1955) 581.
²⁰⁴ E. NIKKILÄ und R. GRÄSBECK, *Acta Med. Scand.* 1954, 39.
²⁰⁵ H. L. DOBSON und S. STRIBLING, *J. Lab. Clin. Med.* 44 (1954) 788.
²⁰⁶ E. KLEIN und F. FRANKEN, *Dtsch. med. Wschr.* 80 (1955) 44.
²⁰⁷ H. KUTZIM, *Naturwiss.* 39 (1952) 135.
²⁰⁸ G. EISEL und H. SEEFELDT, *Naturwiss.* 41 (1954) 305.
²⁰⁹ R. HUMBERT, *Mtschr. Kinderheilkde.* 102 (1954) 431.
²¹⁰ R. SANTARATO, *Arch. Int. Pharm. Dyn.* 98 (1954) 394.
²¹¹ C. TRIPODO und A. CAPALDO, *Atti Accad. Pugliese* 1953, 11.
²¹² K. OFFE, S. RUST, E. SCHWARZ und H. WEISE, *Klin. Wschr.* 33 (1955) 419.
²¹³ A. LASS, H. J. TEPE und K. WUNDERLICH, *Klin. Wschr.* 33 (1955) 515.
²¹⁴ H. OTT und C. SEEGER, *Z. ges. exp. Med.* 125 (1955) 455.

- ²¹⁵ F. WUHRMANN und B. JASINSKY, *Klin. Wschr.* 33 (1955) 97.
²¹⁶ G. STIEFEL und B. JASINSKY, *Schweiz. med. Wschr.* 84 (1954) 946, 947.

worden (WÖHLER²¹⁷ und Mitarbeiter²¹⁸). Dazu wurden P. E. auf Whatman Nr. 1 ausgeführt in Veronal-Natrium-Puffer vom pH 8,6 und 14 Std. Dauer. *Ferritin* kann mit Amidoschwarz angefärbt und mit 10prozentiger Cadmiumsulfatlösung zur Kristallisation gebracht werden. *Ferritin*, *Hämoglobin*, *Hämosiderin* und *Cytochrom C* Verfahren nach Besprühen mit 2 prozentiger Kaliumferrocyanidlösung eine Blaufärbung (Berlinerblau); auf Grund einer Eichkurve kann der Ferritineisengehalt quantitativ ermittelt werden.

Unerwartet wichtig wurde die P. E. für das Erkennen *abnormen Hämoglobins*. Die Erfahrung zeigte, daß alle Arten von Hämoglobin (Hb) anodisch wandern in Veronalpuffer von pH 8,6 und $\mu = 0,05$, jedoch mit abweichender Geschwindigkeit. Die relativ größte Wanderungsgeschwindigkeit besitzt das Hämoglobin des normalen Erwachsenen (s. Abb. 16), während für weitere Arten die Reihenfolge gilt: $A > F > S$, $D > C$ (MOTULSKY, PAUL und DURRUM²¹⁹). Die P. E. macht es möglich, in Gemischen bis zu minimal 10 % von einer Art Hämoglobin zu erkennen; im allgemeinen ist dies genügend, da Mischungen *in vivo* mit kleineren Gehalten nur ausnahmsweise gefunden werden²²⁰. Abb. 16^a bringt eine Zusammenstellung verschiedener Hämoglobinarten nach P. E. und Färbung der Globin-komponente mit Bromphenolblau.

Auf Abb. 16b²¹⁹ sind Modellmischungen²¹⁹ von Hb C und Hb A gewandert, daraus konnten Ausbeute und Genauigkeit ermittelt werden. Da die P. E. für die Reihenuntersuchung²²¹ von Familien oder ganzen Sippen vorzüglich geeignet ist, hat sie sich im klinisch-hämatologischen Laboratorium rasch einen Platz erobert²²². Ferner wurde mit P. E. untersucht: das *Stroma*²²³ menschlicher Erythrocyten, das Hb von Säugetieren²²⁴ (Ziege, Schaf), *Hämolyse* von Erythrocyten mit *Sichelzellen*^{225, 226} und Hb relativ hoher elektrophoretischer Beweglichkeit²²⁷.

Die P. E. wurde ferner verwendet zur Auftrennung der löslichen Anteile von *Muskelleiweiß*²²⁸ (Kaninchen); der

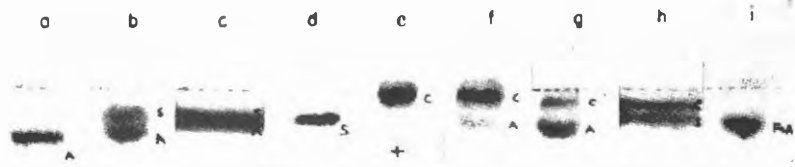


Abb. 16 (oben). Hämoglobinarten nach P. E.²¹⁹ a) Hämoglobin des normalen Erwachsenen (100% A). b) Sichelzellen (35% S und 65% A). c) Sichelzell-Thalassämie (82% S und 18% A). d) Sichelzell-Anämie (100% S) usw.

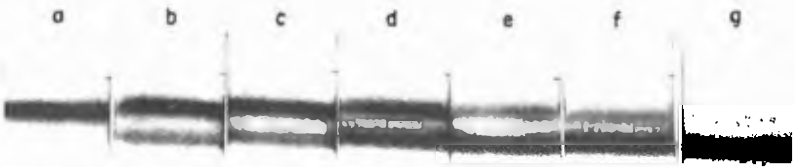


Abb. 16 (unten). Modellmischungen verschiedener Arten von Hämoglobin²¹⁹. a) 90% Hb C und 10% Hb A. b) 75% Hb C und 25% Hb A. c) 67% Hb C und 33% Hb A usw.

normalen und pathologischen *Magenschleimhaut*²²⁹; der Proteinveränderungen während der Bebrütung des Hühnerreis²³⁰; des *Maul-und-Klauenseuche-Virus*²³¹; der Proteinkomponenten des *Tuberculin*²³²; des Verhaltens der Serumweißkörper beim Kaninchen unter experimenteller *chronischer Allylformiatvergiftung*²³³ sowie experimentell erzeugter *toxischer Nephrose*²³⁴. Um die Bindung des Kupfers an die Serumweißkörper zu untersuchen²³⁵, wurde das Kupferisotop Cu^{64} (Halbwertszeit 12,8 Std.) als Chlorid einem Menschen, 3 Hunden, 3 Kaninchen und 3 Meerschweinchen intravenös injiziert. Für die P. E. wurde jeweils 0,3 cm³ Serum auf Streifen von Whatman Nr. 1 aufgetragen und im Veronalnatrium (Natriumacetatpuffer von pH 7,4 und $\mu = 0,05$ mit 280 V innert 4 bis 5 Std. aufgetrennt²³⁵. Nach 12 bis 24 Std. ist beinahe die gesamte Aktivität im α -Globulin (Kaninchen, Meerschweinchen) bzw. im β -Globulin (Hund) lokalisiert.

