

Papierchromatographie und Papierelektrophorese

Von Dr. A. GRÜNE

C. Schleicher & Schüll, Dassel

Im vergangenen Frühjahr führte Frau Dr. A. GRÜNE in verschiedenen Schweizer Städten ein Kolloquium über Papierchromatographie und Papierelektrophorese durch. Das grosse Interesse, das die Veranstaltung fand, und die weite Verbreitung der beiden Methoden boten den Anlass, den Inhalt des Vortragszyklus in der *Chimia* abzdrukken, wie es von verschiedener Seite angeregt wurde. Die Vortragsfolge erscheint in den Heften 7 und 8. Sicher werden die vielen Literaturangaben und die zahlreichen aus der Erfahrung abgeleiteten praktischen Hinweise den Benützern dieser Methoden nützliche Dienste leisten.

Die Redaktion

Zum Geleit

Diese Aufsatzreihe verdankt ihr Entstehen einer Anzahl von Vorträgen, die im Auftrage der Firmen C. Schleicher & Schüll, Dassel/Kreis Einbeck, Hannover, und Schleicher & Schüll AG, Feldmeilen am Zürichsee, vor geladenen Gästen gehalten wurden.

Natürgemäß konnte diese Vortragsreihe nicht das ganze Gebiet restlos erschöpfen, dazu ist es bereits viel zu groß und hat eine viel zu breite Anwendungsbasis erfahren. Es wurde daher vor allem versucht, überall das Wesentlichste herauszuschöpfen und den Hörern vor Augen zu führen. Eine Einführung in die Methode an sich war zunächst nicht vorgesehen, erwies sich jedoch bald als wünschenswert und wurde daher noch eingefügt. Erläutert wurde das Ganze durch eine große Anzahl von Chromatogrammen und Pherogrammen, welche die Freunde des Hauses C. Schleicher & Schüll, Dassel, in liebenswürdiger Weise zur Verfügung gestellt hatten. Ihnen allen sei an dieser Stelle herzlich gedankt, ebenso den zahlreichen Hörern der Vorträge, die bis zum Schluß mit großem Eifer teilnahmen. Wir geben uns der Hoffnung hin, daß sie alle einen Gewinn aus diesen Tagen davontrugen.

Dr. A. Grüne

Inhaltsverzeichnis

- | | |
|---|--|
| I. Einführung und geschichtliche Entwicklung | D. Das Papier |
| II. Methodik des papierchromatographischen Arbeitens | E. Auftragen des Serums |
| III. Theorie der Papierchromatographie, Deutungsversuche | F. Pufferlösungen |
| IV. Praxis und Anwendung papierchromatographischen Arbeitens, Methoden, Apparaturen | G. Dauer der Elektrophorese |
| a) Absteigendes Verfahren | H. Quantitative Auswertung |
| b) Aufsteigendes Verfahren | J. Anwendungen |
| c) Rundfilter- oder Horizontalchromatographie | K. Papierelektrophorese mit erhöhter Spannung |
| V. Beschickung des Chromatogramms | L. Präparative Papierelektrophorese |
| VI. Die Fließmittel | Literatur |
| VII. Reproduzierbarkeit der R_F -Werte, Leitchromatogramme | XX. Anwendungsgebiete der Papierchromatographie |
| VIII. Ansetzen der Chromatogramme, Sättigen des Papiers | 1. Aminosäuren, Peptide, Proteine |
| IX. Filtrierpapier für chromatographisches Arbeiten | Literatur |
| X. Zweidimensionales Arbeiten | 2. Antibiotika |
| XI. Mehrdimensionales Arbeiten | Literatur |
| XII. Geformte Streifen | 3. Vitamine |
| XIII. Vor- und nachbehandelte Papiere | Literatur |
| 1. Hydrophobierte Papiere durch Tränkung fertiger Papiere | 4. Alkaloide |
| 2. Hydrophobierte Papiere durch Veresterung der Faser | Literatur |
| 3. Modifikationen an der Cellulosefaser mit dem Ziel der Schaffung eines Kationen- oder Anionenaustauschers höherer Austauschkapazität | 5. Zucker |
| 4. Einlagerung von Partikeln in das Papier, sei es durch Tränkung und Ausfällung im Papier, sei es durch Einlagerung in die Faser bei der Papierbildung | Literatur |
| 5. Carboxylpapier | 6. Aliphatische Säuren und verwandte Gebiete |
| XIV. Identifizierung der Flecken auf dem Papier | a) Flüchtige aliphatische Säuren C_1 bis C_9 |
| XV. Ermittlung der R_F -Werte | b) Nichtflüchtige wasserlösliche Säuren |
| XVI. Beziehungen zwischen R_F -Wert und chemischer Konstitution | c) α -Ketosäuren |
| XVII. Quantitative Auswertung von Papierchromatogrammen | d) Hohe Fettsäuren und Fette |
| XVIII. Präparative Papierchromatographie | e) Phosphatide |
| Literatur | f) Steroide und herzwirksame Glucoside |
| XIX. Papierelektrophorese | g) Gallensäuren |
| A. Geschichtliches | Literatur |
| B. Allgemeines | 7. Amine |
| C. Methoden der Papierelektrophorese | Literatur |
| | 8. Phenole, aromatische Oxysäuren, aromatische Aminosäuren |
| | Literatur |
| | 9. Phosphat in anorganischer und organischer Bindung |
| | Literatur |
| | 10. Farbstoffe |
| | Literatur |
| | 11. Kationen |
| | Literatur |

I. Einführung und geschichtliche Entwicklung

Seit im Jahre 1944 die drei englischen Forscher CONSDEN, GORDON und MARTIN¹ die Methode der Papierchromatographie in ihrer heutigen Form publizierten, sind etwa dreizehn Jahre vergangen. Diese Zeit lieferte den Beweis dafür, daß das Verfahren praktisch universelle Anwendbarkeit besitzt; es wird heute fast auf allen Gebieten papierchromatographisch gearbeitet. Diese Erfolge dürften nicht zuletzt darauf zurückzuführen sein, daß durch die Methode neue Möglichkeiten entstanden zur Trennung auch solcher Stoffgemische, deren Komponenten einander chemisch sehr ähnlich sind. Das wird erklärlich durch die Tatsache, daß vor der Identifizierung der einzelnen Substanzen durch chemische oder physikalische Hilfsmittel eine fraktionierte Trennung erfolgt, anhand ihrer verschiedenen Wanderungszeit bzw. bei gegebener Wanderungszeit ihres verschiedenen Wanderungsweges in der Ebene reiner und saugfähiger Filtrierpapiere.

Als klassisches Beispiel von auf chemischem Wege schwer trennbaren Stoffgemischen lassen sich vor allem die α -Aminosäuren und die einfachen Zucker anführen.

Trotz der relativ kurzen Entwicklungszeit, welche die Papierchromatographie in ihrer heutigen universell anwendbaren Form innerhalb von dreizehn Jahren durchlief, kann man ihre Anfänge praktisch über ein Jahrhundert zurückverfolgen.

Nach dem heutigen Stande unseres chemiegeschichtlichen Wissens² war F. F. RUNGE³ der erste, welcher auf die Möglichkeit aufmerksam machte, die Saugfähigkeit ungeleimter Papiere zu Reaktionen innerhalb ihrer Ebene nutzbar zu machen. Ihm verdanken wir auch die erste im Schrifttum verzeichnete Tüpfelreaktion⁴, mit Hilfe deren er die quantitative Ausfällung von Farbstoffen durch Metallsalze prüfte.

Trennungen allerdings führte er noch nicht durch. Die Entdeckung dieser Möglichkeit und ihre ersten Anwendungen verdanken wir dem bekannten Basler Ozoneforscher SCHOENBEIN und seinem Schüler GOPPELSROEDER. F. F. RUNGE verfaßte in den Jahren 1850 und 1855 zwei eigenartige Werke, von denen uns vor allem das letztere noch an verschiedenen deutschen Bibliotheken erhalten ist³.

Die Firmen C. Schleicher & Schüll in Dassel und Uhuwerk in Bühl (Baden) gaben zum hundertjährigen Gedächtnis des *Bildungstriebes der Stoffe* ein kleines Lebensbild von RUNGE heraus⁵, geschmückt mit einigen Nachschöpfungen seiner Kapillarbilder und bezeichnet mit dem von RUNGE selbst gefundenen Namen *Das chemische Wappen*.

SCHOENBEIN war nach RUNGE wohl der erste, der – wahrscheinlich anhand eines selbst angefertigten Jodkalistärkepapieres – feststellte, daß verschiedenartige Stoffe aus einer gemeinsamen Lösung verschieden schnell wandern. Er publizierte bereits eine Arbeit über die kapillaranalytische Trennung von Farbstoffen⁶. Sein Schü-

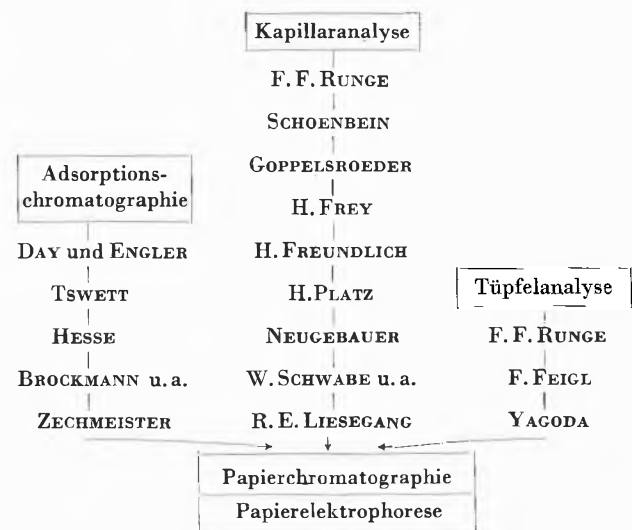
ler GOPPELSROEDER schuf den Begriff «Kapillaranalyse» und publizierte eine Reihe von Arbeiten auf praktisch allen Gebieten⁷. Das Verdienst, die Methode wachgehalten zu haben, gebührt zweifellos der homöopathischen Pharmazie. Namen wie PLATZ⁸, NEUGEBAUER⁹, SCHWABE¹⁰ sind damit engstens verknüpft.

Sie wurde vor allem angewandt zur Charakterisierung von Drogenauszügen und ähnlichem mit und ohne Betrachtung unter der UV-Lampe.

Den stärksten Impuls gaben zweifellos die Arbeiten von R. E. LIESEGANG¹¹ zu Beginn der vierziger Jahre dieses Jahrhunderts.

LIESEGANG publizierte eine Reihe von Arbeiten, die bereits ganz deutliche Übergänge zur Papierchromatographie zeigen. Seine «Kreuz- und Kreis-Kapillaranalyse» ähneln stark der heutigen zweidimensionalen und Rundfilterchromatographie. Zwei Momente sind es wohl vor allem, welche LIESEGANG die Erfindung der eigentlichen Papierchromatographie versagten, nämlich die Tatsache, daß er die Wirkungsweise der wasserhaltigen organischen Fließmittel nicht kannte, sowie den Wert der geschlossenen Kammer mit konstanten Verhältnissen in bezug auf Wasser- und Fließmitteldampf und Temperatur.

Neben der Kapillaranalyse dürften Adsorptionschromatographie und Tüpfelanalyse die Weiterentwicklung der Papierchromatographie entscheidend beeinflusst haben, wobei letzterer vor allem die Kenntnis über im Papier durchführbare Farbreaktionen zu danken ist.



II. Methodik des papierchromatographischen Arbeitens

Zunächst sei nun die Methodik des papierchromatographischen Arbeitens anhand eines Streifenchromatogramms kurz erläutert.

Einige cm von der einen Schmalkante eines Papierstreifens entfernt – die Entfernung richtet sich nach den Ausmaßen der Apparatur – setzt man einen Tropfen des zu analysierenden Gemisches auf. Man trocknet – meistens mit Hilfe von Heißluft – und bringt dann den Streifen so in die später zu beschrei-

bende Apparatur, daß er mit dem Ende, in dessen Nähe der Tropfen aufsitzt, eintaucht, ohne daß jedoch der Tropfen selbst benetzt wird, und läßt aus einem das Fließmittel enthaltenden Gefäß den Streifen vom Fließmittel bis zu seinem gegenüberliegenden Ende überwandern. Man trocknet und behandelt das Chromatogramm in der später zu besprechenden Art mit einem Reagens, so daß die Substanzen sichtbar werden.

Man beobachtet dann folgendes:

Die in dem aufgetragenen Flecken enthaltenen Substanzen sind mit verschiedener Wanderungsgeschwindigkeit gewandert und haben sich in verschiedener Entfernung vom Startpunkt bzw. vom ursprünglichen Substanzfleck in Form größerer etwas diffuser, aber getrennter Flecken niedergeschlagen. Die einzelnen Substanzen sind also verschieden schnell gewandert.

Jede Substanz hat dabei ihre definierte Wanderungswerte, bezogen auf den Wanderungsweg des Lösungsmittels, als Einheit.

Die Kapillaranalyse nannte diesen Weg «relative Steighöhe», wir nennen ihn heute « R_F -Wert». Dieser R_F -Wert ist tatsächlich eine für jede Substanz typische Konstante. Wie weit er konstant und reproduzierbar ist, sei späterhin erläutert.

Er ist das Verhältnis der Strecken:

$$R_F = \frac{\text{Wanderungsweg einer Substanz}}{\text{Wanderungsweg des Fließmittels}}$$

und ist, wenn man letzteren gleich 1 setzt, immer eine Dezimalzahl unter 1.

III. Theorie der Papierchromatographie, Deutungsversuche

Über die theoretische Deutung des papierchromatographischen Geschehens gehen heute noch die Meinungen auseinander.

Einzelne Autoren versuchen sie – ausgehend von den Erfahrungen an der Adsorptionssäule und der Tatsache, daß Filtrierpapier selbst stark adsorbierend ist – ebenfalls als Adsorptionschromatographie zu deuten¹², eine Erklärung, die sicherlich ihre Gültigkeit hat, je nach pH-Wert des Fließmittels oder chemischer Natur der zu trennenden Stoffe. Infolge der späterhin noch näher zu erläuternden kationenaustauschenden Natur der Fasern aus Cellulose ist auch von Fall zu Fall die Möglichkeit einer Austauschchromatographie kaum von der Hand zu weisen. In gewissen Fällen, z. B. bei der Trennung von Phenolen, ist auch ein Austausch über Wasserstoffbrücken an den OH-Gruppen der Cellulose denkbar. Hier und da dürfte auch – je nach Vorbehandlung des Papiers oder Natur des Fließmittels und der zu trennenden Stoffe – eine Aussalzchromatographie oder Fällungschromatographie stattfinden können¹³.

Die überwiegende Zahl der Wissenschaftler neigt heute dazu, in der Mehrzahl der Fälle eine Verteilungschromatographie anzunehmen, d. h. eine unzählig oft wiederholte Ausschüttelung einer in wäßriger Lösung befindlichen Substanz durch ein organisches Lösungsmittel.

Diese Annahme setzte zunächst nur begrenzt mit Wasser mischbare Lösungsmittel voraus, und es bedeutete daher eine gewisse Erschütterung der vorgefaßten Meinung, als DECKER und Mitarbeiter fanden¹², daß auch mit Wasser unbegrenzt mischbare Lösungsmittel gute Trennungen zu geben vermögen. CRAMER und andere¹⁴ deuten auch diesen Vorgang als Verteilungschromatographie zwischen einer wäßrigen Phase (stationäre Phase) – in diesem Falle die wasserhaltige Cellulosefaser, als Träger der zu trennenden Stoffe – und einer organischen Phase, dem wasserhaltigen organischen Lösungsmittel (mobile oder bewegliche Phase).

Über den Cellulose-Wasser-Komplex als stationäre Phase siehe weiter hinten.

Die richtigste Erklärung dürfte alle Möglichkeiten einschließen, d. h. je nach pH-Wert und sonstiger Beschaffenheit des Fließmittels und der zu trennenden Stoffe Austausch-, Adsorptions- oder Verteilungschromatographie. Auch ist sicher anzunehmen, daß selbst eine Stofftrennung auf Verteilungsbasis mehr oder weniger durch Adsorptionsmomente im positiven oder negativen Sinne beeinflusst werden kann.

Zum R_F -Wert ist noch folgendes zu sagen: Normalerweise benutzt man zur Messung der R_F -Werte die jeweiligen Massenschwerpunkte der aufgetrennten Substanzflecken, doch nimmt man gelegentlich auch ihre Spitze und mißt also den sogenannten R_L -Wert¹⁵. Hier und da erweist es sich als zweckmäßig, die Weglänge eines Chromatogramms unter geeigneten Bedingungen dadurch zu verlängern, daß man das Fließmittel abtropfen läßt, vor allem wenn die R_F -Werte verwandter Stoffe sehr nahe zusammenliegen und nur durch lange Dauer des Lösungsmittelflusses eine Trennung erzielt werden kann. Man führt in diesem Falle ein «Durchlaufchromatogramm» durch, wobei natürlich die Fließmittelfront entfällt. Daher dient eine geeignete Substanz von guter Trennbarkeit als Bezugssubstanz. So z. B. bei der Trennung der Zucker, wo man meistens Glucose als Bezugssubstanz wählt. Man spricht dann von einem R_G -Wert, allgemein von einem R_X -Wert:

$$R_G = \frac{\text{Wanderungsweg eines Zuckers}}{\text{Wanderungsweg der Glucose}}$$

Der R_F -Wert wird bestimmt durch das Verhältnis der Löslichkeiten einer Substanz in Wasser und in einem organischen Lösungsmittel. Er ist also abhängig vom Verteilungskoeffizienten und steht zu diesem in folgender einfacher Beziehung:

$$\alpha = \frac{A_L}{A_S} \left(\frac{1}{R_F} - 1 \right),$$

wobei α der Verteilungskoeffizient ist und A_L sowie A_S Stoffkonstanten, nämlich:

$$\begin{aligned} A_L &= \text{Querschnittsfläche der Lösungsmittelphase,} \\ A_S &= \text{Querschnittsfläche der wäßrigen Phase.} \end{aligned}$$

Bestimmung von A_L/A_S : TURBA¹⁶ richtet sich nach den Angaben von CONSDEN, GORDON und MARTIN und ermittelt das Gewichtsverhältnis des trockenen Papiers zu dem des entwickelten Chromatogramms. – SCHUTE¹⁷ behandelt das chromatographische Papier 40 Stunden hindurch mit Wasserdampf und stellt danach eine Gewichtszunahme von etwa 28% fest. Dasselbe getrocknete oder ein gleich großes Stück Papier wird, mit Fließmittel getränkt, gewogen. Für *n*-Butanol findet er dabei Werte zwischen 0,44 und 0,62.

Für α gilt nach dem NERNSTschen Verteilungssatz außerdem noch:

$$\frac{C_1}{C_2} = \alpha = \text{const.},$$

d. h. die Isotherme der Verteilung eines Stoffes zwischen zwei Lösungsmitteln ist eine Gerade, solange die beiden Phasen nicht an gelöstem Stoff gesättigt sind.

Es besteht außerdem noch die Beziehung:

$$R_M = \log \left(\frac{1}{R_F} - 1 \right).$$

Wieweit diese mathematischen Begriffe zur Konstitutionsermittlung von Stoffen heranziehbar sind bzw. bereits herangezogen wurden, siehe weiter hinten.

In der Praxis wird man das Fließmittel für ein bestimmtes Substanzgemisch so wählen, daß die R_F -Werte der Einzelkomponenten möglichst günstig über das Gesamtchromatogramm verteilt sind, daß also die Verteilung der Stoffe zwischen Wasser und organischem Lösungsmittel möglichst günstig ist.

IV. Praxis und Anwendung papierchromatographischen Arbeitens, Methoden, Apparaturen

Es sei nun im folgenden die Methode näher beschrieben.

Das Arbeitsziel, nämlich die Überwanderung eines aufgetragenen Substanzfleckens durch geeignete Fließmittel und Auftrennung in differenzierte Einzelflecken, läßt sich durch drei Hauptmethoden und mittels der verschiedensten apparativen Hilfsmittel erreichen. Man arbeitet

aufsteigend,
absteigend,
horizontal,

gemäß den Methoden der Rundfilterchromatographie.

a) Absteigendes Verfahren

Bei diesem Verfahren wandert das Fließmittel in Richtung der Erdanziehung über das zu trennende Substanzgemisch, muß also aus einem Behälter, der sich innerhalb der chromatographischen Kammer oben befindet, über das Papier nach unten geleitet werden.

Demzufolge besteht eine chromatographische Kammer für absteigendes Arbeiten aus einem Trog, auch Küvette genannt, welcher das Fließmittel enthält, und einer gasdichten Kammer, in welcher der Trog zweckmäßig oben montiert ist. Die Apparaturen können groß sein, d. h. bis zu ganzen Bogen fassen, sie können aber auch klein sein, so daß das Chromatographiergefäß nur einen

schmalen Streifen aufnehmen kann. Im letzteren Falle dient es oft zur Auswahl geeigneter Fließmittelgemische, und Kammer und Trog sind in einer Apparatur zusammengefügt¹⁸.

Es ist eine ganze Anzahl von chromatographischen Kammern im Handel, die teils in Anlehnung an die alte DENTSche Kammer aus Glaswänden in Holzleisten – Glas auf Glas – aneinandergesetzt sind, teils auch völlig aus Glas bestehen. Auch runde Zylinderkammern mit Schliffdeckel wurden gebaut.

Das wesentlichste Stück bei einer chromatographischen Kammer für absteigendes Arbeiten ist der Trog. Meistens ist er aus Glas und wird so hergestellt, daß man ein mehrere cm im Durchmesser messendes, bis zu 60 cm langes Glasrohr unter Hinterlassung von Luftlöchern zuschmilzt und dann oben plan mit einem geeigneten Glasschneider abschneidet.

Auch Tröge, die aus einem zugeschmolzenen Glasrohr durch zentrale Halbierung hergestellt sind, sind im Handel.

Bekannt sind auch Tröge aus V2A-Stahl, meist mit V-förmigem Querschnitt, doch besteht im letzteren Falle immer die Gefahr der Abgabe von Schwermetallionen an das Fließmittel, weshalb sie nur noch selten benutzt werden.

WUNDERLY¹⁹ beschreibt einen in vier Segmente geteilten Trog, mit Hilfe dessen man acht verschiedene Chromatogramme gleichzeitig laufen lassen kann. Er erscheint vor allem für Spezialarbeiten interessant, bei denen es sich um Reihenversuche mit wechselndem pH handelt oder bei denen bei gleichem Fließmittel verschiedene Papiere oder verschiedene Konzentrationen des gleichen Fließmittelgemisches ausprobiert werden sollen. Die Anwendung verschiedener Fließmittel in der gleichen Kammer gestattet er selbstverständlich nicht.

Für kleinere Apparaturen sind auch große Porzellanschiffchen im Gebrauch.

Hier wie auch bei den anderen Methoden ist es wichtig, daß die Apparatur völlig dicht ist, daß sie also eine gesättigte Atmosphäre in bezug auf Wasser- und Lösungsmitteldampf zu erzeugen gestattet, und vor allem, daß sie gleichmäßig von allen Seiten temperiert ist.

Diese Dichtung erzielt man außer durch Schliff durch Gummistreifen, durch angefeuchtete Filtrierpapierstreifen, am besten jedoch durch dünne «Würste» aus Plastilin, die man in bekannter Weise dreht und außen um die Berührungsstelle zwischen Apparatur und Deckel legt. Dadurch ist absolute Dichtigkeit am besten garantiert.

Eine kleine, für absteigendes Arbeiten geeignete Kammer, die zugleich zum Ausprobieren verschiedener Fließmittel gedacht ist, beschreibt RABEK¹⁸. Es handelt sich um 3 cm im Durchmesser messende, 60 cm lange Rohre, die oben einen durch Schliff aufsetzbaren Deckel besitzen und in die man über einen Glassteg Streifen eintaucht.

b) Aufsteigende Methode

Während absteigendes Arbeiten immerhin einen gewissen apparativen Aufwand verlangt, ist die aufsteigende Methode mit den einfachsten Mitteln durchzuführen und daher überall dort zu empfehlen, wo aus Platz- oder Etatsgründen große Anschaffungen nicht gemacht werden können. Jedes Glas mit Deckel, das einen ebenen Boden hat und dicht sowie groß genug ist, kann als chromatographische Kammer dienen: also Weckgläser, Bonbongläser mit Schliff oder Überfalldeckel, runde Standzylinder genügender Größe mit Glasplatte, ausgediente Batteriekästen, in die man eine Kri-

stallisierschale einsetzt. Die richtige Größe dürfte in den meisten Fällen, dort wo nicht sehr viskose Fließmittel verwendet werden oder sehr weit auseinander liegende R_F -Werte vorliegen, 30–40 cm an Höhe betragen.

Praktisch alle käuflichen Apparaturen sind auch für aufsteigendes Arbeiten eingerichtet.

Was die Dichtung der Apparaturen angeht, so gilt sinngemäß das gleiche wie für das absteigende Verfahren.

c) Rundfilter- oder Horizontalchromatographie

Hier gibt es zwei verschiedene Verfahren, die jedoch beide das gleiche bezwecken, Trennung von *im* Zentrum oder *im* Kreise *um* das Zentrum angebrachten Substanzen in Form konzentrischer Kreise oder Kreissegmente. Da die Tiefe der Kreise bzw. ihre Breite gering ist, erfolgt scharfe Auftrennung leichter als beim aufsteigenden und sogar dem trennschärferen absteigenden Chromatogramm, wo Flecken sich infolge ihrer kompakten und runden Form leichter überlagern.

Dies ist die einfachste und sicher stichhaltigste Form der Erklärung für das Phänomen, daß das Rundfilterchromatogramm besonders trennscharf ist. Es sind auch formelmäßige Deutungen versucht worden, jedoch erscheint die Notwendigkeit ihrer Anwendung kaum gegeben.

