

33–35°C by means of an infrared lamp directed on the left thigh. The distal end of the left lumbar sympathetic chain, cut at L5, was placed on two platinum electrodes.

Nerve stimulation (condenser discharges, 20/sec, supra-maximal intensity) was applied for 5 sec and maximal change in flow at the initial arterial pressure was measured. Some of the blood flow was then diverted to the jugular vein and another stimulation was effected at the lower perfusion pressure. This procedure was repeated and a series of pressures and corresponding flows were determined, and curves representing the relationship between pressure and flow were plotted. As a measure of the effect of nerve stimulation the change in flow at the perfusion pressure of 80 mm Hg was established by interpolation.

Reserpine (lyophilized reserpine phosphate)<sup>10</sup> was given subcutaneously; all doses refer to the base. In 12 dogs, single doses in the range of 0.01 to 0.3 mg/kg were given 24 h before the experiment; 2 dogs received 10 daily doses of 0.006 mg/kg, the last injection was given 24 h prior to the experiment.

**Results.** In four normal animals maximal sympathetic stimulation reduced femoral blood flow to 22–63% of the control flow. After a single dose of reserpine, 0.01 mg/kg or 0.03 mg/kg, the response was in the normal range. At 0.1 mg/kg, sympathetic stimulation resulted in an increase rather than a decrease in blood flow, and at 0.3 mg/kg, the increase in flow was very marked (Fig.). In the presence of 1 mg/kg atropine sulfate, increasing doses of reserpine produced graded decreases in the reduction of blood flow so that, after 0.3 mg/kg, maximal sympathetic stimulation altered blood flow only slightly or not at all (see Fig.).

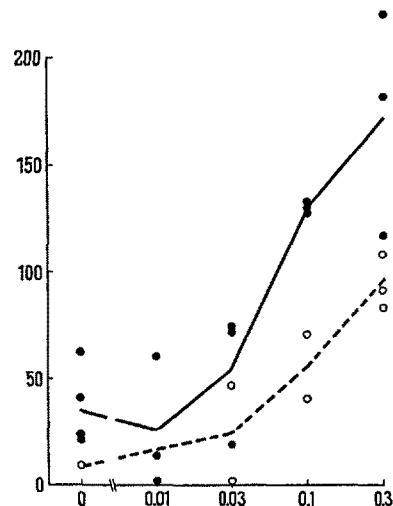
After 10 daily doses of reserpine 0.006 mg/kg (2 preparations), nerve stimulation increased the femoral blood flow to 120% and 170% respectively of the control values. Administration of atropine unmasked a residual constrictor response which reduced blood flow to 60% and 85% respectively of the controls.

Doses of reserpine which are known to reduce the level of norepinephrine in the dog heart<sup>9</sup> also alter the function of the sympathetic fibers innervating the blood vessels of the leg. The single pretreatment dose of 0.1 mg/kg so interferes with vasoconstrictor function in the leg of the dog, that vasoconstriction in response to sympathetic nerve stimulation is overbalanced by vasodilator activity. The same dose of reserpine reduces norepinephrine levels in the heart of the dog to about  $\frac{1}{3}$  of normal. When this dilator effect, caused by the stimulation of sympathetic cholinergic neurons, is annulled by atropine, a residual vasoconstrictor effect is seen which, however, no longer occurs if the pretreatment dose of reserpine is increased to 0.3 mg/kg. The same dose of reserpine was also required to abolish the effect of sympathetic nerve stimulation on myocardial contractility<sup>9</sup>.

### Technische Probleme der Hämoglobin-Elektrophorese im Stärkeblock<sup>1</sup>

Die von KUNKEL und WALLENIUS<sup>2</sup> angegebene Stärkeblock-Elektrophorese eignet sich besonders zum Nachweis kleiner Hämoglobin-<sup>3-5</sup> und Myoglobinmengen<sup>6</sup>. Da die im Handel befindlichen Hochspannungs-Elektrophorese-Geräte als Universalapparate ausserordentlich kostspielig sind, haben wir in Zusammenarbeit mit der Firma Therna AG Schwanden (GL Schweiz) einen einfacheren Apparat konstruiert.

