

Beiträge zur Kenntnis der Papierelektrophorese in feuchter Kammer. I. Die papierelektrophoretische Trennfähigkeit

Zvonimir Pučar

Zentrales Medizinisch-Chemisches Laboratorium, Zagreb, Kroatien

Eingegangen am 18. Juli 1953.

Im Folgendem wird die Wirkung der physikalischen Vorgänge, die sich am Filterpapier während der Elektrophorese in feuchter Kammer abspielen, auf die apparente Bewegungsform der Kolloidteilchen studiert. Weiter wird gezeigt dass diese Bewegungsform vom verwendeten Arbeitsregime und von den elektrokinetischen Eigenschaften der Kolloidteilchen abhängt. Es ergibt sich daraus dass das verwendete experimentelle Verfahren einen grundsätzlichen Unterschied von allen anderen Elektrophoreseverfahren aufweist. Dieser Unterschied kann in konkretem Falle zur besserer Trennung der elektrokinetischen Fraktionen benützt werden.

EINLEITUNG

Bis jetzt sind in der Literatur zwei Methoden der elektrophoretischen Trennung am Filterpapier beschrieben worden:

1. Die Methode der Elektrophorese zwischen Glasplatten nach Cremer und Tiselius^{1, 2, 3}, die auch von theoretischer Seite bearbeitet wurde⁴. Das Einbetten des Filterpapiers zwischen Glasplatten verhindert während der Elektrophorese die Verdunstung von der Papieroberfläche.

2. Die Methode der Elektrophorese an in geschlossener Kammer freihängendem feuchtem Filterpapier. Nach diesser Methode wurden verschiedene Arbeitsweisen angegeben: a) Das Verfahren das nach Wieland^{5, 6, 7, 8, 9} an horizontal aufgespanntem Filterpapier arbeitet, welches von einer feuchten Atmosphäre umgeben ist (feuchte Kammer). Diese feuchte Kammer soll die Verdunstung nicht aufheben, sondern nur einen Gleichgewichtszustand zwischen Verdunstung, Konvektion und Wärmestrahlung von der Papieroberfläche aus aufrechterhalten. Dieses älteste Verfahren wird hier als »Papierelektrophorese in feuchter Kammer« bezeichnet. b.) Dem erwähnten Verfahren ähnlich ist das von Durrum^{10, 11} angegebene, wo der Filterpapierstreifen in feuchter Atmosphäre fast vertikal über einen Stützen aufgehängt wird. Neben der Verdunstung spielt hier auch noch die Gravitation eine nicht zu vernachlässigende Rolle. Die Feuchtigkeit des Filterpapierstreifens wächst in der Richtung von oben nach unten. c.) Dadurch, dass sich der Filterpapierstreifen an mehreren Stellen der Länge nach in Kontakt mit Pufferlösung befindet, und die feuchte Kammer statt mit Luft mit Helium oder Wasserstoff wegen der Konvektionsverstärkung angefüllt wird, versucht Mc. Donald¹² den Einfluss der Verdunstung auf die elektrophoretische Wanderung der Kolloidteilchen zu eliminieren. d.) Ferner versuchte Holt u. Mitarb.¹³ durch gleichzeitige Erwärmung und Kühlung der feuchten Atmosphäre dasselbe Ziel zu erreichen.

Soweit uns bekannt ist, gibt es z. Z. keine Literatur über die physikalischen Vorgänge, die sich am Filterpapier bei der Elektrophorese in feuchter Kammer abspielen, so dass wenigstens grundsätzliche Schlüsse bezüglich des Trennvorganges sowie eine allgemeine Prognose für ein angesetztes Experiment ermöglicht würden. Es soll gezeigt werden, wie in möglichst einfacher Weise diese Lücke in der Kenntnis der Methodik gefüllt werden kann.

THEORETISCHE BETRACHTUNGEN

Um sich in möglichst einfacher Weise über die verwickelten Vorgänge, die sich während einer Elektrophorese am Filterpapier nach der Methode der feuchten Kammer abspielen, klarzuwerden, stellen wir uns zunächst schematisch eine Apparatur vor (Abb. 1 oben).

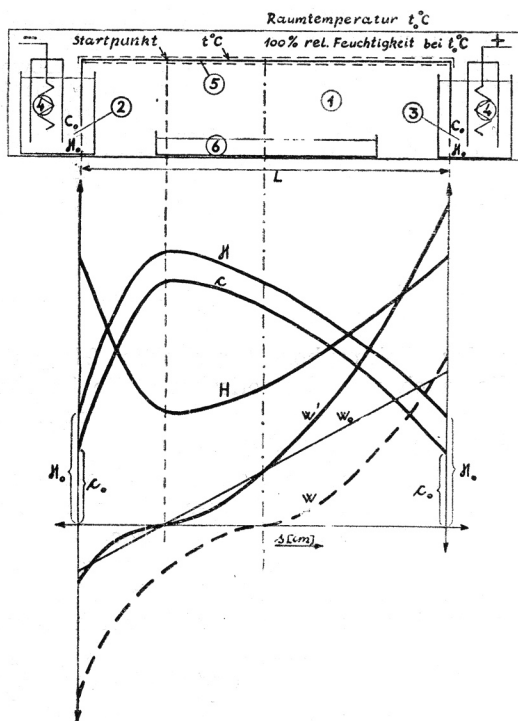


Abb. 1.: Oben: Schematische Darstellung einer Apparatur für die Elektrophorese in feuchter Kammer. Unten: Schematische Darstellung der c , κ , H und w Kurven in Abhängigkeit von der Entfernung s am Filterpapier. Es bedeutet: c die Elektrolytkonzentration, H die spezifische Leitfähigkeit des Elektrolyten, H die apparente elektrische Feldstärke am Filterpapier, und w die Elektrolytgeschwindigkeit am Filterpapier.

Slika 1.: Gore: Šematski prikaz aparature za elektroforezu metodom vlažne komore. Dolje: Šematski prikaz c , κ , H , i w krivulja u ovisnosti o udaljenosti s na filterpapiru. Oznake: c je koncentracija elektrolita, κ specifična vodljivost elektrolita, H aparentna jakost električnog polja na filterpapiru, a w je brzina elektrolita na filterpapiru.

