

CCA-29

537.363:545.83

Beiträge zur Kenntnis der Papierelektrophorese in feuchter Kammer

IV. Kontinuierliche Elektrophorese und zweidimensionale Elektrochromatographie

Zvonimir Pučar

Institut »Ruđer Bošković«, Zagreb, Kroatien, Jugoslawien

Eingegangen am 3. August 1956

Es wird eine Apparatur für die kontinuierliche Elektrophorese am Filtrierpapier und zweidimensionale Elektrochromatographie mit einem Hinweis auf ihre konstruktiven Vorteile beschrieben. Im theoretischen Teil werden ausführlich die Grundlagen der kontinuierlichen und diskontinuierlichen Arbeitsweise besprochen, und zum Schluss wird eine tabellarische Übersicht über elektrophoretische und elektrochromatographische Prozesse gegeben. Aus der Analyse der horizontalen oder elektrophoretischen, und der vertikalen oder chromatographischen Komponente geht hervor, dass der Ausdruck »Elektrochromatographie« nur für den diskontinuierlichen Prozess in Anwendung kommen kann. Im Abschnitt über Terminologie wird auf den Unterschied zwischen zweidimensionalen Prozessen und der in zwei (oder mehreren) Richtungen verlaufenden, d. h. lediglich aus zwei (oder mehreren) eindimensionalen Prozessen zusammengestellten Technik hingewiesen.

Im experimentellen Teil werden eine kontinuierliche elektrophoretische und eine zweidimensionale elektrochromatographische Trennung einer Farbstoffmischung von Tropäolin, Fluorescein, Chlorphenolrot, Rosolsäure, Chrysoidin Y, und Nitranilin beschrieben. Ferner wird eine kontinuierliche elektrophoretische Trennung von undialysiertem humanen Serum (γ -plasmocytom) angegeben.

EINLEITUNG

Das Prinzip der kontinuierlichen elektrophoretischen Trennung beruht darauf, dass man einem vertikalen Flüssigkeitsstrom ein horizontales elektrisches Feld überlagert. Die elektrisch geladenen Teilchen wandern dann in der Richtung der Resultante, und können am Ende der Bahn getrennt aufgefangen werden.

In den ersten drei Mitteilungen dieser Reihe^{1, 2, 3} wurde die apparente Bewegungsform der elektrisch geladenen Teilchen auf einem Filtrierpapierstreifen unter Bedingungen der Elektrophorese in feuchter Kammer studiert. Als Unterschied von allen anderen Elektrophoreseverfahren wurde die grund-

* Über die Apparatur und den experimentellen Teil wurde an der I. Zusammenkunft der jugoslawischen medizinischen Biochemiker vom 13. bis 16. Oktober 1955 referiert.

sätzliche Möglichkeit hervorgehoben, dass an ein und demselben Ort und in demselben Zeitpunkt ein Teilchen mit grösserer Beweglichkeit eine apparente Beschleunigung erfahren, während ein anderes, mit kreinerer Beweglichkeit, gleichzeitig eine apparente Verzögerung der Bewegung aufweisen kann.

In dieser Mitteilung wollen wir uns hauptsächlich mit der Bewegung der geladenen Teilchen bei der kontinuierlichen Papierelektrophorese befassen, die unter Bedingungen der Elektrophorese in feuchter Kammer verläuft. Es soll ferner gezeigt werden, dass die Beschreibung der Bewegungsform auch hier auf dieselbe Weise wie bei der Streifenelektrophorese erfolgen kann (Mittlg. I.).

Das Prinzip der kontinuierlichen Elektrophorese, die sich bis heute als eine der wertvollsten neuen Methoden der präparativen Trennung von Gemischen bewährt hat, wurde zum ersten Male ungefähr gleichzeitig von W. Grassmann⁴ sowie von H. Svenson und I. Brattsten⁵ im Jahre 1949 veröffentlicht, und darauf erschienen (1951) die Arbeiten von E. L. Durrum⁶ und H. H. Strain und J. C. Sullivan⁷. Da die Apparatur von Svenson und Brattsten^{5, 22} mit einer mit Glasstaub gefüllten Plexiglasküvette arbeitet, und da die Apparatur von Strain und Sullivan im wesentlichen aus zwischen zwei Glassplatten gepresstem Filtrierpapier besteht, kann man diese zwei Verfahren nicht als Elektrophorese in feuchter Kammer bezeichnen.

In den letzten Jahren wurden dann mehrere Arbeiten veröffentlicht über kontinuierliche elektrophoretische Trennung von Farbstoffen,^{5, 6, 8} Proteinen^{4, 6, 8, 9, 11, 24}, Aminosäuren^{6, 8, 9, 10, 11}, anorganischen Ionen^{7, 12, 13, 14, 15}, radioaktiven anorganischen Ionen^{12, 13, 14}, sowie Referate über Elektrophorese^{16, 17, 18, 19} und Monographien, die auch, mehr oder weniger, die kontinuierliche Technik behandeln^{20, 21, 22, 23}.

DIE APPARATUR

Die Apparatur nach Durrum⁶ ist konstruktiv zwar sehr einfach, aber sie hat den Nachteil, dass die elektrische Feldstärke in der Richtung von unten nach oben am Filtrierpapier sehr rasch abfällt. Die Folge davon ist, dass die Trennung im wesentlichen nur am unteren Teil des Papiers, d. h. am Ende der Bahn, erfolgt. Einfache Elektrodengefässe, welche die Pufferlösung nicht kontinuierlich spülen kann, geben ausserdem nicht den Eindruck einer vollkommen kontinuierlichen Arbeitsweise.

Deswegen haben wir bei unserem Bau der Apparatur das Prinzip von Grassman^{9, 10} übernommen und die Konstruktion der Apparatur in mehreren Punkten verbessert. Die Vorteile unserer Apparatur (Abb. 1. und 2.) gegenüber den im Handel erhältlichen Apparaturen (Elphor V und Elphor Va, Bender & Hobein, München) sind im wesentlichen folgende:

1) Das Filtrierpapier kann von aussen jederzeit und ohne Unterbrechung der Elektrophorese nachgespannt und zentriert werden. Infolgedessen kann das Papier trocken montiert werden, und, nach selbsttätiger und gleichmässiger kapillarer Anfeuchtung aus der Pufferwanne, nachgespannt werden.

2) Das Filtrierpapier kann beim Montieren an die Elektrodenrinnen mittels zwei mit Schaumgummi belegten Elektrodenbalken und vier randrierten Schrauben leicht angepresst und gedichtet werden.

3) Beim Montieren und Demontieren wird die vordere Glaswand nach der Entfernung der oberen Kappe einfach nach oben ausgezogen, so dass die ganze Papierebene, bzw. das Papier, vollkommen frei für Manipulationen bleibt.