Methode nach ZIMMERMANN und NEHRING

Zwischen Deckel und Unterteil eines Exsikkators, der einen Deckeltubus besitzt, legt man ein Blatt Filtrierpapier in Form eines Rundfilters oder auch eines Filterquadrates.

Im Tubus befindet sich ein durchbohrter Stopfen mit einer an der Spitze zur Kapillare ausgezogenen Pipette. Durch Anbringen eines Stückchens Schlauch mit Schraubenquetschhahn oben an der Pipette kann man den Zufluß des Fließmittels nach Wunsch regulieren, so daß keine «Pfütze» in der Mitte des Chromatogramms entsteht.

Das zu untersuchende Substanzgemisch bringt man entweder in Form eines Einzeltropfens auf die Mitte des Filters oder besser auf einen kleinen Bleistiftkreis, wobei die Benutzung von Leitchromatogrammen ermöglicht wird. Um die Verteilung des Fließmittels noch weitherhin zu verbessern, kann man in das Filterzentrum (die Substanzen sitzen auf einem Kreis um das Zentrum) ein kleines, lose gedrehtes Filtrierpapierrollchen einfügen, das den Überschuß des Fließmittels abtropfen läßt und nur soviel an das Filter abgibt, wie dieses aufnehmen kann.

Methode nach RUTTER

Zwischen zwei gut aufeinander passende, gleich große Kristallisierschalen geeigneter Größe oder besser plan geschliffene dickwandige Schalen nach Art der SCHOTTschen Duraxschalen oder Pyrexschalen geeigneten Durchmessers (23 bis 25 cm) legt man ein passendes Rundfilter oder ein quadratisches Stück Filtrierpapier bzw. einen Viertelbogen. In einem Kreis um das Zentrum befinden sich die Substanzen. RUTTER schreibt vor, eine kleine Zunge aus dem Filter herauszuschneiden, die man nach unten biegt und als Docht in das Fließmittel eintauchen läßt. Diese Art der Zuführung des Fließmittels wird heute nur noch wenig ausgeübt, da die Breite der Zunge nicht ganz leicht zu treffen ist. Sie soll nicht zu schmal sein, da sie sonst zu langsam saugt, jedoch auch nicht zu breit, da sonst das Chromatogramm zu stark elliptisch wird. Darüber hinaus fehlt ein Stück im Chromatogramm, und die Ränder sind verzerrt.

Man führt daher heute meistens in die Mitte einen kleinen Docht aus Filtrierpapier oder ein kleines Röllchen aus dem gleichen Stoff ein oder benutzt als Docht einen mehrfachen Faden aus gut saugfähiger Baumwolle. Ist die Saugung des Baumwolldochtes nicht ausreichend, so wäscht man ihn mit irgendeinem kapillaraktiven Waschmittel vor oder mit Äther. Auch kann man ihn mit dem Fließmittel netzen und hochziehen, so daß das Papier benetzt wird.

V. Beschickung des Chromatogramms

Zum Auftragen der Substanzflecken eignen sich: Blutzuckerpipetten, Erythrozytenpipetten, abgesprengte Schmelzpunktröhrchen, die natürlich am Auftragsende plan sein müssen.

Zum quantitativen Auftragen wird auch häufiger die Agla-Mikrometerpipette benutzt. Die Pipetten sind so graduert, daß man einige Mikroliter auftragen kann.

Einige cm von der einen Kante des Bogens bzw. Schmalseite des Papierstreifens entfernt zieht man mit Bleistift eine Startlinie. Die Entfernung von der Kante richtet sich nach den Ausmaßen der Apparatur. Die aufgetragenen Substanzflecken dürfen natürlich nicht eintauchen; darüber hinaus empfiehlt es sich jedoch auch aus anderen Gründen, die Substanzen nicht zu nahe an den Flüssigkeitsspiegel heranzuführen.

Es hat sich nämlich herausgestellt, daß nur in den mittleren Teilen des Chromatogramms die Flüssigkeitsverteilung gleichmäßig ist. Beim absteigenden Chromatogramm sollen ohnehin die Substanztropfen unterhalb des Führungsstabes liegen. Die Fleckengröße soll nur in Ausnahmefällen bis zu 1 cm im Durchmesser betragen. Das gilt für alle Arbeitsverfahren. Sind die Lösungen der Substanzen zu verdünnt oder zu arm an einer Komponente, so gibt es zwei Möglichkeiten, ohne vorherige Eindampfung die Lösungen auf dem Papier zu konzentrieren:

1. Man setzt einen Tropfen geeigneter Größe auf, trocknet ihn, je nach Empfindlichkeit der Substanzen, mit dem Kaltluft- oder Warmluftstrom eines Haarföhns, setzt wieder auf die gleiche Stelle und fährt mit diesem Verfahren so lange fort, bis schätzungsweise die notwendige Konzentration erreicht ist.
2. Man trägt auf einer Seite auf und richtet auf dieselbe Stelle von der Rückseite des Bogens den Luftstrom des Föhns, wobei man am besten die Auftragspipette befestigt, ebenso wie das Papier.

Beim Rundfilterchromatogramm ist zu beachten, daß die aufgetragenen Substanzmengen infolge der starken seitlichen Ausbreitung der Flecken etwas größer sein müssen.

Nicht immer wird man Punkte auftragen, vor allem, wenn größere Substanzmengen zur Trennung gelangen sollen. Man kann dann die Substanz auch streifenförmig auftragen, was aufsteigend, absteigend und im Rundfilterchromatogramm möglich ist. Letzteres trägt dann den Namen *Zirkular- oder Kreischromatogramm*, auch *Ringchromatogramm*. Man zieht die Streifen mit Hilfe der Blutzuckerpipette oder setzt möglichst gleichmäßig Tropfen an Tropfen, so daß das Zentrum des einen auf der Peripherie des vorhergehenden ruht. Der oft emp-

fohlene Gebrauch einer Schwedenfeder erschien uns bei dem stark saugfähigen Filtrierpapier nicht sehr geeignet.

Das Zirkularchromatogramm sowie das auf- oder absteigende Bandenchromatogramm geben die Möglichkeit, das Chromatogramm zu zerschneiden und mit jedem Sektor eine andersartige Reaktion durchzuführen.

VI. Die Fließmittel*

Heute gibt es eine derart große Anzahl verschiedener chromatographischer Arbeiten auf allen Gebieten²⁰, daß man bereits durch Studium der einschlägigen Literatur ein oder mehrere geeignete Lösungsmittelgemische als Fließmittel herausfinden kann, die man ausprobiert.

Aus der vorliegenden Literatur wird man immer dasjenige Fließmittel heraussuchen, das für den vorliegenden Fall die günstigste, also möglichst weit differenzierte Lage der R_F -Werte verspricht. Einzelne Stoffgruppen verlangen besondere Fließmittelsysteme, z. B. Säuren und Phenole ammoniakhaltige, da sie oft oder meist als Ammoniumsalze wandern, Alkaloide Pufferlösungen, usw.

Das *Biochemische Taschenbuch*²² bringt 153 Standardfließmittel und eine Anzahl von R_F -Werten bei Benutzung dieser Fließmittel. Zu Beginn der papierchromatographischen Erfahrungen glaubte man, daß nur mit Wasser begrenzt mischbare Lösungsmittel zur Papierchromatographie geeignet seien, da nur mit diesen eine echte Verteilungschromatographie möglich erschien.

Tab. 1. Fließmittel für papierchromatographische Arbeiten²⁵

Phenol/Wasser = 80 : 20 (g/v)	
Kresol, wassergesättigt	
Collidin, wassergesättigt	
2,6-Lutidin/Wasser = 65 : 35 (v/v)	
<i>n</i> -Butanol, wassergesättigt	
sek. Butanol/3 prozentigem wäßrigem Ammoniak = 50 : 20 (v/v)	
Amylalkohol, wassergesättigt	
<i>n</i> -Butanol/Eisessig/Wasser = 80 : 20 : 20 (v/v/v)	
sek. Butanol/Ameisensäure/Wasser = 75 : 13 : 12 (v/v/v)	
Pyridin/ <i>n</i> -Butanol/Wasser = 80 : 20 : 20 (v/v/v)	
50 : 20 : 20 (v/v/v)	
Isopropanol/konz. Ammoniak/Wasser = 6 : 3 : 1 (v/v/v)	
Essigester/Pyridin/Wasser = 2 : 1 : 2 (obere Phase)	
Methyläthylketon/Pyridin/Wasser = 70 : 15 : 15 (v/v/v)	
Isobuttersäure/Eisessig/Wasser = 80 : 20 : 20	
Für anorganische Kationen:	
Aceton/Wasser/konz. HCl = 87 : 5 : 8	
Pyridin mit 20 Vol.% Wasser und 1% KSCN	
Methyläthylketon/konz. HCl = 7 : 3 (v/v)	
<i>n</i> -Butanol, mit 3- <i>n</i> HCl gesättigt	

* Wir schließen uns dem Vorschlag von DITTMAR²¹ an, das Lösungsmittelgemisch, die «mobile Phase», als «Fließmittel» zu bezeichnen, um einen klaren Begriff zu schaffen. Das Wort «Lösungsmittel» sei den organischen Einzelkomponenten der Fließmittel oder dem Löser für das Substanzgemisch vorbehalten.

Literatur siehe S. 194-5

DECKER²³ bewies, daß sich in zahlreichen Fällen auch mit Wasser unbegrenzt mischbare Lösungsmittel eignen. CRAMER¹⁴ deutete diese Erscheinung damit, daß als stationäre Phase der bekannte Cellulose-Wasser-Komplex gebildet wird, aus dem das organische Lösungsmittel die zu trennenden Stoffe herausholt. In vielen Fällen eignen sich auch wäßrige Salzlösungen und Pufferlösungen, doch ist hier wohl anzunehmen, daß eine Form der Aussalzchromatographie vorliegt²⁴.

Eine gewisse Zahl von Fließmitteln kann man als sogenannte «Standardfließmittel» bezeichnen, da sie sich für sehr viele Fälle eignen; eine relativ kleine Anzahl organischer Lösungsmittel dient dazu als Basis (Tab. 1).

Hat man bei der Bearbeitung eines neuartigen Gebietes keinen Anhalt, so kann man sich zur Erprobung eines geeigneten Fließmittelgemisches der Reagensglas-methode nach ROCKLAND und DUNN²⁶ bedienen.

Man benutzt dazu unten verjüngte Papierstreifen, die in Reagensgläser passen, welche 1-2 ml des auszuprobierenden Fließmittels enthalten. Die aufgetragenen Substanztropfen dürfen natürlich nicht eintauchen.

Diese Methode dient vorzugsweise dem Erproben von Fließmitteln für das aufsteigende Verfahren. Zum absteigenden Verfahren empfehlen wir die Methode nach RABEK¹⁸:

Rohre vom Ausmaß 3×60 cm, die oben einen durch Schliff angefügten Deckel tragen und eine Vorrichtung, damit der Streifen Filtrierpapier über eine Glasbrücke in einen Trog eintauchen kann. Das Streifenchromatogramm kann die ganze Bogenlänge umfassen. Aus eigener Erfahrung möchten wir zusätzlich folgende Ratschläge geben:

Die in der älteren Literatur angegebenen Reinigungsvorschriften der organischen Lösungsmittel dürften heute weitgehend nicht mehr notwendig sein, da die chromatographische Reinheit in fast allen Fällen ausreichend ist.

Gewisse Fließmittel neigen zu einer geringfügigen Zersetzung, die das Chromatogramm insofern etwas stören kann, als sich eine mehr oder weniger breite, fast immer fluoreszierende, manchmal gefärbte Fließmittelfront bildet, in die Substanzen mit hohen R_F -Werten hineinreichen können.

Phenol, vor allem bei Gegenwart von Ammoniak, bildet besonders leicht diese gefärbte Fließmittelfront. Es bilden sich farbige Oxydationsprodukte, deren Ausbildung durch Spuren von Schwermetallionen, vor allem Eisen und Kupfer, stark katalysiert wird.

Die Entfernung bzw. Unschädlichmachung der in Größenordnungen von Mikrogrammen immer im Papier vorhandenen Spurenelemente geschieht, indem man:

1. dem zur Sättigung der Atmosphäre dienenden Phenol Spuren von Schwefelwasserstoff oder Cyankali zufügt
2. oder, indem man das Papier vor der Chromatographie mit Komplexonen, wie Trilon, 8-Oxychinolin, Äthylendiamintetraessigsäure usw., vorwäscht,
3. indem man im Handel befindliche, mit Säure gewaschene chromatographische Papiere benutzt,
4. indem man dort, wo es angeht, dem Fließmittel Spuren von Komplexbildnern zufügt.

Ein oft erwähntes, aber selten experimentell durchgeprobtes Moment ist die Veränderung von Fließmittelgemischen durch chemische Vorgänge zwischen den Komponenten. Als Prototyp dafür gilt die Veresterung von *n*-Butanol bzw. *n*-Propanol mit Essigsäure.

Um die Verhältnisse bei Verwendung eines der üblichen Fließmittelgemische aus *n*-Butanol, Eisessig und Wasser näher zu studieren, führten wir folgende Versuchsreihe durch:

Vorliegendes Fließmittelgemisch: *n*-Butanol/Eisessig/Wasser = 8 : 2 : 2 (v/v/v).

10 ml des Gemisches wurden von Stunde zu Stunde mit *n*-NaOH gegen Phenolphthalein als Indikator titriert. Das Gemisch wurde bei 20°C aufbewahrt.

Ergebnis: Zu Beginn: 10 ml Gemisch = 29,2 ml *n*-NaOH. Nach 24 Stunden: 10 ml des Gemisches = 28,6 ml *n*-NaOH.

Die Veresterung begann also erst nach einer Anzahl von Stunden merklich zu werden, insofern als die Menge der freien Säure abnahm. Im vorliegenden Falle, also bei einem großen Überschuß freien Alkohols und ohne Anwesenheit eines Katalysators, ist die Veresterung innerhalb der Versuchsdauer eines normalen Chromatogramms nicht sehr stark. Ein mehrere Tage gestandenes Gemisch allerdings zeigt bereits deutliche Änderungen der R_F -Werte. Einsatz der Iso- statt der *n*-Alkohole zögert die Veresterung noch weiter hinaus. Immerhin ist es ratsam, in allen Fällen nur soviel Gemisch anzusetzen, als man zum jeweiligen Chromatogramm benötigt.

SOMMER²⁷ studierte die Trennung der Kationen und die Änderung ihrer R_F -Werte anhand eines frischen, eines 5 Tage alten und eines 45 Tage alten Gemisches aus Methanol, Salzsäure und Wasser. Er fand selbst nach 45 Tagen keine Änderung, was kaum verwunderlich ist, da bekanntlich eine Veresterung Methanol-Salzsäure unter diesen Bedingungen kaum zu erwarten ist.

Tab. 2. R_F -Werte von Kationen

Kation	Alter des Fließmittels		
	0 Tage	5 Tage	45 Tage
Fe ³⁺	0,78	0,78	0,78
Al ³⁺	0,85	0,86	0,86
Co ²⁺	0,71	0,74	0,73
Ni ²⁺	0,67	0,71	0,70
Mn ²⁺	0,71	0,73	0,72
Zn ²⁺	0,94	0,96	0,95
TiO ²⁺	0,75	0,78	0,76
Mg ²⁺	0,71	0,73	0,72
Ca ²⁺	0,47	0,54	0,49
Sr ²⁺	0,24	0,29	0,30
Ba ²⁺	0,09	0,11	0,13
K ⁺	0,10	0,12	0,16

VII. Reproduzierbarkeit der R_F -Werte Leitchromatogramme

Eine reine Verteilungschromatographie müßte erwarten lassen, daß der R_F -Wert einer Substanz – unabhängig von äußeren Bedingungen – eine reproduzierbare Zahl wäre. Das stimmt jedoch nur in erster Annäherung.

Der weiter vorn entwickelte enge Zusammenhang zwischen dem Verteilungskoeffizienten α und dem R_F -Wert:

$$\alpha = \frac{A_L}{A_S} \left(\frac{1}{R_F} - 1 \right)$$

besagt bereits, daß dieser lösungsmittelabhängig sein muß. Er wird also variieren mit der Natur der organischen Lösungsmittel und der Wassermenge, welche im Gemisch vorhanden ist, nach Maßgabe dessen, wie die betreffende Substanz sich zwischen beiden verteilt. Richtige Auswahl des zur Verwendung gelangenden Fließmittels kann also die R_F -Werte der zu trennenden Substanzen günstig zwischen den beiden Grenzen 0,1 und 0,9 verteilen. R_F -Werte über 0,9 gelangen zu nahe an die Fließmittelfront und sind oft schlecht zu identifizieren. Solche unter 0,1 trennen sich nur schlecht auf.

Einige Arbeiten sind vor allem interessant geworden, die sich mit der Reproduzierbarkeit der R_F -Werte und Gründen für mangelnde Reproduzierbarkeit befassen.

ZIMMERMANN²⁸ hat vorzugsweise die Abhängigkeit der R_F -Werte von äußeren Bedingungen studiert und neun zu beachtende Punkte aufgestellt. Nach seinen Anschauungen können diese neun Punkte Lage und Reproduzierbarkeit der R_F -Werte beeinflussen:

1. Fließmittel
2. Papiersorte
3. Maschinenrichtung oder Querrichtung
4. Entwicklungsart
5. Weglänge, d. h. die von den einzelnen Substanzen zu durchwandernde Strecke
6. Entfernung der Startlinie von der Eintauchzone
7. Konzentration der zu trennenden Substanzen
8. Begleitstoffe
9. Temperatur

DE WAEL und DIAZ CADAVIECO²⁹ studierten die Abhängigkeit der R_F -Werte vom Mahlungsgrad der Faser bzw. von der mehr oder weniger dichten Beschaffenheit des Papiers. Sie stellten fest, daß auf Papieren ähnlicher Beschaffenheit, jedoch verschiedener Herkunft, z. B. 2043 a und b von C. Schleicher & Schüll und Whatman 1, unter bestimmten Bedingungen die R_F -Werte hundertprozentig reproduzierbar waren. Das war immer der Fall, wenn die Fließmittel vorher mit alkalischen Puffern geschüttelt wurden. Härtere Papiere jedoch, wie z. B. Schleicher & Schüll Nr. 2045 b, ließen sich in bezug auf Reproduzierbarkeit der R_F -Werte nicht hundertprozentig damit vergleichen.

TEWARI³⁰ studierte die Abhängigkeit der R_F -Werte von verschiedenen Faktoren bei der Trennung der Kupfergruppe mit Hilfe von *n*-Butanol/Salzsäure. Er gab vier verschiedene Gesetzmäßigkeiten an:

1. Die R_F -Werte der Kationen nehmen mit deren Konzentration im Gemisch zu.
2. Die R_F -Werte der Kationen fallen mit fallenden Temperaturen.
3. Die R_F -Werte nehmen ab mit steigender Entfernung der Fließmittelfront vom Startpunkt, da sich die Zusammensetzung des Fließmittels durch Aufnahme von Wasser aus dem Papier ändert.
4. Die R_F -Werte ändern sich, wenn man das Papier vorher mit Salzlösungen trinkt.

Im Rahmen der bereits vorher zitierten Arbeit studierte SOMMER²⁷ auch das Verhalten von Kationen auf weichen, mittleren und harten Papieren der Produktion C. Schleicher & Schüll. Er stellte fest, daß mittlere Papiere die höchsten R_F -Werte zeigen, bei harten Papieren liegen sie niedriger, ebenfalls bei ganz weichen. Das deckt sich genau mit den Erfahrungen bei DE WÆL. Es ist schwer, dafür eine Erklärung zu finden. Offensichtlich ist bei mittleren Papieren das Verhältnis der Wanderungsgeschwindigkeit von Substanz zu Fließmittel am günstigsten.

Bei harten Papieren bietet die durch die Naßvermahlung erzeugte große Oberfläche der Faser der Wanderung der Substanzen offenbar mehr Widerstand als derjenigen des Lösungsmittels, auch ist letzteres mengenmäßig unvergleichlich stärker vertreten. Die Möglichkeit der Adsorption an die Faser ist zudem bei geringen Substanzmengen und vergrößerter Faser Oberfläche stark erhöht.

Beim sehr weichen Papier läßt vielleicht die starke Kapillarwirkung das Fließmittel gegen die Substanz vorseilen.

Tab. 3. R_F -Werte bei Kationen nach SOMMER

Fließmittel: HCl / CH₃OH / H₂O = 10 : 80 : 10
Steighöhe: 20,5 cm. Temperatur: 20°C

Kation	2040b	2043b	2045b	Kation	2040b	2043b	2045b
Sb ³⁺	0,76	0,82	0,68	Th ⁴⁺	0,75	0,75	0,66
Sn ⁴⁺	0,89	0,90	0,90	UO ₂ ²⁺	0,51	0,51	0,43
Hg ²⁺	0,91	0,92	0,85	Be ²⁺	0,86	0,85	0,84
Bi ³⁺	0,80	0,82	0,76	Ba ²⁺	0,11	0,12	0,07
Cu ²⁺	0,64	0,66	0,60	Sr ²⁺	0,26	0,30	0,19
Pb ²⁺	0,33	0,34	0,29	Ca ²⁺	0,46	0,49	0,37
Cd ²⁺	0,88	0,91	0,88	Mg ²⁺	0,67	0,70	0,65

Tab. 4. R_F -Werte bei Kationen nach SOMMER

Fließmittel: HCl / CH₃OH / H₂O = 10 : 80 : 10
Steighöhe: 20,5 cm. Temperatur: 20°C

Kation	2040b	2043b	2045b	Kation	2040b	2043b	2045b
Fe ³⁺	0,69	0,74	0,71	Li ⁺	0,71	0,74	0,68
Al ³⁺	0,79	0,82	0,79	Na ⁺	0,29	0,30	0,20
Co ²⁺	0,66	0,71	0,66	K ⁺	0,11	0,12	0,06
Ni ²⁺	0,63	0,68	0,62	Rb ⁺	0,10	0,11	0,07
Mn ²⁺	0,68	0,71	0,64	Cs ⁺	0,11	0,12	0,07
Zn ²⁺	0,87	0,89	0,86	Au ³⁺	0,87	0,92	0,81
TiO ²⁺	0,75	0,75	0,66	Pt ⁴⁺	0,89	0,90	0,77

Aus unserer eigenen Erfahrung können wir dazu ebenfalls einiges an Tatsachen mitteilen, vor allem in bezug auf zwei Punkte:

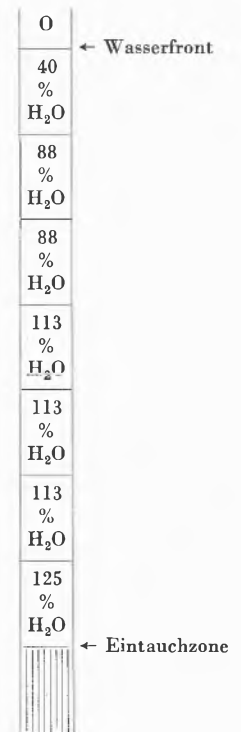
1. Verteilung der Lösungsmittelmenge über das Gesamtchromatogramm.
2. Änderung der Fließmittelzusammensetzung durch kapillare Auftrennung während des Chromatographiervorganges.

Literatur siehe S. 194-5

Zu Punkt 1: Bereits LIESEGANG¹¹ führte Versuche durch, um festzustellen, wie sich das Fließmittel – im Falle von LIESEGANG destilliertes Wasser – vom Startpunkt zur Lösungsmittelfront verteilt, bzw. wieviel an Fließmittel prozentual auf gleich große und gewogene Papierabschnitte kommt. Das Ergebnis ist zugleich verblüffend und interessant:

Wasserverteilung im Kapillarstreifen

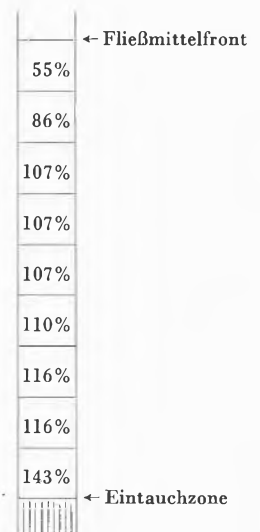
Papier: Nr. 598 von C. Schleicher & Schüll
Streifen 1,0 × 20 cm
(20 = Laufrichtung)
2,5 × 1 cm = 32 mg
Eintauchzone 2 cm



Im gleichen Zusammenhang haben wir ganz analoge Versuche – sowohl im aufsteigenden wie auch im absteigenden Verfahren – durchgeführt, welche ganz ähnliche Resultate ergaben:

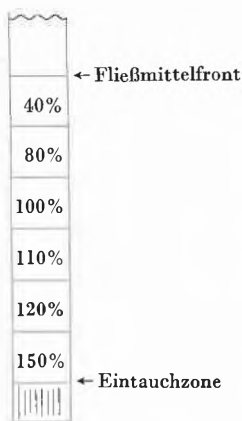
Verteilung des Fließmittels im Chromatogramm³¹

Papier: 2040b M, Streifen 5 cm breit, in Laufrichtung geschnitten
Methode: absteigend
Fließmittel: n-Butanol/ Eisessig/ Wasser = 8 : 2 : 2 (v/v/v)



Verteilung des Fließmittels im Chromatogramm³¹

Papier: 2040 b, 5 cm breit, in Laufrichtung geschnitten
Methode: aufsteigend
Fließmittel: n-Butanol/Eisessig/Wasser = 8 : 2 : 2 (v/v/v)



SCHUTE¹⁷ fand ebenfalls, daß die Aufnahme des Fließmittels mit steigender Weglänge abnimmt:

Fließmittel: Petroleum
Methode: aufsteigend
Papier: Streifen 5 × 30 cm, mit 7,2% Wasserdampf beladen

Quadrate 5 × 5 cm, von oben nach unten untersucht:

1. Abschnitt: 32,6% Fließmittelgehalt
2. Abschnitt: 58 % Fließmittelgehalt
3. Abschnitt: 64,5% Fließmittelgehalt
4. Abschnitt: 72 % Fließmittelgehalt

Es nimmt also auch hier die Beladung des Papierstreifens von der Startlinie bis zur Fließmittelfront ab.