**Apparatur.** Als Kühlelement dient eine 80 × 120 cm messende Kühlplatte Therna aus Metall, wie sie für in-



Influence of reserpine pretreatment on response of the femoral vascular bed to electrical stimulation of the lumbar sympathetic chain. Sixteen dogs. Pentobarbital anesthesia. Artificial respiration. Heparin 5 mg/kg. Ordinate: blood flow through left femoral artery after stimulation as a percentage of the flow before stimulation of lumbar sympathetic chain at L5, both at a perfusion pressure of 80 mm Hg. Abscissa: dose of reserpine (mg/kg) given 24 h before the experiment. Full circles: without atropine; a solid line joins the means. Open circles: after atropine sulfate 1 mg/kg; a broken line joins the means. For further details see text.

The strong cumulative action of reserpine, emphasized in earlier studies<sup>11,12</sup> is shown by the fact that, in the present experiments, the daily reserpine dose of 0.006 mg/kg given for 10 days is as active as the single dose of 0.1 mg/kg<sup>13</sup>.

**Zusammenfassung.** Die durch sympathische Nervenreizung ausgelöste Vasoconstriktion im Hinterbein des Hundes wird durch Reserpinvorbehandlung aufgehoben. Die dazu benötigten Reserpindosen entsprechen denen, die am Herzen Verlust der Nervenfunktion und des Noradrenalinegehaltes hervorrufen.

D. R. WAUD

Department of Pharmacology, Harvard Medical School, Boston (Massachusetts), January 9, 1961.

<sup>10</sup> Generously supplied by Ciba Pharmaceutical Products Inc., Summit (New Jersey).

<sup>11</sup> D. R. WAUD, S. R. KOTTEGODA, and O. KRAYE, *J. Pharmacol.* 124, 340 (1958).

<sup>12</sup> E. MUSCHOLL and M. VOGT, *J. Physiol.* 141, 132 (1958).

<sup>13</sup> The author would like to thank Mr. A. BANKS for his careful assistance.

dustrielle und gewerbliche Zwecke serienmässig hergestellt wird. Sie ist mit einer Therna-Kühlmaschine vom Typ LT 2 F 33 mit  $\frac{1}{3}$  PS Drehstrommotor verbunden und

<sup>1</sup> Die Arbeit wurde mit Hilfe eines Forschungsbeitrages des Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung durchgeführt.

<sup>2</sup> H. G. KUNKEL and G. WALLENIUS, *Science* 122, 288 (1955).

<sup>3</sup> K. BETKE, *Internist* 1, 236 (1960).

<sup>4</sup> K. BETKE, P. SCHLAICH und H. HUIDOBRO-TECH, *Klin. Wschr.* 37, 794 (1959).

<sup>5</sup> P. S. GERALD und L. K. DIAMOND, *Blood* 13, 61 (1958).

<sup>6</sup> H. R. MARTI, *Klin. Wschr.* 39, 286 (1961).

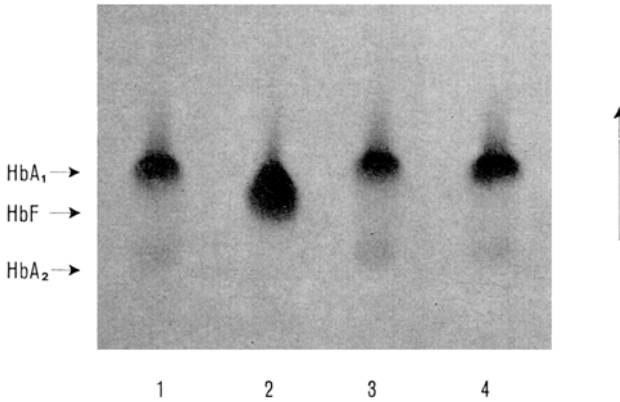


Fig. 1. Trennung der normalen Hb-Fractionen. Laufzeit 8 h. Von links nach rechts: 1 = Hämolsat mit 3,2% Hb A<sub>2</sub>. 2 = Nabelschnur-Hämolsat. 3 = Hämolsat mit 4,4% Hb A<sub>2</sub>. 4 = Hämolsat mit 2,3% Hb A<sub>2</sub>.