4) Wenn die Glaswand dann, beim Einschieben, um die Vertikalachse um 180° gedreht wird, fallen die fünf Öffnungen für die Substanzzufuhrvorrichtung auf weitere vier Stellen, so dass mit den neuen Zuführungslagen, ohne Wechsel der Stromrichtung, jeweils die günstigste Zuführungsstelle für die zu trennende Substanz bereit steht.

5) Die Elektrodenrinnen haben eine besondere Gasableitung nach aussen, so dass das abropfen der Pufferlösung am Ausgang der Apparatur nicht verhindert wird, und ausserdem können schädliche Gase, die sich an den Elektroden entwickeln, wie z. B. Chlor, nicht mit dem Papier und der zu trennenden Substanz in Berührung kommen.

6) Da beim Papierwechsel keine Gefahr der Beschädigung des Papiers besteht, kann die Apparatur entsprechend grösser gebaut werden, und ausserdem können auch dünnere und weniger feste Papiersorten Verwendung finden.

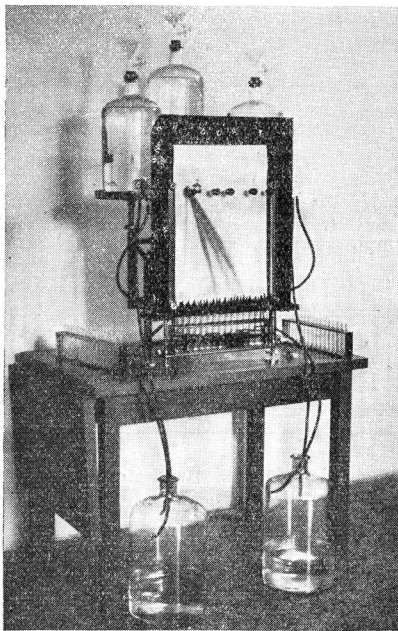


Abb. 1. Die Gesamtansicht der Trennapparatur.
Sl. 1. Aparatura (opći pogled).

7) Beim Papierwechsel entfallen Montage und Demontage der Pufferzuleitungen, da das Papier direkt in die Apparatur montiert wird, und nicht an einen besonderen Rahmen, der erst dann in die eigentliche feuchte Kammer geschoben wird.

Als Stromquelle benutzen wir einen Gleichrichter von 100 bis 1000 Volt und 50 mA.

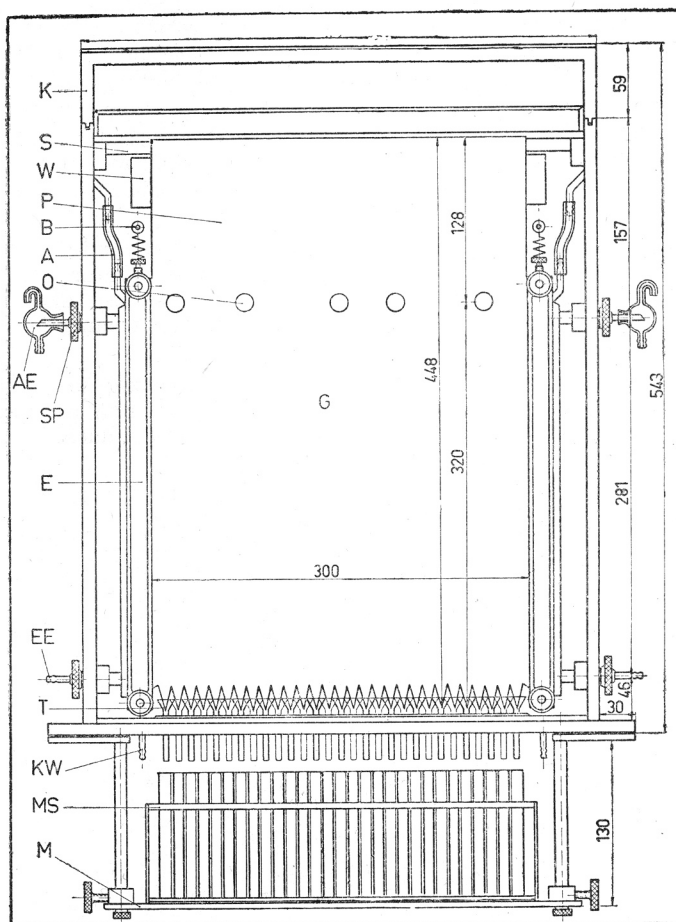


Abb. 2. Frontansicht der feuchten Kammer. Baumaterial geschweisstes PVC. Erklärung der Zeichen: G = vordere Glaswand, K = abnehmbare Kappe aus PVC, S = abnehmbarer Glasstab bzw. abnehmbares Glasrohr zur Unterstützung des Filtrierpapiers, W = Pufferwanne aus PVC, P = Filtrierpapier, B = Stromzuführbüchse mit Stromzuleitung, A = Gasableitung, O = Öffnungen in der Glaswand für die Zuführvorrichtung für das zu trennende Substanzgemisch, E = schaumgummibeleger Elektrodenbalken aus Metall mit zwei randierten Schrauben zum Anpressen des Filtrierpapiers. Unter dem Elektrodenbalken befindet sich die Elektrodenrinne aus PVC mit der Platindrahtelektrode, SP = Spannvorrichtung und Zentriervorrichtung aus PVC für das Filtrierpapier, AE = Ausgang der Elektrodenspülung mit dem Tropfenzähler aus Glas, EE = Eingang der Elektrodenpülung. Der Eingangstropfenzähler aus Glas befindet sich an jeder der drei Mariotteschen Flaschen von je 5 Liter Inhalt, T = Auffangtrichter für die getrennten Komponente, KW = Abfuhr des Kondenswassers, M = Metalltasse mit Vorrichtung zur Einstellung der Gläschenhöhe, MS = Abnehmbares Metallstativ mit 29 Auffanggläschen von je 21 ccm. Inhalt.

Sl. 2. Pogled s prednje strane na vlažnu komoru. Građevni materijal PVC. Opis znakova: G = prednja staklena ploča, K = gornji poklopac iz PVC-a, S = stakleni štap ili staklena cijev za podupiranje filterpapira, W = jase za pufer iz PVC-a, P = filterpapir, B = dovod struje, A = odvod plinova, O = otvori u prednjoj staklenoj stijeni za montažu posudice za dovod materijala, E = metalni jaram sa spužvastom gumom i dvije randirane matice pomoću kojeg se učvršćuje filterpapir. Ispod jarma nalazi se elektroodni žlijeb iz PVC-a sa platinskom elektrodom, SP = uređaj za napinjanje i centriranje filterpapira iz PVC-a, AE = izlaz pufera iz elektroodnog žlijeba sa staklenim brojačem kapi, EE = ulaz pufera u elektroodni žlijeb. Stakleni brojač kapi (ulazni) nalazi se na svakoj od tri Mariotove boce. Svaka boca ima zapreminu od 5 litara, T = stakleni lijevčiči za sabiranje frakcija, KW = odvod kondenzne vode, M = metalna polica za podešavanje visine posudica, MS = metalni stalak sa 29 posudica od kojih svaka sadrži 21 ml.