Diese Versuche sind sehr aufschlußreich. Sie zeigen eindeutig, warum es sich empfiehlt, den Startpunkt nicht zu nahe an die Eintauchzone zu setzen, und warum R_F -Werte in der Mitte des Chromatogramms schärfer und gleichmäßiger werden. In den mittleren Zonen des Chromatogramms ist eben die Beladung mit Fließmittel bzw. die Durchströmung am gleichmäßigsten.

Zu Punkt 2: Hier machten wir zwei Versuche, welche durch mehrere Beobachtungen aus der Literatur hinreichend gestützt sind.

Wir ließen im aufsteigenden Verfahren in zwei Versuchen bei Anwendung zweier verschiedener Fließmittelgemische das Papier überwandern, nahmen dann aus der Apparatur heraus, markierten die Fließmittelfront, trockneten das Chromatogramm und schnitten es parallel zur Startlinie in 2 cm breite Streifen, die wir eluierten durch Auslaugen mit destilliertem Wasser.

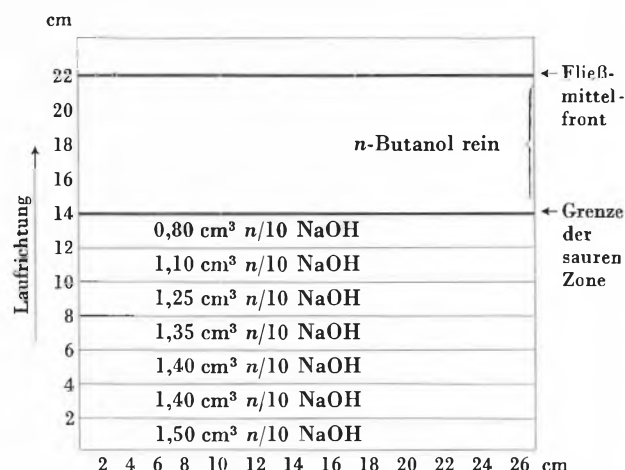
Die Eluate wurden jeweils mit n/10-NaOH gegen Phenolphthalein als Indikator titriert³¹ (siehe Spalte rechts).

Die Versuche zeigen ganz deutlich, daß bei nicht hinreichend mit Wasser gesättigten Papieren das Papier aus dem Fließmittelgemisch Wasser herauszieht und sich damit absättigt. Auch wäßrige Säure wird ganz offensichtlich vom Papier gebunden (über Säureaddition und Cellulose-Wasser-Komplex siehe weiter hinten). Ähnliche Beobachtungen machten auch andere Autoren:

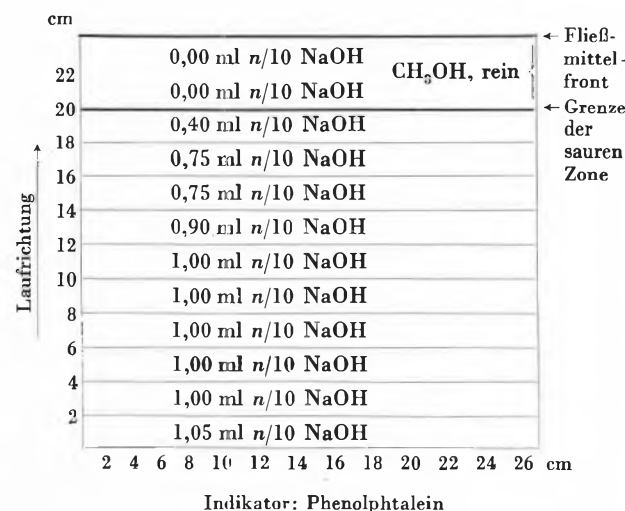
HORNER, EMRICH und KIRSCHNER³² stellten fest, daß im Durchlaufchromatogramm ein Phenol-Wasser-Gemisch solange an Wasser verarmte, bis die Faser damit gesättigt war. Erst in diesem Augenblick blieb die Zusammensetzung Phenol-Wasser konstant.

SOMMER, FOUASSIN²⁷ und andere beschreiben das auf gleichen Ursachen beruhende Phänomen der doppelten

Papier: 2040 a M, 27 cm breit, 25 cm hoch
Methode: aufsteigend
Fließmittel: n-Butanol, mit 5 prozentiger HCl gesättigt
Fließmittelfront: bei 22 cm Höhe



Papier: 2045 b M, 27 cm breit, 25 cm hoch
Methode: aufsteigend
Fließmittel: Methanol/0,5-n Schwefelsäure = 3 : 1 (v/v)
Fließmittelfront: an der oberen Bogenkante



Indikator: Phenolphthalein

Fronten. Bei unseren Versuchen resultierte ebenfalls eine völlig säurefreie Zone, in der mit Sicherheit R_F -Werte anders sind als in der säurehaltigen. Jedenfalls ergeben die Versuche und Literaturangaben eindeutig, daß es zunächst einmal notwendig ist, das Papier vor der Chromatographie mit Wasser- und Fließmitteldampf so abzusättigen, daß es möglichst keine oder nur eine minimale Veränderung des Fließmittelgemisches mehr hervorrufen kann und daß unter Umständen scheinbare Unregelmäßigkeiten in bezug auf Reproduzierbarkeit der R_F -Werte durch sinnvolle Versuchsanordnung ausgeschaltet werden können.

Wir möchten unsere Erfahrungen dahingehend zusammenfassen, daß die Reproduzierbarkeit von R_F -Werten nur bedingt gegeben ist und daß ihnen vor allem ein relativer, weniger ein absoluter Wert innewohnt, in-

sofern als man aus R_F -Werten in Tabellen bei gegebenen Fließmitteln anhand der Zahlen entnehmen kann, ob diese für eine Reihe von Stoffen weit genug auseinanderliegen, um eine klare Trennung zu ermöglichen.

Die nicht immer gewährleistete Reproduzierbarkeit der R_F -Werte führte bekanntlich zur Benützung der «Leitchromatogramme», d. h. zum Mitführen reiner Testsubstanzen unter den Bedingungen des Hauptchromatogramms, in der gleichen Apparatur, sowie auch eines «Testgemisches» aus diesen Reinsubstanzen. Diese wird man natürlich so wählen, wie man sie nach Lage der Dinge in der zu analysierenden Substanz erwarten kann. Es hat sich herausgestellt, daß die meisten Substanzen einander etwas «drücken», d. h. aus einem Gemisch mit Begleitsubstanzen heraus chromatographiert sind die R_F -Werte etwas niedriger. Auch das Gegenteil ist je nach Natur der zu trennenden Stoffe hier und da zu beobachten. Reinsubstanzen für Leitchromatogramme werden heute bereits von der chemischen Industrie in den Handel gebracht.

VIII. Ansetzen der Chromatogramme, Sättigen des Papieres

Die bisherigen Ausführungen dürften zur Genüge gezeigt haben, welche Punkte für das Ansetzen eines Chromatogramms mit Leitchromatogrammen wichtig sind. Man wird also folgendermaßen verfahren:

Will man auf- oder absteigend ein Chromatogramm mit Leitchromatogrammen ansetzen, so zieht man in bereits angegebener Weise die Startlinie mit Bleistift, bleibt jeweils etwa 1 cm vom Rande weg und teilt den Streifen, Bogen oder Bogenabschnitt in 3 cm breite Einzelchromatogramme ein, in deren Mitte man jeweils auf die Startlinie den Substanztropfen aufsetzt.

Während das absteigende Chromatogramm die Länge des ganzen Bogens umfassen kann – die Breite richtet sich nach Apparatur und Zahl der aufzutrennenden Stoffe –, hat es beim aufsteigenden Verfahren wenig Zweck, die Höhe des Chromatogramms 30 cm wesentlich übersteigen zu lassen. Bei dieser Höhe hört der kapillare Sog praktisch auf, und Auftrennungen finden nicht mehr statt.

Will man zwei absteigende Chromatogramme im Trog einlegen, d. h. nach jeder Seite des Troges eins, so näht man sie am besten mit weißem Nähgarn locker zusammen, so daß sie sich nicht berühren. Sie lassen sich dann wesentlich besser in den Trog einlegen und vom Beschwerungsstab überdecken. Beim Einlegen eines Chromatogramms biegt man zum gleichen Zwecke eine 1 cm breite Kante um.

Die untere Kante eines absteigenden Chromatogramms versteht man zweckmäßig mit Einschnitten, durch die man einen Glasstab zieht, damit das Chromatogramm gerade hängt.

Den für das aufsteigende Verfahren häufig benutzten Viertelbogen schließt man mit weißem Nähgarn mit nicht zu weiten Stichen – damit keine Stauchung eintritt – zum Zylinder, in der Art, daß die Kanten sich nicht berühren.

Zum sogenannten Rundfilterchromatogramm hat sich nach unseren Erfahrungen besser ein quadratisches

Stück Filtrierpapier als ein eigentliches Rundfilter geeignet. Die Ecken lassen sich besonders gut zum Handtieren ausnutzen (wegen der Hautausscheidung an Salzen, Fetten, Aminosäuren soll man das Chromatogramm selbst so wenig wie möglich berühren) sowie auch zum Beschriften.

Den ungefähren Mittelpunkt legt man in bekannter Weise durch Markierung der Diagonalen fest und schlägt darum einen etwa 2 cm im Durchmesser messenden Kreis, auf dem man die Tropfen in bekannter Weise in entsprechenden Abständen aufsetzt oder den Substanzkreis (Zirkularchromatogramm) mit Hilfe einer Mikropipette zieht.

Man legt dann das Chromatogramm ein und läßt es bei verschlossener Apparatur am besten über Nacht mit Wasser- und Fließmitteldampf sättigen. Die Atmosphäre erzeugt man durch Einsatzschalen mit Wasser und Fließmittel. Bei nicht völlig mischbaren Fließmitteln benutzt man meist zum Einsetzen in die Kammer das lösungsmittelgesättigte Wasser, zum *Entwickeln*, d. h. zur Trennung der Substanzen, die wassergesättigte organische Phase.

In besonders heiklen Fällen kann man Seitenwände und Deckel mit Filtrierpapier oder -karton auskleiden, den man tränkt. Dadurch wird die wirksame Oberfläche stark vergrößert. Beim Rundfilterchromatogramm wird man zweckmäßig in die untere Schale zur späteren Aufnahme des Fließmittels eine kleine Einsatzschale einstellen.

Die Flüssigkeit zur vorherigen Sättigung der Atmosphäre nimmt der Raum zwischen Einsatzschale und unterer Gefäßwand auf.

IX. Filtrierpapier für chromatographisches Arbeiten

Bekanntlich ist Filtrierpapier ein sogenanntes ungeleimtes Papier, d. h. es fehlen ihm die in Schreib- und Zeichenpapier vorhandenen Leim- und Füllstoffe; es besteht also praktisch aus reiner Cellulose und kann seine Saug- und Kapillarwirkung voll entfalten. Als System allerdings sehr unregelmäßiger Kapillaren richtet es sich in erster Annäherung nach den Kapillargesetzen, z. B. unter anderem:

$$r^2 \pi h s = 2 r \pi \sigma$$

oder:
$$h = \frac{2 \sigma}{r s}$$

Dabei ist: r der Radius der Kapillare
 h die Länge der Kapillare
 s das spezifische Gewicht der Flüssigkeit
 σ die Oberflächenspannung der Flüssigkeit

Diese Formel besagt, daß der kapillare Aufstieg in Filtrierpapier beendet sein wird, wenn das Gewicht der flüssigkeitsgefüllten Kapillare dem kapillaren Sog das Gleichgewicht hält.

Das gilt bis zu einem gewissen Grade also auch für das Filtrierpapier innerhalb eines chromatographischen Versuches.

Gelegentlich³³ stellten wir Versuche an über die zeitlichen Verhältnisse des kapillaren Sogs der Fließmittel im auf- und absteigenden Chromatogramm. Es stellte sich heraus, daß zwar, wie zu erwarten war, das absteigende Chromatogramm später verlangsamte als das auf-

steigende, bei dem die Erdanziehung dem Sog entgegenwirkt – beim absteigenden läuft sie parallel –, doch wird es auch immer langsamer, wohl durch Verstopfung der Kapillaren, Brücken- und Gewölbebildung innerhalb der Kapillaren, Reibung an den Kapillarwänden und ähnlichem, wie man es auch aus der Filtrationstechnik kennt.

Der Sog im Filtrierpapier wird vor allem erzeugt durch die auch im Lichtmikroskop sichtbaren Poren, welche durch die Verfilzung der naßvermahlenden Faser entstehen und in Größenordnungen zwischen 1 und 14 Mikron liegen.

Die Vermahlung der Faser in Berührung mit Wasser ist ein relativ komplexer Vorgang, desgleichen die Papierbildung auf der Maschine, die unter schrittweiser Entwässerung der Papierbahn vor sich geht. Man nimmt heute an, daß die Cellulosefaser – teils dabei die Cellulose selbst, stärker jedoch die begleitenden Hemicellulosen – in Berührung mit dem Fabrikationswasser eine Schleimschicht ausbildet, innerhalb deren die Faser gekürzt und teilweise längs gespalten wird in Richtung ihrer naturgegebenen Fibrillen. Beim «röschen», d. h. relativ grobfaserigen Filtrierpapier steht allerdings sehr wahrscheinlich die Faserkürzung im Vordergrund, und die Faserlängsspaltung findet nur an den Enden statt. Innerhalb der Schleimschicht bilden sich sehr wahrscheinlich von OH zu OH Wasserstoffbrücken aus, dort, wo räumliche Nähe von Faser zu Faser gegeben ist. So entsteht die Verfilzung zum Papierblatt unter Aussparung der oben erwähnten Poren.

Wie heute allgemein bekannt, eignet sich für chromatographische Papiere fast einzig und allein die reine Baumwollfaser, die meist in Form der kurzen Lintersfaser von der Baumwollsaat zur Verarbeitung gelangt und einen zentralen Hohlraum, das «Lumen», besitzt, das sie in einem anteiligen Durchmesser von 3 bis 17% durchzieht. Dieses Lumen hat natürlich ebenfalls kapillare Eigenschaften. Die Faserwandung selbst ist locker gebaut. Sie besitzt zwischen den Fibrillen und selbst zwischen den Mizellen – vor allem aber im amorphen Teil des Mizells – Lücken, in die sich je nach Ausdehnung dieser Lücken kleinere oder größere Moleküle einschleichen.

Nach CASSIDY³⁴ tritt diese Art von Hohlräumen allerdings nur wenig in Erscheinung, da sie wahrscheinlich beim Trocknen der Papierbahn teilweise verkleben und sich bei Berührung mit Wasser nicht hundertprozentig wieder öffnen. Sie sind also wahrscheinlich für den kapillaren Sog im Filtrierpapier nur wenig interessant. Farbstoffe, vor allem die substantiven, sollen nach unseren jetzigen Anschauungen vorwiegend zwischen den Fibrillen eingelagert sein, kleinere Moleküle dagegen, wie NaOH, H₂O, NH₃ usw., auch zwischen den Mizellen, vor allem natürlich zwischen den Kettenmolekülen des amorphen Teiles.

Für die Papierchromatographie und ihre Deutung ist vor allem die Wasseraddition an die Faser interessant.

Nach der Anschauung der Mehrzahl der heutigen Wissenschaftler ist die Papierchromatographie bekanntlich eine Verteilungschromatographie, wobei als «stationäre Phase» die wassergesättigte Cellulosefaser funktioniert und als «mobile Phase» das wasserhaltige organische Lösungsmittel. Als primäre Stufe der wasserhaltigen Cellulose nimmt man den sogenannten «Cellulose-Wasser-Komplex» an, der relativ fest ist und vielleicht als wichtigste Funktion die Verhinderung andersartiger Bindungen an den amorphen Teil der Cellulose zu besorgen hat, welche eine reine Verteilung stören könnten.

Die Bildung dieses Komplexes erschien uns interessant genug, um ihr in der Celluloseliteratur³⁵ nachzuforschen. Es fand sich folgendes:

Die Kurve der Wiederfeuchtung einer völlig getrockneten Cellulose deckt nicht völlig die Entwässerungskurve, beide zusammen bilden eine Hysteresisschleife. Trockene Cellulosen nehmen 6 bis 7% Wasser auf, unter Kontraktion der Wassermoleküle, in exothermer Reaktion. Das Wasser addiert sich an die OH-Gruppen überall dort, wo diese unter sich nicht in Reaktion treten können, wo sie nämlich über 2,6 Å auseinanderliegen. Das ist der Fall im amorphen Teil und an der Oberfläche der Mizelle. Das weitere Wasser, insgesamt etwa 25%, wird kapillar aufgenommen, sitzt also wohl in den Poren. Nach unseren Erfahrungen nehmen Filtrierpapiere Wasserdampf von Normaltemperatur über 6 bis 7% sehr langsam auf, selbst bei stundenlangem Lagern über Wasser. Man muß also unbedingt das Papier eine Nacht hindurch sättigen bzw. einen Tag, wenn man das Chromatogramm abends ansetzen will.

Daß die Lintersfaser sich wesentlich besser als die Zellstofffaser für papierchromatische Arbeiten eignet, dürfte an ihrer wesentlich größeren chemischen Reinheit, ihrem höheren kristallinen Anteil sowie an ihrem geringeren Anteil an reaktionsfähigen Gruppen liegen (Tab. 5).

Tab. 5. Vergleich von Linters und Zellstoff

	Linters	Zellstoffe
Kristalliner Anteil der Mizelle	etwa 70%	etwa 40%
Polymerisationsgrad . . .	2000–3000	1000–1500
Glucosezahl	etwa 500	etwa 125
Chemische Beschaffenheit der Lintersfaser in bezug auf Verunreinigungen:		
Asche = Mineralstoffgehalt . . .	0,05 bis 0,07 %	
Eisen	0,001 bis 0,002%	
Stickstoff (organisch gebunden + Ammoniak)	0,01 bis 0,015%	
Ätherextraktivstoffe	0,025 bis 0,050%	
Hemicellulosen in wechselnden Mengen		

Stickstoff und Ätherextraktivstoffe (Baumwollwachs, also ein Gemisch von hohen Alkoholen, Fettsäuren, Kohlenwasserstoffen und Phosphatiden) sind teils in die Zellwand der Faser eingelagert, also schlecht angreifbar, teils Reste des Protoplasmakerns, der beim Schwinden infolge Faserreifung als granular gebaute Haut sich der Innenwand des Lumens anlegt.

Die Mineralstoffgehalte, von denen bis zu 60% wasserlöslich sein können, sind trotzdem bei Säurebehandlung des Papiers nicht völlig löslich, es bleiben Silikate zurück, wobei vor allem das Eisen sehr fest gebunden ist.

Bei Säurewäsche werden die Mineralstoffgehalte meistens bis auf etwa ein Zehntel, oft sogar noch darunter, reduziert, es bleiben also nur minimale Mengen zurück, die zudem schwer löslich oder unlöslich sind. Daß die anteiligen Gehalte der Mineralstoffe sich dabei verschieben, infolge ihrer verschiedenen Löslichkeit bzw. Angreifbarkeit, verwundert nach dem vorhin Erwähnten nicht.

Die Säurebehandlung verursacht auch eine gewisse Hydrolyse der Proteinspuren und peptidähnlichen Stoffe innerhalb der Faser, so daß Säureextrakte aus Filtrierpapieren, die papierchromatographisch untersucht werden, meist eine ganze Anzahl der verschiedensten Aminosäuren ergeben:

WYNN³⁶ fand darin: Asparaginsäure, Cysteinsäure, Glutaminsäure, Glycin, Prolin, Alanin, Valin, Leucin, Arginin, Tyrosin.

CATLET, GIUFFRIA, MOORE und ROLINS³⁷ stellten fest: Glutaminsäure, Asparaginsäure, Valin, Alanin.

Nach neueren englischen und anderen Arbeiten finden sich als wäßrige Extraktivstoffe in Filtrierpapieren Hemicellulosen.

HUFMAN und Mitarbeiter fanden in einem Whatman-Filtrierpapier wäßrige Extrakte, die erst höher waren, sich jedoch nach mehrmaliger Extraktion auf eine konstante Menge einstellten und nach Hydrolyse und Papierchromatographie als Bruchstücke von Hemicellulosen auswiesen³⁸:

Tab. 6. Extrakt von Hemicellulose aus Cellulose
1000 g Whatman 1, Wasser von 25°C

Extraktion Nr.	Extraktivgewicht in g
1	0,26
2	0,16
3	0,15
4	0,09
5	0,09
6	0,09

Die Extraktivstoffe erwiesen sich nach Hydrolyse und papierchromatographischer Untersuchung als Bausteine eines Pentosans:

Uronsäuren und Neutralzucker, nämlich
Xylose Glucose
Arabinose Galaktose

ADAMS und BISHOP³⁹ untersuchten einen wäßrigen Extrakt aus Cellulose und fanden darin:

16,2 % Arabinose
35,0 % Xylose
41,5 % Glucose
7,55 % Galaktose

HATANO und SOBUE⁴⁰ fanden in Rohlinters folgende Zucker:
Glucose Galakturonsäure
Arabinose Galaktose
Glucuronsäure

In gereinigten Linters fanden sie jedoch nur Arabinose und Glucuronsäure.

Literatur siehe S. 194-5

Nach GIERTZ⁴¹ sind Hemicellulosen in der Faser notwendig, da sie stärker hydrophil sind als die Cellulosefaser und in ihrer Schleimschicht sich leichter Wasserstoffbrücken ausbilden.

Sie bewirken die Verklebung der Fasern zum Papier. Ohne einen wenn auch minimalen Hemicellulosegehalt sollen nur sehr wenig naßfeste Papiere entstehen.

Über die Möglichkeit der Bildung von oxydativen Abbauprodukten der Faser und ihre eventuelle Einwirkung auf das adsorptive Geschehen bei Papierchromatographie und Papierelektrophorese siehe unten.

Im großen und ganzen sind es bislang doch relativ wenige Papiere – gemessen an dem bereits riesigen Umfang der Gebiete –, welche die Anforderungen zu befriedigen vermögen.

Das Filtrierpapier, das die drei ersten englischen Autoren aus der gesamten Whatman-Produktion als geeignet durch rein empirischen Versuch herausfanden, war Whatman Nr. 1, ein reines Baumwollpapier mittlerer Saugigenschaften, das analytisch – d. h. nur für Filtrationsaufgaben – praktisch dem Papier Nr. 595 aus der Produktion Schleicher & Schüll nahekommt.

Einige andere Papiere wurden im Laufe der Zeit noch hinzugenommen, als die Vielfalt der zu trennenden Substanzen, der Ausmaße der Apparaturen und der Fließmittel zu etwas größerer Variation auch in bezug auf die Papiereigenschaften zwangen.

Bislang hat sich noch keine Einheitlichkeit in bezug auf die Abmessungen der Geräte für die Papierchromatographie durchsetzen können. Wahrscheinlich ist auch trotz der Vielzahl der Publikationen die Methode noch viel zu stark in Entwicklung begriffen, als daß man schon Normungsversuche oder eine gewisse Gruppierung vornehmen könnte. Vielleicht werden diese sogar bei der starken Vitalität der Methode niemals oder erst sehr spät möglich sein.

Es ist daher fast erstaunlich, daß die papierchromatographisch Arbeitenden bislang mit so relativ wenig Papieren auskamen. Auch häufige Wünsche nach abwegigen Papieren können diesen Eindruck kaum verwischen, wenn man bedenkt, daß die Methode heute bereits das ganze Gebiet der Chemie, Biologie, Pharmazie, Medizin, Pharmakologie, Botanik, Lebensmittelchemie u. a. bestreicht.

Innerhalb der Produktion von C. Schleicher & Schüll wurde eine Anzahl von reinen Linterspapieren geschaffen, mit bewußter Variation von Dicke und Saugigenschaften, die in Tab. 7 zusammengestellt sind.

Was an Sonderpapieren für spezielle Zwecke geschaffen wurde, vor allem an Papieren mit hydrophobierenden und sonstigen Zusätzen, sei im Abschnitte «Vor- und nachbehandelte Papiere» beschrieben.

X. Zweidimensionales Arbeiten

Die bislang beschriebenen Verfahren arbeiteten alle «eindimensional», d. h. die Wanderungsrichtung des Lö-

sungsmittels verlief in einer Dimension und in einem Arbeitsgang.

Die Wanderung der Substanzen verlief geradlinig.

Bei sehr nahe liegenden R_F -Werten kann es sich ereignen, daß selbst bei sorgfältigster Fließmittelauswahl keine Trennung einzelner Stoffe stattfindet, sondern daß diese sich «überlappen».

In solchen Fällen – wenn auch geschickte Auswahl des Fließmittels und der Versuchsbedingungen nicht weiterführen – pflegt man «zweidimensional» zu arbeiten, d. h. man läßt einen in einer Ecke eines Bogens oder Bogenabschnittes aufgetragenen Substanzfleckens einmal in einer Richtung durch ein geeignetes Fließmittelgemisch überwandern, bis letzteres an der gegenüberliegenden Kante angelangt ist, trocknet sehr sorgfältig bis zum Verschwinden des Fließmittelgeruches und läßt dann im rechten Winkel zum ersten ein zweites Fließmittelgemisch überwandern, wobei man beide so auswählt, daß die R_F -Werte – diesmal innerhalb der Papierebene – möglichst weit auseinanderliegen. So kann man Trennungen erzielen, die in einer Dimension unmöglich sind.