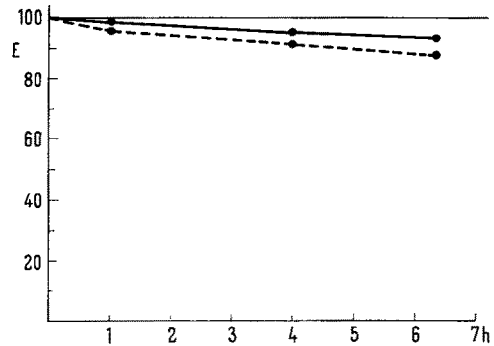


Fig. 2. Unstabilität eluierter Hb-Fractionen bei Zimmertemperatur. Annähernd linearer Abfall der optischen Dichte. Photometrische Messung bei 415 m $\mu$ . Extinktion zu Beginn als 100% gerechnet. — = Oxy-Hb mit Zusatz von KCN. - - - = Oxy-Hb ohne KCN. (Mittelwerte von 12 Messungen bei 6 eluierten Fractionen.)

durch ein Regulierventil auf eine Oberflächentemperatur von + 4°C eingestellt. Auf der Kühlfläche liegt eine Glasplatte mit guter Wärmeleitfähigkeit, auf welche ein 2 cm hoher Kunststoffrahmen wasserdicht aufgeschweisst ist. Auf diese Weise entstehen 2 je 36 × 40 cm messende und 2 cm tiefe Kammern für die Stärke. Ein guter und gleichmässiger Wärmeabfluss ist aber nur möglich, wenn Metalloberfläche und Glasplatte durch ein Bindemittel mit hoher Wärmeleitfähigkeit fest miteinander verbunden sind. Diese Verbindung geschieht durch einen von der Firma Thermo gelieferten Spezialkitt, der eine fast ebenso hohe Wärmeleitfähigkeit aufweist wie Metall. Damit ist sogar ein besserer Wärmeabfluss gewährleistet als bei der sonst üblichen Kühlung durch Flüssigkeitsgemische<sup>3,4,7</sup>.

Auf zwei einander gegenüberliegenden Seiten der Stärkekamern befindet sich in einer Vertiefung von 10 cm je 1 Puffergefäß mit einem Platindraht als Elektrode. Der Rahmen der Kühlplatte ist beidseitig durch einen Kunststoffüberzug isoliert und durch eine eingebaute Heizspirale vor Kondenswasserbildung geschützt. Als Stromquelle dienen 2 handelsübliche Gleichrichter, die eine konstante Spannung von 600 V liefern. Es wird mit einer Stromstärke von 40–60 mA pro Kammer gearbeitet. Schliesslich sind noch alle erforderlichen Sicherungsvorrichtungen angebracht: Einbau in einen Schrank, Erdung und Absicherung der gesamten elektrischen Anlage, ferngesteuerter Motorschutz, rotes Betriebslicht, Sicherungsschalter zum Unterbruch des Stromkreises bei jeder Manipulation.

**Arbeitsmethode.** Wir verwenden üblicherweise Veronal-Veronal-Na-Puffer pH 8,6, Ionenstärke 0,075. Herstellung des Stärkeblocks und Auftragen der Hämoglobin(Hb)-Proben erfolgen nach der von BETKE<sup>3,4</sup> angegebenen Methode. Auf eine zusätzliche Wiederanfeuchtung des Stärkeblocks durch Pufferspray verzichten wir. Die Stromübertragung von den Pufferschalen auf den Stärkeblock geschieht durch puffergetränkte mehrschichtige Filterpapierbrücken, die zur Vermeidung von Verdunstung mit einer Cellophanfolie bedeckt sind. Etwa 3–4 mm über dem Stärkeblock liegt gemäss dem Vorschlag von GERALD und DIAMOND<sup>5</sup> eine Glasplatte, welche gleichzeitig die Filterpapierbrücken auf die Stärke drückt. Die Elektrophorese läuft über Nacht, und nach einer Laufzeit von 8–14 h ist eine gute Auftrennung erreicht (vgl. Fig. 1).

Die einzelnen Hb-Fractionen können ohne Schwierigkeit auf einer Glasfritte quantitativ aus der Stärke eluiert