THEORETISCHE BETRACHTUNGEN

Die Bewegung eines elektrisch geladenen Teilchens setzt sich bei der kontinuierlichen Elektrophorese als vektorische Summe der horizontalen oder elektrophoretischen und vertikalen oder chromatographischen Komponente zusammen. Hier sollen jetzt die beiden Komponenten getrennt behandelt werden.

A. Die horizontale oder elektrophoretische Komponente

Bei der Elektrophorese in feuchter Kammer ist die elektrische Feldstärke wegen der Verdunstung des Lösungsmittels, bzw. Konzentration des Elektrolyts, und der Kapillarsaugwirkung des Filtrierpapiers in horizontaler Richtung nicht konstant^{1, 2}.

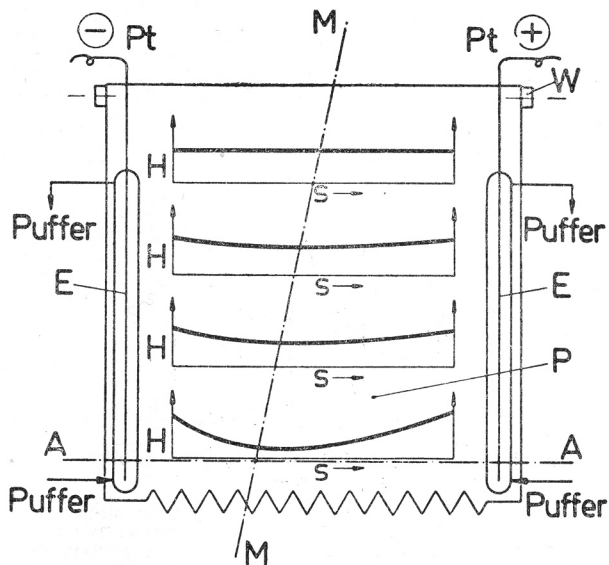


Abb. 3. Schematischer Verlauf der elektrischen Feldstärke (*H*-Kurven) im Stationärzustand am Filtrierpapier. Die Krümmung der *H*-Kurven wächst im Stationärzustand infolge Verdunstung und Kapillarwirkung von oben nach unten. Erklärung der Zeichen: *P* = Filtrierpapier, *W* = Pufferwanne, *E* = Elektrodenrinne mit Platinelektrode, *M-M* = Lage der Minima der *H*-Kurven, bzw. der maximalen Elektrolytkonzentration in der betreffenden Horizontale, *A-A* = eine charakteristische Horizontale.

Sl. 3. Šematski tok jakosti el polja (*H*-krivulja) na filterpapiru u stacionarnom stanju. Zakrivljenost krivulja raste u stacionarnom stanju uslijed isparavanja i kapilariteta odozgo prema dolje. Opis znakova: *P* = filter-papir, *W* = jasje za puffer, *E* = elektrodni žljeb sa platinskom elektrodom, *M-M* = položaj minimuma *H*-krivulja, odnosno maksimalne koncentracije elektrolita u odgovarajućoj horizontali, *A-A* = karakteristična horizontala.

Im stationären Zustand wird die Elektrolytlösung sowohl aus der Pufferwanne (*W*) in der Vertikalrichtung, wie auch von den beiden Elektrodenrinnen (*E*) her in der Horizontalrichtung vom Filtrierpapier angesaugt. Abb. 3 schildert schematisch den Verlauf der elektrischen Feldstärke (*H*-kurven) am Filtrierpapier im stationären Zustand und in vier charakteristischen Horizontalen.

Im folgenden wird eine anodische elektrophoretische Bewegung der elektrisch geladenen Teilchen betrachtet. Eine kathodische Bewegung würde

prinzipiell der anodischen Bewegung gleichen. Dabei soll davon abgesehen werden, dass die Beweglichkeit der Teilchen (u), wegen des Durchlaufens von Konzentrationsgradienten im Elektrolyt und der dadurch bedingten Änderung des ξ Potentials, nicht streng konstant ist.

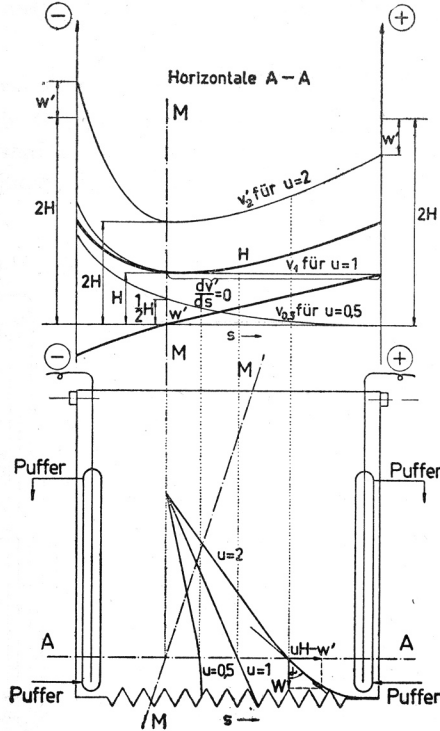


Abb. 4. Oben: die H und w' -Kurve in der Horizontalen A-A im stationären Zustand (schematisch). Nach Gleichung (1) sind dann die Kurven der apparenten Horizontalgeschwindigkeiten v'_1 für $u=1$, v'_2 für $u=2$, und $v'_{0,5}$ für $u=0,5$ in der Horizontalen A-A aufgezeichnet. Unten: Schematische Wiedergabe der Bahnen der Teilchen am Filtrierpapier mit den Beweglichkeiten $u=0,5$, $u=1$, und $u=2$.

Sl. 4. Gore: H i w' -krivulja u horizontali A-A nakon uspostavljanja stacionarnog stanja (šematski). Prema jednačbi (1) nacrtane su krivulje aparentnih horizontalnih brzina u horizontali A-A, i to v'_1 za $u=1$, v'_2 za $u=2$, i $v'_{0,5}$ za $u=0,5$. Dolje: Šematski prikaz tragova čestica na filtarpapiru sa pokretljivostima $u=0,5$, $u=1$, i $u=2$.