Den Einfluß der *Pasteurisation* und *Sterilisation* auf die *Molkenproteine* der Milch haben VANDEGAER und MIETTINEN²³⁶ untersucht; die HTST-Pasteurisation von 15 Sek. bei 72°C verändert die Proteinzusammensetzung nur unwesentlich (s. Abb. 17a), dagegen erscheint nach der Sterilisation eine gültige Auftrennung nicht mehr möglich, was auf irreversible Strukturveränderungen hindeutet.

Ähnliche Verhältnisse ergeben sich bei der *Pasteurisation* von *Plasmaproteinlösung*, wo die Wärmebehandlung

²¹⁷ F. WÖHLER, *Dtsch. med. Wschr.* 80 (1955) 30.

²¹⁸ W. KÄIDERLING und F. WÖHLER, *Arch. exp. path. Pharm.* 221 (1954) 375, 418.

²¹⁹ A. MOTULSKY, M. PAUL und E. L. DURRUM, *Blood* 9 (1954) 897.

²²⁰ K. SINGER und B. FISHER, *Blood* 8 (1953) 270.

²²¹ K. SINGER und Mitarbeiter, *Blood* 9 (1954) 1023, 1032, 10 (1955) 405.

²²² W. BERGREN, PH. STURGEON und H. ITANO, *Acta Haemat.* 12 (1954) 160.

²²³ T. A. PRANKERD, K. ALTMAN und J. ANDERSON, *Nature* 174 (1954) 1146.

²²⁴ H. HARRIS und F. L. WARREN, *Biochem. J.* 60 (1955) xxix.

²²⁵ E. SHOOTER und E. SKINNER, *Biochem. J.* 60 (1955) xxviii.

²²⁶ L. PEROSA und L. B. BARI, *Experientia* 10 (1954) 469.

²²⁷ D. RIGAS, *Scienza* 121, Nr. 3141, vom 11. März 1955.

²²⁸ G. TOSCHI und A. MARANI, *Rendic. Ist. Sup. San.* 16 (1953) 148, 17 (1954) 780.

²²⁹ L. DEMLING und J. ZACH, *Ärzt. Forsch.* 9 (1955) 300.

²³⁰ M. KAMINSKY und J. DURIEUX, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 36 (1954) 1037.

²³¹ A. RANDRUP, *Acta Path. Microb. Scand.* 35 (1954) 381.

²³² J. RHODES und E. SORKIN, *Experientia* 10 (1954) 427.

²³³ M. KESSEL, P. KÖRTGE und F. PEZOLD, *Arch. exp. Path. Pharm.* 223 (1954) 123, 127.

²³⁴ R. EMMRICH und CH. PFERNER, *Z. ges. inn. Med.* 10 (1955) 355.

²³⁵ H. WOLFF, N. LANG und M. KNEDEL, *Z. ges. inn. Med.* 125 (1955) 359.

²³⁶ J. VANDEGAER und J. MIETTINEN, *Acta Chem. Scand.* 7 (1953) 1239.

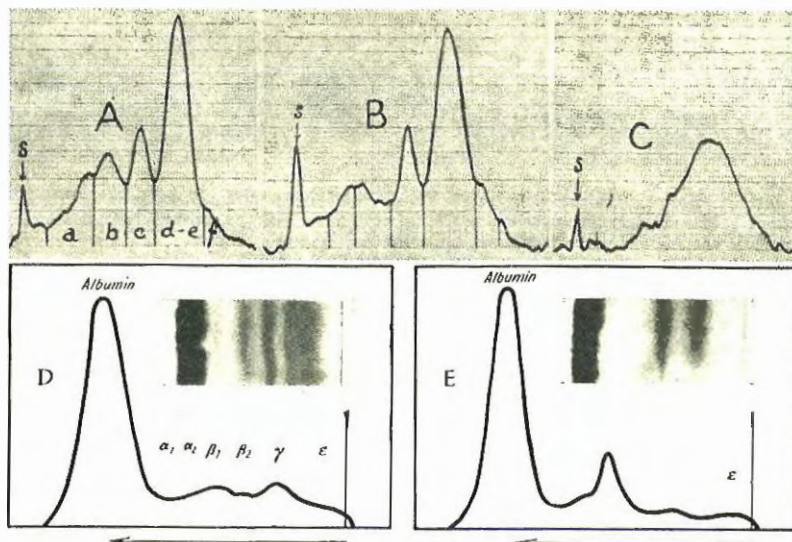


Abb. 17. a) Densitogramme nach P.E. der Molkenproteine von normaler Milch (A), nach Pasteurisation (B) und Sterilisation (C)²³⁰. - b) Papier- und TISELIUS-Phorogramme (absteigende Gradienten) von Plasmaproteinlösung: D unvorbehandelt, E nach Pasteurisation²³⁷

lung (10 Std. bei 60°C) bei einem Teil der Globuline eine Assoziation zu größeren Teilchen bewirkt (NITSCHMANN und KISTLER²³⁷); immerhin ist die Abnahme der Dispersion noch nicht so groß, daß Anteile der Proteine auf der Auftragsstelle haften bleiben.

In *Körperflüssigkeiten*²³⁸ sind insbesondere die Proteine im *Liquor cerebrospinalis* vielfach mit P.E. untersucht worden. Dabei konnte eine Proteinfraction, welche dem Albumin vorausläuft (Vorfraktion), näher charakterisiert werden. Diese Vorfraktion²³⁰ macht bei gesunden Personen etwa 4% des Liquorgesamtproteins (Normalwerte: 0,02 bis 0,04%) aus und hat deshalb eine vorgängige Konzentration des Liquors zur Voraussetzung. Diese wird erreicht durch Dialyse von 15 bis 20 Std. gegen 35 prozentige Dextranlösung bei 4°C. Das Protein der Vorfraktion hat einen Mittelwert der Sedimentationskonstanten²³⁹ von $s_{20} = 4,2$ (Albumin $s_{20} = 4,1$ bis 4,3), einen Hexosamingehalt²³⁰ von 0,4 bis 1,4%; es enthält 16% Stickstoff, jedoch weder Nukleoproteine noch Lipoproteine. Weitere Arbeiten betreffen die Methodik^{240, 241} der P.E. zur Untersuchung der Liquorproteine; ferner deren Auftrennung bei verschiedenen Krankheiten^{238, 242, 243}, wo sie wertvolle Beiträge brachten zur Liquordiagnostik^{139, 245}. In Ergänzung zur Serumanalyse wurde

²³⁷ H. NITSCHMANN und P. KISTLER, *Helv. Chim. Acta* 37 (1954) 1767.