DENT⁴² gab bereits im Jahre 1948 eine Art «Landkarte» oder «Map of spots» mit über 60 Aminosäuren.

Natürlich wurde diese Landkarte nicht in einem einzigen zweidimensionalen Chromatogramm gewonnen, sondern aus einer Anzahl von unter gleichen Bedingungen gelaufenen Chromatogrammen komponiert. Sie gestattet die Feststellung der Lage eines unter gleichen Bedingungen gelaufenen Stoffes, ist also eine wesentliche Hilfe bei der Papierchromatographie der α -Aminosäuren.

XI. Mehrdimensionales Arbeiten

Zwei Arbeiten erschienen in diesem Zusammenhang interessant, nämlich diejenige von STÖCKLI⁴³ und diejenige von DECKER, RIFFART und OBERNEDER⁴⁴.

Nach STÖCKLI arbeitet man so, daß man eine eindimensionale Vortrennung vornimmt – auf- oder absteigend – mit Leitchromatogrammen. Die Streifen, welche die mehr oder weniger gut vortrennten Substanzen tragen, schneidet man aus und näht sie über ein ausgespartes Fenster entsprechender Größe auf ein neues Blatt Filtrierpapier. Man kann wieder Leitchromatogramme mitlaufen lassen und das Verfahren des Ausschneidens und Aufnehmens noch ein oder mehrere Male wiederholen. Auch ergibt sich dabei die Möglichkeit, immer in der Laufrichtung des Papiers zu arbeiten.

Tab. 7. Linterspapiere für Papierchromatographie (Schleicher & Schüll)

Sorte	Oberfläche	Gewicht g/m ²	Dicke mm	Saughöhe mm	Asche %	Fe mg/100 g	N mg/100 g	Ätherextrakt mg/100 g	Stoff BW = Baumwolle	Eigenschaften
2040 a		85–90	0,18 bis 0,19	140–160	0,04 bis 0,07	1–2	etwa 20	unter 50	100% BW	schnell
2040 b	M*	120–125	0,22 bis 0,24	140–160	0,04 bis 0,07	1–2	»	»	»	»
2040 b	GI**	120–125	0,16 bis 0,17	140–160	0,04 bis 0,07	1–2	»	»	»	»
2043 a		85–90	0,18 bis 0,19	90–100	0,04 bis 0,07	1–2	»	»	»	mittel
2043 a	Mgl***	90–95	etwa 0,15	90–100	0,04 bis 0,07	1–2	»	»	»	»
2043 b	M*	120–125	0,22 bis 0,24	90–100	0,04 bis 0,07	1–2	»	»	»	»
2043 b	GI**	120–125	0,14 bis 0,15	90–100	0,04 bis 0,07	1–2	»	»	»	»
2043 b	Mgl***	120–125	0,20 bis 0,22	90–100	0,04 bis 0,07	1–2	»	»	»	»
2045 a	M*	90–95	0,16 bis 0,17	60–70	0,04 bis 0,07	1–2	»	»	»	langsam
2045 a	GI**	90–95	0,10 bis 0,11	60–70	0,04 bis 0,07	1–2	»	»	»	»
2045 b	M*	120–125	0,18 bis 0,19	60–70	0,04 bis 0,07	1–2	»	»	»	»
2045 b	GI**	120–125	0,15 bis 0,17	60–70	0,04 bis 0,07	1–2	»	»	»	»
598 G	M*	140–145	0,25 bis 0,28	145–155	etwa 0,08	1–2	»	»	»	dick, schnell
2315	M*	150–155	0,29 bis 0,32	130–140	etwa 0,08	1,5–2	»	»	»	»
2316	M*	150–155	0,29 bis 0,32	100–110	0,05 bis 0,06	2–2,5	»	»	»	»
2071	M*	630–680	0,65 bis 0,70	65–75	0,05 bis 0,06	1,5–2	»	»	»	Karton
2230	M*	700–750	0,88 bis 0,93	160–170	etwa 0,06	2–3	»	»	»	{ Karton weich
2181	M*	2400–2500	3,6 bis 4,2	–	etwa 0,09	2–3	»	»	»	{ Karton stark

M* = raue Oberfläche, GI** = nachgeglättet, Mgl*** = maschinenglatt, nicht nachgeglättet.

Saughöhe (a): Streifen 15 × 250 mm, die 15-mm-Kante taucht in destilliertem Wasser von Raumtemperatur. Durchfeuchtete Strecke in 30 Min. Mittelwert aus Laufrichtung und dazu senkrecht stehender Richtung.

Die Papiere 2040 a und b, 2043 a und b sowie 2045 a und b mit allen Oberflächen werden auf Anfrage ausgewaschen (Salzsäure, Flußsäure, destilliertes Wasser).

Asche: 0,011 bis 0,013 % in 100 g Papier, Ätherextrakt: unter 50 mg in 100 g Papier
Fe: 0,4 bis 0,6 mg in 100 g Papier, N: 10–15 mg in 100 g Papier

Die Papiere 2040 a und b, 2043 a und b sowie 2045 a und b mit allen Oberflächen können mit Dowex 1107 hydrophobiert geliefert werden. Bezeichnung «hy».

Asche: 1,7 bis 1,9 % annähernd in 100 g Papier
Fe: 0,8 bis 0,9 mg in 100 g Papier

Literatur siehe S. 194-5

XII. Geformte Streifen

Die guten Trennmöglichkeiten des Rundfilterchromatogramms lassen sich auch auf absteigendes und aufsteigendes Arbeiten übertragen, wenn man dem aufgesetzten Substanztropfen eine ganz schmale Wanderungsbahn vorschreibt. Das kann man erreichen mit Hilfe der sogenannten «geformten Streifen». Mehrere Methoden seien erwähnt.

1. *Methode nach REINDEL und HOPPE.* Die Streifenchromatogramme tragen Zungen am Auftragsende, auf denen man die zu trennenden Substanzen aufträgt. Die Breite der Zunge bestimmt die Wanderungsgeschwindigkeit⁴⁵.

2. *Methode nach MATTHIAS*⁴⁶. Ein rechteckiger Bogen Filterpapier wird so zugeschnitten, daß am unteren Ende etwa zehn keilförmige Zungen entstehen, die – über einige mm breite Brücken – in etwa 1 cm breite Streifen auslaufen. Die keilförmigen Zungen sind über einen Glasstab aufgeriehen, der in Form eines Bügels umkehrt und oben die Streifen hält.

An den markierten Punkten am oberen Ende der Brücken werden die Substanzen aufgesetzt, die im aufsteigenden Verfahren von dem Fließmittelgemisch überwandert werden. Die einzelnen Komponenten des Gemisches breiten sich in Form von schwach gekrümmten Banden aus, die im weiteren Verlauf der Arbeit immer geradliniger werden. Um das Rundfilter noch trennschärfer zu gestalten, wird hier und da die Methode nach MATTHIAS noch mit dem Rundfilter kombiniert, d. h. man schneidet aus dem Rundfilter wie bei MATTHIAS sechseckige Sektoren aus und läßt die Substanzen über die dabei entstehenden schmalen Brücken wandern.

3. *Methode nach SCHWERDTFEGER*⁴⁷. Man schneidet mit einer scharfen Klinge Fünfecke aus dem Papierbogen aus und setzt die Substanztropfen auf die dadurch entstehenden schmalen Brücken.

4. *Besonders schmale Streifen* wurden häufiger benutzt, wenn in sehr schmaler Kammer schnell eine Sättigung erzielt werden soll, z. B. bei gewissen Kationentrennungen. Auch dort, wo besonders geringe Substanzmengen vorliegen, z. B. bei den Schriftfälschungsuntersuchungen der Kriminalisten, benutzt man wenige mm breite Streifen, um die geringen Substanzmengen wenigstens erkennen zu können.

XIII. Vor- und nachbehandelte Papiere

Bei gewissen Spezialaufgaben versagt das reine Linterspapier, so daß gewisse Behandlungen der Faser oder des fertigen Papiers stattfinden müssen, um Trenneffekte zu erzielen. Eine Anzahl derartiger Verfahren sei hier beschrieben.

1. Hydrophobierte Papiere durch Tränkung fertiger Papiere

a) Behandlung mit Silikonharzen

Dowex 1107. Das Papier wird mit einer 5prozentigen Lösung des Stoffes in Cyclohexan getränkt und anschließend eine Stunde auf 110°C erhitzt. So wird das Papier 2043b «hy» von C. Schleicher & Schüll hergestellt.

Natriummethylsilikonat Bayer liegt in wäßriger Emulsion vor. *Aquatex* von der Firma Heyden in Dresden.

Rhodorsil. SAVARY⁴⁸ empfiehlt die Tränkung des Papiers mit einer Lösung von 1 Vol. Rhodorsil in 100 Vol. wasserfreiem Cyclohexan, während 10 sec, dann Trocknung.

Dow Corning oder *Silikon-Hahnfett*, 25 g in 250 ml Methylchlorid, empfiehlt BROWN⁴⁹ zur Tränkung bei 50°C, anschließend Trocknung.

Die tschechische Literatur⁵⁰ beschreibt ein Silikonöl, das ein Copolymerisat von Methyl- und Phenylsilan darstellt.

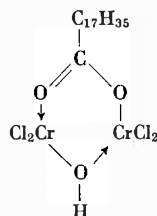
b) Tränkungsmittel auf Fettbasis

Cerosin, eine Petroleumfraktion vom etwaigen Siedepunkt 190 bis 220°C, benutzten KAUFMANN und NITSCH⁵¹, sowie INOUE und NODA. Man taucht, preßt dann zwischen Filterpapier und zwischen Glasplatten unter konstantem Druck (4 kg) während einiger Minuten. Man trocknet dann horizontal liegend unter mehrmaligem Umwenden.

Vaseline, weiß, oder Paraffinöl, 2–5prozentig in Äther oder Petroläther, GRUCH⁵².

Dekalin legt RÖTH⁵³ als Barriere über die Startlinie eines Fettsäurechromatogramms und erzielt so Schnelltrennung in der Seifenindustrie.

Quilon, ein Chromstearatkomplex folgender Formel:



der E. I. Du Pont de Nemours Comp., Inc., Wilmington, Delaware⁵⁴. Man trinkt das Papier mit einer durch geeignete Verdünnung der käuflichen Lösung gewonnenen einprozentigen Lösung. Die Papiere sind jedoch nicht unbeschränkt haltbar.

c) Tränkung mit Kautschuk-Latex

Das Papier wird in eine verdünnte Lösung von vulkanisiertem Kautschuklatex gelegt, dann getrocknet. Das fertige Papier soll 30% Kautschuk enthalten. Man wäscht mit Alkohol und Aceton und bewahrt bis zum Gebrauch unter Aceton auf.

2. Hydrophobierte Papiere durch Veresterung der Faser

a) *Acetylierung* des Filterpapiers mit etwa 20 bis 25% Acetyl⁵⁵. Alle Acetylierungsvorschriften schreiben Benzol, Toluol oder Xylol als Verdünnungsflüssigkeit vor, wahrscheinlich zur Bildung sogenannter «Inklusionscellulosen», d. h. solcher, bei denen das Wasser in den Hohlräumen in der Faserwandung und in den Kapillaren durch einen Kohlenwasserstoff verdrängt wurde; die Hohlräume bleiben. Acetyliert wird immer mit Essigsäureanhydrid, zeitweise auch bei Gegenwart von Essigsäure, mit wechselndem Katalysator:

0,1 Vol.% Schwefelsäure nach MICHEEL und SCHWEPPE⁵⁵,
10% Überchlorsäure nach BURTON⁵⁵,
Pyridin.

Man acetyliert wechselnde Zeiten und bei wechselnden Temperaturen: 6 Stunden bei 70°C mit Schwefelsäure als Katalysator, nach MICHEEL und SCHWEPPE

20 Stunden bei 38°C ohne Katalysator nach BOSCOIT,

75 min bei 0°C mit Überchlorsäure als Katalysator. So

kann auch vollacetyliert werden.

Der Acetylierungsgrad kann also gesteuert werden durch Zeit, Temperatur und Katalysator.

b) *Vollacetylierung* nach ZIJP⁵⁶. Unter geeigneten Versuchsbedingungen gelingt es, die Acetylierung der Faser ohne Zerstörung des Papierblattes bis über 90% Acetyl zu steigern.

c) *Veresterung mit anderen Fettsäuren* sowie Dicarbonsäuren aliphatischer und aromatischer Natur.

MICHEEL und ALBERS⁵⁷ verestern die Faser mit Buttersäure, Benzoesäure, Phtalsäure.

Die Veresterung mit Buttersäure geschieht mit einem Gemisch von buttersäurehaltigem Buttersäureanhydrid, Schwefelsäure und Benzin, diejenige mit Benzoesäure durch Benzoylchlorid bei Gegenwart von Pyridin, mit Benzin als Verdünnungsmittel, diejenige mit Phtalsäure durch Phtalsäureanhydrid, Benzol und Pyridin. Die Inklusionscellulose wird hier durch aromatische und aliphatische Verdünnungsmittel gebildet, als Katalysator dienen Schwefelsäure oder Pyridin. Beim Phtaloylpapier ist nur eine Carboxylgruppe verestert, das Papier ist daher ein Kationenaustauscher. Vorteil gegen das später zu beschreibende Carboxylpapier: Unlöslichkeit in Alkali.

d) Veresterung der Papierfaser mit Phosphorsäure⁵⁸. KEMBER und WELLS trennten Kationen auf phosphorylierter Cellulose, in Form von Streifen im Ausmaß 1×20 cm. Der Phosphorgehalt der Faser betrug 3,85%, die Austauschkapazität 2,04 m-Äquiv. pro Gramm. Als Fließmittel wurden wäßrige Salz- und Mineralsäurelösungen benutzt.

Beispiel: Trennung: Fe, Cu, Ni mit 2-n NaCl als Fließmittel.

R_F -Werte:	Fe	0,00
	Cu	0,3
	Ni	0,5
	Al	0,00
	Be	0,00
	Co	0,4
	Pb	0,5

Desgleichen veresterten sie ein Papier mit 2-Aminoäthylschwefelsäure. Das Papier erwies sich als stark wasserabweisend und ergab eine nur mangelhafte Trennung der Kationen:

Au, Pt, Pd und Rh

Es wurden auch Säulen aus phosphoryliertem Papierpulver hergestellt und daran Kationentrennungen versucht.

3. Modifikationen an der Cellulosefaser mit dem Ziel der Schaffung eines Kationen- oder Anionenaustauschers höherer Austauschkapazität

Carboxylgruppen wurden in die Cellulose eingeführt durch Behandlung von Alkalicellulose mit Monochloressigsäure (Austauscher auf Carboxylbasis).

Durch Veresterung mit Butansulfon wurde ein Kationenaustauscher von stärkerer Austauschkapazität auf Sulfogruppenbasis erhalten.

Durch Einführung quaternärer Ammoniumverbindungen (Veresterung mit Toluolsulfochlorid und Behandlung des Esters mit tertiären Aminen) wurde ein anionenaustauschendes Papier erhalten. Auf 20 bis 30 Glucoseeinheiten kam durchschnittlich je eine ionische Gruppe. Es ist anzunehmen, daß vor allem die primären Alkoholgruppen der Cellulose in Reaktion traten. An den Kationepapieren wurden Aminosäuren auch elektrophoretisch getrennt. Weiteres siehe LAUTSCH, MANECKE und BROSER⁵⁹.

Neueren Datums sind Arbeiten von SOBER und PETERSON, die anhand von Ionenaustauscher umgewandelten Cellulosen auch Proteine aus Serum und Pflanzenextrakten trennen konnten, die sonst chromatographisch infolge ihrer Unbeweglichkeit und ihrer sehr nahe beieinander liegenden R_F -Werte nicht trennbar waren. Jedoch liegen diese Erzeugnisse bislang nur als Pulver vor. Weiteres siehe Abschnitt «Präparative Chromatographie».

4. Einlagerung von Partikeln in das Papier, sei es durch Tränkung und Ausfällung im Papier, sei es durch Einlagerung in die Faser bei der Papierbildung

a) Aluminiumoxydpapier: Man taucht Streifen von nicht zu weichen Papieren (Schleicher & Schüll Nr. 2045 a und b werden empfohlen) in eine Lösung von 65 g/Liter von Aluminiumsulfat, dann in 2-n Ammoniak. Gute anschließende Auswäsche bis zur Ionenfreiheit ist erforderlich.

b) Silicagelpapier: Das Papier, das nicht zu weich sein soll, damit es die Behandlung erträgt, wird mit verdünnter Wasser-glaslösung und dann mit verdünnter Salzsäure behandelt, gewaschen und bei 110°C getrocknet.

c) Papiere mit eingelagerten Ionenaustauschern. Feinst zermahlene Ionenaustauscher auf Kunstharzbasis lassen sich ohne Schwierigkeiten mit der Papierfaser bei der Holländerarbeit vereinigen.

Typen des Handels: Schleicher & Schüll Kationenaustauscherpapier mit 5% Dowex 50. – Anionenaustauscherpapier mit 5% Dowex 2 \times 8.

LEDERER⁶⁰ ging einen anderen Weg. Er wusch die Kolloidteilchen von Dowex 50 nacheinander mit Salzsäure, Kochsalz, Salzsäure, destilliertem Wasser; dann führte er eine Suspension von 1 Vol.-Teil Harz und zwei Vol.-Teilen destilliertem Wasser durch Behandlung mit einem Überschuß von Ammoniak in die Ammoniumform über. Mit der Suspension wurde dann das Papier getränkt und durch schnelles Auflegen auf Filtrierpapier vom Überschuß befreit. Mit diesem Papier gelang die Trennung seltener Erden, während die Trennung anderer Kationen keinen besonderen Erfolg brachte. Das Papier erwies sich als ziemlich hydrophob.

5. Carboxylpapier

Die Erhöhung des natürlichen und durch die Faseraufbereitung gegebenen Carboxylgehaltes geschieht am zweckmäßigsten durch Behandlung mit N_2O_4 . Es werden dabei überwiegend die primären Alkoholgruppen oxydiert und Polyuronsäuren gebildet, mit allerdings beschränkter Austauschkapazität.

Besonders zwei Arbeiten wurden bekannt:

a) WIELAND⁶¹ benutzte ein auf diese Art hergestelltes Papier mit 1 bis 4% Carboxyl zur Trennung von Aminosäuren bei einem pH von 8 oder darüber, Aminen, Alkoholen und anorganischen Kationen. Letztere bei Anwendung wäßriger Ammonacetatpuffer.

b) STRÖLE⁶² benutzte ein Papier mit 1% Carboxyl und wäßrigem Phosphatpuffer vom pH 7. Damit trennte er α -Aminosäuren. Es zeigte sich, daß die R_F -Werte der Aminosäuren vom Carboxylgehalt abhängig waren.

Tab. 8

Trennung: Arginin, Lysin, Histidin, Alanin
Fließmittel: 0,1-n NaCl-Lösung

% Carboxyl als NaO_xC	R_F Arginin	R_F Lysin	R_F Histidin	R_F Alanin
0,6	0,50	0,65	0,47	0,95
0,8	0,45	0,58	0,43	0,92
1,0	0,38	0,51	0,39	0,95
1,6	0,29	0,41	0,31	0,91
2,0	0,25	0,34	0,28	0,91

Ähnliche Verhältnisse ergaben sich bei Verwendung von Pufferlösungen als Fließmittel.

XIV. Identifizierung der Flecken auf dem Papier

In der großen Mehrzahl der Fälle durch Trocknen des Chromatogramms und Sprühen mit der Lösung eines farbgebenden Reagens. Die einschlägigen Firmen handeln alle heute auch Sprüher für die Chromatographie. Man sollte darauf achten, daß die Sprühdüse fein genug ist, so daß das Chromatogramm nur feucht, jedoch nicht naß wird, da einzelne leicht lösliche Substanzen, z. B. die Zucker, sehr leicht weggeschwemmt werden.

In manchen Fällen zieht man Baden in der Reagenslösung vor, was immer gleichmäßiger erfolgt als die Sprühung. Es ist jedoch nur möglich, wenn die Flecken sich nicht im Lösungsmittel des Reagens auflösen können.

Hier und da wird man auch durch Betrachtung unter der UV-Lampe identifizieren, wenn die Flecken allein oder zusammen mit einem Reagens fluoreszieren oder eine Fluoreszenzlöschung zeigen.

Andere Nachweismöglichkeiten je nach Lage der Aufgabe: Beladung mit einem radioaktiven Atom und Identifizierung durch Kontaktphotographie oder GEIGER-MÜLLER-Zähler. Kombination mit biologischen Plattentesten (Vitamine, Antibiotika). Abtötung von Insektenlarven bei Insektiziden. JEPSON und SMITH⁶³ empfehlen bei α -Aminosäuren das sogenannte «Mehrfachtauchverfahren» statt des Sprühens. Nach diesen Autoren erzielt man oft gute Identifizierungen von Aminosäuren durch aufeinanderfolgendes Tauchen in:

Ninhydrin oder Isatin,
EHRЛИCHS Reagens,
SAKAGUCHI-Reagens,
Diazoreagens.

XV. Ermittlung der R_F -Werte

1. *Durch Messung mit Zirkel oder Lineal.* Legt man aus irgendwelchen Gründen Wert auf die Ermittlung des R_F -Wertes, so mißt man die Entfernung der Fließmittelfront vom Startpunkt bzw. der Startlinie, dann die Entfernung des Startpunktes vom Zentrum des jeweiligen Fleckens. Zur Bestimmung des Fleckenzentrums ermittelt man zweckmäßigerweise den Schnittpunkt zwischen der Längs- und Querrichtung, muß sich aber darüber klar sein, daß oft die Hauptsubstanzmenge an der Spitze des Fleckens liegt. Daher haben TERRES, GEBERT u. a. den R_L -Wert eingeführt, bei dem immer die Spitze des Fleckens als Maß benutzt wird. Man kann dem Gefühl nach auch in etwa den Massenschwerpunkt ermitteln. Infolge dieser Ungenauigkeiten ist es sinnlos – wie es hier und da geschieht –, R_F -Werte auf die dritte Kommastelle zu ermitteln. Bereits die zweite ist mit einer gewissen Unsicherheit behaftet.

Beim Durchflußchromatogramm benutzt man irgendeine charakteristische und schnell wandernde Substanz als Bezugssubstanz, z. B. beim Durchflußchromatogramm der Zucker die Glucose: R_C -Wert.

Aus ähnlichen Gesichtspunkten arbeiten einzelne Forscher mit P_K -Werten, sogenannten «Positionskonstanten», z. B.

$$P_K\text{-Wert} = \frac{\text{Von einem Stoff zurückgelegter Weg} \times 100}{\text{Vom Monophosphat zurückgelegter Weg} \times 100}$$

Daß es die Erscheinung der sogenannten «doppelten Fronten» gibt, wurde bereits früher erwähnt. Sie führt dazu, R_F -Werte über 1 zu finden, wenn der Substanzfleck zwischen den beiden Fronten lag. Natürlich sind derartige R_F -Werte sehr problematisch, da in der neutralen Fronten die Substanzen ganz anders wandern als in der sauren und weil mit Hydrolysen leicht hydrolysierbarer Metallsalze gerechnet werden muß.

Substanzen, deren R_F -Werte zwischen 0,1 und 0,9 liegen, sind am besten trennbar. Solche, die zu nahe an die Fließmittelfront gelangen, leiden mitunter unter der Tatsache, daß sich in dieser Front sämtliche Schmutz-

stoffe aus dem Papier und dem Fließmittel sammeln; sie ist daher oft stark verbreitert und gefärbt. Flecken, die in diese Zone hineinfallen, sind daher oft schwer identifizierbar.

Nach Herausnahme aus der Kammer markiert man die Fließmittelfront mit einem Bleistiftstrich. Hat man das verabsäumt, so ist sie praktisch immer unter der UV-Lampe wiederzufinden, da sie immer fluoresziert. Wahrscheinlich sind es Gemische hydrophiler und lipophiler Stoffe, welche diese Fluoreszenz erzeugen. Erstere sollen nach BALSTON und TALBOT⁶⁴ Celluloseabbauprodukte mit niedrigem Polymerisationsgrad und Oxydationserscheinungen sein, letztere freie Fettsäuren. Daß erstere Annahme stimmt, kann man als sicher voraussetzen, da nach den Erfahrungen aus der Cellulosechemie die Cellulose unter dem gleichzeitigen Einfluß von Licht, Luft-sauerstoff und Wasser in einem ständig energetisch katalysierten Abbau begriffen ist, der fluoreszierende Stoffe bildet.

2. *Messung mittels Gummiband*⁶⁵. Man spannt ein entsprechend graduiertes Gummiband über das Chromatogramm und liest den R_F -Wert direkt ab, dort, wo der Massenschwerpunkt des Fleckens sich befindet.

Hier besteht allerdings die Gefahr, daß nach einer bestimmten Zeit die Dehnung des Gummibandes nicht mehr über die ganze Strecke gleichmäßig ist, sondern in der Mitte stärker wird, daß also die Zahlenwerte nicht mehr genau stimmen.

3. *JERCHELscher Proportionalzirkel*⁶⁶. Die Bestimmung geht in der Art vor sich, daß man mit den Zirkelenden (Skalenteile 1,0) die Entfernung Startpunkt–Fließmittelfront einstellt.

Im Anschluß daran bringt man durch Parallelverschiebung gleiche Skalenteile mit Startpunkt und Mittelpunkt des Fleckens zur Deckung. Der abzulesende Wert ist der R_F -Wert.

XVI. Beziehungen zwischen R_F -Wert und chemischer Konstitution

Im Verlauf der letzten Jahre hat man begonnen, eine ganze Anzahl von Gesetzmäßigkeiten aufzufinden, die zwischen dem R_F -Wert und der chemischen Konstitution der betreffenden Stoffe bestehen.