Die apparente momentane Geschwindigkeit eines Teilchens mit der Beweglichkeit u im elektrischen Feld H ist¹:

$$v' = uH - w' \quad (1)$$

Hier bedeutet w' die kapillare Elektrolytgeschwindigkeit in der Horizontalrichtung. Die Differenzierung nach s ergibt:

$$\frac{dv'}{ds} = u \frac{dH}{ds} - \frac{dw'}{ds} \quad (2)$$

Darauf folgt für

$$\text{a) } u \frac{dH}{ds} = \frac{dw'}{ds}, \quad \frac{dv'}{ds} = 0, \quad v' = \text{Konst.} \quad (3)$$

Das Teilchen bewegt sich in der Horizontalrichtung mit konstanter Geschwindigkeit.

$$b) \quad u \frac{dH}{ds} > \frac{dw'}{ds}, \quad \frac{dv'}{ds} > 0 \quad (4)$$

Das Teilchen erfährt in der Horizontalrichtung eine apparente Beschleunigung der Bewegung.

$$c) \quad u \frac{dH}{ds} < \frac{dw'}{ds}, \quad \frac{dv'}{ds} < 0 \quad (5)$$

Das Teilchen erfährt in der Horizontalrichtung eine apparente Verzögerung der Bewegung.

Die Differenzialgleichung (2) können wir durch Abb. 4 einfach veranschaulichen.

Die obere Zeichnung in Abb. 4. gibt uns schematisch folgende Kurven in der Horizontale $A-A$ (Abb. 3.) wieder: 1) Die Kurve der elektrischen Feldstärke H , und 2) die Kurve der kapillaren Elektrolytgeschwindigkeit in der Horizontalrichtung w' (vergleiche auch Mittlg. I. und II.^{1,2}). Weiter sind nach Gleichung (1) die Kurven für die apparenten Geschwindigkeiten, v_1' für die Beweglichkeit der Teilchen $u = 1$, v_2' für $u = 2$, und $v_{0,5}'$ für $u = 0,5$, aufgezeichnet. Einfachheitshalber sind in Abb. 4 rechts von der $M-M$ Linie die Gradienten dH/ds und dw'/ds gleich gross gezeichnet ($dH/ds = dw'/ds$). Die $M-M$ Linie bedeutet das Minimum der H -Kurve.

Das Teilchen mit $u = 2$ erfährt rechts von der $M-M$ Linie stets eine apparente Beschleunigung in der Horizontalrichtung, das Teilchen mit $u = 1$ bewegt sich in demselben Bereich mit konstanter Geschwindigkeit, während das Teilchen mit $u = 0,5$ eine Verzögerung der Bewegung erfährt.

Da wir hier annehmen müssen, dass sich keines der drei Teilchen am Filtrierpapier adsorbiert, ist die vertikale Komponente für alle drei Teilchen gleich der vertikalen Elektrolytgeschwindigkeit W . Die untere Zeichnung (Abb. 4.) gibt schematisch die Bahnen der Teilchen am Filtrierpapier wieder. Links von der $M-M$ Linie erfahren alle drei Teilchen apparente Verzögerung in der Horizontalrichtung, und wenn wir jetzt den Startpunkt vielleicht noch mehr nach links verschieben würden, könnten die Teilchen in S -förmigen Bahnen über das Filtrierpapier laufen. Obwohl ein kleiner Teil der Bahnen in unserer Zeichnung links von der $M-M$ Linie verläuft, haben wir die kleinen Verzögerungen am Anfang der Bahnen vernachlässigt, da die Krümmungen und die Wirkung der H und w' -Kurven am oberen Teil des Papiers (am Anfang des Prozesses) klein sind. Die Neigung der $M-M$ Linie zur Vertikale ist durch Elektroosmose bedingt (vergleiche auch Mittlg. I. und II.).

B. Die vertikale oder chromatographische Komponente

H. H. Strain und J. C. Sullivan⁷ haben schon bemerkt, dass im kontinuierlichen Prozes die Trennung von zwei Substanzen unmöglich ist, wenn das relative Verhältnis ihrer elektromigrationen Wege und ihrer chromatographischen Wege dasselbe ist. Im diskontinuierlichen Prozess ist die Trennung von

zwei Substanzen nur dann unmöglich, wenn ihre elektromigrationen und gleichzeitig ihre chromatographischen Wege identisch sind. Abb. 5. soll uns das veranschaulichen.

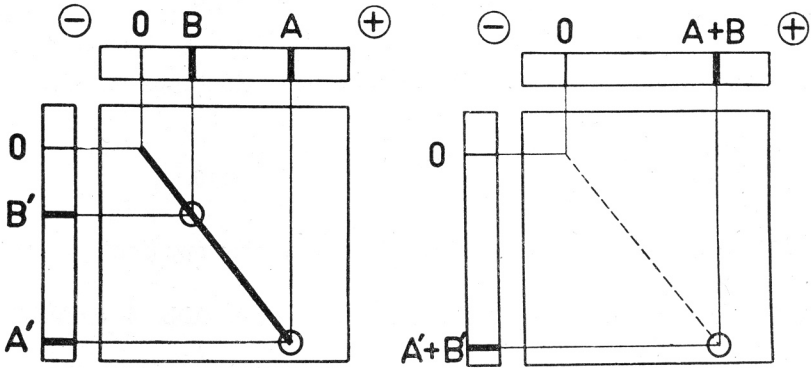


Abb. 5. Die Trennung der Substanzen A und B.

Links: Die Substanzen sind im diskontinuierlichen Prozess trennbar. Die Trennbarkeit beruht nur auf dem chromatographischen Effekt. Die elektrophoretischen Beweglichkeiten sind identisch, und deswegen sind die beiden Substanzen im kontinuierlichen Prozess untrennbar. O = Startstrich.

Rechts: Der chromatographische wie auch der elektrophoretische Effekt ist identisch, daher die Untrennbarkeit auch im diskontinuierlichen Prozess.

Sl. 5. Odjeljivanje substanca A i B.

Lijevo: Smjesa se daje u diskontinuiranom procesu rastaviti, i to samo uslijed kromatografskog efekta. U kontinuiranom procesu smjesa je nedjeljiva, jer je elektroforetski efekt od A i B identičan. O = početna linija.

Desno: Kromatografski i elektroforetski efekt je identičan, pa se smjesa ne može rastaviti ni u diskontinuiranom procesu

Die genannten Verfasser haben aber nicht darauf hingewiesen, dass in beiden Fällen die elektrophoretischen Beweglichkeiten (u) der Substanzen A und B identisch sind. Die Substanzen A und B, im linken Bild, werden zwar sehr gut durch eindimensionale Streifenelektrophorese getrennt, aber der Trenneffekt ist offensichtlich nur auf einen chromatographischen zurückzuführen. Der elektrophoretische Trenneffekt ist gleich Null. Im rechten Bild ist der elektrophoretische und gleichzeitig auch der chromatographische Trenneffekt gleich Null, und daher ist auch die Trennung in einem diskontinuierlichen (chromatographischen), wie auch im kontinuierlichen (elektrophoretischen) Prozess unmöglich.

Abb. 6. veranschaulicht eine kontinuierliche oder diskontinuierliche Trennung. Die Substanz B wird vom Filtrierpapier adsorbiert, die Substanz A wird im Gegenteil nicht adsorbiert, sondern sie wandert in der Vertikale mit der Flüssigkeitsfront, d. h. mit der Geschwindigkeit W .