Es bedeutet: (1) die feuchte Kammer, (2) (3) das kathodische, bzw. anodische Elektrodengefäß, (4) Platinelektroden, die in geeigneter Weise durch ein Syphonssystem blockiert werden müssen, damit sich die Änderungen der

Pufferlösung (Elektrolytlösung) durch Elektrolyse am Papier nicht bemerkbar machen, (5) den Filterpapierstreifen, (6) destilliertes Wasser, das nach dem Schliessen der Kammer die Feuchtigkeit wiederherstellt.

Der Filterpapierstreifen ist mit Elektrolytlösung durchtränkt, was in einfachster Weise nach Montierung des trockenen Streifens in die Apparatur nach 1—1,5 Stunden durch Kapillarkräfte des Filterpapiers geschehen kann. Während der Elektrophorese in feuchter Kammer findet infolge entwickelter Wärme eine erhebliche Verdunstung der Pufferlösung vom Papierstreifen statt. Es wird sofort klar, dass die Temperatur t des Papierstreifens und einer dünnen Schicht der feuchten Atmosphäre, die den Streifen umhüllt, etwas höher liegt als die Raumtemperatur t_0 , bei der die Kammer als 100% mit Wasserdampf gesättigt angenommen werden darf. Es folgt daraus dass die Atmosphäre in der Nähe des Papierstreifens nicht mit Wasserdampf gesättigt ist. Der Zweck der feuchten Kammer ist, in diesser Atmosphäre die maximal mögliche relative Feuchtigkeit für das betreffende Arbeitsregime, d. h. Stromspannung an den freien Enden des Streifens und Stromstärke je Zentimeter Papierbreite (Stromdichte) zu erhalten. Das verdunstete Wasser kondensiert an den Kammerwänden bei der Temperatur t_0 . Es resultiert ein Gleichgewichtszustand von Temperatur und relativer Feuchtigkeit, der letzten Endes ein Resultat der bereits entwickelten Wärme am Papierstreifen, der momentanen Stromleistung je cm Papierbreite, und der freien Länge des Filterpapierstreifens L ist. Die Dicke des Papierstreifens hat keinen Einfluss darauf.

So wie die Verdunstung der Pufferlösung von der Papieroberfläche fortschreitet, zieht das Papier, bei nicht allzu hohen Stromleistungen, kapillarisch frische Elektrolytlösung von beiden Seiten aus den Elektrodengefässen, so dass die Feuchtigkeit des Papiers konstant bleibt. Es resultiert daraus ein Fließen der Elektrolytlösung gegen die Mitte des Papiers. Diese Geschwindigkeit müsste ihr Maximum an den Enden des Streifens annehmen, und ihr Minimum, d. h. Geschwindigkeit Null, müsste in der Mitte des Streifens liegen. Die Kurve w (gestrichelt) (Abb. 1) gibt diese Geschwindigkeitsverteilung wieder, wie sie sich nach einer bestimmten Zeit, und bei einen bestimmten Arbeitsregime, längs des Filterpapierstreifens einstellt. Als positiv wurde die Geschwindigkeitsrichtung von der anodischen zur kathodischen Seite gewählt. Im allgemeinen werden alle Kurven mehr oder weniger nach links, bzw. kathodisch deformiert, infolge von elektroosmotischer Wirkung (Kurve w'). Gleichzeitig wächst auch die Konzentration des Puffers gegen die Mitte des Papierstreifens (Kurve c), und die spezifische Leitfähigkeit (Kurve κ). Die Konzentration des Puffers in den Elektrodengefässen, und gleichzeitig auch an den Enden des Papierstreifens, ist $c_0 = \text{Konst.}$ Da sich während der Elektrophorese, infolge von geeigneter Blockierung der Elektroden, keine Änderung der Elektrolytlösung in der Umgebung der eingetauchten Enden der Papiers bemerkbar machen darf, ist die spezifische Leitfähigkeit des Elektrolyts an dieser Stelle κ_0 auch konstant. Da die Feuchtigkeit des Papiers und die Stromstärke der Länge nach konstant ist, verlaufen die Kurve der elektrischen Feldstärke H spiegelbildlich zu den Kurven der spezifischen Leitfähigkeit κ .

Abbildung 1 stellt die Situation dar, wie sie sich nach der Zeit τ , bei Verwendung eines bestimmten Arbeitsregimes einstellt. Wird die Zeit bei diesem Arbeitsregime länger gewählt, verlaufen die Kurven schärfer, nach

kürzerer Zeit verlaufen sie, im Gegenteil, flacher als sie in Abb. 1 gegeben sind. Zur Zeit Null, am Anfang der Elektrophorese, degenerieren sämtliche Kurven, mit Ausnahme von w' in Gerade, die parallel zur Abszissenachse laufen. Am Anfang der Elektrophorese ist w' eine zur Abszissenachse geneigte Gerade (w_0). Die Stromstärke wächst mit der Zeit an. Die Gestalt sämtlicher Kurven müsste daher irgendwie abhängig sein von der bereits entwickelten Wärme am Papierstreifen, d. h. abhängig von der bereits verwendeten elektrischen Arbeit $A = \Delta E I \tau$, oder für $\Delta E = H'L$ und $I = \Delta E/R$:

$$A = \frac{\Delta E^2}{R} \tau \quad (1)$$

$$A = \frac{(H')^2 L^2}{R} \tau \quad (2)$$

Hier bedeutet A die el. Arbeit, ΔE die Stromspannung an den Enden des Papiers, I die Stromstärke, R den el. Widerstand des feuchten Papiers, H' die mittlere Feldstärke, und L die freie Länge des Papierstreifens. H' bleibt bei Verwendung von stabilisierter Spannung während der Elektrophorese fast konstant, man kann nur ein geringes Absinken der mittleren Feldstärke mit der Zeit beobachten, eine gute Konstruktion der Elektrodengefäße vorausgesetzt.

Offensichtlich wird die zugeführte el. Energie ausser durch Verdunstung auch noch durch Wärmestrahlung und Konvektion vom Filterpapierstreifen abgegeben. Diese Tatsache ändert aber nichts an der Behauptung, dass die Verdunstung abhängig ist von der zugeführten el. Energie, d. h. von der verwendeten el. Arbeit. Dafür brauchen auch nicht die auf die Verdunstung bzw. Konvektion und Wärmestrahlung entfallenden Anteile der Energie näher definiert zu sein.

