

## Vergleichsmessungen an Papier-Elektrophoresestreifen mit vier verschiedenartigen optischen Geräten

In einer vorhergehenden Mitteilung<sup>1</sup> beschrieben wir ein photoelektrisches Auswertegerät, bei dem das Messprinzip auf der Registrierung der Reflektionsintensität beruht. Wir wiesen nach, dass der Lichtstrahl auch den nicht durchsichtiggemachten Elektrophoresestreifen ganz durchdringt. Wir verwandten Whatman-Papier Nr. 1 bzw. Papier entsprechender Stärke, doch nicht immer gleicher Homogenität.

In einer neuen Versuchsreihe verglichen wir die Messergebnisse unseres photoelektrischen Reflektometers mit drei anderen Messverfahren. Wir massen unsere Pherogramme mit dem Kugelreflektometer am nicht durchsichtig gemachten Streifen (Pulfrich-Photometer mit Ulbrichtscher Kugel), mit dem Pulfrich-Photometer in der Sonderausführung für Schwärzungsmessungen in Durchsicht, mit dem Schnellphotometer in Durchsicht und mit unserem Reflektometer.

Das Pulfrich-Photometer mit Ulbrichtscher Kugel wird im allgemeinen in technischen Betrieben benutzt, um zum Beispiel Farbe, Transparenz, Remission rauher oder genarbter Oberflächen von Papierproben usw. zu messen. Der Vorteil des Gerätes liegt in der gleichmässigen diffusen Beleuchtung des Objektes unter Vermeidung der Fehlerquellen, die bei einseitig gerichteter Beleuchtung durch Schattenwirkungen in Oberflächenstrukturen entstehen. Zur Messung selbst dient der übliche Pulfrich-Photometer-Ansatz.

Das Schnellphotometer von Zeiss dient üblicherweise zum Ausmessen von Spektralplatten, die bei spektrochemischen Analysen mit dem Zeißschen Quarzspektrographen Q 24 erhalten werden.

Wir färbten, wie an anderer Stelle berichtet<sup>2</sup>, die Pherogramme mit Ponceau 2 R und stellten bei Beginn der Messungen die Lage der stärksten Absorption des Farbstoffes fest. Das dabei gefundene Grünfilter wurde sowohl beim Kugelreflektometer als auch beim Pulfrich- und Schnellphotometer benutzt.

Die im Kugelreflektometer und im Pulfrich-Photometer gemessene Fläche bildet einen Halbkreis von etwa 2 mm<sup>2</sup> Radius, die wirksam photometrierte Fläche etwa 4,2 mm<sup>2</sup>. Beim Schnellphotometer wurde bei grösster Spaltbreite und Höhe eine Objektfläche von 1 × 0,15 mm<sup>2</sup> gemessen. Wir haben bei den drei Geräten der Firma Zeiss die Messungen alle 5 mm durchgeführt, in unserem Gerät alle 1 mm.

Zur Durchsichtigmachung des Filtrierpapierstreifens benutzten wir ein Gemisch von Monobromnaphthalin und Paraffinöl mit einem Berechnungsindex von 1,515.

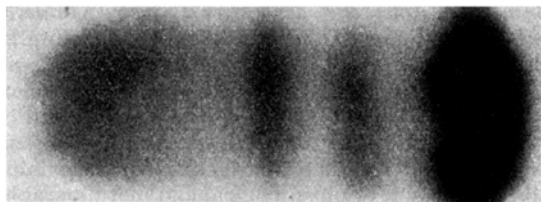


Abb. 1.

Uns kam es darauf an, an Hand der Vergleichsuntersuchungen nachzuweisen, dass unser photoelektrisches

Reflektometer zumindest den übrigen Messverfahren gleichwertig ist. Dies galt insbesondere dem Messverfahren in der Durchsicht nach der Methode GRASSMANN und HANNIG<sup>1</sup>. Wir sind der Ansicht, dass die Messung

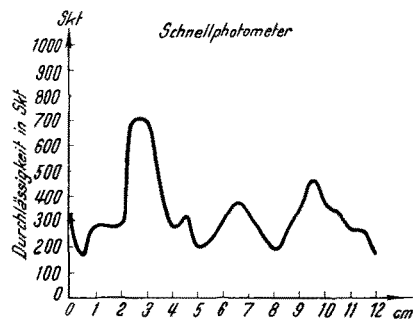


Abb. 2.