werden. Wir arbeiten nach dem Vorschlag von BETKE<sup>3</sup> mit Oxy-Hb und messen die eluierten Fractionen in der Soretbande bei 415 m $\mu$ . Alle verdünnten Hb-Lösungen sind aber unbeständig. Eluieren, Zentrifugieren und Messen am Photometer nehmen für 10–20 Fractionen mehrere Stunden in Anspruch, und während dieser Zeit sinkt die Extinktion der Hb-Lösungen deutlich ab. Zur Bestimmung dieser Extinktionsabnahme bei Zimmertemperatur haben wir fortlaufende Messungen frisch hergestellter Eluate von Hb A<sub>2</sub> und kleinen Hb A<sub>1</sub>-Mengen vorgenommen. Dabei zeigt sich, dass die Extinktion von Oxy-Hb bei 415 m $\mu$  innerhalb von 4 h um fast 10% zurückgeht. (12 Messungen bei 6 verschiedenen Eluaten: Mittelwert nach 4 h 90,75% des Ausgangswertes mit Streubereich zwischen 89 und 93%.) Es ist gleichgültig, ob Hb A<sub>1</sub> oder Hb A<sub>2</sub> vorliegt und ob mit *Aqua dest.* oder Phosphatpuffer pH 6,8 eluiert wird. Auch Messungen bei 540 m $\mu$ <sup>8</sup> ergeben denselben prozentualen Abfall. Im Parallelversuch wurde zum halben Eluat aller Fractionen pro 5 ml 1 Tropfen 5% KCN-Lösung gegeben. Der Mittelwert der Extinktion bei 415 m $\mu$  beträgt nach 4 h mit KCN 94,5%, ohne KCN 90,75%, und nach 6½ h mit KCN 93,3%, ohne KCN 87,8% (Streubereiche nach 6½ h 90–96,5% bzw. 85–90%). Daraus folgt, dass sich der auf Unstabilität von Oxy-Hb-Lösungen beruhende Messfehler durch Zusatz von KCN auf etwa die Hälfte reduzieren lässt (vgl. Fig. 2).

Auch wenn das Hämolsat vor der Elektrophorese mit kleinen Mengen KCN versetzt wurde, so wandert KCN während der Elektrophorese aus dem Hb-Bereich heraus, und die nachher eluierten Hb-Fractionen sind wieder KCN-frei. Wir verwenden jetzt zur Elution *Aqua dest.* mit Zusatz von 1/50 Vol. 5% KCN. Dadurch wird das sich spontan bildende Hämoglobin laufend in Cyanhämoglobin übergeführt, dessen Soretbande derjenigen von Oxy-Hb sehr nahe liegt (420/415 m $\mu$ ). Trotzdem sinkt aber die Extinktion des Eluates innerhalb von 4 h um 5,5% und innerhalb von 6½ h um 6,7% ab. Es ist deshalb unerlässlich, alle Arbeitsgänge von der Elution bis zur Messung am Photometer in möglichst kurzer Zeit zu erledigen, jede

<sup>7</sup> W. KÜNZER und E. AMBS, *Klin. Wschr.* 37, 249 (1959).

<sup>8</sup> J. H. P. JONXIS und T. H. J. HUISMAN, *Abnormal Haemoglobins* (Blackwell Scientif. Publ. Oxford 1959), p. 16.

stärkere Erwärmung der Hb-Lösungen zu vermeiden und wenn möglich zum Zentrifugieren eine Kühlzentrifuge zu verwenden.

**Summary.** A simple apparatus for starch block electrophoresis is described. The cooling element consists of a commercially available cold plate in metal.

If oxyhaemoglobin is used, an error in measurement by the instability of the haemoglobin solutions can be re-

duced by adding small amounts of KCN, not only to the initial haemolysate, but also to the haemoglobin fractions which were eluted.

H. R. MARTI<sup>9</sup>

*Medizinische Universitätspoliklinik Basel, 28. Februar 1961.*

<sup>9</sup> Wir danken Fr. L. BARGETZI für ihre technische Hilfe bei allen Untersuchungen.

## Durchlaufende Dünnschicht-Chromatographie

Bei kleinen Unterschieden von Rf-Werten muss zur vollständigen chromatographischen Trennung eines Substanzpaares die Laufstrecke vergrößert werden. Diese Forderung ist für langsam wandernde Substanzen leicht erfüllbar, indem man die mobile Phase über den Bereich der stationären Phase hinausströmen lässt. In der Papierchromatographie ist dieses als Durchlaufmethode bezeichnete Verfahren in besonders einfacher Weise realisierbar<sup>1</sup>. Wir beschreiben im folgenden eine Form, die sich bei Dünnschicht-Chromatogrammen bewährt hat.

Als erster hat unseres Wissens MOTTIER<sup>2</sup> die Dünnschicht-Chromatographie mit einem Durchlaufverfahren kombiniert. Seine Methode ist indessen auf die Verwendung von relativ schwerflüchtigen Lösungsmitteln wie Wasser und *n*-Butanol beschränkt. Unser Prinzip (Fig. 5) ist demgegenüber vielseitig anwendbar. Die mobile Phase wird dabei durch die Kapillarkwirkung von Filterpapier auf die horizontal liegende Dünnschicht übertragen und kann nach Durchlaufen der Trennstrecke, die oben durch eine Deckplatte geschützt ist, verdampfen. Zwei längsseits zwischen Dünnschicht- und Deckplatte angebrachte Glas- oder Polyäthylensbänder dienen als Dichtung und gewährleisten genügend Abstand von Schicht zu Deckplatte, um das Eindringen von mobiler Phase in den Zwischenraum zu verhindern. Diese Anordnung lässt sich auch für «normale» Dünnschicht-Chromatogramme verwenden und erübrigt die sonst übliche Benützung von Trennkammern<sup>3</sup>.