²³⁸ R. CANTA und R. CAMBRA, *Rass. Med. Sarda* 5 (1954) 135.

²³⁹ F. W. ALY, *Biochem. Z.* 325 (1954) 505.

²⁴⁰ G. GRIES, F. W. ALY und H. v. OLDERSHAUSEN, *Klin. Wschr.* 31 (1953) 644.

²⁴¹ R. CUVELIER, J. BERGER, P. TRONCHIE und J. CHACNAUD, *Ann. Biol. Clin.* 12 (1954) 389.

²⁴² E. ROBOZ, W. HESS und D. TEMPLE, *J. Lab. Clin. Med.* 43 (1954) 785.

²⁴³ R. ROBINEAUX und S. BAZIN, *Sang (Paris)* 25 (1954) 900.

²⁴⁴ R. EMMICH und H. PETZOLD, *Dtsch. Arch. klin. Med.* 202 (1955) 303.

²⁴⁵ H. SCHÖNENBERG, *Arztl. Forsch.* 9 (1954) 33.

auch die Ascites-Flüssigkeit^{246, 247} mit P. E. untersucht. Ferner bewährte sich die Methode bei der Untersuchung der Kammerwasserproteine²⁴⁸, wo beim Menschen²⁴⁹ in einem Volumen von 0,12 bis 0,18 cm³ normalerweise ein Proteingehalt von etwa 15 mg% vorliegt.

Zahlreich sind die Untersuchungen, wo durch die Gabe von radioaktiv markierten Aminosäuren oder durch Infusion von radioaktiv markiertem Serumweiß eines artgleichen Spendertieres die mittlere Lebensdauer des Serumweißes auf Grund seiner Abbaugeschwindigkeit bestimmt werden konnte. Nach intravenöser Gabe von Spurendosen konnte mittels P. E. der Einbau der markierten Aminosäuren in einzelne Eiweißfraktionen²⁵⁰ bestimmt und daraus die Umsatzrate berechnet werden. Auf diesem Wege messen MAURER, NIKLAS u. LEHNERT²⁵¹ die Umsatzrate von Serumweiß und

Körperweiß beim normalen Kaninchen mit S³⁵-Methionin²⁵²; ferner das Stoffwechselgleichgewicht und die Bildungsrate²⁵³ von Serumalbumin und -globulin beim Menschen²⁵⁴. Weitere Arbeiten mit radioaktiven Isotopen und P. E. betreffen den Einbau von Glycerin-2-C¹⁴ und J¹³¹(²⁵⁵) in das Serumweiß²⁵⁶, Hämoglobinstudien mittels Na₂Cr⁵¹O₄²⁵⁷, den Nachweis von Ribonukleinsäure und Desoxyribonukleinsäure²⁵⁸ über Markierung mit P³², Transport und Bindung²⁵⁹ im Serum von Fe⁵⁵ und Fe⁵⁰, Cu⁶⁴(²⁶⁰), Co⁶⁰ und Co⁶⁷, Mu⁸², Ga⁶⁷, S³⁵ sowie J¹³¹(¹⁹⁵) und Se⁷⁵(²⁶¹). Eine besonders erfolgreiche Anwendung erfuhr die P. E. sodann als Kontrollmethode der Radiojodanwendung²⁶² in Diagnostik und Therapie²⁶⁵; es wurden Testwerte ausgearbeitet für die verschiedenen Phasen des Jodzyklus, aus deren Werten eine Funktionsdiagnostik der Schilddrüse abgeleitet werden kann²⁶³.

²⁴⁶ H. E. KAY, *Brit. Med. J.* 1954, 1025.

²⁴⁷ H. SHIMURA und K. TAMAZAWA, *Jap. J. Canc. Res.* 45 (1954) 107.

²⁴⁸ W. MUNICH, *Arch. Ophthalm.* 154 (1953) 50.

²⁴⁹ CH. WUNDERLY, R. STEIGER und H. R. BÖHNINGER, *Experientia* 10 (1954) 432.

²⁵⁰ A. NIKLAS, W. MAURER und H. KRAUSE, *Biochem. Z.* 325 (1954) 464.

²⁵¹ W. MAURER, A. NIKLAS und G. LEHNERT, *Biochem. Z.* 326 (1954) 28.

²⁵² A. NIKLAS und G. LEHNERT, *Biochem. Z.* 326 (1954) 79.

²⁵³ W. MAURER und F. R. MÜLLER, *Biochem. Z.* 326 (1955) 474.

²⁵⁴ A. NIKLAS und H. POLIWODA, *Biochem. Z.* 326 (1954) 97.

²⁵⁵ E. GABRIELI, D. GOULIAN und T. KINERSLY, *J. Clin. Inv.* 33 (1954) 136.

²⁵⁶ D. DRADKIN, *J. Biol. Chem.* 212 (1955) 623.

²⁵⁷ I. WEINSTEIN, C. SPURLING, H. KLEIN und TH. NECHELES, *Blood* 9 (1954) 1155.

²⁵⁸ M. DEIMEL, *Biochem. Z.* 325 (1954) 358.

²⁵⁹ W. HORST, *Klin. Wschr.* 32 (1954) 961.

²⁶⁰ H. WOLFF, N. LANG und M. KNEDEL, *Klin. Wschr.* 33 (1955) 186.

²⁶¹ K. MCCONNELL und E. VAN LOON, *J. Biol. Chem.* 212 (1955) 747.

²⁶² Übersicht: W. HORST, *Strahlentherapie* 94 (1954) 169.

²⁶³ H. BILLION, J. BRIX, P. FREYSCHMIDT, J. KREMPFEN und H. MEHL, *Klin. Wschr.* 33 (1955) 23.