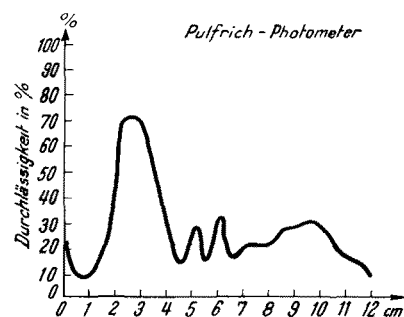


Abb. 3.

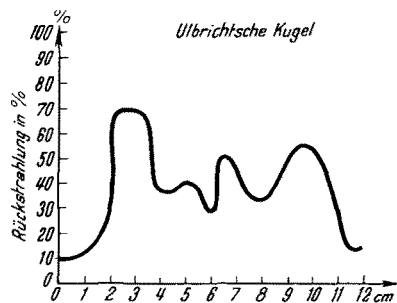


Abb. 4.

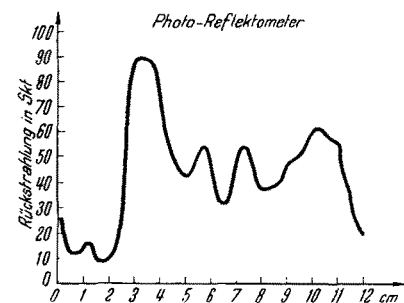


Abb. 5.

in der Durchsicht mit dem Pulfrich-Photometer und mit dem Schnellphotometer diesem Verfahren gleichwertig sind, wenn auch im Falle des Pulfrich-Photometers keine Photozelle benutzt wird, sondern die Messung in der bekannten Weise durch Einstellen der Blende erfolgt. Wir

<sup>1</sup> H. RÖTTGER, Klin. Wschr. 31, 55 (1953).

<sup>2</sup> H. RÖTTGER, Naturwiss. 39, 451 (1952).

<sup>1</sup> W. GRASSMANN und K. HANNIG, Naturwiss. 37, 496 (1950).

konnten feststellen, dass bei der Durchsichtmessung die Streuung der Einzelwerte infolge der Faserstruktur des Papiers – auch bei Whatman Nr. 1 – sehr gross ist. Diese Streuung ist bei unserem Gerät wie auch beim Kugelreflektometer nicht vorhanden.

Des weiteren möchten wir mit unserer Mitteilung auf die Verwendungsmöglichkeiten sowohl des Pulfrich-Photometers in der genannten Modifikation für die Durchsichtmessung als auch des Kugelreflektometers in der Aufsichtmessung hinweisen.

Wir haben in unseren Abbildungen neben dem Elektrophoresestreifen die vier erhaltenen Kurven aufgezeichnet. Der Vergleich der einzelnen Kurven ergibt die Vorteile unseres Gerätes. Die Trennungen der einzelnen Eiweissfraktionen treten deutlich in Erscheinung, die « Extinktionswerte » werden mit gleich grossen Unterschieden in der Höhe, wenn nicht noch differenter hinsichtlich der Trennungsunterschiede, wiedergegeben. Die Verschiedenartigkeit der Kurvenformen ist nach unseren eingehenden Messungen durch das Meßsystem des jeweilig benutzten Gerätes bedingt.

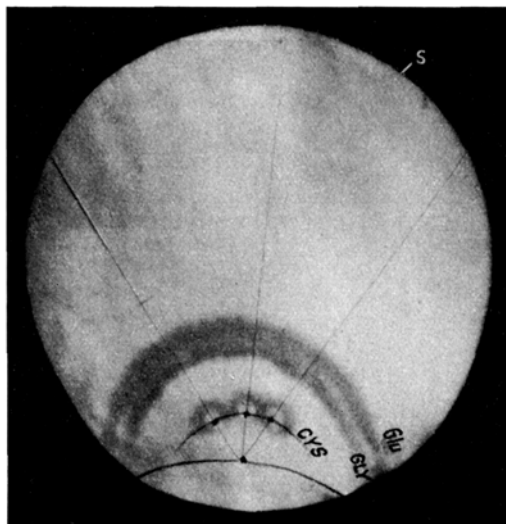
H. RÖTTGER

*Aus der Staatlichen Rheumaklinik und Rheumaforschungsanstalt des Staatsbades Elster, den 1. Februar 1953.*