Gewisse Regelmäßigkeiten in bezug auf die relative Steighöhe eines Stoffes zur Lage der Fließmittelfront kannte bereits die Kapillaranalyse. Schon GOPPELS-ROEDER stellte z. B. fest, daß in homologen Reihen mit steigender C-Zahl die Steighöhe zunimmt, wobei sich jedoch gelegentlich auch ein Maximum findet, mit anschließender stufenweiser Wiederabnahme.

Isomere zeigen häufig eine verschiedene Steighöhe.

Diamine besitzen geringere Steighöhen als Monamine u. a. m.

Seit Beginn des systematischen papierchromatographischen Arbeitens haben sich eine Anzahl von Gesetzmäßigkeiten bei der Trennung einzelner Stoffgruppen als Einzelbeobachtungen herausgeschält, bis im Verlauf der letzten Jahre eine Reihe von Publikationen erschienen, die sich mit der systematischen Erforschung

der Beziehungen zwischen R_F -Wert und chemischer Konstitution befaßten, vor allem auch mit den Möglichkeiten, diese Beziehungen quantitativ zu erfassen.

Bereits MARTIN im Jahre 1949⁶⁷ kam auf Grund thermodynamischer Überlegungen zu der Auffassung, daß bei Hinzufügung bestimmter Atomgruppen in ein Molekül der R_F -Wert sich um einen bestimmten Betrag erhöhen müsse, daß weiterhin auch die sogenannten R_M -Werte additive Größen sind.

Zwischen dem R_F -Wert, dem Verteilungskoeffizienten α und dem R_M -Wert finden sich folgende einfache Beziehungen:

$$R_M = \log \left(\frac{1}{R_F} - 1 \right) \quad \text{oder} \quad R_M = \log \left(\frac{R_F}{1 - R_F} \right)$$

$$\alpha = \frac{A_L}{A_S} \left(\frac{1}{R_F} - 1 \right)$$

Der R_M -Wert ist also eine Funktion des Verteilungskoeffizienten und steht zugleich in enger Beziehung zu dem R_F -Wert.

BATE-SMITH und WESTALL versuchten 1950⁶⁸, anhand des R_M -Wertes die Glieder von homologen Reihen zu identifizieren. Wenn sie die R_M -Werte gegen die C-Zahlen graphisch darstellten, erhielten sie mehr oder weniger gerade Linien.

Auch bei Polyphenolen konnten sie feststellen, daß eine annähernd lineare Beziehung zwischen der Zahl der im Molekül vorhandenen OH- und COOH-Gruppen und dem R_M -Wert bestand.

JERMYN und ISHERWOOD stellten fest, daß zwischen den Schmelzpunkten von Zuckern und dem R_F -Wert eine umgekehrte Proportionalität bestand⁶⁹.

Bei der Trennung von aliphatischen Säuren im alkalischen Medium kann man beobachten, daß Monocarbonsäuren schneller wandern als Dicarbonsäuren, Dicarbonsäuren schneller als Tricarbonsäuren.

MARTIN⁶⁷ zeigte, daß der Verteilungskoeffizient eines Dipeptids, dividiert durch das Produkt der Verteilungskoeffizienten der es aufbauenden Aminosäuren, bei gegebenem Fließmittel eine Konstante sein muß:

Beispiel: Dipeptid A · B (A und B sind zwei Aminosäuren)

$$\alpha_{A \cdot B} / \alpha_A \cdot \alpha_B = \text{const.}$$

Weiterhin:

$$\alpha = \frac{A_L}{A_S} \left(\frac{1}{R_F} - 1 \right),$$

wobei das Verhältnis der durch das Papier aufgenommenen Mengen Wasser und Fließmittel bei bestimmten Fließmittelsystemen konstant ist.

Daher:

$$\frac{\left(\frac{1}{R_F^{AB}} - 1 \right)}{\left(\frac{1}{R_F^A} - 1 \right) \left(\frac{1}{R_F^B} - 1 \right)} = \text{const.} = K.$$

$\frac{A_L}{A_S}$ wurde bei bekanntem Wassergehalt des Papiers aus dem Gewichtsverhältnis des trockenen Papiers zu dem des entwickelten Chromatogramms bestimmt.

Literatur siehe S. 194-5

Dann:

$$R_F^{AB} = \frac{1}{k \left(\frac{1}{R_F^A} - 1 \right) \left(\frac{1}{R_F^B} - 1 \right) + 1}$$

So kann man also die R_F -Werte von Peptiden aus denjenigen ihrer Bausteinamino-säuren vorausberechnen.

PARDEE⁷⁰ gab ebenfalls eine Formel an, anhand deren man die R_F -Werte niedriger Peptide aus denjenigen der sie aufbauenden α -Aminosäuren errechnen kann.

BREMNER⁷¹ fand bei primären aliphatischen Aminen, daß die R_F -Werte mit wachsender C-Zahl anstiegen, vor allem vom Methylamin bis zum Heptylamin:

Tab. 9. R_F -Werte von aliphatischen Aminen

Fließmittel: *n*-Butanol / Eisessig / Wasser = 4:1:5

Amin	R_F -Wert
Methylamin	0,37
Äthylamin	0,45
<i>n</i> -Propylamin	0,58
<i>n</i> -Butylamin	0,70
<i>n</i> -Amylamin	0,77
<i>n</i> -Heptylamin	0,85
1,2-Diaminoäthan	0,14
1,3-Diaminopropan	0,15
1,4-Diaminobutan	0,16
1,5-Diaminopentan	0,17
1,6-Diaminohexan	0,20

Eine Anzahl von α -Aminosäuren liegt im zweidimensionalen Chromatogramm auf Parabeln⁷²:

Citrullin - α -Aminobuttersäure - Valin - Isoleucin - Leucin, Glykokoll - Alanin - α -Aminobuttersäure - Norvalin - α -Amino-*n*-heptylsäure, Serin - Threonin - Tyrosin.

BERTETTI⁷³ stellte fest, daß bei der Papierchromatographie der aromatischen Amine der R_F -Wert stark strukturabhängig ist:

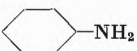
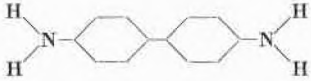

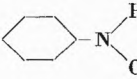
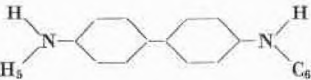
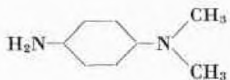
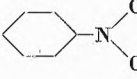

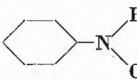
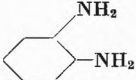
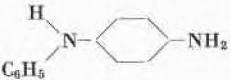
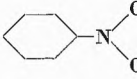
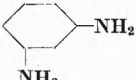
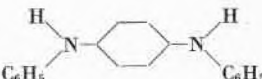
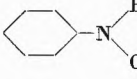

Die ersten Versuche, auch quantitative Beziehungen zu finden, stammen von REICHL⁷⁴ einerseits und SCHAUER, BULIRSCH und DECKER⁷⁵ andererseits.

Nach SCHAUER, BULIRSCH und DECKER gilt zwischen dem R_F -Wert und dem R_M -Wert folgende einfache Beziehung:

$$R_F = \frac{10^{R_M}}{1 + 10^{R_M}}$$

Man kann also aus gefundenen R_M -Werten die R_F -Werte berechnen und umgekehrt aus dem R_M -Wert Rückschlüsse auf die Konstitution eines Stoffes in Analogie zu verwandten Stoffen ziehen. SCHAUER und BULIRSCH stellen wie REICHL bei der rechnerischen Ermittlung der R_M -Werte die beiden Begriffe der *Grundkonstante* und der *Gruppenkonstante* auf und zeigen zugleich - wie bei allen additiven Eigenschaften der Moleküle - die Notwendigkeit der Berücksichtigung gewisser Inkremente für bestimmte Bindungsformen.

Tab. 10

	R_F 0,74		R_F 0,62		R_F 0,49
	0,79		1,00		0,58
	0,81				0,73
	0,80		0,65		0,80
	0,82		0,39		1,00
	1,00		0,49		

Bei der Berechnung der Gruppenkonstanten wurde so verfahren, daß die R_M -Werte zweier sich nur durch eine bestimmte Gruppe voneinander unterscheidender Substanzen subtrahiert wurden, z. B.:

$$R_M(\text{Alanin}) - R_M(\text{Glycin}) = \text{Gruppenkonstante } -\text{CH}_2-$$

Die Berechnung muß natürlich immer unter Berücksichtigung mehrerer Verbindungspaare erfolgen, wobei das Mittel aus den erhaltenen Werten genommen werden soll.

Die Grundkonstante wurde ähnlich ermittelt unter Rückführung auf den Grundkörper aus verschiedenen Verbindun-

gen, wobei man nicht nur innerhalb streng homologer Reihen bleiben soll, etwa nur innerhalb einer Reihe von Carbonsäuren usw.

Für die Ringbindung, Verzweigung, Doppelbindung usw., die energetisch einem besonderen Zustand entsprechen, müssen die betreffenden Inkremente in Rechnung gestellt werden. Die aus den R_M -Werten berechneten und die gefundenen R_F -Werte stimmten in den meisten Fällen gut überein – auch bei REICHL –, desgleichen die aus dem R_F -Wert – also experimentell – ermittelten R_M -Werte und die aus den Teilkonstanten additiv errechneten.

Es ergeben sich also Möglichkeiten:

1. bei bekannter Substanz R_F -Werte vorzuberechnen,
2. bei vorliegendem experimentellem Material an R_F -Werten Rückschlüsse auf die Konstanten der Substanz zu ziehen.

Diese Erfahrungen sind noch in den Anfängen begriffen, und es liegt noch nicht allzu viel Tatsachenmaterial dazu vor. Auch ist eine gewisse Kritik nicht von der Hand zu weisen im Hinblick auf die oft mangelnde Reproduzierbarkeit der R_F -Werte und ihre starke Abhängigkeit von äußeren Faktoren. Bei Benutzung streng gleichmäßiger Arbeitsbedingungen, die sich bis auf die Papiersorte und die äußeren Bedingungen erstrecken müßten, könnte man wahrscheinlich die Reproduzierbarkeit erhöhen.

Jedoch eröffnen diese Publikationen eine Anzahl neuer Möglichkeiten:

Es müßte mit einer gewissen Vorsicht möglich sein, ohne vorherige Reindarstellung einer Substanz Rückschlüsse auf ihre Konstitution zu ziehen, durch Bestimmung des R_F -Wertes und Vergleich mit bekannten Sub-

Tab. 11. Gruppenkonstanten⁷⁴

Fließmittel: Amylalkohol / 5-n Ameisensäure = 1:1 (v/v)

Papier: Whatman 1. Methode: absteigend

Grundkonstante	+ 0,97
Jedes C-Atom	+ 0,12
Kettenverzweigung	+ 0,25
Primäres OH	- 0,73
Sekundäres OH	- 0,50
Tertiäres OH	- 0,58
-COOH	- 0,63
-NH ₂	- 1,65
-CO-	- 0,39

Tab. 12. Gruppenkonstanten⁷⁴

Fließmittel: Essigester / Eisessig / Wasser = 3:1:1

Papier: Schleicher & Schüll Nr. 2043b. Methode: aufsteigend

Grundkonstante	+ 1,02
Jedes C-Atom	+ 0,21
Kettenverzweigung	- 0,29
Sekundäres OH	- 0,46
-COOH	- 0,68
-NH ₂	- 1,36

stanzen bzw. durch Ermittlung des R_M -Wertes aus dem R_F -Wert und Aufstellung einer mutmaßlichen Formel aus diesen.

Immerhin wird diese Möglichkeit der Konstitutionsermittlung immer neben anderen Methoden herlaufen müssen, infolge des großen Unsicherheitsfaktors.

Ein weiteres günstiges Moment läge in der Tatsache der minimalen zur Konstitutionsermittlung notwendigen Substanzmengen.

XVII. Quantitative Auswertung von Papierchromatogrammen

Obwohl die Papierchromatographie in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle als qualitative Nachweismethode benutzt wird, um Trennungen, Identifizierungen, Konstitutionsermittlungen durchzuführen, biologische Vorgänge zu verfolgen usw., kann gegebenenfalls auch ein Interesse daran bestehen, die Mengen der getrennten Stoffe wenigstens annähernd quantitativ zu erfassen. Dazu dient eine Reihe von Verfahren, die mit mehr oder weniger großer Genauigkeit arbeiten.

1. *Visueller Vergleich* mit Flecken bekannter Konzentration. Dieses Verfahren verlangt eine gewisse Übung sowie eine Anzahl von Chromatogrammen in verschiedenen Verdünnungen und wurde in den ersten Jahren der Papierchromatographie, d. h. etwa 1948 bis 1950, von POLSON⁷⁶, BERRY⁷⁷, DENT⁷⁸ u. a. angewandt.

Man arbeitet in der Art, daß man den Flecken der Lösung unbekanntes Gehaltes zusammen mit einer Reihe von Flecken bekannter und ansteigender Konzentrationen aufsetzt und das Chromatogramm mit den für den betreffenden Stoff typischen Lösungsmitteln durchführt.

Die aufgetragenen Lösungsflecken sollen 1 bis 10 Mikroliter betragen und alle gleich groß sein. Die steigenden Konzentrationen erzielt man durch steigende Konzentration der Lösungen bekannten Gehaltes oder durch mehrmaliges Auftragen mit dazwischen eingeschalteten Trocknungen. Man vergleicht Farbtiefe und Größe der Flecken. – Genauigkeit nur etwa $\pm 10\%$. Demzufolge kann die Methode in vielen Fällen nur zur annähernden Schätzung dienen.

2. *Elutionstechnik*. Diese Methode ist viel benutzt und gilt als die genaueste. Es ist dabei eine gewisse Adsorption der Stoffe an die Papierfaser je nach Natur der getrennten Substanzen in Rechnung zu stellen. Das Elutionsmittel kann daher in bestimmten Fällen die Substanz nicht restlos vom Filtrierpapier lösen.

Der Elution folgt dann meistens eine Anfärbung der Lösung mit farbgebenden Reagenzien und kolorimetrische Bestimmung, entweder mit Hilfe eines der im Handel befindlichen Kolorimeter oder in Zylindern gleicher Größe, etwa der HEHNER-Zylinder, gegen Lösungen bekannten Gehaltes. Meistens allerdings wird man heute absolut kolorimetrieren.

3. *Messung der Fleckengröße*. Nach der üblichen Durchführung des Chromatogramms umfährt man den Flecken mehrmals mit dem Planimeter und mißt so seine Fläche. Auch kann man durchsichtiges Millimeterpapier darauflegen und die Quadrate zählen.

Diese Methode beruht auf der Erfahrung von FOWLER⁷⁹, daß der Logarithmus des Fleckeninhaltes eine kontante Funktion der Fleckengröße ist bei Benutzung von 5 mm breiten Papierstreifen bei Trennung von Zuckermengen zwischen 4 und 450 Mikrogramm.

$$\frac{\log c}{\log C} = \text{const.}$$

Allgemein kann man sagen, daß die Fleckengröße proportional dem Logarithmus des Gehaltes an Substanz ist.

Zum Vergleich nimmt man die Flecken bekannter Substanzmengen, etwa je 5 Mikroliter von Lösungen, die 1,25; 2,5; 5,0 und 10,0 Mikroliter der bekannten Substanzen enthalten. FISHER⁸⁰ gibt folgende Berechnung eines derartigen Verfahrens:

4 Flecken, davon 2 bekannt, 2 unbekannt, also:
 s_1 und s_2 bekannt, u_1 und u_2 unbekannt.

$$s_1/s_2 = \frac{u_1}{u_2} = k.$$

Wenn die entsprechenden Fleckenflächen

S_1 und S_2 sowie U_1 und U_2 sind, so gilt folgende Beziehung:

$$\log \frac{u_1}{s_1} = \frac{(U_1 + U_2) - (S_1 + S_2)}{(U_1 - U_2) + (S_1 - S_2)} \log \cdot k.$$

Man soll so $\pm 5\%$ an Genauigkeit erzielen können.

4. *Messungen der Extinktionen auf dem Papier*. Die Auswertung kann z. B. unter Verwendung des ZEISSschen Extinktionsschreibers mit Zusatzgerät für die Papierchromatographie vorgenommen werden.

Bei Anwendung dieser Methode ergeben die dickeren und dünneren Stellen der Papierbahn, die sogenannten *Wolken*, eine gewisse Streuung des Nullwertes, den man erhält, indem man sich auf eine fleckenfreie Stelle des Chromatogramms bezieht. Diese Wolken verdanken einer unregelmäßigen Verfilzung der Papierbahn ihr Dasein. Der Papiermacher sagt: «Die Faser flockt.» Ganz lassen sie sich nie vermeiden. Bei sehr weichen Papieren, also solchen mit kurzer Mahldauer der Faser, sind sie stärker als bei harten Papieren, also solchen mit langer Mahldauer der Faser. Je kürzer die Faser, desto gleichmäßiger verfilzt sie.

Um diese Streuungen etwas auszugleichen und das Papier lichtdurchlässiger zu machen, trinkt man die Chromatogramme mit Glycerin, Paraffinöl, Bromnaphthalin, Plexisol* und Paraffinöl, gegebenenfalls auch mit Herbopanlack** oder ähnlichen Transparenzlacken für Papiere.

5. *Retentionsanalyse*. Ein quantitatives Verfahren ist auch die Retentionsanalyse, die zuerst von WIELAND eingeführt und späterhin vom WIELANDSchen Arbeitskreis verbessert wurde.

*Ältere Form*⁸⁴: Flecken der quantitativ zu erfassenden Aminosäuren von etwa 1 mg Gehalt (Trennung aus Gemisch durch Papierchromatographie oder Papierelektrophorese oder auch aufgesetzte Tüpfel auf einem Filtrierpapierstück von

* Plexisol: Röhm und Haas, Darmstadt.

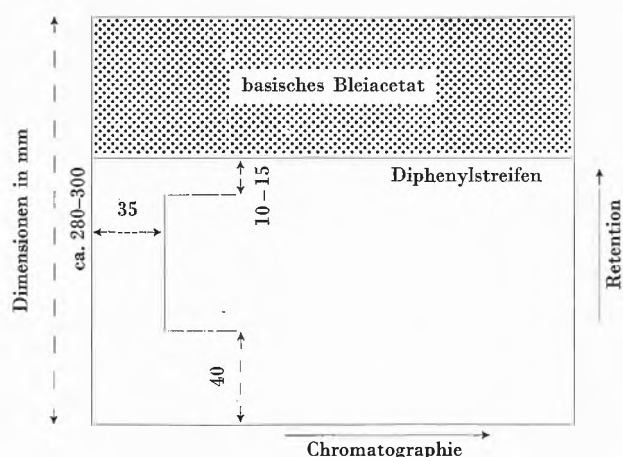
** Herbopanlack: Hersteller Herbig-Haarhaus, Köln-Bickendorf.

7 cm²) werden aufsteigend von Kupferacetat in Tetrahydrofuran überwandert. Darauf sprüht man mit einer 0,1prozentigen Lösung von Rubeanwasserstoff in Aceton, das 10% Wasser enthält. Dort, wo das Kupfersalz mit den Aminosäuren innere Komplexe bildet, entstehen durch Verzögerung der Wanderung Frontlücken. Diese Methode verlangt ein hartes Papier, das scharfe Fließmittelfronten ergibt (Schleicher & Schüll Nr. 575).

Die ältere Form ist insofern nicht allgemein anwendbar, als sie eine gewisse Gleichmäßigkeit der Flecken in bezug auf Gehalt und Größe voraussetzt, da sonst größere Konzentrationen noch nicht ausreagiert haben, wenn kleinere längst zu Ende sind.

*Neuere Form*⁸²: Die neuere Form sieht daher die Flecken nicht rundlich, sondern als Streifen oder Banden vor. Hiermit werden bessere Ergebnisse erzielt.

REICHL und LÖFFLER⁸³ bauten diese Methode zur sogenannten «Inversen Retention» aus.



Auf einem Streifen Filtrierpapier werden die zu untersuchenden Substanzen, hier organische Säuren, strichförmig aufgetragen. Man chromatographiert mit einem Fließmittelmisch Essigester-Eisessig-Wasser = 70 : 15 : 15. Darauf trocknet man und knickt dann das Chromatogramm zusammen, daß die mit Substanzen beladene Hälfte und die nicht-behandelte Hälfte sich decken. Den Knick taucht man in Diphenyl, darauf die obere Seite in eine Bleiacetatlösung. Der Diphenylstreifen verhindert, daß das Bleiacetat sich auch über die Chromatogrammseite saugt.

Durch Trocknung im Trockenschrank wird das Diphenyl verjagt. Man formt dann zum Zylinder und chromatographiert aufsteigend, indem man senkrecht zur Chromatographie-richtung Aceton-Wasser steigen läßt. Nach dem Trocknen kann man die Flecken mit Silbernitrat-Phenol sichtbar machen, ausschneiden, wägen. ERDEM und PRIJS⁸⁴ benutzten die WIELANDSche Retentionschromatographie zur quantitativen Erfassung von Cu²⁺ mit Hilfe eines Komplexbildners im Fließmittel.

Fließmittel: Tetrahydrofuran/Wasser = 90 : 10 + 0,1% Leucin oder: Dioxan/Wasser = 70 : 30 + 0,1% Leucin oder: Tetrahydrofuran/Isopropylalkohol/Wasser = 10 : 70 : 20. Die Sichtbarmachung der Aminosäurefront geschah mit Ninhydrin. Diese Front lag natürlicherweise unterhalb der Fließmittelfront und zeigte Einbuchtungen, in denen sich das Cu quantitativ befand.

Bei angewandten Mengen von 6 bzw. 12 Mikrogramm Kupferacetat erhielten sie 2 bzw. 4 cm² Frontlücken.

XVIII. Präparative Papierchromatographie

Den Übergang von den in der Papierchromatographie erfaßten Gammamengen bzw. Mengen bis zu Milligrammen im Kreischromatogramm bis zu den relativ großen Mengen der Cellulosesäule gestattet zunächst einmal die Anwendung dickerer Papiere und Kartons sowie auf diesen das Auftragen in Banden. Während die normalen Papiere durchweg 80 bis 90 g, 120 g, 140 bis 150 g, im Höchstfall etwa 180 g Flächengewicht haben, beginnt der Karton bei etwa 200 g. Dicke und Flächengewicht werden so groß, daß naturgemäß das Erzeugnis nicht mehr so flexibel sein kann.

Die in der Papierchromatographie üblichen Kartons haben Flächengewichte von 600 bis etwa 800 g. Ein handgearbeiteter Karton vom Flächengewicht 2,5 kg wird von Schleicher & Schüll hergestellt und von einzelnen Laboratorien routinemäßig zu Untersuchungen benutzt.

Sorte	Oberfläche	Gewicht g/m ²	Dicke mm	Saughöhe mm
2071	M	630-680	0,65 bis 0,70	65-75
2230	M	700-750	0,88 bis 0,93	160-170
2181	M	2400-2500	3,6 bis 4,2	90-110
2453b	M	155-165		

Das Auftragen auf diesem Karton ist eine Sache der Erfahrung.

Es geschieht am besten so, daß man auf einer Startlinie mehrere Male vorn und hinten Tropfen so auf Tropfen setzt, daß die Peripherie des nächsten auf dem Zentrum des ersten aufsitzt. Auch kann man durch Bohrung dünnere kreisrunde Stellen erzeugen und in diese die Substanz hineingeben. Mit Hilfe dieses Kartons gelang es z. B. WEYGAND, einige mg Folsäure zu isolieren⁸⁵.

Oft natürlich genügen diese Trennmöglichkeiten noch nicht, wenn relativ große Mengen zur Trennung gelangen und die im Papierchromatogramm gewonnenen Erfahrungen auf größere Mengen übertragen werden sollen.

Interessante Kombinationen von kleiner Säule und Rundfilterchromatogramm zeigten verschiedene Autoren.

Die Säule wird dabei zur Vortrennung und einer gewissen Vorreinigung benutzt.

SCHWERTFEGER⁸⁶ benutzte ein kleines Glasrohr mit Watte, das innerhalb eines Exsikkators in dem Vorratsgefäß mit Fließmittel steht, während das Rundfilter zwischen Deckel und Unterteil des Exsikkators liegt. Eine Glaskapillare leitet das Fließmittel zu. Die Substanz ist im Watterohr eingebettet.

ERBRING und PATT⁸⁷ benutzen ein TSWETT-Röhrchen vom Ausmaß 10 × 200 mm, in das sie das zu analysierende Gemisch (Drogenpulver) zugleich mit Cellulosepulver einfüllen. Durch die Säule mittels eines Tropftrichters tropft das Fließmittel. Das Ganze ist mit einem oder mehreren Rundfiltern kombiniert. Es lassen sich bei flüssigen Untersuchungsmaterialien 2 ml, bei festen Substanzen bis zu 2 g trennen.

TÖPPEL⁸⁸ arbeitet ähnlich. Auch hier wird die zu untersuchende Substanz zusammen mit Cellulosepulver in ein Röhrchen gefüllt, das auf dem Zentrum des Rundfilters sitzt. Die

Wanderungsgeschwindigkeit wird bestimmt durch Röhrchenausmaße, Stopfdichte und Stopfhöhe. Der Durchmesser ist ist am besten 3 bis 4 mm. Höhe des Cellulosepulvers etwa 5 bis 10 mm. Das Röhrchen sitzt mit Hilfe eines durchbohrten Stopfens im Deckeltubus des Exsikkators.

BROCKMANN⁸⁹ benutzte einen Papierpack von 60 Schichten d. h. 15 zweimal rechtwinklig gefaltete Bogen 2043b, die in der Mitte zusammengepreßt und mit Pufferlösung durch eine im Deckel des Exsikkator-tubus befindliche Pipette getränkt wurden. Der Exsikkatordeckel liegt auf einer Kristallisierschale, in der der Papierpack auf einem Porzellan-Wasserbadring ruht. BROCKMANN und PATT trennten so Rhodomycin A und B.