Daß es möglich ist, *immunchemische Reaktionen* auf dem Papierstreifen qualitativ zur Abbildung zu bringen, hatten MACHEBOEUF und Mitarbeiter²⁰⁴ an dem verschieden raschwandernden Toxin und Antitoxin von Diphtherie gezeigt. Diese Möglichkeit wurde neuerdings von LANG²⁰⁵ auf die Reaktion von Organantikörpern mit den betreffenden Organen ausgedehnt und als Überwanderungselektrophorese bezeichnet. Die Kombination von kontinuierlicher P.E. (s. Abschnitt Ib) und Antigen-Analyse durch Diffusion in Agargel (OUDIN-Technik) haben LARSON und FEINBERG²⁰⁶ verwirklicht. Es wird sichtbar, wie der stärker anodisch abgelenkte Anteil von einer Albuminfraktion (Papierspitze Nr. 8) im Agarröhrchen eine immunchemische Reaktion auslöst (s. Pfeil), während der Albuminanteil aus Spitze

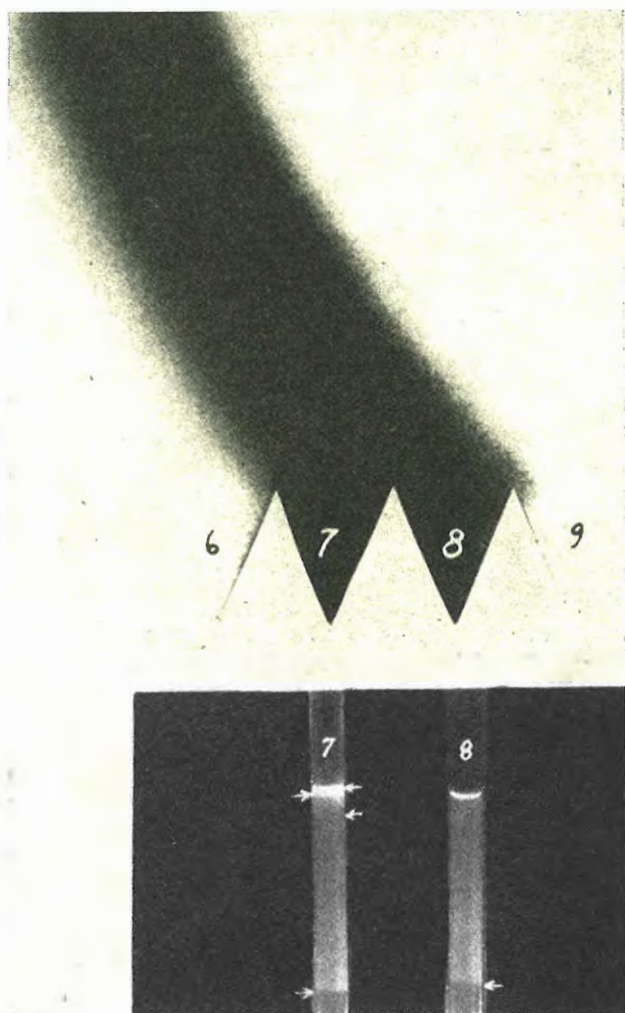


Abb. 10. Kombination von kontinuierlicher P.E. und der Gel-Diffusionsmethode von OUDIN³². Oben die Wegspur von Albumin, welche sich entsprechend der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit auf die Papierspitzen 7 und 8 verteilt. Unten die Reaktion der abtropfenden Fraktionen mit Antikörper, der im Agargel enthalten ist

²⁰⁴ M. MACHEBOEUF, P. REBEYROTTE, J. DUBERT und M. BRUNERIE, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 35 (1953) 334, 346.

²⁰⁵ N. LANG, *Klin. Wschr.* 33 (1955) 29.

²⁰⁶ H. GERHARTZ und M. KESSEL, *Dtsch. Arch. klin. Med.* 202 (1955) 347.

Nr. 7 deren vier aus löst. WUNDERLY, WUHRMANN und HÄSSIG²⁰⁷ führten Präzipitinreaktionen aus mit Unterfraktionen vom Serum von Makroglobulinpatienten, welche durch präparative P.E. gewonnen waren; auf diese Weise gelang es, die sonderspezifischen Antigene innerhalb der Reihe der Serumproteinfraktionen zu lokalisieren.

Bei den überaus zahlreichen Anwendungen der P.E. in *klinisch-chemischen Bereich* war es geboten, in diesem Rahmen eine Auswahl namhaft zu machen. Neben Einführungen zur Technik²⁰⁸⁻²⁷⁰ wurden Übersichten geboten zur klinischen Bedeutung^{271, 272} der Serumweißveränderungen, die sich auf ein ausgedehntes Untersuchungsmaterial stützen²⁷³; Verlaufsbeobachtungen des Serumweißbildes bei der Tuberkulose^{274, 275}, Hämoblastosen²⁰⁶, Nephrose^{277, 289} und Nephropathie²⁷⁸, bei Tumoren^{270, 275}, bei multiplem Myelom²⁸⁰⁻²⁸⁴, multipler Sklerose^{285, 286}, Leberkrankheiten^{244, 287-288}, Makroglobulinämie^{280, 201}, Agammaglobulinämie²⁰²⁻²⁰⁷, Rheumatismus^{208, 184}, Diabetes mellitus³⁰⁰, Geburtshilfe³⁰¹,

²⁰⁷ CH. WUNDERLY, F. WUHRMANN und A. HÄSSIG, *Proc. VIth Congr. Microbiol. Rom* 1954, 1429.

²⁰⁸ C. HARDERS, *Chem. Weekblad* 49 (1953) 246.

²⁰⁹ J. C. VERSCHURE und Mitarbeiter, *Nederl. Tijdschr. Geneeskunde* 98 (1954) 2607, 3410.

²⁷⁰ P. REGNIERS und R. WIEME, *Conc. Méd.* 1955, Nr. 10.

²⁷¹ F. WUHRMANN, *Bull. Schweiz. Akad. med. Wiss.* 10 (1954) 180.

²⁷² P. SCHEURLEN, *Z. klin. Med.* 152 (1955) 500.

²⁷³ O. FELDER, *Münchn. med. Wschr.* 96 (1954) 879.

²⁷⁴ H. ZETTEL, M. KNEDEL, M. und H. ENDRESS, *Z. klin. Med.* 153 (1955) 134.

²⁷⁵ W. SCHROEDER und E. CARSTENSEN, *Ärztl. Forsch.* 9 (1955) 337.

²⁷⁶ B. DREVON, H. PIGEAUD und R. DONKIAN, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 37 (1955) 613.

²⁷⁷ D. WIEDERMANN, *Schweiz. med. Wschr.* 84 (1954) 1367.

²⁷⁸ M. F. JAYLE, G. LAGRUE und G. BOUSSIER, *Presse Méd.* 62 (1954) 1246.

²⁷⁹ M. KESSEL und I. KESSEL, *Z. klin. Med.* 151 (1954) 526.

²⁸⁰ J. A. BERGER, *Thèse, Clermont-Ferrand* 1953.

²⁸¹ H. BRAUNSTEINER u. F. REINHARDT, *Klin. Wschr.* 31 (1953) 710.

²⁸² F. NAVAZIO und L. PERSICO, *Haematologica* 38 (1954) 12.