### A) Benötigte Einzelteile

1. Ein Behälter B aus rostfreiem Stahl (Fig. 1). Er besitzt eine plangeschliffene Oberseite und dient als Gefäß für die mobile Phase. Durch die beiden Löcher L in der Seitenwand werden 2 etwa 7 cm lange Polyäthylensröhrchen R gesteckt und nach Figur 1 aufwärts gebogen. Durch eines wird später die mobile Phase eingefüllt, das andere ermöglicht den Druckausgleich (s. u.).

2. Ein Filterpapier F (Fig. 2). Es überträgt die mobile Phase auf die Schicht. Der Teil *efgh* ist dem Innenprofil des Behälters B anzupassen. Bei Verwendung einer leichtflüchtigen mobilen Phase kann dasselbe Filterpapier mehrmals benutzt werden.

3. Eine Trägerplatte T, 200 × 200 mm (Fig. 3). Sie trägt die Dünnschicht, zum Beispiel Kieselgel. An 2 gegenüberliegenden Rändern wird mit dem Finger soviel von der Schicht abgestreift, dass etwa 6 mm breite, völlig blanke Streifen entstehen. Auf der Vorderseite (Fig. 3) werden die Substanzen in gewohnter Weise 15 mm vom Plattenrand entfernt aufgetragen. Es ist empfehlenswert, im rechten Winkel zur Streichrichtung zu chromatographieren.

4. Eine Deckplatte D, 200 × 200 mm, mit «Kufen» (Fig. 4). Als Kufen werden auf 2 gegenüberliegenden Seiten einer planen Glasplatte (zum Beispiel blanke

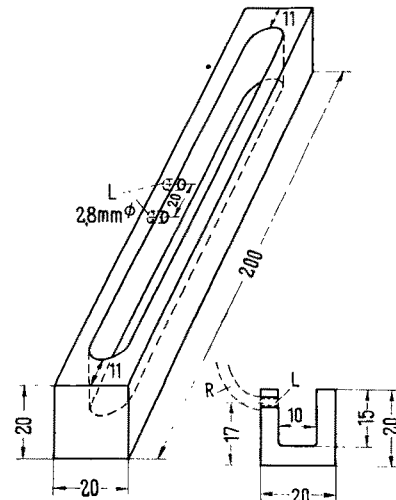


Fig. 1. Behälter aus V4A-Stahl für die mobile Phase. Längenmasse in mm.

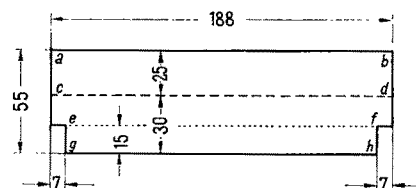


Fig. 2. Filterpapier Whatman No. 1 (Schnittbogen). Längenmasse in mm.

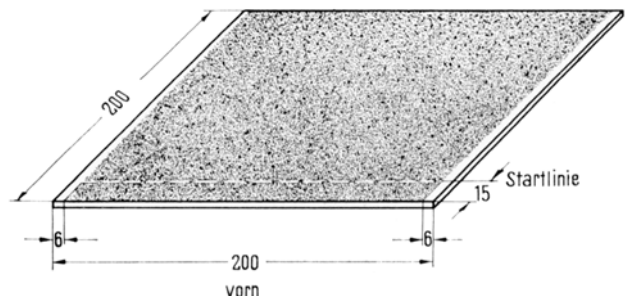


Fig. 3. Trägerplatte mit Dünnschicht und blanken Rändern. Längenmasse in mm.

<sup>1</sup> F. CRAMER, *Papierchromatographie*, 4. Aufl. (Verlag Chemie GmbH, Weinheim an der Bergstrasse 1958), p. 49.

<sup>2</sup> M. MOTTIER, *Mittlg. Lebensmittelunters. u. Hygiene (Bern)* 49, 454 (1958).

<sup>3</sup> Vgl. E. STAHL, *Chemiker Ztg.* 82, 323 (1958).