Die zurückgelegten Wege \overline{OA} , \overline{OB} , $\overline{OA'}$ und $\overline{OB'}$ entsprechen einfachheitshalber einem System ohne Verdunstung. Die Länge \overline{OB} ist dann der apparente elektrophoretische Weg der Substanz B, die übrigen Längen die wahren elektrophoretischen bzw. chromatographischen Wege. In der Zeit, in der die Substanz A den Weg \overline{OE} zurückgelegt hat, ist die Substanz B, wegen Adsorption, von O nur bis zum Punkt D angelangt. Wenn die Substanz B nicht adsorbiert würde, müsste sie in derselben Zeit bis zum Punkt C vorrücken. Durch Projektion der Länge \overline{OC} auf die Horizontale bekommen wir

den wahren Weg $\overline{O(B)}$, den die Substanz B mittels Papierstreifenelektrophorese zurückgelegt hätte, wäre sie nicht durch Adsorption vom Filtrierpapier zurückgehalten worden. Nachdem die beiden Substanzen im kontinuierlichen

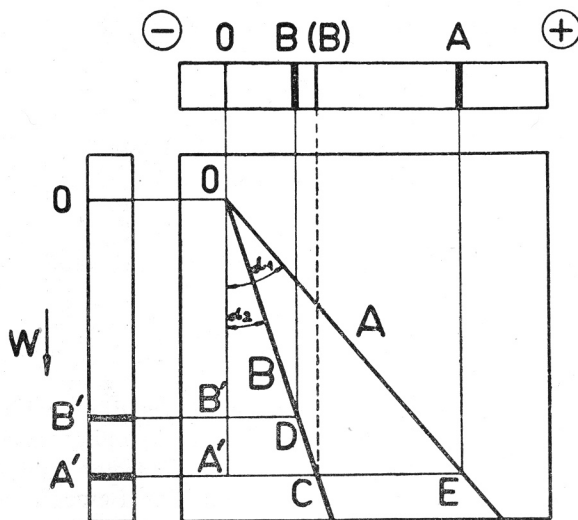


Abb. 6. Die Trennung der Substanzen A und B , die verschiedene chromatographische und auch elektrophoretische Eigenschaften aufweisen. Die Trennung ist sowohl im kontinuierlichen wie auch im diskontinuierlichen Prozess möglich. Weitere Erläuterungen im Text.
 Sl. 6. Rastavljanje supstancu A i B , koje pokazuju različita kromatografska i elektroforetska svojstva. Odjeljivanje je moguće u kontinuiranom kao i u diskontinuiranom procesu. Daljnji opis vidi u tekstu.

Prozess an den unteren Rand des Filtrierpapiers gelangt sind, ist im stationären Zustand die Bahn der Substanz B adsorptiv gesättigt, und die neuankommenden Stoffmengen erleiden keine Adsorption. Die Bahn der Substanz B wird dadurch keinesfalls geändert, da die Projektion der Länge \overline{OC} auf die Horizontale wie auch auf die Vertikale den zurückgelegten Wegen ohne Adsorption entspricht.

Wir können jetzt die elektrophoretische Beweglichkeit aus der Messung des apparenten Weges berechnen, den die Substanz in einem Adsorbens zurückgelegt hat. Für System ohne Verdunstung gilt:

$$u = \frac{\overline{O(B)}}{H\tau} \quad (6) \quad \text{O}(B) = \frac{\overline{OA'}}{\overline{OB'}} \cdot \overline{OB} \quad (7)$$

und für: $\frac{\overline{OB'}}{\overline{OA'}} = R_f$ $u = \frac{1}{R_f} \cdot \frac{\overline{OB}}{H\tau} \quad (8)$

oder $u = \frac{u'}{R_f} \quad (9)$

Hier bedeutet u die wahre Beweglichkeit, u' die apparente Beweglichkeit im Adsorbens, und R_f ist der bekannte chromatographische Faktor. Nach (9) ist die horizontale Komponente:

$$v' = R_f v \quad (10), \quad \text{bzw.} \quad v' = R_f u H \quad (11)$$

und die vertikale Komponente:

$$W' = R_f W \quad (12), \quad \text{und} \quad \text{tg} \alpha = \frac{uH}{W},$$

schliesslich:

$$\frac{\text{tg} \alpha_1}{\text{tg} \alpha_2} = \frac{u_1}{u_2} \quad (13)$$

Für den Prozess in feuchter Kammer ist:

$$\text{tg} \alpha = \frac{u H - w'}{W} \quad \text{und für denselben Punkt } (w'_1 = w'_2):$$

$$\text{tg} \alpha_1 - \text{tg} \alpha_2 = \frac{H}{W} (u_1 - u_2) \quad (14)$$

Die Neigungen der Bahnen der Teilchen gegen die Vertikale, im System ohne Verdunstung, verhalten sich wie ihre elektrophoretischen Beweglichkeiten (13). Bei der Elektrophorese in feuchter Kammer sind die Differenzen der Neigungen proportional den Differenzen der Beweglichkeiten, bezogen auf einen identischen Punkt ($w'_1 = w'_2$) (14). Für das System ohne Verdunstung gilt dasselbe, aber jetzt für alle Punkte am Filtrierpapier, weil $w' = 0$. Im kontinuierlichen Prozess sind zwei Substanzen nur dann trennbar, wenn sie verschiedene elektrophoretische Beweglichkeiten besitzen. Eine eventuelle Adsorption hat auf die Trennung keinen Einfluss. Mit anderen Worten: Alle Teilchen, die sich auf derselben Bahn befinden, haben identische elektrophoretische Beweglichkeiten.

Jeder diskontinuierliche Prozess ist im wesentlichen ein elektrochromatographischer Prozess. Untrennbar sind nur Substanzen, die gleichzeitig identische elektrophoretische Beweglichkeiten und R_f Werte haben. Bei eindimensionaler Streifenelektrophorese oder eindimensionaler Elektrochromatographie sind jene Substanzen untrennbar, welche der Gleichung (15) genügen:

$$u_1 R_{f1} = u_2 R_{f2} \quad (15)$$

Auf Seite 204 geben wir noch eine Übersicht über elektrophoretische und elektrochromatographische Prozesse, sowie über die Bedingungen für die Untrennbarkeit.