²⁸³ G. HERMANN, *Ann. Univ. Saraviensis* (II - 2 - 1954).

²⁸⁴ E. OSSERMAN und D. LAWLOR, *Amer. J. Med.* 18 (1955) 462.

²⁸⁵ E. ROBOZ, W. HESS, F. FORSTER und D. TEMPLE, *Neurology* 4 (1954) 811.

²⁸⁶ B. VOLK, A. SAIFER, A. RABINER, I. ORESKES, *A. M. A. Arch. Neurol. Psychiatry* 73 (1955) 66.

²⁸⁷ J. GRONLADE, R. TIZZANI und B. DRUFOVKA, *Presse Méd.* 62 (1954) 1349.

²⁸⁸ R. J. WIEME und L. DEMENLENAERE, *Belg. Tijdschr. Geneeskunde* 10 (1954) 1032.

²⁸⁹ H. BROICHER und H. ODENTHAL, *Klin. Wschr.* 32 (1954) 592.

²⁹⁰ E. MANDEMA, P. SCHAAF und T. HUISMAN, *J. Lab. Clin. Med.* 45 (1955) 261.

²⁹¹ F. LAYANI, A. ASCHKENASY und A. BENGUI, *Presse Méd.* 63 (1955) 44.

²⁹² G. GRANT und W. WALLACE, *Lancet* 1954, 671.

²⁹³ A. HAYLES, G. STICKLER und B. MCKENZIE, *Pediatrics* 14 (1954) 449.

²⁹⁴ J. C. VERSCHURE, *Ned. Tijdschr. Geneeskunde* 98 (1954) 2805.

²⁹⁵ N. KULNEFF, K. PEDERSEN und J. WALDENSTRÖM, *Schweiz. med. Wschr.* 185 (1955) 363.

²⁹⁶ G. SELTZER, S. BARON und M. TOPOREL, *New Engl. J. Med.* 252 (1955) 252.

²⁹⁷ R. WALL und S. SASLAW, *Arch. Int. Med.* 95 (1955) 33.

²⁹⁸ A. CAMP und H. OSWALD, *Z. klin. Med.* 151 (1954) 397.

²⁹⁹ J. MOELLER und J. STEGER, *Z. klin. Med.* 153 (1955) 205.

³⁰⁰ P. C. SCHEURLEN, *Klin. Wschr.* 33 (1955) 198.

³⁰¹ H. SUENDERHAUF und CH. WUNDERLY, *Arch. Gynäkol.* 105 (1955) 513.

Neugeborenenblut²⁷⁶ und Schwangerschaft^{302, 303}, neben Untersuchungen über *Gerinnungsfaktoren*³⁰⁴ des Blutes und *Uroproteinen*³⁰⁵⁻³⁰⁷. Auch der Zusammenhang von *Serumlabilitätsproben* und der Zusammensetzung der Serumproteine³⁰⁸⁻³¹⁰ wurde mit P.E. untersucht.

Für die Reihenuntersuchung von *Tiersera* (Maus, Ratte, Kaninchen, Pferd, Rind, Schaf und Hund) zwecks Feststellung der physiologischen Schwankungsbreite wurde die P.E. vielfach angewendet; eine Zusammenstellung³¹¹ der Ergebnisse zeigt die Wünschbarkeit standardisierter Versuchsbedingungen. Neben Laboratoriumstieren (Ratte³¹², Kaninchen³¹³) waren insbesondere unsere *Haustiere*³¹⁴ die Objekte eingehender

Untersuchung der Serumproteine; bei *Rind*^{315, 316} und *Pferd*³¹⁷ wurden ferner die krankheitshalber bedingten Veränderungen der Proteinzusammensetzung untersucht. Schließlich wurde auch zur Feststellung einer humoralen Mitwirkung beim Farbenwechsel der *Krebse*³¹⁸ die P.E. neben Papierchromatographie angewandt.

Überblickt man den Fortschritt, wie er auf dem Gebiete der P.E. in der Berichtsperiode erreicht wurde, so fällt wohl in erster Linie die Breitenentwicklung auf, welche die Methode erfahren hat. Methodische Neuerungen, wie die Hochspannungs-P.E. und die kontinuierlichen Verfahren, sind vielversprechend, ebenso die weitere Testung von Eluatden der Unterfraktionen mit enzymchemischen, gerinnungsphysiologischen und immunchemischen Methoden. Dagegen sind solche Arbeiten noch zu spärlich, welche zum Zwecke haben, Fehlermöglichkeiten auszuschließen und die Streuung der Ergebnisse zu verkleinern. Eine standardisierte Technik mit genau definierten Bezugswerten für Färbung und Entfärbung sollte die Eignung der P.E. als Routine-methode noch verbessern.

³⁰² R. BROWN, *J. Obst. Gyn. Brit. Emp.* 61 (1954) 781.

³⁰³ M. MANCIA, *Polidinicco* 61 (1954) 1197.

³⁰⁴ CH. OWEN und B. MCKENZIE, *J. Appl. Physiol.* 6 (1954) 696.

³⁰⁵ W. SEITZ, E. ZIMMER und P. ALBERTI, *Z. klin. Med.* 152 (1953) 196.

³⁰⁶ W. LATHEN und Mitarbeiter, *J. Clin. Invest.* 33 (1954) 1457.

³⁰⁷ E. LOEWGREN, *Acta Med. Scand. Suppl.* 1955, 300.

³⁰⁸ P. CONFORTINI und A. DAGRADI, *Biol. Latina* 6 (1953) 465, 472.

³⁰⁹ J. SONNET, *Rev. Belge Pathol.* 23 (1954) 197.

³¹⁰ M. KNEDEL und F. W. BUDE, *Klin. Wschr.* 33 (1955) 64.

³¹¹ W. GEINITZ, *Klin. Wschr.* 32 (1955) 1108.

³¹² G. BERG, K. KIMBEL und F. SCHEIFFARTH, *Naturwiss.* 42 (1955) 51.

³¹³ F. SCHEIFFARTH, K. KIMBEL und G. BERG, *Naturwiss.* 42 (1955) 214.

³¹⁴ P. CHOPARD, Diss. Bern 1954 (Professor W. WEBER); *Schweiz. Arch. Tierheilkde.* 96 (1954) 252.

³¹⁵ W. WEBER, *Schweiz. Arch. Tierheilkde.* 97 (1955) 222.

³¹⁶ J. ZIMMERLI, Diss. Bern 1955 (Professor W. WEBER).

³¹⁷ O. MEIER, Diss. Zürich 1955 (Professor W. LEEMANN).

³¹⁸ D. CARLISLE, M. DUPORT und F. KNOWLES, *C. R. Acad. Sci.* 240 (1955) 665.