### Summary

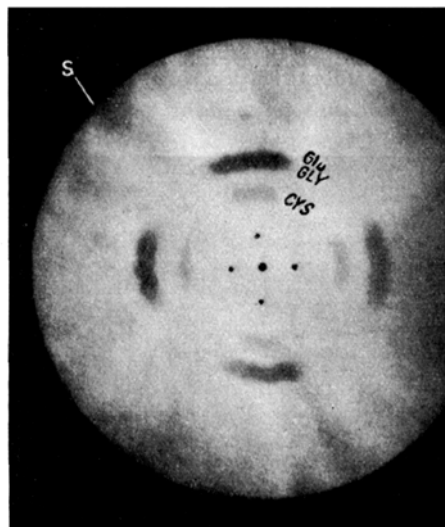
Four methods for the registration of paper electrophoresis are described and the results compared: globe-reflectorometer, Pulfrichphotometer, quickphotometer and a new system of the photoreflexometer. The great sensitivity of this photoreflexometer makes it particularly suitable for the determination of the paper electrophoresis results.

to develop a chromatogram by the present method was about  $5\frac{1}{2}$  h.



1.—Modified method—n-Butanol-formic acid-water.

A chromatogram of a mixture of cystine, glycine and glutamic acids ( $R_f$  values 0.04, 0.15, and 0.20 respectively) in n-butanol-formic acid-water<sup>1</sup> (12:1:7) was run and is represented in Figure 1. The amino acids appeared to have travelled radially along lines drawn from the wick and were well separated.



2.—Conventional method (irrigated once).

### A Modification in Horizontal Migration Paper Chromatography

In view of the difficulty experienced in the separation and identification of substances having close  $R_f$  values, by the horizontal migration method of paper chromatography, GIRI and RAO<sup>1</sup> suggested the employment of either the multiple development technique of JEANES and co-workers<sup>2</sup>, or of larger size filter-paper discs. From primary considerations, it would appear that better separations can be obtained if the mobile phase is made to travel a longer effective distance (thereby increasing the irrigating time) than in the conventional method with the wick at the centre. This could be achieved by shifting the position of the wick from the centre to a point as near the periphery of the filter disc as possible. To verify this, chromatograms were run with this modification and compared with those obtained in the usual way. The results obtained are described in this note.

WHATMAN No. 1 filter-paper discs of 18 cm diameter were used throughout and the temperature was maintained at  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ . The wick, made of WHATMAN No. 1, was inserted at a point about 0.5 cm away from the outer edge of the filter-paper, and the drops of mixture to be chromatographed were spotted on an arc of radius 1.5 cm with the wick as the centre. In this way the effective distance available was almost doubled. Except for this modification, the technique employed was identical with that of GIRI<sup>1</sup> or PROOM<sup>3</sup>. The time required

For comparison the same mixture of amino acids, but in n-butanol-acetic acid-water (4:1:5) (corresponding  $R_f$  values being 0.25, 0.38 and 0.44), was run by irrigating the disc once (Fig. 2) and twice (Fig. 3) in the conventional way, and once with the wick near the periphery (Fig. 4). A close examination of the three chromatograms would show that the separation of glycine and glutamic acid is the best in Figure 4. Similarly the separation of lysine and histidine in n-butanol-

<sup>1</sup> K. V. GIRI and N. A. N. RAO, J. Ind. Inst. Sci. 34, 95 (1952).

<sup>2</sup> A. JEANES, C. S. WISE, and R. J. DIMLER, Anal. chem. 23, 415 (1951).

<sup>3</sup> H. PROOM and A. J. WOJWOD, J. Gen. Microbiol. 5, 681 (1951).

<sup>1</sup> L. F. WIGGINS and W. J. HOWARTH, Nature 170, 279 (1952).