Im freihängenden feuchten Filterpapierstreifen ist mit guter Annäherung $R = L/q\kappa$, wo q den freien Querschnitt des Streifens bedeutet. Die Änderung des Widerstandes R durch Änderung der Dicke oder Breite des Papierstreifens (bzw. q) spielt bei der Änderung der Gestalt der Kurven in Abb. 1 keine Rolle, da die dadurch bedingte Änderung der el. Arbeit A keinen Einfluss auf die Geschwindigkeit und Geschwindigkeitsverteilung der Elektrolytlösung längs des Papierstreifens hat. Dadurch wird die Gestalt der anderen Kurven auch nicht beeinflusst. Ein dickes Filterpapier hat aber den grossen Vorzug, dass sich mehr Substanz an derselben sichtbaren Oberfläche bei der Trocknung der Papierstreifen ansammelt, da es mehr Substanz aufzunehmen fähig ist, wobei das Elektroferrogramm nach Anfärben sehr viel an Kontrast gewinnt. Somit ist die Gestalt sämtlicher Kurven, und auch die elektrophoretische Trennfähigkeit, nicht einfach abhängig von der el. Arbeit A , sondern von dem Quotienten A/q .

Aus (1) und (2) folgt:

$$\frac{A}{q} = \frac{\Delta E^2}{L} \kappa \tau \quad (3)$$

$$\frac{A}{q} = (H')^2 L \kappa \tau \quad (4)$$

Im folgenden wird eine anodische elektrophoretische Bewegung der Kolloidteilchen betrachtet, die etwa am Ort, der mit einem Pfeil markiert ist

(Abb. 1), ihren Startpunkt hat. Eine kathodische Bewegung würde prinzipiell der anodischen Bewegung gleichen. Dabei soll davon abgesehen werden, dass die Beweglichkeit der Teilchen, wegen des Durchlaufens von Konzentrationsgradienten im Elektrolyt und der dadurch bedingten Änderung des ξ Potentials, nicht konstant ist. Die momentane Geschwindigkeit eines Kolloidteilchens mit der Beweglichkeit u im elektrischen Feld ist:

$$v = uH \quad (5)$$

Die apparente momentane Geschwindigkeit desselben Teilchens am Filterpapier ist aber kleiner um den Betrag der Elektrolytgeschwindigkeit die stets entgegengerichtet ist:

$$v' = uH - w' \quad (6)$$

oder:

$$\frac{dv'}{ds} = u \frac{dH}{ds} - \frac{dw'}{ds} \quad (7)$$

Im Moment wenn $u \cdot H = w'$ wird die apparente Geschwindigkeit v' Null. Da im Falle der Serumweiseselektrophorese wegen kleiner Beweglichkeit u der Teilchen normalerweise die Gradienten der Elektrolytgeschwindigkeit dw'/ds grösser sind als die dazugehörigen Werte von uH/ds , wird dv'/ds negativ. Das Teilchen erfährt eine Verzögerung der apparenten Geschwindigkeit, und es kommt letzten Endes immer zu Stillstand, wenn es nur die Länge des Papierstreifens und die Elektrophoresedauer gestattet.

Eine konstante apparente Geschwindigkeit ist gegeben durch $dv'/ds = 0$ oder $uH/ds = dw'/ds$, und eine apparente Beschleunigung des Teilchens durch $dv'/ds > 0$ oder $uH/ds > dw'/ds$.

Bei Fortschreiten der Elektrophorese wird schliesslich $w' > uH$, und damit die apparente Geschwindigkeit v' negativ.

Der zurückgelegte Weg muss um eine völlige Trennung zu erreichen, so gross wie möglich gewählt werden, da die elektrophoretische Trennung zweier elektrokinetisch verschiedenen Teilchen von zurückgelegten Wege abhängt. Bei der Elektrophorese in feuchter Kammer muss aber auch die Differenz der apparenter Wege zweier Teilchen am Filterpapier relativ gross sein. Es kann experimentell gezeigt werden, dass die Differenz der apparenter Wege $\Delta s = s_1 - s_2$ von zwei elektrokinetisch verschiedenen Teilchen um so grösser wird, je flacher die Kurven in Abb. 1, im Moment der Unterbrechung der Elektrophorese verlaufen. Aus dem Vorhergesagtem folgt, dass der Quotient A/q so klein wie möglich gehalten werden soll. Somit ergibt sich aus der Gleichung (3) (4) und $s = uH\tau$ folgendes:

a) Es ist nicht vorteilhaft die Elektrophoresedauer τ durch Erhöhung der Stromspannung ΔE abzukürzen, weil die ungünstigen Effekte von der zweiter Potenz der Stromspannung abhängen.

b) Es ist ungünstig, ein übermässig langes Papierstreifen zu benutzen.

c) Die spezifische Leitfähigkeit κ des Elektrolyts oder der Pufferlösung soll so klein wie möglich gehalten werden.

An Hand der bereits erwähnten Ergebnisse könnte man versuchen durch beliebige Herabsetzung der Elektrolytleitfähigkeit die besten Bedingungen für die Papierelektrophorese einer Substanz zu finden.

Bei der Herabsetzung der Elektrolytleitfähigkeit wächst tatsächlich die Differenz der apparenten Wege am Filterpapier, aber es wird uns leider bald klar, dass praktisch eine untere Grenze der Elektrolytleitfähigkeit für die Elektrophorese jeder betreffenden Substanz besteht. Bei zu kleinen Elektrolytleitfähigkeiten wird jede der Fraktionen als solche zu weit durch den elektrischen Strom auseinandergezogen, so dass das Elektroferrogramm diffus und ohne Kontrast erscheint.

Es ist uns hier zur Zeit unmöglich eine einwandfreie und, mit den von uns in dieser Richtung angestellten zahlreichen Experimenten, widerspruchslose Erklärung für dieses Auseinanderziehen der Fraktionen zu geben.