VI. Autorenverzeichnis

Ziffern in Klammern = Nummern der Literaturzitate

- | | | | |
|--|------------------------------------|--------------------------------|--|
| A | Bergren W. 21 (222) | Capaldo A. 20 (211) | Dumazert C. 4 (37), 4 (38) |
| Abell L. 19 (179) | Berkes I. 9 (73) | Carlisle D. 24 (318) | Duport M. 24 (318) |
| Abraham E. 5 (44) | Billion H. 22 (263) | Carstensen E. 23 (275) | Durieux J. 21 (230) |
| Ackermann P. 19 (180) | Biserte G. 15 (117), 16 (131) | Carta R. 22 (238) | Durram F. I. 1 (4), 3 (26), 4 (39),
5 (47), 12 (95), 19 (173), 21 (219) |
| Adjutantis G. 8 (63) | Björnesjö K. B. 16 (132), 17 (142) | Causa L. 20 (200) | |
| Alagille D. 19 (188) | Blanquet L. 12 (101) | Chagnaud J. 22 (241) | E |
| Alberti P. 24 (305) | Blass J. 14 (113), 14 (114) | Chopard P. 24 (314) | Eder H. 19 (187) |
| Allen F. W. 6 (49) | Block R. J. 1 (4) | Chrestfield A. 6 (49) | Eisfeld G. 20 (208) |
| Altman K. I. 17 (157), 21 (223) | Blondheim S. H. 8 (68) | Clotten R. 1 (10) | Emmrich R. 21 (234), 22 (244) |
| Aly F. W. 22 (239), 22 (240) | Boas N. F. 17 (144), 17 (145) | Comfort A. 19 (178) | Endress M. 23 (274) |
| Anderson J. 21 (223) | Böhringer H. R. 22 (249) | Confortini P. 24 (308) | Engelke J. L. 7 (52), 14 (109) |
| Andreani D. 16 (136) | Boser H. 17 (160) | Consdon R. 8 (62) | Enselme J. 1 (7) |
| Antonini R. 19 (192) | Boussier G. 17 (146), 23 (278) | Corrigal J. 17 (156) | |
| Ardry R. 12 (100) | Bowles A. 17 (149) | Cresseri A. 19 (170) | |
| Aschkenasy A. 23 (291) | Boyd G. S. 19 (177) | Cunningham L. W. 17 (158) | |
| | Bozzi M. 4 (37), 4 (38) | Cavelier R. 12 (101), 22 (241) | F |
| B | Braunstein H. 23 (281) | | Feinberg I. 3 (31) |
| Badin J. 17 (146) | Brix J. 22 (263) | | Felder O. 23 (273) |
| Baker R. W. 17 (155) | Brodie B. 19 (179) | D | Fischer A. 2 (19) |
| Bansi H. 19 (193) | Broicher H. 23 (289) | Dagradi A. 24 (308) | Fischer F. 19 (190) |
| Bari L. B. 21 (226) | Brown D. 17 (159) | Dangerfield W. 9 (72) | Fisher B. 21 (220) |
| Barnett A. 14 (111) | Brown R. 24 (302) | Darmois E. 7 (51) | Flodin P. 4 (34) |
| Baron S. 23 (296) | Brügel H. 19 (195) | Deimel M. 22 (258) | Foley J. 17 (144) |
| Barr D. 19 (187) | Bruneric M. 1 (2), 23 (264) | Demenlaeac L. 23 (288) | Forster F. 19 (199), 23 (285) |
| Baudoin A. 16 (139) | Bube F. W. 24 (310) | Denling L. 21 (229) | Foster A. B. 2 (21), 16 (122),
16 (123) |
| Bazin S. 22 (243) | Burke D. C. 2 (21) | Dicastro G. 3 (29) | Franken G. T. 6 (48), 8 (65),
17 (153) |
| Becker H. 3 (25) | Burma D. P. 5 (41) | Dobson H. L. 20 (205) | Frank II. 14 (110) |
| Behrens M. 2 (19) | Burstein M. 19 (188) | Donikian R. 11 (87), 23 (276) | Franken F. II. 19 (198), 20 (206) |
| Belk W. P. 11 (88) | Büttner H. 14 (110) | Dose K. 19 (169) | Fretwurst F. 19 (193) |
| Bengui A. 23 (291) | | Drabbe F. 10 (80) | Frey Schmidt P. 22 (263) |
| Benhamou E. 16 (138) | C | Drabkin D. 22 (256) | Friedmann N. 19 (191) |
| Berg C. 2 (18), 24 (312), 24 (313) | Cady P. 19 (196) | Drevon B. 11 (87), 23 (276) | Funnel H. 2 (16) |
| Berger I. A. 12 (101), 22 (241),
23 (280) | Cambra R. 22 (238) | Dreyfus J. Cl. 1 (7) | |
| | Cannon J. R. 1 (12) | Drufovka B. 19 (194), 23 (287) | |
| | | Dubert J. M. 1 (2), 23 (264) | |

G

Gabrieli E. 22 (255)
 Gamp A. 23 (298)
 Garcia I. 15 (119)
 Geinitz W. 24 (311)
 Geldmacher M. 16 (127)
 Gerhartz H. 23 (266)
 Gerrin F. 16 (131)
 Ghiglione C. 4 (37)
 Gilson A. 1 (12)
 Gleiß J. 12 (97)
 Gomori G. 16 (130)
 Gottfried S. 19 (191)
 Götz H. 2 (18)
 Goulian D. 22 (255)
 Graff M. 17 (142)
 Grant G. 23 (292)
 Granzer E. 3 (32)
 Gras J. 13 (102)
 Grüsbeck R. 20 (204)
 Grasset J. 18 (168)
 Grassi B. 16 (136)
 Großmann W. 3 (27), 8 (67),
 11 (85), 15 (115), 18 (166)
 Greenspan M. 17 (142)
 Gries G. 22 (240)
 Gronlade J. 19 (194), 23 (287)
 Grönwall A. 12 (93), 16 (128)
 Gross D. 1 (13), 2 (22), 16 (125)
 Guillion R. 8 (66)