TERMINOLOGIE

In der Literatur wurden bereits mehrere Ausdrücke für die verschiedenen elektrophoretischen und elektrochromatographischen Prozesse am Filtrierpapier vorgeschlagen, wie z. B. Ionographie²⁵, Papierelektrophorese^{1, 2, 3, 26, 27, 28}, Papierionophorese²⁶, Kontinuierliche Elektrophorese^{6, 14}, Kontinuierliche Ionophorese⁶, Elektrochromatographie^{7, 12, 13}, Kontinuierliche Elektrochromatographie^{7, 12, 13}, Zonenelektrophorese¹⁷, Elektrochromatophorese²⁹, Elektromigration^{30, 31} u. s. w. In Tabelle 1 benannten wir die einzelnen Prozesse so, wie wir es zur allgemeinen Annahme vorschlagen möchten. Wie aus obigen Betrachtungen über die vertikale oder chromatographische Komponente hervorgeht, müsste man den Ausdruck »Kontinuierliche Elektrochromatographie« vollkommen aufgeben, da die chromatographische

TABELLE I

Übersicht über elektrophoretische und elektrochromatographische Prozesse.

Prozess	Bedingungen für die Untrennbarkeit
Kontinuierliche Elektrophorese	$u_1 = u_2$
Zweidimensionale Elektrochromatographie oder zweidimensionale Elektrophorese. (Diskontinuierliche Elektrophorese) (Die Bedingung für diesen Prozess ist die gleichzeitige Trennung in der chromatographischen und elektrophoretischen Richtung)	$u_1 = u_2$ und gleichzeitig $R_{f1} = R_{f2}$
Eindimensionale Elektrochromatographie oder eindimensionale Elektrophorese.	$u_1 = u_2$ und gleichzeitig $R_{f1} = R_{f2}$ oder $u_1 R_{f1} = u_2 R_{f2}$
(Eindimensionale) Streifenelektrophorese. (R_f -Werte aller Fraktionen sind 1)	$u_1 = u_2$

Komponente im kontinuierlichen Prozess keinen Einfluss auf die Trennung hat. Die eindimensionale Elektrophorese in porösen Trägern ist ein Prozess, bei welchem die chromatographischen Effekte nicht zum Ausdruck kommen (sämtliche Fraktionen haben $R_f = 1$), wie zum Beispiel bei der üblichen Papierelektrophorese des Serumweißes³². Im Falle dass die Fraktionen einen merklichen chromatographischen Effekt am Papier zeigen ($R_f \neq 1$), wäre auch der Ausdruck »Streifenelektrophorese« zulässig, aber nur dann, wenn die Resultate, z. B. auf rechnerischem Wege, frei von chromatographischen Effekten angegeben werden, wie zum Beispiel bei der Ermittlung elektrophoretischer Beweglichkeiten³³.

Den Ausdruck »Ionophorese«, der den Unterschied zwischen Ionenwanderung und Wanderung kolloider Partikelchen unterstreichen sollte, umgehen wir, weil: 1) elektrokinetisch im wesentlichen kein Unterschied besteht, 2) häufig ist es unmöglich, eine scharfe Grenze zwischen Kolloidteilchen und Ionen aufzustellen, besonders bei biologischem Material, 3) man kann die Wanderung der Kolloidteilchen nicht als Ionophorese bezeichnen, im Gegenteil, es ist durchaus zulässig die Wanderung der Ionen als Elektrophorese zu betrachten.

Es muss noch zum Schluss darauf hingewiesen werden, dass der vorgeschlagene Terminus »zweidimensionale Elektrochromatophorese« oder »zweidimensionale Elektrochromatographie« nicht mit der Elektrochromatographie in zwei Richtungen zu verwechseln ist, da die Elektrochromatographie in zwei (oder mehreren) Richtungen, wie sie Durrum³⁴ oder Strain³⁵ beschrieben haben, nicht gleichzeitig (simultan) in beiden Richtungen verlaufen kann. Diese Technik ist lediglich aus zwei eindimensionalen elektrochromatographischen Prozessen zusammengestellt. Dasselbe gilt auch für die Kombination von Papierelektrophorese und Papierchromatographie wie sie Kickhöfen³⁶ beschrieben hat. In diesem Falle ist die Technik aus einem elektrophoretischen oder elektrochromatographischen und einem separaten chromatographischen Prozess zusammengestellt.

EXPERIMENTELLER TEIL

A. Kontinuierliche Elektrophorese von Farbstoffen

Abb. 7 zeigt die kontinuierliche elektrophoretische Trennung einer Mischung von Tropäolin O(T), Fluorescein wasserlöslich (F), Chlorphenolrot (P), Rosolsäure

(R), Chrysoidin Y (Ch) und Nitranilin (N). Die Konzentration jedes der sechs Farbstoffe in 50%-iger ethanolischer Lösung war 4 mg/cm.

Als Elektrolyt wurde eine Borsäure - Na - Acetat - NaOH - Pufferlösung vom $pH = 8,6$ und Ionenstärke $\mu = 0,012$ verwendet. Die Zusammensetzung der Pufferlösung war:

H_3BO_3 1,947 g
Na-Acetat . 3H₂O . . . 0,483 g

1N NaOH 8,5 ccm
Destilliertes Wasser ad 1 Liter

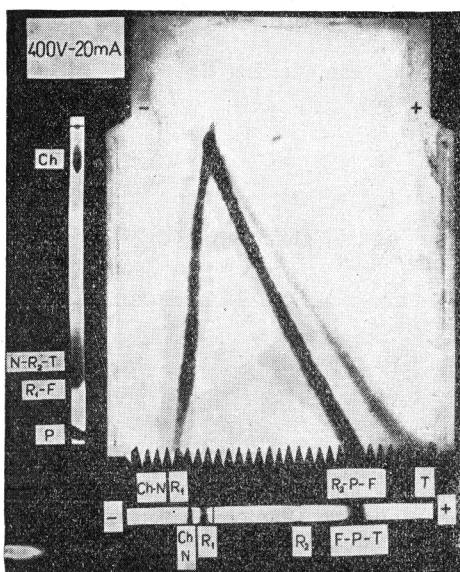


Abb. 7.

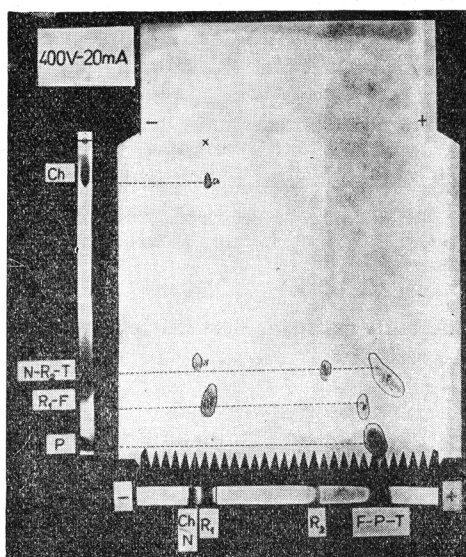


Abb. 8.

Abb. 7. Kontinuierliche Elektrophorese einer Mischung von Tropäolin O (T), Fluorescein (F), Chlorphenolrot (P), Rosolsäure (R_1 und R_2), Chrysoidin Y (Ch) und Nitranilin (N) in einer Boratpufferlösung von $pH = 8,6$ und Ionenstärke 0,012. Filtrierpapier Munktell No. 20/150.