Wegen dieses »Ausdehnungseffektes« besteht für die Elektrophorese jeder Substanz, um die Differenz der apparenten Wege der einzelnen Fraktionen so gross wie möglich zu gewinnen, bei gleichzeitig gutem Elektroferrogrammkontrast eine optimale spezifische Elektrolytleitfähigkeit. Aus den Gleichungen (3) (4) und (6) ergibt sich dass auch die Grössen ΔE , L und τ im Falle der Elektrophorese in feuchter Kammer nicht willkürlich gewählt werden können, um nach den bekannten Elektrophoresegleichungen einen gewünschten Effekt zu erzielen, weil jede von ihnen ein von der der Elektrophorese unterworfenen Substanz abhängiges praktisches Optimum besitzt.

EXPERIMENTELLES

Um den Vorgang der elektrophoretischer Trennung anschaulich zu machen, benutzen wir ein Diagramm (Diagramme 1—9), das wir als »Diagramm der elektrophoretischen Trennung« bezeichnen.* Auf der Ordinate wird jeweils der apparente Weg s in Zentimetern und auf der Abszisse die Elektrophoresedauer τ in Stunden aufgetragen. Der Ausgangspunkt des Koordinatensystems gibt uns den Startpunkt der Elektrophorese wieder. Alle vorstehenden Diagramme entstammen der Elektrophorese des humanen Serums ohne vorangehende Dialyse. Das Serumweiß besteht bekanntlich aus fünf Eiweissfraktionen: aus Albumin (A) und α_1 , α_2 , β und γ Globulinen. Alle Fraktionen haben eine anodische Beweglichkeit im el. Felde. Um ein Diagramm aufzuzeichnen, benötigen wir vier parallelgeschaltete Filterpapierstreifen, auf denen wir gleichzeitig und unter denselben Bedingungen die Elektrophorese in Gang setzen. In bestimmten Zeitabständen wird der Apparatur ein Streifen nach dem anderen entnommen, und die Eiweissfraktionen durch Anfärben mit Amidoschwarz 10 B sichtbar gemacht.

Die Streifen werden dann rechtwinklig zur Abszissenachse des Koordinatensystems auf die zugehörige Elektrophoresedauer τ aufgesetzt, und zwar so, dass der Startstrich genau mit der Abszissenachse in Deckung gebracht wird. Nun werden Ort und Länge jeder Fraktion durch eine Gerade parallel zur Ordinate im Koordinatensystem markiert, und die Anfangs- und Endpunkte der zugehörigen Geraden durch Kurven verbunden. Alle Anfangskurven (Kurven, die die Anfangspunkte der Fraktionen verbinden) laufen bei $\tau = 0$ auf die Ordinate $+0,5$ cm., und alle Endkurven auf die Ordinate $-0,5$ cm., weil am Anfang der Elektrophorese der Serumfleck am Papier immer 1 cm. breit war. Wenn wir an einem solchen Fächerdiagramm zwischen der Anfangs- und Endkurve einer Fraktion eine Mittellinie konstruieren, (am Diagramm 8 und 9 wiedergegeben), gibt uns der Tangens der Tangentenwinkel unmittelbar die apparente Geschwindigkeit v' der betreffenden Fraktion in jedem Augenblick wieder [siehe auch Gleichung (6)].

An jedem Diagramm ist jeweils auch eine gestrichelte Gerade die Mitte des Filterpapierstreifens, und durch einen Pfeil die maximale Differenz der apparenten Wege von Albumin und γ Globulinfraktion (Δs_{\max}) angegeben. Unter jedem Diagramm sind folgende Daten verzeichnet: Die Stromspannung an den freien Enden des Papierstreifens ΔE (Wegen Spannungsabfall in Elektrodengefässen wurde für

* Ein ähnliches Diagramm ist auch von Holt u. Mitarb. angegeben worden¹³.

ΔE 120 V, 240 V und 360 V die Klemmspannung U von 140 V, 280 V, bzw. 420 V verwendet). L ist die freie Länge des Papierstreifens, und κ die spezifische Leitfähigkeit des verwendeten Elektrolyts (Puffers) bei 25°C. Das verwendete Filterpapier war Munktell No. 20/150. Mit Whatmann No. 1 Filterpapier wurden gleiche Resultate erhalten, ausgenommen im Falle von Arbeitregime die an den Diagrammen 5 und 6 wiedergegeben sind. Hier wurden infolge von bedeutend schwächerer Kapillarität des Whatmann No. 1 unorganisierte Elektroferrogramme bei grösserer Elektrophoresedauer erhalten. Solche »wirbelförmige« Deformierung der Fraktionsbilder haben wir im allgemeinen immer dann beobachtet, wenn die Kapillarität des Filterpapiers nicht zur Aufrechterhaltung der ursprünglichen Feuchtigkeit des Papiers ausreichte. Es wurde ein Na-Veronal Na-Azetat HCl Puffer mit $p = 8,60$ als Elektrolytlösung verwendet. B ist die Konzentration des dissoziierten Anteiles der Diethylbarbitursäure in Mol/Lit. Die Konzentration des zugefügten Na-Azetats war immer $c = B \times 1,415$. Bei $pH = 8,60$ kann Na-Azetat, infolge seiner Dissoziationskonstante, als völlig dissoziiert angesehen werden, und demzufolge ist durch B die Zusammensetzung und Konzentration jeder der verwendeten Pufferlösungen definiert. Die Beschreibung der verwendeten Experimentalapparatur wird in kurzer Zeit in der II. Mitteilung dieser Reihe erscheinen.

RESULTATE

Die Diagramme 1 bis 4 geben bei Verwendung von optimaler Stromspannung das Anwachsen der Trennfähigkeit durch sukzessive Verminderung der Elektrolytkonzentration, bzw. der spezifischen Leitfähigkeit wieder. Obwohl am Diagramm 4 die grösste Differenz Δs erreicht war, erschien wegen Unterschreitung der minimal erforderlichen Elektrolytleitfähigkeit der Kontrast des Elektroferrogramms bedeutend schwächer als im Experiment No. 3.

Am Diagramm No. 7 ist die Differenz der apparenten Wege von Albumin und γ Globulinfraktion als Funktion der Elektrophoresedauer für alle vorliegenden Diagramme angegeben. Kurve 1 gibt an, dass die maximale Trennung nach 21 Stunden erreicht war, und bei weiteren Fortschreiten der Elektrophorese ein »Zusammenziehen« des Elektroferrogramms stattgefunden hat. Kurve 2 gibt nach 21 Stunden eine Stagnierung des Δs an.