H

Haibermann E. 18 (167)
 Hannig K. 3 (27), 8 (67), 11 (85),
 15 (115), 18 (166)
 Harasawa S. 14 (106)
 Harders C. L. 9 (74), 23 (268)
 Harris H. 15 (116), 21 (224)
 Hartel J. 7 (56)
 Hashimoto Y. 17 (154)
 Hässig A. 23 (267)
 Hausen E. A. 18 (167)
 Hauser E. A. 7 (59)
 Hayles A. 23 (293)
 Heilmeyer L. 1 (10)
 Herbst F. 19 (171), 20 (203)
 Hermann G. 8 (66), 23 (283)
 Hess W. 19 (199), 22 (242),
 23 (285)
 Hetzel H. 18 (165)
 Hinsberg K. 12 (97)
 Hoefsmitt I. 2 (17)
 Holdsworth E. S. 3 (30), 3 (34)
 Holeček J. 17 (142)
 Horst W. 22 (259), 22 (262)
 Hotchkiss R. 16 (129)
 Hübner E. 11 (90), 12 (99)
 Huisman T. 23 (290)
 Humbert R. 20 (209)
 Hurley N. 20 (203)

I

Itano H. 21 (222)

J

Jacqueline F. 19 (194)
 Jasinsky B. 20 (215), 20 (216)
 Jayle M. F. 17 (146), 23 (278)
 Jencks W. P. 12 (95)
 Jones G. 18 (163)
 Jorio M. 5 (45)

K

Kallee E. 7 (61)
 Kuminsky M. 21 (230)
 Kunnegießler W. 2 (20)

Kapuscinski V. 17 (143)
 Karas V. 9 (73), 9 (78)
 Kariyone T. 17 (154)
 Kassenaar A. 18 (164)
 Kawerau E. 3 (24)
 Kay H. E. 22 (246)
 Keiderling W. 21 (18)
 Kellner H. 17 (141)
 Kendall F. 19 (179)
 Kessel I. 23 (279)
 Kessel M. 21 (233), 23 (266),
 23 (279)
 Kimbel M. 9 (75), 24 (312),
 24 (313)
 Kimura M. 17 (151), 17 (154)
 Kimersly T. 22 (255)
 King E. 11 (89)
 Kistler P. 22 (237)
 Klein E. 19 (195), 19 (188),
 20 (205)
 Klein H. 22 (257)
 Klementschtz W. 2 (15)
 Knedel M. 16 (140), 21 (235),
 22 (260), 23 (274), 24 (310)
 Knowles F. 24 (318)
 Köiv E. 12 (93), 16 (128)
 Körtge P. 21 (233)
 Koszalka T. 17 (157)
 Kountz W. B. 19 (180)
 Krause H. 20 (250)
 Krempien J. 22 (263)
 Kroetz Ch. 19 (190)
 Kulneff N. 23 (295)
 Kunkel H. 7 (58)
 Kutzim H. 20 (207)

L

Lagrate G. 23 (278)
 Lameyer L. 18 (164)
 Lang N. 21 (235), 22 (260),
 23 (265)
 Langen Th. A. 12 (95)
 Larson D. I. 3 (31)
 Lass A. 20 (213)
 Latham W. 24 (306)
 Latner A. L. 8 (64), 9 (77)
 Laurell S. 20 (202)
 Lawlor D. 23 (284)
 Lawrence D. 8 (63)
 Layuni F. 23 (291)
 Leeonte O. 14 (114)
 Lederer M. 1 (6), 5 (45), 13 (104),
 14 (105), 17 (150)
 Lehman I. 17 (142)
 Lehnert G. 22 (251), 22 (252)
 Leopold F. 14 (110)
 Levy B. 19 (179)
 Lewin J. 16 (139)
 Lindberg K. 18 (162)
 Lipp A. 1 (10)
 Lissitsky S. 15 (119)
 Lockhart D. L. 5 (44)
 Loewgren E. 24 (307)
 Loon van, E. 22 (261)
 Lynn J. 7 (59)

M

Macheboef M. 1 (2), 14 (113),
 23 (264)
 Magnin P. 9 (70)
 Mancina M. 24 (303)
 Mandema F. 23 (290)
 Mariani A. 21 (228)
 Marini-Bettolo G. B. 5 (45)
 Markham R. 1 (9)
 Martin N. 6 (48), 8 (65)
 Martini V. 12 (91)

Martlew E. F. 16 (123)
 Masseyeff R. 7 (57)
 Maurer W. 22 (250), 22 (251),
 22 (253)
 Mauro S. 19 (191)
 Maw W. 19 (175)
 McConnell K. 22 (261)
 McDonald H. J. 1 (5), 7 (54)
 McKenzie B. 23 (293), 24 (304)
 Mead T. H. 5 (42)
 Mehl H. 22 (263)
 Meier O. 24 (317)
 Merklen F. P. 7 (57)
 Merlevede E. 5 (43)
 Michl A. 1 (11), 9 (71)
 Miettinen J. K. 12 (92), 21 (236)
 Millon P. 16 (139)
 Moeller J. 23 (299)
 Molinski H. 11 (86)
 Mori I. 17 (151), 17 (154)
 Mosio T. 12 (92)
 Motulsky A. 21 (219)
 Müller E. R. 22 (253)
 Münich W. 22 (248)
 Murphy G. 14 (108)

N

Navazio F. 23 (282)
 Necheles Th. 22 (257)
 Neely R. A. 8 (69)
 Neill F. 8 (69)
 Neumann W. 18 (167)
 Nikkilä E. 20 (204)
 Niklas A. Z. 22 (250), 22 (251),
 22 (252), 22 (254)
 Nitschmann H. 22 (237)
 Nöller N. G. 10 (81)
 Norris W. 14 (107)
 Northcote D. H. 16 (125)
 Nys A. 19 (197)

O

Odenthal H. 23 (289)
 Oeff K. 20 (212)
 Oldershausen v. H. 22 (240)
 Oosterhuis H. K. 12 (96)
 Oreskes I. 23 (286)
 Ossermann E. 23 (284)
 Ostaux R. 15 (117)
 Oswald H. 23 (298)
 Ott H. 19 (174), 20 (214)
 Owen Ch. 24 (304)

P

Passmann J. M. 15 (118)
 Patti F. 17 (152)
 Paul M. 19 (173), 21 (219)
 Pedersen K. 23 (295)
 Pellegrino C. 17 (155)
 Pelzer H. 2 (23), 18 (165)
 Perosa L. 21 (226)
 Persico L. 23 (282)
 Petermann M. 17 (148)
 Pezold F. 21 (233), 22 (244)
 Pfaff M. 16 (133)
 Pfeil E. 2 (20)
 Perner Ch. 2 (234)
 Pickels E. 5 (47)
 Pieper I. 9 (78), 11 (86)
 Pigeaud H. 23 (276)
 Pimentor A. 5 (45)
 Pinterie L. 9 (76)
 Piva G. 19 (192)
 Plückl M. 15 (115)
 Polimeni P. 12 (99)