Weitere Angaben im Text.

Sl. 7. Kontinuirana elektroforeza smjese, Tropäolin O (T), Fluorescein (F), Chlorphenolrot (P), Rozolna kiselina (R_1 i R_2), Chrysoidin Y (Ch), i Nitranilin (N), u boratnom puferu $pH = 8,6$ i ionske jakosti 0,012. Filtrpapir Munktell br. 20/150. Ostale podatke vidi u tekstu.

Abb. 8. Zweidimensionale Elektrochromatographie von Farbstoffen. Experimentale Daten wie in Abb. 7.

Sl. 8. Dvodimenzionalna elektrokromatografija boja. Eksperimentalni podaci kao kod slike 7.

Das verwendete Filtrierpapier war Munktell No. 20/150, die Zeit zwischen Eingang und Ausgang der Substanz war 3,5 Stunden (die vertikale Puffergeschwindigkeit), die Stromspannung 400 Volt, die Stromstärke 20 mA. Die Größe des Filtrierpapiers kann aus Abb. 2. entnommen werden. In Abb. 7. und 8. ist jeweils auf der linken Seite ein Chromatogramm, und unten eine eindimensionale Elektrochromatographie derselben Farbstoffmischung abgebildet. Es ist unter anderem aus Abb. 7. ersichtlich, dass Fluorescein (F) eine grössere elektrophoretische Beweglichkeit besitzt als Chlorphenolrot (P), während die elektrochromatographische Beweglichkeit des Fluoresceins (F) kleiner als die des Chlorphenolrots (P) ist. Tropäolin O (T) unterscheidet sich hinsichtlich der elektrophoretischen Beweglichkeit viel mehr vom Chlorphenolrot (P) als bezüglich der elektrochromatographischen Beweglichkeit. Rosolsäure (R) wird elektrokinetisch in zwei Fraktionen (R_1 und R_2) getrennt. Die elektrophoretische Beweglichkeit der beiden Fraktionen ist bedeutend grösser als ihre elektrochromatographischen Beweglichkeiten.

B. Zweidimensionale elektrochromatographische Trennung von Farbstoffen

Dieselbe Mischung von Farbstoffen wurde unter gleichen Bedingungen zweidimensional elektrochromatographisch getrennt (Abb. 8.).

Die Dauer des Versuches war 3,5 Stunden. Alle sieben Komponenten wurden vollkommen getrennt, obwohl die chromatographische Trennung (links vertikal), und die elektrochromatographische Trennung (unten horizontal) unvollkommen sind.

C. Kontinuierliche Elektrophorese des Serums

Abbildung 9. zeigt die kontinuierliche Elektrophorese eines menschlichen Serums (γ -plasmocytom). Das Serum wurde ohne vorhergehende Dialyse der Elektrophorese unterworfen. Das Filtrierpapier war Whatman No. 1, die Zeit zwischen Eingang und Ausgang des Serums war 7 Stunden, die Stromspannung 300 Volt, die Stromstärke 12 mA. Als Elektrolyt wurde eine Na-Veronal-Na-Acetat-HCl-Pufferlösung vom $pH = 8,6$ und Ionenstärke 0,0241 verwendet. Die Zusammensetzung der Pufferlösung war:

Na-Veronal	33,750 g
Na-Acetat . 3H ₂ O	27,000 g
1N HCl	22,9 ccm

Destilliertes Wasser ad 15 Liter.

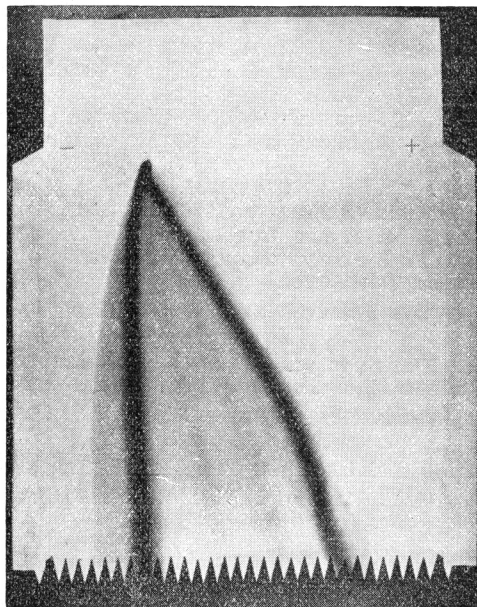


Abb. 9. Kontinuierliche Elektrophorese des undialysierten menschlichen Serums (γ -plasmocytom). Versuchsdaten: Papier Whatman No. 1., Stromspannung 300 Volt, Stromstärke 12 mA, Veronalpuffer $p_H = 8,6$, Ionenstärke $\mu = 0,0241$.

Von rechts nach links: Albumin, α_1 -Globulin, α_2 -Globulin, β -Globulin, und γ -Globulin.

Sl. 9. Kontinuirana elektrofereza nedializiranog ljudskog seruma (μ -plasmocytom). Podaci: Papir Whatman br. 1., napon 300 V, jakost struje 12 mA, veronalpufer $p_H = 8,6$, ionska jakost $\mu = 0,0241$.

Od desna na lijevo: albumin, α_1 -globulin, α_2 -globulin, β -globulin, i γ -globulin.

Die von uns beschriebene Färbungsmethode mit Amidoschwarz^{37, 38} wurde für diesen Zweck etwas vereinfacht, da die photometrische Reproduzierbarkeit für die Abbildung der Bahnen einzelner Serumeiweissfraktionen überflüssig ist. Nach Beendigung des Versuches wurde das lufttrockene Filtrierpapier bei 105°C getrocknet,

mit Methanol besprüht, und wieder bei 105°C getrocknet. Darauf wurde es gleichmässig mit Farblösung besprüht (1 Gramm Farbstoff in 100 ccm 10%-iger Essigsäure) und bei cca 70—80°C getrocknet. Dann wurde der überflüssige Farbstoff in einer photographischen Wanne mit 5%-iger Essigsäure bei 70—80°C vom Papier abgewaschen. Zum Schluss wurde das Filtrierpapier an der Luft getrocknet.

Da die Eiweissteilchen eine geringe elektrophetische Beweglichkeit haben, erfahren alle Komponenten eine apparente Geschwindigkeits-Verzögerung in der horizontalen Richtung, und alle Bahnen sind nach innen gekrümmt.