Die Diagramme 5 und 6 geben den Trennungsvorgang bei erhöhter Klemmspannung wieder (280 V bzw. 240 V). In beiden Fällen war die Pufferlösung identisch mit derjenigen die im Experiment 2 verwendet wurde. Das Elektroferrogramm war, im Einklang mit dem Vorhergesagten, gegen die Mitte des Papierstreifens (d. i. den Ort wo $w' \approx 0$) zusammengepresst und das Diagramm der elektro-phoretischen Trennung ist dem ähnlich, das im Experiment 1 bei Verwendung von niedriger Spannung, aber grösserer Elektrolytleitfähigkeit gewonnen wurde. Aus Diagramm 7, Kurve 5 und 6 ist ersichtlich, dass eine maximale Trennung nach 13 bzw. 2 Stunden erfolgte.

Bei der Besprechung der Gleichung 7 haben wir behauptet, dass die Teilchen normalerweise eine Verzögerung der apparenten Geschwindigkeit erleiden, wegen $u dH/ds < dw'/ds$. Es liegt jetzt nahe, durch künstliche Krümmung der H Kurve, bevor die Substanz appliziert wird, die Bedingung $u dH/ds > dw'/ds$ zu realisieren, und somit eine Beschleunigung der Teilchen zu erzielen. Für dieses Experiment verwendeten wir folgende Daten: $\Delta E = 120$ V, $L = 27$ cm, $B = 0,0156$ Mol/Lit und $\kappa = 0,0026 \Omega^{-1} \text{cm}^{-1}$. Vor der Applizierung des Serums verwendeten wir zur künstlichen Krümmung der H Kurve die elektrische Arbeit von 4900 Wattsekunden für je 1 cm. Papierstreifenbreite. Tatsächlich resultierte eine ständige Beschleunigung der Albuminfraktion (Diagramm 8). Wegen der etwas kleineren Beweglichkeit der α_1 Globuline wurden zufälligerweise die zugehörigen $u dH/ds = dw'/ds$, und es resultierte eine konstante apparente Geschwindigkeit dieser Fraktion $dw'/ds = 0$. Bei dem Übergang zu α_2 Globulinen stellen wir eine leichte Verzögerung der apparenten Bewegung fest, infolge von verminderter Beweglichkeit. Durch das nächste Experiment wird die etwas seltsame Bewegung der β und besonders γ Globuline erläutert.

Bei allen bereits besprochenen Experimenten war es charakteristisch das die Abszisse des Minimums der H Kurve ungefähr mit der Abszisse des Punktes

$w' = 0$ übereinstimmte. Theoretisch wäre es von Interesse das bereits besprochene Experiment mit künstlicher Krümmung der H Kurve so zu modifizieren, dass diese Charakteristik nicht zutrifft. Der vor dem eigentlichen Experiment zur künstlichen Krümmung der H Kurve dienende el. Strom, wurde jetzt in entgegengesetzter Richtung durch die Apparatur getrieben. Die dazu verwendete el. Arbeit war wieder

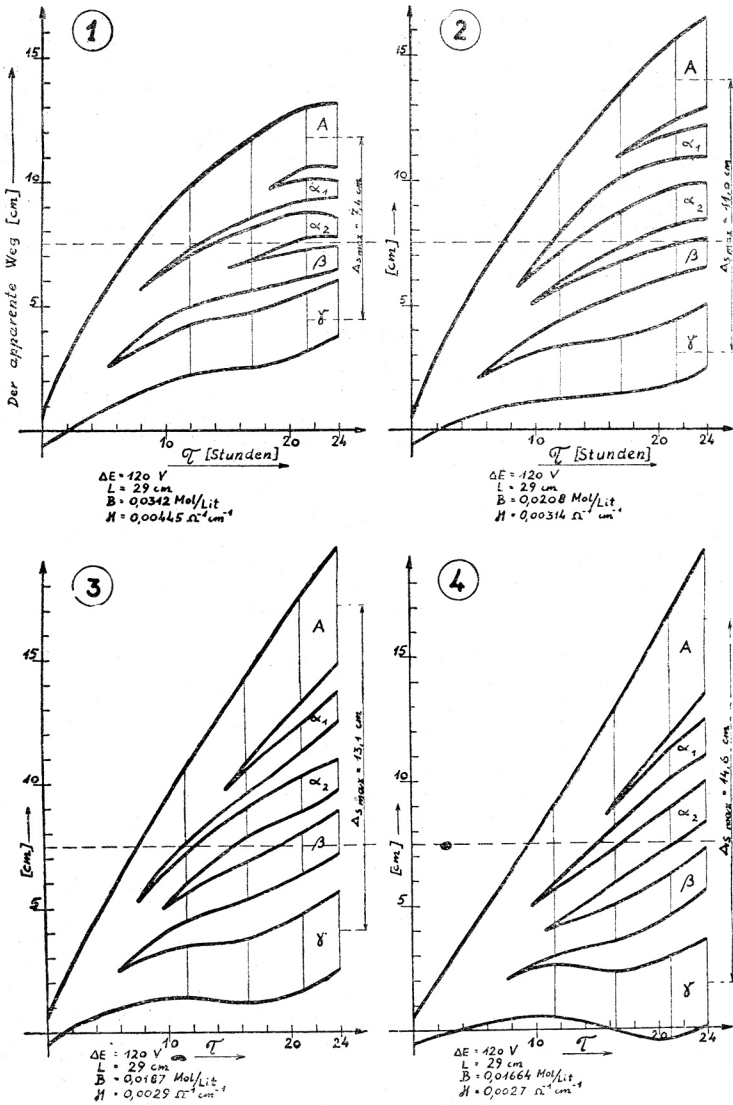


Abb. 2.: Die Diagramme der elektrophoretischen Trennung No. 1—4 sind am Beispiel der Elektrophorese der Eiweissfraktionen des humanen Serums wiedergegeben. Die Diagramme geben bei Verwendung von optimaler Stromspannung das Anwachsen der Trennfähigkeit durch sukzessive Verminderung der spezifischen Leitfähigkeit des Elektrolyten wieder.