GIRI und PARIHAR⁹⁰ zeigten ein gänzlich neues Verfahren, und zwar ein Durchflußchromatogramm mit Hilfe eines an den Rändern ausgezackten Rundfilterpacks von 4 bis 5 Filtern Whatman 3 vom Durchmesser 31,5 cm. Die zu analysierende Substanz wurde in der Mitte aufgesetzt. Die Rundfilter waren ausgezackt, das Ganze saß auf einem Trichter auf.

Der Apparat bestand aus: 2 Rundscheiben aus Glas A und B, 7 bis 8 mm dick, 28 cm im Durchmesser. In Scheibe A befand sich ein Zentrumsloch von 3,2 cm Durchmesser.

Der Papierpack wird vorher in einer der üblichen Arten entwickelt, erhält dann ebenfalls das Zentrumsloch vom Durchmesser 3,2 cm und wird zwischen die Glasscheiben gelegt und durch vier Klammern mit diesen zusammengedrückt. Das Ganze liegt auf dem Trichter so auf, daß die Zacken innen anliegen. Durch Auftropfen des Lösungsmittels eluiert man und fängt die Eluate in Röhrchen auf.

Diese Methoden leiten über zu den bereits früh in der Literatur beschriebenen Kombinationen von einzelnen Rundfiltern und Streifen, die allgemein als *Chromatopack*⁹¹ und *Chromatopile* bekannt sind⁹².

Beide haben Anwendung gefunden, sind jedoch kaum je Allgemeingut geworden. Ihre Beschaffenheit ist allgemein bekannt: Durch Klammern zusammengepreßte Stapel von Rundfiltern oder Packs von Papierstreifen, wobei die Schwierigkeit darin besteht, den Druck so gleichmäßig zu gestalten, daß das Ganze praktisch ein einheitlicher Block ist (250 Rundfilter, 10 davon beschickt). Der Chromatopile kann angepinselt werden mit einem Reagens, so daß man sieht, wo die Zonen sitzen.

Chromatopack: Man kann einen Streifen entwickeln und so die Lage der Substanzen auf allen Streifen ermitteln. Eine Möglichkeit, eine große Anzahl von Chromatogrammen gleichzeitig laufen zu lassen, bietet auch der Spannrahmen, der eine Anzahl von Chromatogrammen mit Abständen dazwischen aufnehmen kann und alle in ein gemeinsames Bad taucht.

Eine gänzlich neue Methode bot die schwedische Firma LKB-Produkte⁹³.

Ein Kunststoffkern, auf dem eine feste Rolle eines weichen Filtrierpapiers aufgerollt ist. Das Ganze in einer geeigneten Chromatographieapparatur, die das Auftropfen der zu trennenden Substanzen und des reinen Lösungsmittels ermöglicht und den Ablauf der Fraktionen. Der allgemeinen Einführung steht der sehr hohe Preis von etwa 180 DM für die Papiersäule entgegen und die Tatsache, daß sie nur einmal brauchbar ist.

Die zweifellos größte Verbreitung hat im Verlauf der Jahre die Säule mit *Papierpulver* gefunden, wobei letzterer Ausdruck bewußt gewählt wurde, da nicht immer

nur Cellulosepulver eingefüllt wird, sondern auch modifizierte Cellulosen.

Als Säule dienen Rohre in den verschiedensten Abmessungen, je nach Umfang der beabsichtigten Arbeit, von ganz kleinen Abmessungen (etwa 2 × 30 mm) bis zu sehr großen Säulen von 1 m Länge und darüber.

Das Bemantelungsmaterial ist meistens Glas, hier und da auch Polyvinylchlorid oder Polyäthylen. Bei letzterem ist gelegentlich eine Instabilität des Rohrmaterials gegenüber gewissen Fließmittelkombinationen möglich.

Das Glasrohr kann durch Schilfe in Einzelelemente unterteilt sein.

Das Chromatographierohr ist fast immer mit dem Fraktionssammler verbunden, da man in den meisten Fällen ein sogenanntes «flüssiges Chromatogramm» statt des mühsamen Ausstoßens des Inhaltes und Zerschneiden in Zonen vorziehen wird. Man fängt eine Anzahl gleich großer Abläufe auf und arbeitet diese auf ihren Inhalt auf.

Pulvermaterial für die Säule: Im Interesse einer möglichst gleichmäßigen Einfüllbarkeit wird man ein Pulver vorziehen, das mehlig-grießlich ist und praktisch keine Fasereigenschaften mehr zeigt. Diese Forderung wird durch das Cellulosepulver Nr. 123 von Schleicher & Schüll – im säuregewaschenen Zustand Nr. 123a – praktisch erfüllt.

Die Einfüllung geschieht auf trockenem und auf nassem Wege. Letzterer bedeutet zugleich eine gewisse Reinigung des Pulvers, da in organischen Lösungsmitteln lösliche Extraktivstoffe praktisch immer vorhanden sind. Die Trockeneinfüllung kann mit Hilfe des Vibrators erfolgen, auch kann durch festes Stampfen mit einem Holzpestill, das u. U. zum Durchlassen der Luft durchlöchert ist, die Säule gepackt werden.

Nach TURBA⁹⁴ schlämmt man bei kleinen Säulen am besten ein, bei großen füllt man trocken. Allgemeine Regeln lassen sich jedoch nicht aufstellen.

Als Füllmaterial gibt es auch ein etwas gröberes Linterspulver Nr. 124, das in seinen Daten nahe dem Whatman-Standard-Grade liegt.

Die Literatur erwähnt weiterhin Füllungen mit Oxy-cellulose, also durch Oxydation künstlich hergestellte Carboxylcellulose, Hydrocellulose und in neuester Zeit eine Reihe amerikanischer Erzeugnisse, über die kurz berichtet sei: SOBER und PETERSON⁹⁵ stellten modifizierte Cellulosepulver her, wobei sie als Rohstoff zuerst Whatman-Standard-Grade-Pulver, also ein Linters-Erzeugnis, benutzten, später gingen sie auf Holzzellstoffpulver über, nämlich das «Polycel», und, als dieses wegen Aufgabe der Fabrikation nicht mehr greifbar war, auf die Pulver der Solca-Floc-Gesellschaft, besonders das Pulver BW 200. Es ist erklärlich, daß die Holzzellstoffe leichter angreifbar waren als die Linterspulver.

In einer älteren Publikation⁹⁵ stellten sie ionenaustauschende Cellulosen her, und zwar:

1. einen Kationenaustauscher durch Behandlung der Cellulose zunächst mit Alkali und Reifenlassen des Produktes. Aus der entstandenen Alkalicellulose gewannen sie durch Umsatz mit Trichloressigsäure einen carboxylhaltigen Kationenaustauscher, von ihnen CM-Cellulose benannt.

2. Alkalicellulose mit 2-Chlor-N,N-diäthyläthylamin behandelt, ergab einen Anionenaustauscher, von ihnen DEAE-Polycel benannt.

Mit Hilfe dieser Pulver in der Säule und einem sauren Phosphatpuffer vom pH 6,5 als Fließmittel analysierten sie wäßrige Organextrakte.

Das Jahr 1956⁹⁶ brachte eine Weiterführung und Ergänzung dieser Arbeiten sowie eine Ausweitung auf das Gebiet der Proteinchemie.

Diese Weiterführung geschah vor allem aus dem Gesichtspunkt heraus, weil die höher substituierten Pulver zu leicht gelatinös wurden und dann schlechte Resultate ergaben.

Es wurden folgende Erzeugnisse hergestellt:

1. Anionenaustauscher:

DEAE SF aus verschiedenen Solca-Floc-Rohstoffen,
DEAE Polycel aus Polycel-Cellulose,
ECTEO LA SF aus Cellulosepulver Solca Floc.

2. Kationenaustauscher:

CMW aus Whatman-Pulver,
CMSF aus Solca-Floc-BW,
PW aus Whatman-Pulver.

Herstellung:

DEAE SF aus Alkalicellulose + 2-Chlortriäthylaminhydrochlorid,
ECTEO LA SF aus Alkalicellulose + Epichlorhydrin + Triäthanolamin,
CMW aus Alkalicellulose + Chloressigsäure,
PW aus Alkalicellulose + Phosphoroxychlorid.

Mit Hilfe der Säule und eines Fraktionssammlers sowie oben beschriebener Pulver gelangen ihnen Seruntrennungen. Drei verschiedene Seren wurden analysiert: ein Pferdeserum, ein menschliches Serum mit Thrombinzusatz und ein zweites menschliches Serum ohne Thrombinzusatz.

Beide Humanseren stammten von je drei Spendern.

Das komplexe Proteingemisch konnte bereits in einem Tag in einzelne Gruppen aufgetrennt werden, eine genauere Analyse dauerte 8 bis 9 Tage. Sie lieferte sehr verdünnte Fraktionen. Die γ -Globuline konnten vom Gesamtserum abgetrennt werden in elektrophoretisch homogene Fraktionen, die bei pH 8,6 verschieden schnell wanderten. Hierin geht das Verfahren also über die Elektrophorese hinaus. Das Albumin fand sich über die Hälfte des Serumchromatogramms verteilt, was wohl vor allem darauf zurückzuführen ist, daß sicher mindestens drei verschiedene Albumine vorlagen. Nach den Autoren ist anzunehmen, daß die Methode zur Trennung auch anderer Proteingemische brauchbar ist.

Angewandte Mengen bei der Säulenchromatographie

Die zu verarbeitenden Mengen werden sich naturgemäß weitgehend nach der Größe der Säulen und nach der Leistungsfähigkeit des Pulvers richten, d. h. nach

seiner mehr oder weniger schnellen Verschleimung bzw. Verquellung. Nicht immer ist es möglich, die Erfahrungen des Papierchromatogramms sofort auf die Säule zu übertragen. Das liegt sicherlich größtenteils daran, daß im ersten Falle eine Faser mit größerer oder geringerer Fibrillierung vorliegt, im letzteren ein Pulver praktisch ohne Faserstruktur, also ohne Längsausdehnung.

Vielleicht spielt auch das verschiedene Verhältnis Träger-Fließmittel-Substanzmenge eine Rolle.

Literatur

- ¹ R. CONSDEN, A.H. GORDON und A.I.P. MARTIN, *Biochem. J.* 38 (1944) 224.
- ² H. WEIL und T. J. WILLIAMS, *Naturwiss.* 40 (1953) 1.
- ³ F. F. RUNGE, *Zur Farbenchemie*. Musterbilder für Freunde des Schönen und zum Gebrauch für Zeichner, Maler, Verzieherer, und Zeugdrucker, Berlin 1850. *Der Bildungstrieb der Stoffe*. Veranschaulicht in selbständig gewachsenen Bildern. Oranienburg 1855.
- ⁴ *Farbenchemie*, 1. Teil: Die Kunst zu färben, gegründet auf das chemische Verhalten der Baumwollfaser zu den Salzen und Säuren. Lehrbuch der praktischen Baumwollfärberei. 1834. 2. Teil 1842. 3. Teil 1850.
- ⁵ *Das Chemische Wappen*. Zum hundertjährigen Gedächtnis von F.F. RUNGES *Bildungstrieb der Stoffe*, Dassel 1955.
- ⁶ CHR. F. SCHOENBEIN, *Verh. Naturf. Ges. Basel* 4 (1865) 224, 3 (1861) 249.
- ⁷ FR. GOPPELSROEDER, *Über Capillaranalyse und ihre verschiedenen Anwendungen, sowie über das Emporsteigen der Farbstoffe in den Pflanzen*, Wien 1901. – *Studien über die Anwendung der Capillaranalyse*. I. Bei Harnuntersuchungen. II. Bei vitalen Tinktionsversuchen. Basel 1904. – *Anregung zum Studium der auf Capillaritäts- und Adsorptionerscheinungen beruhenden Capillaranalyse*, Basel 1906. – *Capillaranalyse*. Beruhend auf Capillaritäts- und Adsorptionerscheinungen mit dem Schlußkapitel: Das Emporsteigen der Farbstoffe in den Pflanzen. Basel 1901. – Weitere Angaben siehe *Verzeichnis der Publikationen von Prof. Dr. Fr. Goppelsroeder 1861–1911*. Basel 1912.
- ⁸ H. PLATZ, *Über Kapillaranalyse und ihre Anwendung im pharmazeutischen Laboratorium*, Verlag Dr. Willmar Schwabe, Leipzig 1922.
- ⁹ H. NEUGEBAUER, *Die Kapillar-Lumineszenzanalyse im pharmazeutischen Laboratorium*, Verlag Dr. Willmar Schwabe, Leipzig 1933.
- ¹⁰ DR. WILLMAR SCHWABE, *Homöopathisches Arzneibuch*, Selbstverlag, Berlin 1950.
- ¹¹ R. E. LIESEGANG, *Kolloidchemische Technologie*, Dresden und Leipzig 1927. Kreuzkapillaranalyse, in *Naturwiss.* 1943, 348. Kreuzkapillaranalyse, in *Kolloidchemische Technologie*, S. 209.
- ¹² G. SOMMER, *Z. anal. Chem.* 147 (1955) 241. L. GRAIG und O. POST, *Anal. Chem.* 22 (1950) 1346. P. DECKER und W. RIFFART, *Chem.-Ztg.* 74 (1950) 273.
- ¹³ M. MILONE, G. CETINI und B. RICCA, *Ann. Chim.* 43 (1953) 652.
- ¹⁴ F. CRAMER, *Papierchromatographie*, 2. Auflage, Verlag Chemie, Weinheim 1953.
- ¹⁵ E. TERRES und Mitarbeiter, *Brennstoffchemie* 1955, 78.
- ¹⁶ F. TURBA, *Chromatographische Methoden in der Proteinchemie*, S. 24, Springer-Verlag, Berlin/Göttingen/Heidelberg 1954.
- ¹⁷ J.B. SCHUTE, in H. BRÄUNIGER, *Grundlagen und allgemeine Fragen der Papierchromatographie*, S. 10, Berlin 1955.
- ¹⁸ V. RABEK, *Naturwiss.* 42 (1955) 581.
- ¹⁹ CH. WUNDERLY, *Nature* 173 (1954) 267.
- ²⁰ C. SCHLEICHER & SCHÜLL, Dassel, *Literaturzusammenstellungen I bis V* (1946 bis 1955). Selbstverlag.
- ²¹ G. DITTMAR, in *Ullmanns Encyklopädie der technischen Chemie*, Bd. 7, S. 211, Urban & Schwarzenberg, München/Berlin 1956.
- ²² *Biochemisches Taschenbuch*, herausgegeben von H. M. RAUEN, Springer-Verlag, Berlin/Göttingen/Heidelberg 1956.
- ²³ P. DECKER und W. RIFFART, *Chem.-Ztg.* 74 (1950) 273.
- ²⁴ H. THALER und G. SOMMER, *Z. Lebensmittel-Unters. Forsch.* 97 (1953) 345.
- ²⁵ *Methoden der organischen Chemie*, Bd. I, 1. Teil, Abschnitt Papierchromatographie, von TH. WIELAND, modifiziert.
- ²⁶ L. B. ROCKLAND und M. S. DUNN, *Science* 109 (1949) 539.
- ²⁷ G. SOMMER, *Z. anal. Chem.* 147 (1955) 241.
- ²⁸ G. ZIMMERMANN, *Z. anal. Chem.* 138 (1953) 321.

- ²⁹ J. DE WAEL und R. DIAZ CADAVIECO, *Recu. Trav. Chim. Pays-Bas* 73 (1954) 333.
- ³⁰ S.N. TEWARI, *Naturwiss.* 41 (1954) 229.
- ³¹ A. GRÜNE, *Allg. Papierrdsch.* 1956, 677, 716.
- ³² L. HORNER, W. EMRICH und A. KIRSCHNER, *Z. Elektrochem.* 56 (1952) 987.
- ³³ A. GRÜNE, *Über chromatographische und elektroforetische Filtrierpapiere*, C. Schleicher & Schüll, Dassel, Selbstverlag.
- ³⁴ H.G. CASSIDY, *Anal. Chem.* 24 (1952) 1415.
- ³⁵ K.H. MEYER und H. MARCK, *Makromolekulare Chemie*, Leipzig 1950.
- ³⁶ V. WYNN, *Nature* 164 (1949) 445.
- ³⁷ M.S. CATLETT, M.S.R. GIUFFRIA, A.T. MOORE und M.L. ROLLINS, *Textile Res.* 21 (1951) 880.
- ³⁸ C. W. HUFFMAN, P. A. REBERS, D. R. SPIESTERSBACH und F. SMITH, *Nature* 175 (1955) 990.
- ³⁹ G.A. ADAMS und C.T. BISHOP, *Tappi* 38 (1955) 672.
- ⁴⁰ A. HATANO und H. SOBUE, *Chem. Abstr.* 1955, 2065.
- ⁴¹ H.W. GIERTZ, *Proc. Techn. Sect., Brit. Paper Board Maker's Assoc.* 33 (1952) 487.
- ⁴² C.E. DENT, *Biochem. J.* 43 (1948) 169.
- ⁴³ A. STÖCKLI, *Helv. Chim. Acta* 37 (1954) 1581.
- ⁴⁴ P. DECKER, W. RIFFART, G. OBERNEDER, *Naturwiss.* 38 (1951) 288.
- ⁴⁵ F. REINDEL und W. HOPPE, *Naturwiss.* 40 (1953) 245.
- ⁴⁶ W. MATTHIAS, *Naturwiss.* 41 (1954) 17.
- ⁴⁷ E. SCHWERTFEGGER, *Naturwiss.* 41 (1954) 18.
- ⁴⁸ P. SAVARY, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 36 (1954) 927.
- ⁴⁹ I.A. BROWN, *Anal. Chim.* 25 (1953) 774.
- ⁵⁰ O. KNESSL und A. VLASTIBOROVA, *Chem. Listy* 48 (1954) 212, Referat: *Z. anal. Chem.* 146 (1955) 203.
- ⁵¹ H.P. KAUFMANN und W.H. NITSCH, *Fette, Seifen, Anstrichmittel* 56 (1954) 154.
- ⁵² W. GRUCH, *Naturwiss.* 41 (1954) 39.
- ⁵³ K. RÖTH, *Fette, Seifen, Anstrichmittel* 57 (1955) 885.
- ⁵⁴ D. KRITCHEVSKY und M. CALVIN, *J. Amer. Chem. Soc.* 72 (1950) 4330.
- ⁵⁵ F. MICHEEL und H. SCHWEPPE, *Microchim. Acta* 1954, 53. R. I. BOSCOFF, *Nature* 159 (1947) 342. H.S. BURTON, *Chem. Ind.* 1953, 1229.
- ⁵⁶ J. ZIJF, *Chem. Weekbl.* 1955, 547.
- ⁵⁷ F. MICHEEL und P. ALBERS, *Microchim. Acta* 1954, 489.
- ⁵⁸ N.F. KEMBER und R.A. WELLS, *Nature* 175 (1955) 512.
- ⁵⁹ W. LAUTSCH, G. MANECKE und W. BROSER, *Z. Naturforsch.* 8B (1953) 232.
- ⁶⁰ M. LEDERER, *Anal. Chim. Acta* 12 (1955) 142.
- ⁶¹ TH. WIELAND, *Angew. Chem.* 64 (1952) 418.
- ⁶² U. STRÖLE, *Z. anal. Chem.* 144 (1955) 256.
- ⁶³ J. B. JEPSON und I. SMITH, *Nature* 172 (1953) 1100. Referat: *Z. anal. Chem.* 144 (1955) 118.
- ⁶⁴ J.N. BALSTON und B.E. TALBOT, *A Guide to Filter Paper and Cellulose Powder Chromatography*, London 1952.
- ⁶⁵ D.M.P. PHILLIPS, *Nature* 162 (1948) 29.
- ⁶⁶ D. JERCHEL und W. JACOBS, *Angew. Chem.* 66 (1954) 298.
- ⁶⁷ A.I.P. MARTIN, *Biochem. Soc. Symposia* 3 (1949) 4.
- ⁶⁸ E.C. BATE-SMITH und R.C. WESTALL, *Biochim. Biophys. Acta* 4 (1950) 427.
- ⁶⁹ M.A. JERMYN und F.A. ISHERWOOD, *Biochem. J.* 48 (1951) 515.
- ⁷⁰ A.B. PARDEE, *J. Biol. Chem.* 190 (1951) 757.
- ⁷¹ J.M. BREMNER und R.H. KENTEN, *Biochem. J.* 49 (1951) 651.
- ⁷² A. POLSON, *Biochim. Biophys. Acta* 3 (1949) 205. M. JUTISZ, *Bull. Soc. Chim. France* 19 (1952) 822.
- ⁷³ J. BERTETTI, *Ann. Chim.* 44 (1954) 313, 351, 495.
- ⁷⁴ E.R. REICHL, *Angew. Chem.* 67 (1955) 726; *Mh. Chem.* 86 (1955) 69.
- ⁷⁵ H.K. SCHAUER, R. BULIRSCH und P. DECKER, *Naturwiss.* 42 (1955) 626.
- ⁷⁶ A. POLSON, *Biochim. Biophys. Acta* 2 (1948) 575.
- ⁷⁷ H.K. BERRY und L. CAIN, *Arch. Biochem.* 24 (1949) 179.
- ⁷⁸ C.E. DENT, *Biochem. J.* 43 (1948) 169.
- ⁷⁹ H.D. FOWLER, *Nature* 168 (1951) 1123.
- ⁸⁰ R.B. FISHER, D.S. PARSONS und G.A. MORRISON, *Nature* 161 (1948) 764. R.B. FISHER, D.S. PARSONS und R. HOLMES, *Nature* 164 (1949) 183.
- ⁸¹ TH. WIELAND, *Angew. Chem.* 60 (1948) 250.
- ⁸² TH. WIELAND und L. WIRTH, *Angew. Chem.* 63 (1951) 171.
- ⁸³ E.R. REICHL und J.B. LÖFFLER, *Microchim. Acta* 1954, 226.
- ⁸⁴ B. ERDEM, B. PRIJS, H. ERLENMEYER und H. SEILER, *Helv.*

Chim. Acta 38 (1955) 267, 39 (1956) 1218, 1232.

- ⁸⁵ F. WEYGAND und G. SCHAEFER, *Chem. Ber.* 85 (1952) 307.
- ⁸⁶ E. SCHWERTFEGGER, *Naturwiss.* 40 (1953) 201.
- ⁸⁷ H. ERBRING und P. PATT, *Naturwiss.* 41 (1954) 216.
- ⁸⁸ O. TÖPPEL, *Angew. Chem.* 66 (1954) 555.
- ⁸⁹ H. BROCKMANN und P. PATT, *Naturwiss.* 40 (1953) 222.
- ⁹⁰ K.V. GIRI und D.B. PARIHAR, *Nature* 175 (1955) 304.
- ⁹¹ W.L. PORTER, *Anal. Chem.* 23 (1951) 412.
- ⁹² H.K. MITCHELL und F.A. HASKINS, *Science* 110 (1949) 278.
- ⁹³ L. HAGDAHL, C.E. DANIELSON, *Nature* 174 (1954) 1062.
- ⁹⁴ F. TURBA, *Chromatographische Methoden in der Proteinchemie*, S. 42, Springer-Verlag, Berlin/Göttingen/Heidelberg 1954.
- ⁹⁵ H.A. SOBER und E.A. PETERSON, *J. Amer. Chem. Soc.* 1954, 1711.
- ⁹⁶ H.A. SOBER und E.A. PETERSON, *J. Amer. Chem. Soc.* 1956, 751.

XIX. Papierelektrophorese

A. Geschichtliches

Entgegen der allgemein verbreiteten Meinung, daß die Papierelektrophorese eine später ausgearbeitete Abart der Papierchromatographie sei, sind die ersten Angaben über die Wanderung von Stoffen in Elektrolytlösungen mit Filtrierpapier als Trägersubstanz bereits im Jahre 1937 von KÖNIG¹ (portugiesische Publikation) und im Jahre 1939 von KÖNIG und GLOBUSITZKY¹ (siehe WUNDERLY) gemacht worden. In diesen Arbeiten wurde ein Gelbpigment aus Schlangengift isoliert, jedoch wurde die Arbeit relativ wenig beachtet.

1948 erschienen erstmalig neuere Arbeiten auf dem Gebiet der Papierelektrophorese, und das Gebiet wurde praktisch in mehreren Laboratorien unabhängig voneinander wieder entdeckt (HAUGAARD und KRONER 1948², WIELAND 1948³, DURRUM 1949, GARRISON 1949).

Ab 1950 datiert die quantitative Auswertung der Papierelektrophorese, wenn man von den ersten Versuchen WIELANDS absehen will, papierelektrophoretisch getrennte Substanzen durch retentiometrische Bestimmung zu erfassen (1948)⁴. 1950 publizierten CREMER und TISELIUS⁵, TURBA und ENENKEL⁶, GRASSMANN und HANNIG⁷ sowie DURRUM⁸ die quantitative Auswertung papierelektrophoretisch getrennter Proteine, erstere mit Hilfe der Elutionstechnik, letztere durch photoelektrische Auswertung eines angefärbten und transparent gemachten Elektrophoresestreifens.

Die Nomenklatur des Verfahrens wurde verschieden gehandhabt. Man spricht heute am besten von einer *Papierelektrophorese*, wenn Wanderung von Kolloidteilchen im elektrischen Feld erfolgt, also vor allem in der Eiweißchemie, von *Ionophorese* bei der Wanderung kleinerer Ionen.

B. Allgemeines

Grundforderung für die Durchführbarkeit einer Papierelektrophorese ist, daß die zu prüfenden bzw. quantitativ zu bestimmenden Substanzen eine elektrische Ladung von Natur aus tragen oder daß diese ihnen durch einfache chemische Umsetzungen ohne Zerstörung der Substanzen zugeteilt werden kann. Es muß also ein Elektronenüberschuß oder ein Elektronenmangel vorliegen.