LITERATUR

1. Z. Pučar, *Arhiv kem.* **25** (1953) 205.
2. Z. Pučar, *Arhiv kem.* **26** (1954) 29.
3. Z. Pučar, *Arhiv kem.* **26** (1954) 41.
4. W. Grassmann, Tagung der Physiologen und physiologischen Chemiker, Göttingen 31. Aug. 1949.
5. H. Svenson und I. Brattsten, *Arkiv Kemi* **1** (1949) 401.
6. E. L. Durrum, *J. Am. Chem. Soc.* **73** (1951) 4875.
7. H. H. Strain und J. C. Sullivan, *Anal. Chem.* **23** (1951) 816.
8. W. Grassmann, *Naturwiss.* **38** (1951) 200.
9. W. Grassmann und K. Hannig, *Z. physiol. Chem. (Hoppe-Seyler's)* **292** (1953) 32.
10. W. Grassmann und K. Hannig, *Naturwiss.* **37** (1950) 397.
11. I. Brattsten und I. Nilsson, *Arkiv Kemi* **3** (1951) 337.
12. T. R. Sato, W. P. Norris und H. H. Strain, *Anal. Chem.* **24** (1952) 776.
13. T. R. Sato, W. P. Norris und H. H. Strain, *Anal. Chem.* **26** (1954) 267.
14. M. Lederer, *Anal. Chim. Acta* **11** (1954) 145.
15. B. Sansoni und R. Klement, *Angew. Chem.* **66** (1954) 598.
16. H. J. Mc. Donald, E. P. Marbach und M. C. Urbin, *Clinical Chemist* **5** (1953) 17.
17. A. Tiselius, *Angew. Chem.* **67** (1955) 245.
18. Ch. Wunderly, *Chimia (Switz.)* **10** (1956) 1.
19. Č. Michalec und J. M. Hais, *Chem. Listy* **47** (1953) 284.
20. M. Macheboeuf, P. Rebeyrotte, J. M. Dubert und M. Brunerie, *La Microelectrophorèse*, Paris 1954.
21. C. H. Wunderly, *Die Papierelektrophorese*, Aarau und Frankfurt am Main 1954.
22. R. J. Bloch, E. L. Durrum und G. Zweig, *A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis*, New York 1955.
23. M. Lederer, *An Introduction to Paper Electrophoresis and Related Methods*, 1955.
24. I. Brattsten, *Arkiv Kemi* **4** (1952) 503; **8** (1955) 205; **8** (1955) 227.
25. H. J. Mc. Donald, M. C. Urbin und M. B. Williamson, *Science* **112** (1950) 227.
26. E. L. Durrum, *J. Am. Chem. Soc.* **72** (1950) 2943.
27. F. V. Flynn und P. de Mayo, *Lancet* **261** (1951) 235.
28. H. G. Kunkel und A. Tiselius, *J. Gen. Physiol.* **35** (1951) 89.
29. G. L. Weller, *Chromatog. Bull.* **1** (1950) 5.
30. H. J. Mc. Donald, *J. Chem. Educ.* **29** (1952) 423.
31. K. S. Spiegler und C. D. Coryel, *Science* **113** (1951) 546.
32. Z. Pučar und M. Petek, in Vorbereitung.
33. Z. Pučar, in Vorbereitung.
34. E. L. Durrum, *J. Colloid Sci.* **6** (1951) 274.
35. H. H. Strain, *Anal. Chem.* **24** (1952) 356.
36. B. Kickhöfen und O. Westphal, *Z. Naturforsch.* **7** (1952) 659.
37. Z. Pučar, *Z. physiol. Chem. (Hoppe-Seyler's)* **296** (1954) 62.
38. Z. Pučar, *Acta Pharm. Jugoslav.* **4** (1954) 10.

IZVOD

**Prilog upoznavanju elektroforeze na filtarskom papiru metodom vlažne komore. IV.
Kontinuirana elektroforeza i dvodimenzionalna elektrokromatografija**

Z. Pučar

Opisana je aparatura za kontinuiranu elektroforezu i dvodimenzionalnu elektrokromatografiju na filtarskom papiru. Prednosti opisane aparature pred aparaturom Elfor V. i Elfor V. a. (Bender & Hobein, München) uglavnom su ove:

1) Filtarski se papir može, s pomoću posebnog uređaja, s vanjske strane aparature napinjati i centrirati, i to u svako doba i bez prekidanja elektroforeze. Zbog toga je moguće papir montirati u aparaturu u suhom stanju, te ga definitivno napeti tek pošto se pufer jednolično kapilarno navlažio otopinom.

2) Pomoću metalnih jarmova sa spužvastom gumom i s pomoću randriranih matica lako je papir jednolično naprešati uz elektrodne žljebove.

3) Prilikom montaže i demontaže filtarskog papira ravnina papira postaje pristupačna za rukovanje jednostavnim skidanjem gornjeg poklopca i izvlačenjem prednje staklene stijene.

4) Ako se staklena stijena prilikom ponovnog uvlačenja okrene oko vertikale za 180°, padaju četiri od pet postojećih otvora za dovodenje supstance na nova mjesta na filtarskom papiru, pa se tako supstanca može dovoditi na devet mjesta duž širine filtarskog papira. Time se i bez promjene polariteta struje može naći najpovoljnije ulazno mjesto za supstancu.

5) Elektrodni žljebovi imaju poseban odvod plinova iz aparature. Time se postiže nesmetano otapljivanje pufera na izlazu iz aparature, a ujedno se sprečava štetno djelovanje elektrodnih plinova (na pr. klora) na supstancu.

6) Mogu se upotrebljavati i mehanički neotporne vrste filtarskog papira, jer ne postoji opasnost oštećenja toga papira prilikom montaže i demontaže.

7) Prilikom mijenjanja filtarskog papira otpada namještanje dovodnih cijevi za pufer-otopinu, jer papir nije montiran na posebnom okviru, koji se naknadno ulaže u vlažnu komoru, nego je papir neposredno učvršćen u vlažnoj komori.

U teoretskom dijelu razrađeni su osnovi kontinuirane i diskontinuirane separacije, i to s pomoću potanje analize horizontalne ili elektroforetske i vertikalne ili kromatografske komponente. Sastavljen je tablični pregled elektroforetskih i elektrokromatografskih procesa, te uvjeta pod kojima je separacija nemoguća. Iz navedenog razmatranja slijedi, da se izraz »elektrokromatografija« može upotrijebiti samo za diskontinuirane procese, jer u kontinuiranom procesu kromatografski efekt ne dolazi do izražaja. U poglavlju o terminologiji raspravlja se o pojediniim nazivima za elektromigracione procese, a naročito je istaknuta razlika između dvodimenzionalnih (ili višedimenzionalnih) procesa i dvosmjernih (ili višesmjernih) tehnika.

U eksperimentalnom dijelu opisano je kontinuirano elektroforetsko i dvodimenzionalno elektrokromatografsko razdvajanje smjese boja, koja se sastojala od: tropeolina O, fluoresceina, klorfenolnog crvenila, rozolne kiseline, krisoidina Y i nitranilina. Opisano je i kontinuirano elektroforetsko razdvajanje serumskih bjelančevina. Za separaciju bjelančevina uzet je nedijalizirani ljudski serum (γ plasmocytom).