Slika 2.: Dijagrami elektroforetskog razdvajanja bjelančevina humanog seruma. Dijagrami 1—4 prikazuju porast razdvajanja komponenta smanjivanjem specifične vodljivosti elektrolita, uz primjenu optimalnog el. napona.

cca 4900 Wattsekunden pro cm. Breite. Darauf wurde die Stromrichtung umgeschaltet, und das Serum appliziert. Bei der Umschaltung der Stromrichtung war der Punkt $w' = 0$ wegen Elektrosmose auf die kathodische Seite versetzt. Gleichzeitig blieben aber das Maximum der c Kurve und das Minimum der H Kurve an der jetzt anodischen Seite. Wie zu erwarten war, durchlief die Elektrophorese drei charakteristische Zeitperioden (Diagramm 9): die Zeitperiode A, zwischen 0 und cca 12

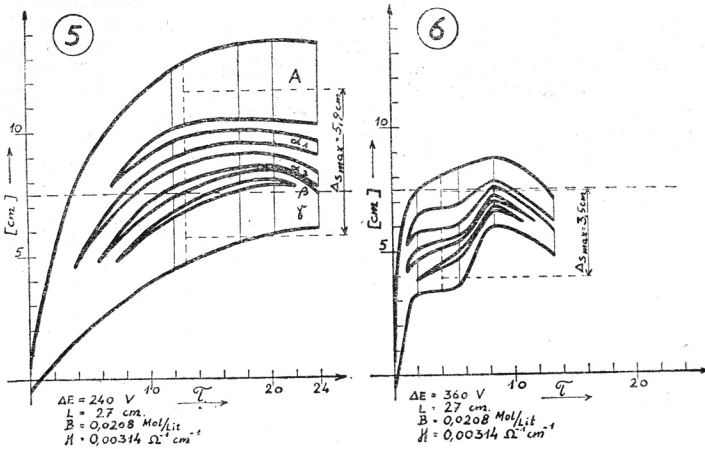


Abb. 3.: Die Diagramme 5 und 6 geben den Trennungsvorgang bei erhöhter Klemmspannung (280 V, bzw. 420 V) wieder. In beiden Fällen war die Konzentration der Pufferlösung identisch mit derjenigen, die im Experiment 2 verwendet wurde.

Slika 3.: Dijagramima 5 i 6 prikazan je tok razdvajanja kod povišenog el. napona. U oba slučaja bila je koncentracija elektrolita identična s koncentracijom iz eksperimenta 2.

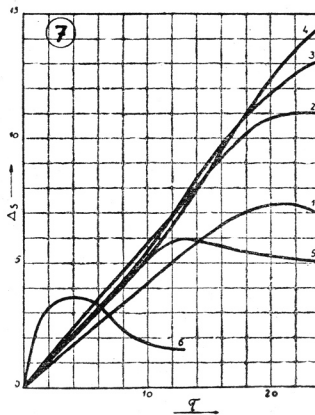


Abb. 4.: Diagramm 7 gibt die Differenz der apparenten Wege von Albumin und γ Globulinfraktion als Funktion der Elektrophoresedauer für die vorliegende Diagramme der elektrophoretischen Trennung wieder. Die Nummerierung der Kurven entspricht den bereits angegebenen Diagrammen.

Slika 4.: Dijagramom 7 prikazana je razlika aparentnih putova albumina i γ globulina kao funkcija trajanja elektroforeze. Brojevi krivulja označuju odnosni dijagram elektroforetskog razdvajanja.

Stunden, wo infolge von $u dH/ds < dw'/ds$ eine Verzögerung der Bewegung stattfand, die Zeitperiode B, zwischen 12 und 18 Stunden, wo es infolge von $u dH/ds > dw'/ds$ zu einer Beschleunigung der apparenter Bewegung kann; schliesslich die Zeitperiode C, nach cca 18 Stunden, in der infolge von $u dH/ds < dw'/ds$ wieder eine Verzögerung

der apparenten Bewegung stattfand. Die drei zugefügten Skizzen A, B und C illustrieren die jeweiligen Zustände der H und w' Kurven. Es wurden hier nicht direkt die H Kurven angegeben, sondern das Produkt uH , wo u die Beweglichkeit eines bestimmten Teilchens bedeutet. Da dieses Produkt die wahre Geschwindigkeit des Teilchens bedeutet, gibt die Differenz der beiden Kurven unmittelbar die apparente Geschwindigkeit wieder. Die mittlere gestrichelte senkrechte Linie in den Skizzen gibt die Lage der Papierstreifenmitte, und die linksstehende gestrichelte Linie die Lage des Startpunktes wieder. Man kann daraus ersehen, dass auch im Falle der normalen Arbeitsmethode wenn namentlich H_{\min} , $w' = 0$ und der Startpunkt nicht ganz übereinstimmen durch solche Änderung der H und w' Kurvenzustände, die durch sukzessive katodische Wanderung des $w' = 0$ Punktes zustande kommen kann, die γ Globulinenfraktion, in viel kleineren Masse auch die β Globulinenfraktion, zu »S«-förmiger Bewegung gezwungen werden. (Diagramme 1, 2, 3, 4, 6, und 8). Dieses ist dadurch bedingt, dass sie sich fast immer zwangsläufig,