Es sind also u. a. elektrophoretisch trennbar:

Aminosäuren, Peptide, Proteine,
Zucker als Boratkomplexe,
Farbstoffe,
anorganische Kationen und Anionen,
Alkaloide,
Gerbstoffe,
Phenole,
Carbonsäuren
und noch einige andere Stoffgruppen.

Doch können auch ungeladene Moleküle oder amphotere Substanzen im isoelektrischen Zustand passiv im elektrischen Feld wandern, infolge von Endosmose. Man kann direkt eine Messung der Endosmose auf dieser passiven Wanderung aufbauen.

Nach BLOCK, DURRUM und ZWEIG⁹ sind drei Faktoren bzw. Faktorenarten maßgeblich für den Verlauf eines elektrophoretischen Vorganges:

- a) *Solche, die das Ion selbst angehen*: Vorzeichen und Höhe seiner Ladung, Molekülform, Dissoziationstendenz, amphoterer Charakter, falls vorhanden.
- b) *Solche, die sich auf die Umgebung beziehen*, innerhalb deren das Ion studiert wird, also: Elektrolytkonzentration, Ionenstärke, dielektrische Eigenschaften, chemische Eigenschaften, pH-Wert, Temperatur, Viskosität, Gegenwart unpolare Moleküle, welche Viskosität oder dielektrische Eigenschaften des Elektrolyten beeinflussen können.
- c) *Charakter des angewandten elektrischen Feldes*, Intensität, Reinheit (d. h. Gegenwart von gegenläufigen Komponenten) und Verteilung längs der Wanderstrecke.

Sekundäre gegenseitige Einwirkung der Faktoren 1 und 2, entweder elektrostatisch oder durch VAN DER WAALSsche Kräfte, können weiterhin das experimentelle Geschehen beeinflussen. Elektrosmose, welche mit der elektrophoretischen Wanderung gleichsinnig oder entgegengesetzt gerichtet sein kann, entsteht durch die negative Ladung, welche das Filtrierpapier gegenüber der Pufferlösung annimmt. Da die Ladung des Papiers räumlich fixiert ist und nicht wandern kann, bewegt sich der Puffer kathodisch.

Störend wirkt hier und da die Adsorption des Papiers, über die später noch berichtet sei, die jedoch nach den bisherigen Erfahrungen kaum zu vermeiden ist. Man kann sogar behaupten, daß sie z. B. bei der Proteinelektrophorese des Serums, also bei derart großen Partikeln wie Proteine und dem adsorptionsfähigen Polysaccharid der Papierfaser, noch relativ gering ist.

C. Methoden der Papirelektrophorese

Das Gebiet kann eingeteilt werden in Verfahren und Apparaturen für die *diskontinuierliche* Elektrophorese, bei Normalspannung und bei erhöhter Spannung, und solche für *präparative* oder *kontinuierliche* Verfahren.

Gemeinsam ist allen Verfahren, daß die zu trennenden Substanzen innerhalb eines elektrischen Feldes auf einem Träger wandern, der im vorliegenden Falle immer Filtrierpapier ist, meist aus Baumwollfaser, in einzelnen

Fällen aus anderem Material, im Extremfall auch ein Seidenfaden¹⁰ oder Baumwollfaden sein kann, dann, wenn besonders geringe Stoffmengen zur Trennung gelangen sollen. Auch innerhalb einer Agar- oder Gelatineschicht¹¹ sowie in Stärke auf einer Glasplatte¹² kann man elektrophoretische Trennungen durchführen. Gemeinsam sind ebenfalls die Anwendung von Puffersystemen als Elektrolyt und die Wanderung der Stoffe unter Gleichstrom, der entweder aus einer Reihe von Akkumulatoren stammt oder aus dem Stromnetz, unter Umwandlung des Wechselstroms in Gleichstrom durch eine entsprechende Gleichrichterapparatur.

Die Wanderung geschieht innerhalb einer geschlossenen Kammer aus Glas oder Plexiglas. Die Streifen zwischen den beiden Polen sind entweder horizontal ausgespannt oder hängen zeltförmig über einen Steg. Gelegentlich ist Kühlung während der Elektrophorese vorgesehen, um Erwärmungen während des Stromdurchganges und damit erhöhten Widerstand sowie Störungen der Trennungen zu vermeiden, andere arbeiten mit einem gewissen Verdunstungseffekt, der dadurch begünstigt wird, daß man Filtrierpapier unter den Deckel der Apparatur legt, welches das verdampfende Wasser aufsaugt¹³.

Die Spannung ist meist 110 V, 220 V bis etwa 500 V, die Stromstärke im elektrischen Feld 0,5 bis 1 mA.

In einzelnen Apparaturen schwebt der Filtrierpapierstreifen frei horizontal und ist nur mit Hilfe seines natürlichen Haftvermögens infolge der Befeuchtung mit Pufferlösung an die Wandung des Elektrodenraumes angeklebt, in anderen ist er in der Mitte durch einen Glasstab gestützt, hängt zeltförmig herab und ist mit seinen Enden an einen feuchten Filtrierpapierstreifen angeklebt (bzw. zusätzlich an Haken befestigt), der zugleich für die Zuführung des Puffers aus den Elektrodenkammern sorgt. Ein System hat die Papierstreifen über Nylonfäden¹⁴ liegen, wodurch ein Durchhängen, also die Ausbildung von stärker feuchten Zonen an der tiefsten Stelle und damit Diffusionserscheinungen innerhalb der getrennten Fraktionen, vermieden wird.

Drei verschiedene Typen von Apparaturen seien beschrieben:

- a) GRASSMANN und HANNIG, Horizontalelektrophorese, das Gerät wird durch die Firma Bender & Hobein hergestellt und gehandelt.
- b) Der Elektrophor nach MACHEBŒUF der Firma Pleuger in Brüssel.
- c) Das Spinco-Gerät nach DURRUM der Firma Beckman Instr. GmbH in München.

a) Das Gerät nach GRASSMANN und HANNIG besteht aus einer oder mehreren Kunststoffkammern pro Stromquelle, deren jede einen Innenraum und zwei Elektrodenkammern trägt. Jede von letzteren ist noch in einen äußeren und einen inneren Elektrodenraum unterteilt. Die äußere enthält die Platinelektroden, die innere nimmt die Enden der Papierstreifen auf. Die zwischen den beiden Abteilungen befindliche Öffnung ist durch Glaswolle lose verstopft. Die Filtrierpapierstreifen werden von einer herausnehmbaren Kunststoffbrücke getragen, die Kammern sind durch Glasdeckel verschließbar.

b) Der Electrorheophor besteht aus einer Kammer aus durchsichtigem Plexiglas, die zwei herausnehmbare Elektrodenzellen aufweist, in denen durch Gummischlauchverbindung die Nivellierung des Puffers erreicht werden kann. Die Papierstreifen werden auf Rahmen mit 12 Nylonfäden aufgelegt, die Papierbreite kann bis zu 20 cm gehen, es kann aber auch zweckmäßig in bis zu 10 Streifen unterteilt werden.

c) Das Spincogerät kann 8 Papierstreifen von 30 × 3 cm aufnehmen. Statt dessen jedoch auch einen entsprechend großen Bogen, mit Hilfe dessen zweidimensional getrennt werden kann. Dieses Gerät hat in der Mitte zeltförmig aufgehängte Streifen. Die haubenförmige Kammer besteht aus Plexiglas und hat ein zusammenhängendes Pufferreservoir, das aus zwei Kammern mit Labyrinthsystem besteht.

D. Das Papier

Einzelne Papiersorten haben sich für die Elektrophorese besonders bewährt, z. B. das Papier Whatman 1 sowie Schleicher & Schüll 2043 a. Beide Papiere liegen in den Eigenschaften sehr nahe beieinander. Außerdem für Spezialarbeiten die Papiere OB und 20/150 der Firma Munktell, ebenfalls für Spezialarbeiten die Sorte 2043 b von C. Schleicher & Schüll sowie der Karton 2230 von C. Schleicher & Schüll.

Für routinemäßige Reihenuntersuchungen in den Kliniken benutzt man vor allem die erstgenannten dünneren Papiere von einem Flächengewicht von 80 bis 90 g, wie 2043 a und Whatman 1. Das hat verschiedene Gründe:

1. Ihre geringe Dicke läßt nur wenig Joule-Wärme aufkommen und sorgt für sofortige Ableitung dieser Wärme.
2. Sie sind leichter transparent zu machen als dickere Papiere. Die bei der Papierelektrophorese im Filterpapier auftretenden Haupt- und Nebenerscheinungen sind noch nicht hundertprozentig geklärt.

SLOTTA, BRIL und BALLESTER¹⁵ geben an, daß bei der Papierelektrophorese der Proteine auf jedes Proteinmolekül während der Elektrophorese vier Kräfte einwirken:

1. *Elektroosmotische*, die eine gleichmäßige Wanderung des Puffers und somit Verschiebung des Proteins von der Anode zur Kathode stören können. Sie werden durch den elektrischen Gegensatz zwischen der negativ geladenen Papierfaser und dem positiv geladenen Puffer verursacht. Da die fixierte negative Ladung des Papiers nicht wandern kann, wandert der Puffer kathodisch.

2. *Elektrophoretische*, die je nach Lage des isoelektrischen Punktes für jede Komponente verschieden sind und die Wanderung der Partikeln im elektrischen Feld bewirken.

3. *Der Sog oder die Pufferströmung*, die durch Verdunstung vom Papierstreifen eintritt; sie hat z. B. auf die Wanderung der Proteine einen deutlichen Einfluß und besteht von den Enden nach der Mitte zu. Die Autoren geben auch Zahlen über die Größe der Verdunstung an dem Papierstreifen:

Tab. 13

Stromdichte mA/cm Papierbreite	Verdampfung aus 1 cm ² /Stunde
0	0,12 mg
0,25	0,63 mg
0,25	0,91 mg
0,50	2,57 mg
0,50	3,09 mg
1,00	8,33 mg

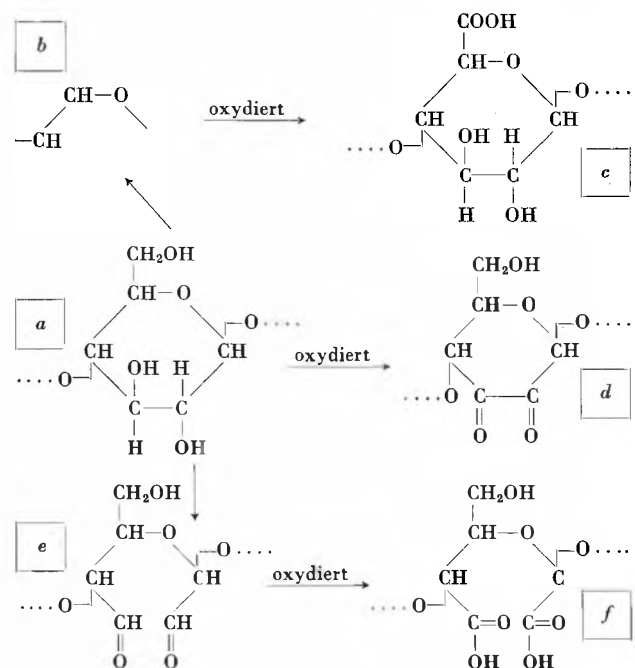
4. *Die Diffusion*, welche die getrennten Banden stark verbreitern kann.

Sog und Elektroosmose können der Elektrophorese parallel gerichtet sein, also die Wanderung begünstigen, meist jedoch verzögern sie die Wanderung. Im sauren Puffer ist die Elektroosmose stark hintangedrängt, entweder durch Absättigung der negativen Ladung des Papiers gegen H-Ionen, wenigstens soweit diese durch den Carboxylgruppengehalt verursacht wird, oder dadurch, daß die Ladung von Papier und Puffer gleichsinnig ist.

Die Entstehung der negativen Ladung im Papier ist insgesamt noch nicht hinreichend geklärt. Vielleicht kann man chemische und physikalische Ursachen dafür verantwortlich machen.

Durch die Erfolge der neueren Celluloseforschung ist uns bekannt, daß Cellulosen bereits im Rohzustand, jedoch immer nach chemischer Aufbereitung, so wie sie die Papierherstellung verlangt, geringe Mengen an Carboxylgruppen tragen, die bei Lintersrohstoffen etwa 1 COOH auf 500 Glucoseeinheiten betragen dürften.

In folgendem Formelschema seien die Oxydationsmöglichkeiten der Faser gezeigt:



Die Behandlung mit Überjodsäure führt zur Oxydationsmöglichkeit *e* und weiterhin zu *f*. Das gleiche findet mit großer Wahrscheinlichkeit bei der Behandlung der Faser mit den in der Papierindustrie üblichen Agenzien statt.

Daneben bestehen noch folgende Möglichkeiten mehr physikalischer Art:

1. Die immer bei Kapillaren zwischen der Kapillarwand und der im Kapillarrinnen befindlichen Flüssigkeit entstehende Ladung mit verschiedenen Vorzeichen.
2. Adsorption negativer Ionen aus der Lösung durch die als Kolloid wirkende wassergequollene Papierfaser.

Ebensowenig konnte bislang die sicherlich teilweise damit verknüpfte Faseradsorption gegenüber den Proteinen, vor allem dem Albumin, hinreichend geklärt werden. Von letzterem bleibt immer ein Teil auf dem Papier liegen und muß bei den Globulinfractionen in Rechnung gestellt werden.

Abgesehen von der durch die negative Ladung des Papiers verursachten Adsorption können u. U. noch andere Faktoren dafür verantwortlich gemacht werden:

1. Bildung einer Art SCHIFFScher Base zwischen den Endaldehydgruppen der Faser und etwaigen Aminogruppen der zu trennenden Stoffe. Bei Proteinen und ihren Bausteinen durchaus möglich¹⁶.
2. Kolloidadsorption an der gequollenen Faser.
3. Bindung durch im Papier vorhandene Verunreinigungen, z. B. Schwermetallionen und freie Fettsäuren.
4. Wasserstoffbrückenbindung mit den OH-Gruppen der Cellulose.

Von uns und verschiedenen Autoren wurden Versuche durchgeführt, Papier so vorzubehandeln, daß die Adsorption vermieden oder zumindest stark reduziert wird.

TISELIUS (1953)¹⁷ veresterte Papier mit Diazomethan, konnte jedoch trotzdem die Adsorption gegenüber Salmin nicht vollständig unterdrücken.

FLODIN¹⁸ veresterte mit 2-Aminoäthylschwefelsäure und erhielt so ionenaustauschende Papiere. Gewisse Proteine, die auf normalem Papier stark adsorbiert wurden, konnten gut getrennt werden bei pH-Werten unter ihrem isoelektrischen Punkt.

JERMYN¹⁹ tränkte Papier mit Überjodsäure und kondensierte die entstandenen Aldehydgruppen mit Hydrazinderivaten.

KALLEE²⁰ tränkte das Papier mit 0,1 bis 0,2% Gelatine, Serumalbumin und Serumglobulin und stellte danach einen Rückgang der Adsorption beim Studium des jodierten Insulins fest.

MICHL²¹ belud die Faser mit fein verteilten Pigmenten: BaSO₄, SrSO₄, ZnO, Fe(OH)₃, MgO, TiO₂. Er konnte keinen Rückgang der Faseradsorption feststellen, eine Beobachtung, die wir aus eigenen, unabhängig davon vorgenommenen Versuchen bestätigen können.

Auch auf mit Farbstoffen getränkten Papieren wurde von mehreren Autoren die Wanderung der Serumproteine studiert.

Wir selbst ließen dem Papier in einer Versuchsreihe folgende Behandlungen angeheißen:

1. Veresterung der Carboxylgruppen durch Diazomethan, d. h. das Diactin der Firma Riedel de Haën.
2. Bindung der Aldehydgruppen durch Formamid,

3. Extraktion des Papiers mit Äther zur Entfernung eventueller freier Fettsäuren,
4. Wäsche mit Säuren zur Entfernung von Schwermetallionen,
5. Wäsche mit Äthylendiamintetraessigsäure zur komplexen Bindung obiger Ionen,
6. Anacetylierung zur Blockierung der OH-Gruppen der Cellulose.

Im Falle der Blockierung der CHO-Gruppen konnten wir zwar einen starken Rückgang der Kupferzahl, d. h. der Reduktion von FEHLINGScher Lösung zu Cu₂O, beobachten, eine Verminderung der Adsorption konnte jedoch nicht festgestellt werden. Am günstigsten wirkte sich die Entfernung bzw. Bindung der Metallionen aus.

Hier und da wurden abwegige Papiere zur Papier-electrophorese herangezogen:

1. *Acetyliertes Papier*.
2. *PVC-Papier in Form des Selecta Rhovyl* von Schleicher & Schüll. Vor allem zur Trennung der Glucoproteide des Serums. Die Ergebnisse waren bislang noch nicht sehr günstig, vielleicht weil die Wanderung nur an der Oberfläche erfolgt. Der bei der Cellulosefaser infolge ihres lockeren Baues relativ lange Wanderungsweg ist hier wahrscheinlich bei der glatten Faser zu kurz. Recht gute Ergebnisse zeigten sich dagegen bei der kontinuierlichen Elektrophorese²².
3. *Glasfaserpapier*: BRIGGS, GARNER und SMITH²³ trennten Kohlehydrate in Boratpuffer bei 600 V in ½ bis 3 Stunden. Das Glaspapier wurde zwischen Polythenplatten gehalten; es lag auf einer Schaumgummiunterlage. Das Ganze wurde zwischen Glasplatten durch Holzklammern zusammengehalten. Bei Proteinen wurde die obere Platte durch eine solche ersetzt, auf der eine Schale aus Pyrexglas befestigt war. Damit war die Möglichkeit zum Durchfließen von kaltem Wasser und damit eine Kühlung möglich. – Aus Schweden wurde uns mitgeteilt, daß bei der Elektrophorese eines sehr empfindlichen Enzyms die Adsorption bei Glasfaserpapier der Produktion Schleicher & Schüll sehr viel niedriger war als bei Baumwoll- bzw. Cellulosepapier. Bei der Papierchromatographie fand überhaupt keine Adsorption statt. Der überschüssige Farbstoff ließ sich leicht wieder auswaschen²⁴.

Die Anwendung anderer als Cellulosepapiere ist vor allem bei der Bestimmung der Glucoproteide erwünscht, da die Überjodsäure-Oxydation bei der Identifizierung auch die Papierfaser zur Oxydation bringt und daher der Untergrund ebenfalls stark rosa gefärbt wird.

E. Auftragen des Serums

Auf den mit dem Puffer befeuchteten Papierstreifen bei dem man zweckmäßigerweise die Auftragslinie wieder etwas abtrocknet, um Diffusionen zu vermeiden. Man trägt nicht ganz bis zur Kante auf, um Diffusionserscheinungen an der Papierkante zu vermeiden. Am besten hält man einen Abstand von 5 mm zur Papierkante.

Man trägt meist 0,01 ml auf mit Hilfe einer Mikropipette oder beim Spincogerät mit Hilfe eines Spezialauftragsstempels, der geschützt ist.

Bei Benutzung größerer Volumina kann man nicht mehr durch Extinktionsmessung auf dem Papier, sondern nur durch Elution quantitativ bestimmen.

F. Pufferlösungen

Man variiert den pH-Wert und damit die Zusammensetzung je nach Natur der zu trennenden Stoffe.

Einige sind in folgender Tabelle zusammengestellt:

Tab. 14. Pufferlösungen²⁵

Für Serumproteine:

1. Barbituratpuffer, pH = 8,6, Ionenstärke = 0,05
1,84 g Diäthylbarbitursäure
10,3 g Natriumbarbiturat
2. Barbituratpuffer, pH = 8,6, Ionenstärke = 0,075
2,76 g Diäthylbarbitursäure
14,45 g Natriumbarbiturat
3. Boratpuffer, pH = 8,6
8,8 g Natriumborat
4,65 g Borsäure
4. Boratpuffer, pH = 9
7,63 g Natriumborat
0,62 g Borsäure
5. Phosphatpuffer, pH = 7,4
0,6 g Mononatriumphosphat-Monohydrat
2,2 g Dinatriumphosphat, wasserfrei

Für Aminosäuren:

- Phtalatpuffer pH = 5,9
5,10 g saures Kaliumphthalat
0,86 g NaOH

Für Zucker:

- CLARKS Boratpuffer, pH = 10

Für Fibrinogene aus Plasma:

- Phosphatpuffer, pH = 9,2

G. Dauer der Elektrophorese

Je nach Trennbarkeit und Wanderungsweg der Stoffe im elektrischen Feld verschieden. Bei Serumproteinen und Normalspannung meist bis 12 Stunden.

H. Quantitative Auswertung

Man nimmt nach der angemessenen Zeit die Streifen heraus, trocknet sie, meist 30 min bei 110 bis 120 °C oder unter der Infrarotlampe und färbt an. Färbungen für klinische Elektrophorese sind in Tab. 15 zusammengestellt.

Einige Autoren empfehlen für die bei Serumproteinen meist angewandte GRASSMANN-HANNIGSche Amidoschwarz-10 B-Färbung, eine Abänderung der Färbung, um starke Färbung des Untergrundes zu vermeiden. Nach Z. PUCAR²⁶ trocknet man den Papierstreifen bei 105 °C, rollt die Streifen zu je vier spiralenförmig zusammen und kocht sie 2 bis 3 min im bedeckten 250-ml-Becherglas in absolutem Methanol auf dem Wasserbad. Darauf legt man bei etwa 80 °C 4 min in die Farblösung. Zur besseren Sättigung läßt man noch einige Minuten auf einer Glasplatte liegen und entfärbt dann, indem man die Streifen etwa 80 min in 5prozentiger Essigsäure unter mehrmaligem Umschwenken bei etwa 80 °C auf dem Wasserbad beläßt. Die Waschflüssigkeit soll so oft gewechselt werden, bis die eiweißfreien Stellen des Papiers völlig entfärbt sind. GRASSMANN und HANNIG u. a. färben in methanolisch-essigsaurer Lösung an und entfärben auch in der gleichen Art. Das Protein bleibt gefärbt, da der Farbstoff an ihm wie an einer Wollfaser

haftet, das Papier entfärbt sich wieder bis zu einer schwachen Restfarbe des Untergrundes, die entweder durch Proteinspuren im Papier oder durch eine gewisse substantive Anfärbbarkeit der Faser durch den Disazofarbstoff verursacht wird. PETERS und VUYLSTEKE^{26a} empfehlen die Entfärbung bei 65 °C mit 1% Essigsäure, da dann das Papier heller wird.

Zur weiteren quantitativen Auswertung stehen drei Methoden zur Verfügung:

1. Die Elution und kolorimetrische Ermittlung des Gehaltes.
2. Die Reflektionsmethode.
3. Die Messung der Extinktionen auf dem transparent gemachten Papier.

1. *Elutionsmethode.* Den gefärbten oder ungefärbten Streifen schneidet man in Zonen, die den Fraktionen entsprechen. Bei ungefärbten Streifen muß ein Parallelstreifen zur Fixierung der Lage der Banden gefärbt werden.

Man eluiert mit dem jeweils zuständigen Lösungsmittel, z. B. bei der Proteinelektrophorese des Serums:

1-n NaOH in 50% Äthanol + 0,25% Komplexon.

Vorteil der Methode gegenüber der Messung auf dem Papier ist die Tatsache, daß die gemessenen Extinktionen dem BEERSchen Gesetz folgen.

Auswertung: durch Kolorimetrie oder besser durch Spektrophotometer.

2. *Reflektionsmethode:* wird relativ selten benutzt.

3. *Messung auf dem Papier:* Zu diesem Zweck muß das Papier möglichst stark transparent gemacht werden.

Transparenzöle: Paraffinöl + Bromnaphthalin nach GRASSMANN und HANNIG²⁷.

Glycerin, Paraffinöl allein. Daneben der Herbopack nach BARROLLIER²⁸. Dieser besteht aus zwei Komponenten und zeigt eine Nachpolymerisation, so daß er nach einigen Stunden erstarrt ist und nicht mehr benutzt werden kann. Man muß ihn also immer restlos verbrauchen. Vorteil: fester Lack, der Streifen braucht bei Aufbewahrung zwecks Dokumentation nicht entfettet zu werden.

Bei allen Tränkmitteln ist wichtig, daß der Brechungsindex möglichst nahe bei dem der Cellulosefaser = 1,51 liegt.

Zu beachten: Der Streifen muß absolut trocken sein, um Trübungen zu vermeiden, und die Luft muß völlig entweichen. Zwei Methoden führen zu diesem Ziel:

1. Tauchen mit nur einer Längsseite und Hochsaugenlassen des Tränkmittels durch Kapillarwirkung.
2. Tränkung im Vakuum, z. B. in dem von Bender & Hobein in den Handel gebrachten Spezialapparat.

Zur Extinktionsmessung ist heute bereits eine Anzahl von Geräten im Handel, die teilweise nur die Extinktionen messen, welche dann auf Millimeter-Papier graphisch dargestellt werden, wonach die Messung der von den einzelnen Fraktionen eingenommenen Flächen unter Berücksichtigung der GAUSSSchen Fehlerkurven erfolgt sowie ihre anteilige Berechnung. Es gibt jedoch auch Geräte, welche die Kurven bereits automatisch aufzeichnen.

Die Messung der Extinktionen auf dem Papier bedingt eine Umwandlung des LAMBERT-BEERSchen Gesetzes, das in seiner klassischen Form nur für gefärbte Flüssigkeiten Gültigkeit hat:

$$\text{Extinktion} = E = \ln \frac{\text{einfallende Lichtmenge}}{\text{ausfallende Lichtmenge}}$$

= Farbkonzentration in g/Liter \times Schichtdicke \times Konstante.