Poliwoda H. 22 (254)
 Pollak L. R. 16 (134)
 Polonovsky J. 14 (114)
 Pope R. 19 (191)
 Porath J. 4 (35)
 Poulik D. 3 (33), 9 (76)
 Powell M. N. 8 (62)
 Prankerd T. A. 21 (223)
 Proger S. 19 (186)
 Pucar Z. 7 (53)
 Pugliese G. 16 (138)
 Putnam R. 17 (149)

Q

Querido A. 18 (164)

R

Rabiner A. 23 (286)
 Rall J. E. 17 (148)
 Randrup A. 21 (231)
 Raynaud R. 16 (137)
 Rebeyrotte P. 1 (2), 14 (113),
 23 (264)
 Regniers P. 23 (270)
 Reinhardt F. 23 (281)
 Reinhold J. 10 (80)
 Remmer H. 11 (90), 12 (99)
 Rhodes J. 2 (232)
 Ricinis K. G. 16 (124)
 Rigas D. 21 (227)
 Riva G. 12 (91)
 Robbins J. 17 (148)
 Robineaux R. 22 (234)
 Roboz E. 19 (199), 22 (242),
 23 (285)
 Roche J. 15 (119)
 Romani J. D. 16 (135)
 Rosenberg N. 19 (186)
 Ross G. 19 (196)
 Roth W. 19 (174)
 Russ E. 19 (187)
 Rust S. 20 (212)
 Rutter L. 7 (60)

S

Sachs B. 19 (196)
 Saifer A. 23 (286)
 Sakamoto T. 14 (106)
 Salazar M. 13 (102)
 Salvino L. 19 (192)
 San Marco M. 3 (29)
 Sano J. 1 (10)
 Santurato R. 20 (210)
 Saslaw S. 23 (297)
 Sato T. R. 14 (107)
 Scannu A. 19 (189), 20 (200),
 20 (201)
 Schaaf P. 23 (290)
 Scheffer F. 3 (25)
 Scheiffarth F. 2 (18), 24 (312),
 24 (313)
 Scheurlen P. 23 (272), 23 (300)
 Schinno S. 19 (189), 20 (201)
 Schlüter H. 3 (25)
 Schönenberg H. 22 (245)
 Schreier K. 17 (157)
 Schroeder W. 23 (275)
 Schulte M. J. 11 (84)
 Schulte N. 17 (141)
 Schuster H. 2 (23), 18 (165)
 Schwartz D. 18 (168)
 Schwartzkopf W. 11 (90),
 12 (99)
 Schwarz E. 20 (212)
 Seefeldt H. 20 (208)

- Seeger C. 20 (214)
 Seibert F. S. 16 (133)
 Seibert M. V. 16 (133)
 Seitz W. 24 (305)
 Seltzer G. 23 (296)
 Shimura H. 22 (247)
 Shooter E. 21 (225)
 Siliprandi D. 4 (36)
 Siliprandi N. 4 (36)
 Simon K. 13 (103)
 Singer K. 21 (220), 21 (221)
 Skinner E. 21 (225)
 Smith D. K. 14 (111)
 Smith E. 9 (72), 17 (159), 19 (173)
 Smith J. D. 1 (9)
 Sonnet J. 24 (309)
 Sordi A. 19 (192)
 Sorkin E. 21 (232)
 Soulier J. P. 19 (188)
 Spackmann D. 17 (159)
 Spurling C. 22 (257)
 Stacey M. 16 (122), 16 (123)
 Steger J. 23 (299)
 Steiger R. 22 (249)
 Sterz H. 2 (15)
 Stewart Ch. 17 (161)
 Stickler G. 23 (293)
 Stiefel G. 20 (216)
 Strain H. H. 3 (28), 7 (50), 7 (52),
 14 (107), 14 (108), 14 (109),
 18 (163)
- Stribling S. 20 (205)
 Sturgeon Ph. 21 (222)
 Sturm A. 1 (10)
 Südhof H. 17 (141)
 Sünderhauf H. 23 (301)
 Sullivan J. C. 3 (28)
 Sundermann F. 11 (88)
 Sundman J. 18 (162)
 Svensson H. 5 (46)
 Swahn B. 19 (172)
- T**
- Tamazawa K. 22 (247)
 Tauber H. 14 (112)
 Temple D. 19 (199), 22 (242),
 23 (285)
 Tepe H. J. 20 (213)
 Tizzani R. 23 (287)
 Toporel M. 23 (296)
 Toro G. 19 (180)
 Toschi G. 21 (228)
 Trautman R. 12 (94)
 Treherne J. 6 (48)
 Tripodo C. 20 (211)
 Tronche P. 22 (241)
 Turba F. 2 (23), 18 (165)
 Turito P. 12 (99)
- U**
- Ulke R. 11 (83)
- Ultee A. 7 (56)
 Urbin M. C. 5 (40)
- V**
- Valmet E. 5 (46)
 Vandegner J. 21 (236)
 Verhelle O. 5 (43)
 Verschuere J. C. 2 (17), 23 (269),
 23 (294)
 Vesselinovitch S. 2 (16)
 Volk B. 23 (286)
- W**
- Wahab E. 8 (63)
 Waldenström J. 23 (295)
 Wall R. 23 (297)
 Wallace W. 23 (292)
 Wallenius G. 12 (93)
 Wallner A. 11 (82), 11 (83)
 Warren F. 15 (116), 21 (224)
 Weber R. 15 (120)
 Weber W. 24 (315)
 Weinland H. 16 (127)
 Weinstein I. 22 (257)
 Weise H. 20 (212)
 Werner G. 1 (14)
 Wetter L. 17 (156)
 Wiedemann E. 12 (98)
 Wiedermann D. 23 (277)
 Wieland Th. 17 (161), 19 (169)
- Wieme R. J. 17 (147), 19 (176),
 23 (270), 23 (288)
 Williams F. 5 (47)
 Williamson M. B. 15 (118)
 Wöhler F. 21 (217), 21 (218)
 Wolf H. 21 (235), 22 (260)
 Wolff R. 9 (70)
 Wood S. E. 7 (50), 7 (52)
 Wootton I. 11 (89)
 Wuhrmann F. 20 (215), 23 (267),
 23 (271)
 Wunderlich K. 20 (213)
 Wunderly Ch. 1 (1), 1 (3), 7 (55),
 19 (176), 22 (249), 23 (267),
 23 (301)
- Y**
- Young S. 19 (186)
- Z**
- Zach J. 21 (229)
 Zak B. 17 (143)
 Zettel H. 23 (274)
 Ziechmann W. 3 (25)
 Zimmer E. 24 (305)
 Zimmerli J. 24 (316)
 Zittel C. A. 16 (121)
 Zweig G. 1 (4)