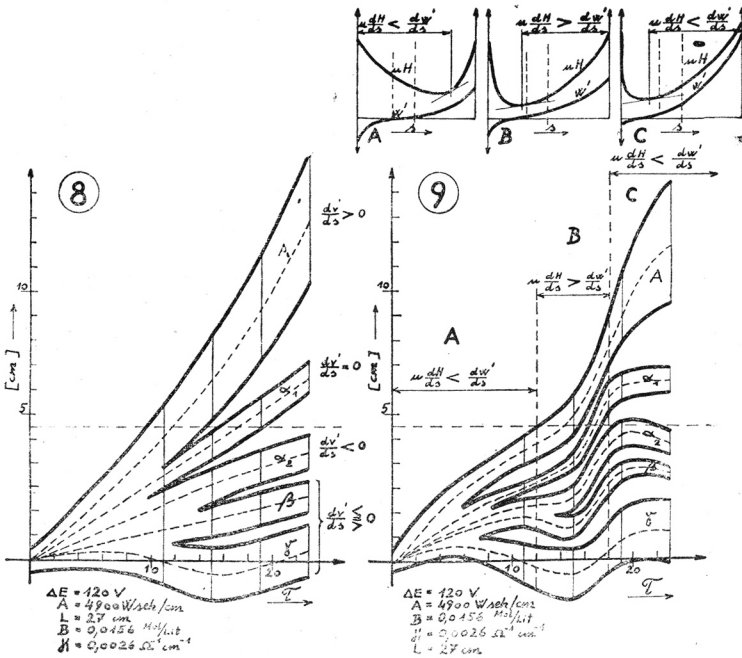


Abb. 5.: Diagramm 8 gibt den Experiment mit der künstlichen Krümmung der H Kurve wieder. Vor der Applizierung des Serums wurde die elektrische Arbeit von 4900 Wattsekunden für je 1 cm. Papierstreifenbreite verwendet. Es resultierte eine ständige apparente Beschleunigung der Albuminfraktion. Wegen etwas kleinerer Beweglichkeit war die apparente Geschwindigkeit der α_1 Globuline konstant, bzw. die α_2 Globuline erfuhren eine kleine Verzögerung der Bewegung.

Die etwas seltsame Bewegung der β und γ Globuline wird durch Diagramm 9 erläutert.

Diagramm 9.: Alle Daten wie im Experiment 8, mit der Ausnahme, dass der elektrische Strom für die künstliche Krümmung der H Kurve in entgegengesetzter Richtung durch die Apparatur getrieben wurde. Die Elektrophorese durchlief drei charakteristische Zeitperioden. Die Zeitperiode A ist durch die Verzögerung, die Periode B durch die Beschleunigung, und die Periode C wieder durch die Verzögerung der Bewegung gekennzeichnet.

Slika 5.: Dijagram 8 prikazuje eksperiment s umjetno proizvedenom krivuljom električnog polja. Prije same aplikacije seruma upotrebljena je električna radnja od 4900 watekunda. Aparentno gibanje albumina bilo je ubrzano, dok je, zbog nešto manje pokretljivosti, aparentna brzina α_1 globulina bila konstantna, a α_2 globulini su se gibalni usporeno. Gibanje β i γ globulina objašnjuje dijagram 9.

Dijagram 9.: Podaci kao i u eksperimentu 8, samo je upotrebljena struja za stvaranje umjetne krivulje el. polja bila protivnog smjera. Elektroforeza prolazi vremenski kroz tri karakteristične periode. Periodu A karakterizira aparentno usporenje, periodu B ubrzanje, a periodu C opet usporenje čestica.

wegen kleiner Beweglichkeit, in der Gegend befinden, wo solche Änderungen stattfinden können, und ausserdem weil die Form der H Kurven, wegen der kleinen Beweglichkeit, für ihre apparente Wanderung nicht allein ausschlaggebend ist.

SCHLUSSFOLGERUNG

Beim Durchgang des el. Stromes durch das mit Elektrolyt durchtränkte Filterpapier kommt es infolge der entwickelten Wärme zur Verdunstung des Lösungsmittels, bzw. zur Erhöhung der Elektrolytkonzentration. Da aber die ursprüngliche Feuchtigkeit des Filterpapiers infolge der Kapillarkräftewirkung erhalten bleibt, ist die Feldstärke am Papier der Länge und der Zeit nach nicht konstant. Demzufolge ist auch der Gradient der Geschwindigkeit der kapillarisch zuströmenden Elektrolytlösung nicht konstant. Für einen bestimmten Zeitpunkt kann der Verlauf der el. Feldstärke und der Geschwindigkeit der kapillarisch zuströmenden Elektrolytlösung durch stetig verlaufende Kurven dargestellt werden, die infolge elektroosmotischer Wirkung kathodisch deformiert sind. Von da aus ergibt die Verknüpfung des Experiments und der theoretischen Betrachtung folgendes:

1. Es wird experimentell gezeigt, dass eine bestimmte Substanz um so besser durch den el. Strom getrennt wird, je flacher die Kurven der Feldstärke und der Elektrolytgeschwindigkeit im Moment der Unterbrechung der Elektrophorese verlaufen. Daraus folgt, dass der Quotient A/q (A = el. Arbeit, q = der freie Querschnitt des Papiers) so klein wie möglich gehalten werden muss, bzw. die Papierstreifenlänge, die spez. Leitfähigkeit des Elektrolyts und besonders die Stromspannung klein gewählt werden müssen.

2. Da sich die apparente Geschwindigkeit eines bestimmten Teilchens als Resultante von zwei einander entgegengerichteten Geschwindigkeiten darstellt (elektrophoretische Geschwindigkeit $u \cdot H$, und die Zuströmung der Elektrolytlösung w'), und da diese Geschwindigkeiten in einem bestimmten Zeitpunkt als Funktion der Entfernung »s« längs des Papierstreifens angesehen werden können, ist offenbar im allgemeinen die apparente Geschwindigkeit, mit Ausnahme eines Spezialfalls, nicht konstant. Es ist von ausserordentlichem Interesse, dass die Form der apparenten Bewegung eines Teilchens nicht nur von der Gestalt der erwähnten Kurven, sondern auch von der Beweglichkeit des Teilchens abhängt. Das Teilchen erfährt eine apparente Beschleunigung bzw. Verzögerung der Bewegung, je nach dem $u \cdot dH/ds \cong dw'/ds$ ist. Im Spezialfall $u \cdot dH/ds = dw'/ds$ ist die apparente Geschwindigkeit konstant. Bei grossen Beweglichkeiten der Teilchen wird die Bewegung durch die H Kurve diktiert, bei mittleren Beweglichkeiten kommt die Wechselwirkung zwischen H und w' Kurve zum Ausdruck, und bei sehr kleinen Beweglichkeiten ist nur die w' Kurve die ausschlaggebende. Es kann zum Beispiel an einem identischen Ort und im selben Zeitpunkt ein Teilchen mit grösserer Beweglichkeit eine apparente Beschleunigung erfahren, während ein anderes, mit kleinerer Beweglichkeit, gleichzeitig eine apparente Verzögerung erfährt. Dieses ist bei allen anderen Elektrophoreseverfahren unmöglich. Dadurch wird auch die gute Trennfähigkeit der Elektrophorese in feuchter Kammer, und besonders die Trennung der α_1 Globuline von der Albuminenfraktion, bei Voraussetzung einer zweckmässigen Auswahl des Arbeitsregimes, erklärt.