GRASSMANN und HANNIG²⁰ wandeln die Formel für den transparenten Streifen um, indem sie die Schichtdicke aus der Formel eluieren. Die Konzentration ist dann $C = \frac{a}{v}$, wobei v das Gesamtvolumen der Flüssigkeit und a die darin gelöste Gewichtsmenge darstellt.

Da man v auch durch $f \cdot d$ ersetzen kann (f = Küvettenfläche senkrecht zum durchfallenden Lichtstrahl, d = Schichtdicke), so resultiert:

$$\begin{aligned} E &= k \cdot \frac{a}{v} \cdot d \\ &= k \cdot \frac{a}{f \cdot d} \cdot d \\ &= k \cdot \frac{a}{f} \\ &= k \cdot c \cdot d. \end{aligned}$$

Tab. 15. Färbeverfahren in der Papierelektrophorese

A. Proteine

1. Bromphenolblau

0,1 g Bromphenolblau
50 g Zinksulfat
50 ml Eisessig

mit dest. Wasser zu einem Liter aufgefüllt.

Arbeitsmethodik: 30 min das Pherogramm bei 110–120 °C trocknen

16 Stunden in das Farbbad einlegen

5 min mit 1–2prozentiger Essigsäure waschen

5 min mit 2prozentiger Essigsäure waschen

10 min mit 2prozentiger Essigsäure waschen

2 min mit einer Lösung waschen, die 2% Natriumacetat und 10% Essigsäure enthält.

Abpressen, trocknen während 10 min bei 120 °C. In bekannter Weise mit dem Transparenzöl tränken, 2 Stunden belassen, abpressen, Vornahme der Messung, Entölen.

2. Amidoschwarz 10 B

Analoge amerikanische Marken:
Naphthalene Blue Black 12 B. 200 (ICI)
Pontacyl Blue Black SX (Dupont)
Buffalo Black NBR (National Aniline)

Gesättigte Lösung in Methanol, das 10% Eisessig enthält. Darin anfärben, nach der Originalvorschrift kalt, 10 min trocknen.

Mit Methanol, das 10% Eisessig enthält, waschen, bis der Untergrund hellblau geworden ist. Lufttrocknen.

Variationen: Nach PUCAR: Trocknung des Streifens bei 105 °C,

Kochen in absolutem Methanol während 2–3 min auf dem Wasserbad,

Färben während 4 min bei 80 °C,

Entfärben durch mehrmaliges Erwärmen auf 80 °C mit 5prozentiger wäßriger Essigsäure.

PETERS und VUYLSTEKE:

Färbung mit einer Lösung von:

5–6 g Amidoschwarz in 1 Liter Flüssigkeit aus 4 Vol.

Methanol, 5 Vol. Wasser und 1 Vol. Eisessig bei

Normaltemperatur.

Entfärbung durch Erwärmen mit 1prozentiger Essigsäure bei etwa 65 °C.

3. Azocarmin G

Gesättigte Lösung in 50prozentigem Methanol mit 10% Eisessig.

Arbeitsmethodik: 10 min in dieser Lösung färben, Entfärbung durch Behandlung mit Methanol während 5 min und Behandlung mit 10prozentiger Essigsäure während 5 min.

B. Lipide

1. Ölrot O (National Aniline) nach DURRUM 1952

Gesättigte Lösung in 16prozentigem Alkohol, die Lösung muß 16 Stunden bei Raumtemperatur stehen, wird dann filtriert und ist gebrauchsfertig.

Man färbt über Nacht an und wäscht kurz mit Wasser.

2. Ölblau N (National Aniline)

Die Zubereitung der Farblösung erfolgt wie oben. Anfärbung durch Einlegen in die Farblösung während 4 Stunden.

3. Sudanschwarz

60prozentiger Alkohol wird mit dem Farbstoff bei Siedetemperatur gesättigt. Man läßt abkühlen und filtriert zweimal.

Anfärbung durch Einlegen in die Lösung während 3 Stunden.

Wäsche: dreimal je 15 min in 100 ml 50prozentigem Alkohol.

C. Glucoproteide

Herstellung der Lösungen:

a) Perjodsäure: 1,2 g Perjodsäure werden in 30 ml dest. Wasser gelöst, dazu 15 ml einer 1/5-mol. Lösung von Natriumacetat gegeben und 100 ml Äthanol. Die Lösung hält sich im Dunkeln mehrere Tage.

b) Reduktionslösung: 5 g KJ und 5 g Natriumthiosulfat werden in 100 ml dest. Wasser gelöst, unter Rühren gibt man dazu 150 ml Äthanol und 2,5 ml 2-n HCl. Die Lösung muß immer frisch bereitet werden.

c) Fuchsin-Sulfitlösung: 2 g Fuchsinbase werden in 400 ml siedendem dest. Wasser gelöst, auf 50 °C abgekühlt und filtriert. Zum Filtrat gibt man 10 ml 2-n HCl und 4 g Kaliummetabisulfit. Man verstößelt und läßt über Nacht kühl im Dunkeln stehen. Dann gibt man 1 g Entfärbungskohle zu, filtriert und gibt dann 10 ml oder mehr 2-n HCl hinzu, bis eine auf Glas getrocknete Probe nicht mehr rot wird. Die Lösung muß verschlossen im Dunkeln stehen.

d) Sulfitwäsche: 100 ml dest. Wasser, 1 ml konz. HCl, dazu 0,4 g Kaliummetabisulfit.

Arbeitsmethodik: Man wäscht den Streifen zuerst in Äthanol, dann 5 min in der Perjodsäurelösung, dann mit 70prozentigem Äthanol. Darauf legt man ihn für 5–8 min in die Reduktionslösung und wäscht darauf erschöpfend in 70prozentigem Äthanol.

Dann legt man ihn für 25–45 min in die Fuchsinbisulfitlösung, wäscht darauf dreimal im Sulfitwaschwasser, entwässert durch Äthanol und trocknet auf einer Glasplatte.

Der transparent gemachte Streifen liegt zwischen zwei Glasplatten, die man zweckmäßigerweise vorher auch mit dem Transparenzmittel bestreicht. Er wird dann in das Auswertegerät eingelegt und millimeterweise an einem Spalt vorbeigeführt. Die Absorptionen werden durch ein Photoelement gemessen, das an ein Galvanometer angeschlossen ist. Die Messungen müssen in monochromatischem Licht erfolgen, bei Amidoschwarz 10B z. B. bei 578 m μ , bei Bromphenolblau desgleichen, bei Azokarmin und Ninhydrin bei 546 m μ .

J. Anwendungen

In der Klinik spielt vor allem die übliche Serum-
elektrophorese des Albumins und der Globuline eine Rolle, die heute bereits bekanntlich eine Routinemethode in den verschiedensten Kliniken geworden ist, da sich herausgestellt hat, daß bei gewissen Krankheitsbildern der Leber, des Blutes und des Herzens Veränderungen im Globulingehalt eintreten, vor allem das γ -Globulin wird erhöht, auf Kosten des Albumins. Da jedoch die Proteine im Blut noch andere Bestandteile binden, z. B. Lipide und Kohlehydrate, ging das weitere Interesse dahin, auch diese Bestandteile zu erfassen, es wurde die sogenannte «Triaselektrophorese» eingeführt. Die Lipide sitzen vor allem an der α_1 und β_1 -Fraktion der Globuline, die proteingebundenen Zucker hauptsächlich am Albumin und der α_1 -Globulinfraktion.

Die weiter vorn bereits behandelten Färbeverfahren für Protein, Lipide und Kohlehydrate (Tab. 15) ermöglichen auch die Erkennung von Schwankungen des Blutlipidgehaltes, wie sie z. B. bei Stoffwechselerkrankungen vorkommen, und des Glucoproteidgehaltes, bei entzündlichen Erkrankungen. Als proteingebundene Kohlehydrate haben sich z. B. Mannose, Galaktose und Acetylglucosamin nachweisen lassen.

Der Begriff der «Triasfärbung» wurde zuerst von WUNDERLY und PILLER³⁰ geprägt und ist heute allgemein eingeführt. Die Methode besteht darin, daß man drei Elektrophoresestreifen mit den jeweils zuständigen, bereits erwähnten Farbstoffen anfärbt, bei der Glucoproteidfärbung stört dabei die Tatsache, daß auch die Papierfaser durch Perjodsäure oxydativ unter Bildung von Aldehydgruppen geschädigt wird, sie färbt sich rosa an.

Versuche, das Papier durch PVC-Papier oder durch Glasfaserpapier zu ersetzen, sind bereits mehrfach ge-

macht worden. Sie sind jedoch noch in den Anfängen begriffen.

Die Auswertung der Streifen für die Triaselektrophorese erfolgt meistens durch Transparenzmessung.

Eine Reihe anderer klinisch interessanter Körperflüssigkeiten wurde bereits zu routinemäßigen und forschenden Untersuchungen herangezogen:

- Liquor cerebrospinalis
- Kammerwasser des Auges
- Magensaft
- Harn
- Kanthalidenblasenflüssigkeit

Bei Liquor ist infolge seines minimalen Proteingehaltes, der etwa nur $1/80$ des Serumproteingehaltes beträgt, eine Einengung unerlässlich, die auf die verschiedensten Arten erfolgt:

- a) Dialyse gegen Kollidon³¹.
- b) Dialyse gegen Dextran³¹.
- c) BÜCHER, MATZELT und PETTE³². Durch Acetonfällung bei niedrigen Temperaturen im Kühlraum, dadurch wird die zur Elektrophorese notwendige Konzentration von etwa 2 bis 5% erreicht.
- d) Ultrafiltration nach EVERBECK³³, d. h. Filtration durch eiweißdichtes Ultrafeinfilter unter Anwendung von Unterdruck.
- e) ESSER, HEINZLER und WILD³⁴. Kombination von Dialyse und Eindickung unter Anwendung eines Ultrafilters.
- f) Einengung durch Kollodiumhülle nach MIES³⁵. Es wird mit Hilfe eines Reagenzglases und einer 4prozentigen Kollodiumlösung eine Nitrocellulosehülle hergestellt, die zur Dialyse benutzt wird.

Interessante Arbeiten auf dem Gebiet der Fermente liegen bereits in größerer Anzahl vor (siehe Tab. 16)

Kohlehydrate lassen sich als Borsäurekomplexe trennen, d. h. in Boratpuffern, was bereits eine Anzahl von Arbeiten beweisen. Bei einfachen Zuckern scheint dabei die Konfiguration eine Rolle zu spielen, es ließ sich mit anodischer Wanderungsrichtung folgende Reihenfolge beobachten³⁶: Maltose – Xylose – Ribose – Glucose + Fruktose – Arabinose – Galaktose.

Auch Glycerin, Glykol und Mannit, weiterhin Protocatechualdehyd, Pyrogallol und Tannin ließen sich bei bestimmter Boratkonzentration trennen³⁷.

Nukleinsäuren wurden mit und ohne Markierung durch ³²P getrennt. Es liegen Arbeiten vor von KANNGIESSER³⁸, WIELAND und BAUER³⁹, DIMROTH und Mitarbeiter⁴⁰ sowie MAURER und Mitarbeiter⁴¹.

Tab. 16. Einige Arbeiten auf dem Gebiet der Fermente

Art des Ferments	Ursprung	Autor	Literaturstelle
Amylase, Proteinase, Phosphatase .	Pilzkulturen	WALLENFELS WALLENFELS und PECHMANN	Biochem. Z. 321 (1950) 189 Angew. Chem. 63 (1951) 44
Insulin (roh)	Bauchspeicheldrüse	STEIGERWALD und SCHÜTTE	Klin. Wschr. 31 (1953) 385
Pepsin, Kathepsin, Lab	Magen	NORPOTH, SURMANN und CLÖSGES	Klin. Wschr. 31 (1953) 1005
Luciferin	Cypridina	TSUGI, CHASE und HARVEY	Fed. Proc. 13 (1954) 311
Amylase, Invertase, Maltase, Transfructosidase, Transglucosidase . .	Aspergillus oryzae	PAZUR	Fed. Proc. 13 (1954) 272

Auch Ribo- und Desoxyribonukleinsäuren wurden getrennt, da sie verschiedene Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld aufweisen.

IRVING und IRVING bearbeiteten Nukleoproteide aus Cytoplasma und Zellkernen von Rattenlebern. Auch Hefenukleinsäuren wurden bereits mehrfach bearbeitet.

Aminosäuren sind bei geeigneter Pufferauswahl leicht im elektrischen Feld trennbar, desgleichen Alkaloide, z. B. liegen Arbeiten vor von DECKERS und SCHREIBER⁴².

SCHOLZ und HAGEDORN⁴³ untersuchten alkaloidhaltige Drogenextrakte, auch BURMA und andere lieferten Publikationen⁴⁴. Die Papierelektrophorese anorganischer Kationen wurde von LEDERER mit dem Spezialausdruck *Ionophorese*, als einer Wanderung kleiner Ionen, belegt.

Es liegen Arbeiten über eine Anzahl von Schwermetallionen als freie oder auch komplexe Ionen vor sowie über seltene Erden. SANSONI und KLEMENT trennten die verschiedensten Phosphate papierelektrophoretisch.

Es könnten noch eine große Anzahl von Beispielen angegeben werden. WUNDERLY gibt in seinem Buch *Die Papierelektrophorese* eine große Anzahl wertvoller Hinweise auf Literaturstellen⁴⁵. Weitere sind in den Literaturzusammenstellungen von C. Schleicher & Schüll zu finden⁴⁶.

K. Papierelektrophorese mit erhöhter Spannung

Der Wunsch, die langen Zeiten der Elektrophorese zu erniedrigen, führte dazu, Spezialgeräte mit erhöhter Spannung zu bauen, in denen Trennungen in z. T. erheblich kürzerer Zeit durchgeführt werden können. Infolge der erhöhten Entwicklung von Joule-Wärme bei stärkerem Stromdurchgang ist bei fast allen Systemen auf Kühlung großer Wert gelegt, die bei den älteren Geräten meist durch organische Flüssigkeiten erzeugt wird, bei den Geräten neuerer Bauart durch strömendes Wasser oder durch strömende Sole.

Die Spannung ist stark erhöht, bei WIELAND⁴⁷ z. B. bis zu 2500 Volt zwischen den Elektrodengefäßen, bei WESTPHAL⁴⁸ bis zu 10000 Volt.

WIELAND gibt folgende Zahlen für die von WIELAND und PFLEIDERER ausgearbeitete Apparatur⁴⁷ an:

Spannung zwischen den Elektrodenräumen: 2500 Volt
Spannungsgefälle 60 Volt/cm
pH des Puffers 6,5 (100 ml Pyridin, 10 ml Eisessig, 890 ml Wasser)
Stromstärke 2,5 mA/cm Streifenbreite

Spannung zwischen den Elektrodenräumen: 1400 Volt
Spannungsgefälle 20 Volt/cm
pH des Puffers 8,6 = 0,075 mol Veronalpuffer
Stromstärke 80 bis 100 mA/cm Streifenbreite

Durch die starke Verkürzung der Elektrophoresezeit wird die Diffusion innerhalb der getrennten Banden stark verringert und die Möglichkeit gegeben, Trennungen auch empfindlicher Substanzen in relativ kurzer Zeit durchzuführen. — Die Temperatur steigt bei richtiger Kühlung nicht über + 5°C.

Literatur siehe S. 203

L. Präparative Elektrophorese

Nach mehreren Verfahren gelingt auch die elektrophoretische Trennung größerer Stoffmengen im mikropräparativen Maßstab.

Die Überleitung von den üblichen Dimensionen des dünnen Papierstreifens auf größere Mengen wird geboten durch die Benutzung größerer Bogen in dazu geeigneter Apparatur, etwa derjenigen von DURRUM, dem sogenannten Spincogerät der Firma Beckman.

Auch die Benutzung dickerer Papiere und Kartons ist bereits häufiger empfohlen worden.

Beispiel: SCHULTZE und BIEL⁴⁹: Benutzt wurden fertig gelieferte Streifen Nr. 2230 von Schleicher & Schüll, 8 × 30 cm, die bei einer Dicke von 2 mm im feuchten Zustande etwa 100 mg pro Karton aufnehmen können = 1 ml Flüssigkeit.

Arbeitsbedingungen: MICHAELIS-Puffer vom pH 8,6, etwas abgewandelt, von einer Ionenstärke 0,05. Angelegte Spannung an den Elektroden: 300 Volt. Spannungsabfall von den Elektroden bis zum Streifenende: 80 Volt. Feldstärke: 9 Volt/cm. — Temperatur: 6°C in Kühlraum mit umlaufendem Kühlwasser. Weiteres siehe Originalliteratur.

Zur Bearbeitung größerer Flüssigkeitsmengen bis zu 4 ml eignet sich die präparative Elektrophoreseapparatur nach BOCKEMÜLLER und REBLING, die mit einer präparativen Elektrophoresesäule aus Plexiglas arbeitet, 220 V Netzspannung über Gleichrichterapparatur und 30 bis 70 mA, die einem Stromdurchgang von etwa 4 bis 9 mA pro cm² entsprechen. Als Trägermaterial dient im Star-mix zerkleinertes 2043 b, also ein noch faseriges Material von Papiernatur, pulverförmige Cellulosen eignen sich weniger.

Zur Auftrennung relativ großer Flüssigkeitsmengen eignen sich vor allem die kontinuierlich arbeitenden Geräte, wie sie z. B. von DURRUM einerseits sowie von GRASSMANN und HANNIG andererseits entwickelt wurden und von den Firmen Shandon sowie Bender & Hobein in den Handel gebracht werden.

Das Prinzip ist bei beiden Gerätetypen ungefähr das gleiche: Ein vertikal hängender Papierbogen geeigneter Größe mit Zacken zum Abtropfen am unteren Ende wird von oben nach unten von Puffer durchströmt und steht unter dem Einfluß zweier Elektroden an den Seiten des Gerätes. Der Bogen taucht oben in das Puffergefäß ein. An einem definierten Punkt des Papierbogens wird das zu trennende Gemisch durch Kapillare kontinuierlich zugeführt und unter der Einwirkung des Stromes in seine Komponenten zerlegt.

Die einzelnen Fraktionen tropfen mit dem Puffer in die den einzelnen Zacken zugeordneten Auffanggefäße, wo sie aufgearbeitet werden können. Der getrocknete und angefärbte Papierbogen ist gewissermaßen «Wegweiser». Er zeigt die Wanderungsrichtung der einzelnen Fraktionen an und das bzw. die betreffenden Auffangrohre, in dem sich die Komponenten befinden.

Eine gewisse natürliche Grenze ist der Wanderung durch die naturgegebene Verlangsamung infolge der Porenverstopfung gegeben, für die es noch keine hinreichende Erklärung gibt. Dieser «Brücken- oder Ge-

wölbefekt» beruht vielleicht auf einer Kapillarverstopfung durch Gasblasen oder feinste Schleimpartikel.

Die Elphorgeräte werden heute in zwei verschiedenen Typen gebaut, die sich durch ihre Größe unterscheiden, das Elphor-V-Gerät und das Elphor-Va-Gerät.

Papiere für die Elphorgeräte nach GRASSMANN und HANNIG

Elphor H	Schleicher & Schüll Nr. 2043 a Mgl
Elphor V	Schleicher & Schüll Nr. 2040 a M
	2040 b M
	2043 a Mgl
	604 L/90
Elphor Va	Schleicher & Schüll Nr. 2040 a M
	2040 b M
	604 L/90

Eine Abwandlung dieser Apparatur, die sich bei geringerer Anzahl von Zacken bzw. Auffanggefäßen besonders zur Trennung von Huminsäuren als geeignet erwies, arbeitet mit einem sehr weichen Karton Nr. 2453b von Schleicher & Schüll. Das Gerät wurde von LAUER in Heidelberg entwickelt. Es wird von der Firma Dr. Virus in Bonn vertrieben.

Literatur

- ¹ CH. WUNDERLY, *Die Papierelektrophorese*, Aarau/Frankfurt am Main 1954.
- ² C. HAUGAARD und TH. D. KRONER, *J. Amer. Chem. Soc.* 70 (1948) 2135.
- ³ TH. WIELAND und E. FISCHER, *Naturwiss.* 35 (1948) 29.
- ⁴ TH. WIELAND, *Angew. Chem.* 60 (1948) 250.
- ⁵ H.-D. CREMER und H. TISELIUS, *Biochem. Z.* 320 (1950) 273.
- ⁶ F. TURBA und H.J. ENENKEL, *Naturwiss.* 37 (1950) 93.
- ⁷ W. GRASSMANN und K. HANNIG, *Naturwiss.* 37 (1950) 397.
- ⁸ E. DURRUM, *J. Amer. Chem. Soc.* 72 (1950) 2943.
- ⁹ R. J. BLOCK, E. L. DURRUM und G. ZWEIG, *A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis*, New York 1955.
- ¹⁰ H. G. NOLLER, *Klin. Wschr.* 1954, 588.
- ¹¹ J. KUNKEL und R. SLATER, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 80 (1952) 42. A. GORDON, B. KEIL und K. SEBESTA, *Nature* 164 (1949) 499. Q. PENISTON, H. AGAR, J. MCCARTHY, *Anal. Chem.* 23 (1951) 994. A. GORDON und P. REICHTART, *Biochem. J.* 48 (1951) 569. P. GRABAR und C. WILLIAMS, *Biochim. Biophys. Acta* 10 (1953) 193. P. GRABAR, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 36 (1954) 65.

- ¹² E. NIKKILÄ, E. HAATHI und R. PESOLA, *Acta Chem. Scand.* 7 (1953) 1222.
- ¹³ M. MACHEBŒUF, J. M. DUBERT, P. REBEYROTTE, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 35 (1953) 346.
- ¹⁴ Kammer nach MACHEBŒUF, Hersteller: Firma Pleuger, Brüssel (Belgien).
- ¹⁵ K. H. SLOTTA, S. BRIL und A. BALLESTER, *Z. physiol. Chem.* 296 (1954) 141.
- ¹⁶ A. R. PATTON, E. M. FOREMAN und P. C. WILSON, *Science* 110 (1949) 593.
- ¹⁷ A. TISELIUS und P. FLODIN, *Advances Protein Chem.* 8 (1953) 461.
- ¹⁸ P. FLODIN, siehe ¹⁷
- ¹⁹ M. A. JERMYN und R. THOMAS, *Nature* 170 (1953) 728.
- ²⁰ E. KALLEE, *Z. Naturforsch.* 7 B (1952) 661.
- ²¹ H. MICHL, *Mh. Chem.* 83 (1952) 210, 737.
- ²² H. STEGEMANN, *Naturwiss.* 43 (1956) 518.
- ²³ D. R. BRIGGS, E. F. GARNER und F. SMITH, *Anal. Chem.* 28 (1956) 1333.
- ²⁴ Ciba Symposium: *Paper Electrophoresis*, S. 60-2, Verlag Churchill, London 1956.
- ²⁵ R. J. BLOCK, E. L. DURRUM und G. ZWEIG, *A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis*, S. 406-7, New York 1955.
- ²⁶ Z. PUCAR, *Z. physiol. Chem.* 296 (1954) 62.
- ²⁷ W. GRASSMANN, K. HANNIG, M. KNEDEL, *Dtsch. med. Wschr.* 76 (1951) 333; *Naturwiss.* 37 (1950) 496.
- ²⁸ J. BARROLIER, *Naturwiss.* 42 (1955) 126.
- ²⁹ W. GRASSMANN und K. HANNIG, *Klin. Wschr.* 1954, 838.
- ³⁰ CH. WUNDERLY und S. PILLER, *Klin. Wschr.* 1954, 425.
- ³¹ A. DITTMER, *Papierlektrophorese*, S. 57, Jena 1956.
- ³² TH. BÜCHER, D. MATZELT und D. PETTE, *Klin. Wschr.* 30 (1952) 325.
- ³³ H. EVERBECK, *Klin. Wschr.* 1950, 692.
- ³⁴ H. ESSER, F. HEINZLER und H. WILD, *Klin. Wschr.* 30 (1952) 228.
- ³⁵ H.-J. MIES, *Klin. Wschr.* 31 (1953) 159.
- ³⁶ J. BÖSEKEN, *Advances Carbohydrate Chem.* 4 (1949) 189.
- ³⁷ H. MICHL, *Mh. Chem.* 82 (1951) 489., 83 (1952) 1.
- ³⁸ W. KANNGIESSER, *Naturwiss.* 38 (1951) 503.
- ³⁹ TH. WIELAND und L. BAUER, *Angew. Chem.* 63 (1951) 511.
- ⁴⁰ K. DIMROTH, I. JAENICKE und I. VOLLBRECHTSHAUSEN, *Z. physiol. Chem.* 289 (1952) 71.
- ⁴¹ M. DEIMEL und W. MAURER, *Naturwiss.* 39 (1952) 488.
- ⁴² W. DECKERS und J. SCHREIBER, *Naturwiss.* 40 (1953) 553.
- ⁴³ E. SCHOLZ und P. HAGEDORN, *Dtsch. Apotheker-Ztg.* 3 (1953) 81.
- ⁴⁴ D. BURMA, *Naturwiss.* 41 (1954) 19.
- ⁴⁵ CH. WUNDERLY, *Die Papierelektrophorese*, Aarau/Frankfurt am Main 1954.
- ⁴⁶ C. Schleicher & Schüll, Dassel, Literaturzusammenstellung I bis V (1946 bis 1955), Selbstverlag.
- ⁴⁷ TH. WIELAND und G. PFLEIDERER, *Angew. Chem.* 67 (1955) 257.
- ⁴⁸ G. WERNER und O. WESTPHAL, *Angew. Chem.* 67 (1955) 251.
- ⁴⁹ G. WERNER, *Recu. Trav. Chim. Pays-Bas* 74 (1955) 613.
- ⁴⁹ H. E. SCHULTZE und H. BIEL, *Behringwerk-Mitteilungen*, Heft 30, Verlag N. G. Elwert, Marburg an der Lahn.

Schluß folgt