Wenn wir uns alles, was vorher gesagt wurde, und besonders noch die Tatsache, dass praktisch eine untere Grenze der verwendbaren Elektrolytleitfähigkeit besteht, vor Augen halten, können wir behaupten, dass für die

Elektrophorese jeder einzelnen Substanz eine optimale Elektrolytleitfähigkeit, Stromspannung, Papierstreifenlänge und Elektrophoresedauer besteht. Die Trennfähigkeit zeigt also ein aussgesprochenes Optimum.

Der experimentelle Teil, der die erwähnten Beziehungen am Beispiel der Serumeiweisselektrophorese illustrieren sollte, ist durch die Diagramme der elektrophoretischen Trennung wiedergegeben worden.

LITERATUR

1. H. Cremer und A. Tiselius, *Biochem. Z.* **320** (1950) 273.
2. G. Schneider, *Acta Chem. Scand.* **5** (1951) 1021.
3. G. Schreider und Ch. Wunderly, *Schweiz. med. Wochschr.* **16** (1952) 445.
4. H. G. Kunkel und A. Tiselius, *J. Gen. Physiol.* **35** (1951) 89.
5. Th. Wieland, *Angew. Chem.* **60** (1948) 313.
6. F. Turba und H. J. Enekel, *Naturwissenschaften* **37** (1950) 93.
7. W. Grassmann und K. Hannig, *Naturwissenschaften* **37** (1950) 496.
8. W. Grassmann, K. Hannig und M. Knedel, *Deut. med. Wochschr.* **76** (1951) 333.
9. W. Grassmann und K. Hannig, *Z. Physiol. Chem.* **290** (1952) 1.
10. E. L. Durrum, *J. Am. Chem. Soc.* **72** (1950) 2943.
11. F. V. Flynn und P. de Mayo, *Lancet* **261** (1951) 235.
12. H. J. Mc. Donald, *J. Chem. Educ.* **29** (1952) 428.
13. C. V. Holt, K. D. Voigt und K. Gaede, *Biochem Z.* **323** (1952) 343.

IZVOD

**Prilog upoznavanju elektroforeze na filtarpapiru metodom vlažne komore.
I. Elektroforetsko razdvajanje komponenata.**

Zvonimir Pučar

Koliko je nama poznato, nema do danas literature o fizikalnim promjenama, do kojih dolazi na samom filtarpapiru za vrijeme elektroforeze u vlažnoj komori, a koja bi dala barem osnovan uvid u proces razdvajanja, kao i principijelnu mogućnost postavljanja prognoze nekog praktičkog eksperimenta. Prikazan je jednostavan način, kako se ova praznina u poznavanju metode može upotpuniti.

Pri prolazanju električne struje kroz filtarpapir, koji je natopljen elektrolitom, dolazi zbog razvijene topline do isparavanja otapala, odnosno do povećanja koncentracije elektrolita. Budući da se prvobitna vlažnost filtarpapira za vrijeme elektroforeze podržava djelovanjem kapilariteta, nije jakost električnog polja po dužini papira i po vremenu konstantna. Zbog toga nije ni gradijent brzine kapilarnog strujanja elektrolita konstantan. Krivuljama se može prikazati jakost električnog polja i kapilarna brzina elektrolita u određenom momentu u ovisnosti o mjestu na filtarpapiru. Te su krivulje zbog elektroosmoze više ili manje deformirane prema katodnoj strani filtarpapira. Uzevši u obzir eksperiment i teoretsko razmatranje izlazi:

1) Eksperimentalno se može pokazati, da će se djelovanjem el. struje određena supstacija to bolje rastaviti na komponente, što je tok krivulja električnog polja i kapilarne brzine elektrolita plosnatiji u momentu prekidanja elektroforeze. Izlazi, da kvocijent A/q (A = el. radnja, q = slobodan presjek papira) treba držati što manjim, t. j. upotrebljena dužina papirne trake, specifična vodljivost elektrolita, a naročito upotrebljen el. napon mora biti po mogućnosti što manji.

2) Budući da je aparentna brzina neke čestice na papiru rezultanta dviju brzina, koje su protivnog smjera (elektroforetske brzine u, H , i brzine elektrolita w'), a jer se spomenute brzine mogu u određenom momentu smatrati nekom funkcijom udaljenosti na filtarpapiru »s«, očito je, da aparentna brzina čestice, osim u jednom specijalnom slučaju, ne će biti konstantna. Od naročitog je interesa, da oblik gibanja čestice nije samo funkcija toka spomenutih krivulja, nego zavisi i od same pokretljivosti čestice. Čestica će doživjeti aparentno ubrzanje, odnosno usporenje, već prema

tome, da li je $u \cdot dH/ds \cong dw'/ds$. U specijalnom slučaju, t. j. kad je $u \cdot dH/ds = dw'/ds$, aparentna brzina čestice je konstantna. Ako je pokretljivost čestica velika, gibanje je diktirano krivuljom jakosti el. polja, kod srednjih pokretljivosti dolazi do izražaja uzajamno djelovanje H i w' krivulja, a kod vrlo malih pokretljivosti oblik gibanja određuje samo krivulja brzine elektrolita. Tako se može, na primjer, na nekom mjestu u isto vrijeme neka čestica s većom pokretljivošću gibati ubrzano, a druga s manjom pokretljivošću usporeno. To je kod svih ostalih metoda elektroforeze nemoguće. Time se može protumačiti dobra moć odvajanja α_1 globulina od frakcije albumina.

Uzmemo li u obzir sve, što je naprijed bilo rečeno, uključivši ovamo i činjenicu, da se praktički ne mogu upotrebljavati elektroliti po volji male vodljivosti, možemo zaključiti, da za elektroforezu svake pojedine supstancije postoji optimalna vodljivost upotrebljenog elektrolita, optimalna dužina trake filterpapira i optimalni el. napon.

Eksperimentalni dio, koji ilustrira razdvajanje smjesa liofilnih koloida na primjeru bjelančevina seruma, prikazan je pomoću dijagrama elektroforetskog razdvajanja.