

20. Die willkürliche Modifizierung der Milieubedingungen bei Elektrophorese-Versuchen zur Eliminierung der Extragradiënten (δ - und ϵ -boundaries) und ihre praktische Bedeutung

von E. Wiedemann.

(29. X. 46.)

Bei der Elektrophorese von Proteinen und verwandten hochmolekularen Stoffen wird der Versuch, um unerwünschte Komplikationen zu vermeiden, ganz allgemein so angesetzt, dass die gegen eine gewünschte Pufferlösung ausdialysierte¹⁾ Lösung der zu untersuchenden Stoffe mit derselben Pufferlösung überschichtet und nach Anlegen einer Gleichspannung die Wanderung der durch diese Stoffe verursachten Grenzflächen beobachtet wird. Bei gegebenen Werten des Milieus (Art des Puffers, Wasserstoffionenkonzentration, Ionenstärke), der Temperatur (Viskosität, Leitfähigkeit) und der Stromstärke liefert dann der in bestimmten Zeitabschnitten durchlaufene Weg einer Grenzfläche ein Mass für die apparente Beweglichkeit und die Grösse der Brechungsindexänderung derselben Grenzfläche ein Mass für die relative Menge des sie verursachenden Proteins.

Handelt es sich, wie es häufig der Fall ist, bei einer solchen Elektrophorese um die Untersuchung eines (z. B. anodisch wandernden) Gemisches, so wird der prinzipielle Vorgang der in Figur 1

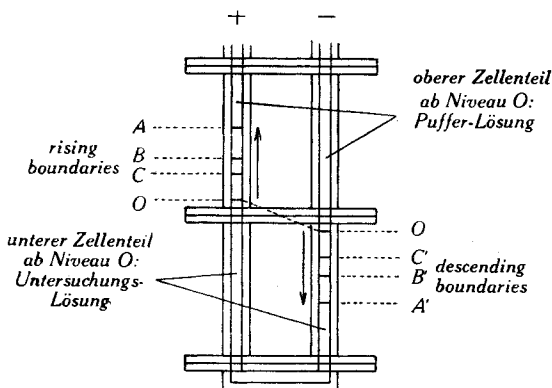


Fig. 1.

gezeichnete sein: die einander entsprechenden Grenzflächen jeder einzelnen Komponente werden sich im U-Rohr um gleiche Strecken

¹⁾ Mit „ausdialysiert“ sei eine Lösung bezeichnet, deren Leitfähigkeit sich bei Fortsetzung der Dialyse nicht mehr ändert.

fortbewegen und die Bilder der beiden U-Rohr-Teile, in denen sich die „rising“ und „descending“ boundaries ausgebildet haben, werden spiegelbildlich zu einander sein.

Von diesem Idealfall weicht nun das Elektrophoresebild zu meist beträchtlich ab. Im allgemeinen sind nicht nur die in gleichen Zeiten durchlaufenen Wege der einzelnen einander entsprechenden Grenzflächen verschieden, sondern auch die Schärfe der diesen Grenzflächen entsprechenden Gradienten differiert erheblich. Ferner treten zusätzlich zwei sehr langsam wandernde Grenzflächen auf, deren ungleich grosse Gradienten sich denen der am langsamsten wandernden Komponente zu überlagern pflegen, so dass deren Beweglichkeits- und Grössenmessung recht unsicher, wenn nicht überhaupt unmöglich wird.

Dies werde durch die Figur 2 illustriert, die ein nach *Philpot-Svensson* aufgenommenes Elektrophoresebild eines normalen humanen Plasmas darstellt; dieses war für den Versuch gegen *Michaelis-Puffer*¹⁾ mit den Werten $p_H = 8,9$ und $\mu = 0,1$ ausdialysiert und nach Verdünnen mit 2,5 Teilen dieses Puffers für den Versuch mit demselben Puffer überschichtet worden.

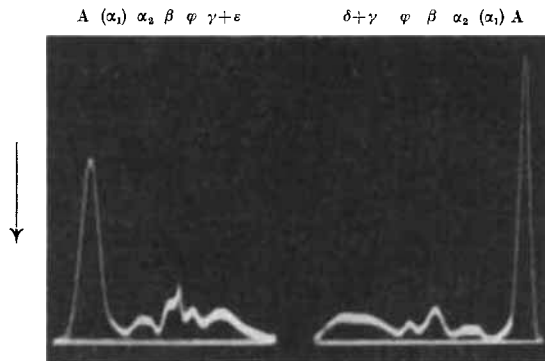


Fig. 2.

Philpot-Svensson-Aufnahme mit Basisreduktion eines normalen humanen Plasmas, nach Dialyse gegen *Michaelis-Puffer* $p_H = 8,9$ und $\mu = 0,1$ 1:2,5 mit diesem verdünnt und im Versuch damit überschichtet. Aufnahmebedingungen: $t = 2,0^\circ$, $i = 9,55$ mA, $t = 8400$ Sek., $\kappa = 0,003078$, Spaltwinkel 50° . Kleinbildaufnahme auf Agfa-Isopan F-Film, Expositionszeit $\frac{1}{2}$ Sek. Links: descending boundaries. Rechts: rising boundaries.

Man kann dem Bilde, das die descending boundaries links und die rising boundaries rechts zeigt, direkt entnehmen, dass die von den letzteren durchlaufenen Strecken grösser als die von den descending boundaries durchlaufenen sind. Der Unterschied in der Schärfe der Gradienten (Steilheit der Kurven) ist insbesondere bei den beiden äussersten, der Albumin-Fraktion zukommenden Gipfeln erheblich.

¹⁾ Vgl. *E. Wiedemann*, Schweiz. med. Wschr. **76**, 241 (1946).

Während an dieser Stelle nicht auf die Verschiedenheit der beiden mittleren, von der β -Globulin-Fraktion herrührenden Gipfel eingegangen werden soll, sei auf die deutlichen Unterschiede hingewiesen, die sich bei der am langsamsten wandernden γ -Globulin-Komponente nahe der Bildmitte zeigen: diese Gipfel sind von sehr ungleicher Form und man kann demjenigen rechts (Seite der rising boundaries) direkt ansehen, dass er von zwei Komponenten gebildet wird. Die von ihnen mit der Basis eingeschlossenen Flächen sind von sehr ungleicher Grösse.

Diese Abweichungen, zu denen noch eine in Figur 2 wenig ausgeprägte Asymmetrie der einzelnen Kurvenzüge hinzukommen kann, sind zum Teil schon anlässlich der Einführung der schlierenoptischen Abbildungsverfahren für Gradienten von *A. Tiselius* entdeckt und beschrieben worden¹⁾. Ausführlich haben sich später *L. G. Longsworth* und *D. A. McInnes*²⁾³⁾ damit beschäftigt; sie erklären die vier erwähnten Abweichungen (des Auftretens von Extragradien, der Ungleichheit der Schärfe, der Asymmetrie der Kurvenzüge und der Unterschiedlichkeit der korrespondierenden Weglängen) wie folgt: Wenn die zur Untersuchung gelangenden Proteine aus ihrem ursprünglichen Milieu durch Dialyse in ein gewünschtes Puffer-Milieu gebracht werden müssen, so resultiert infolge der Einstellung des *Donnan*-Gleichgewichtes bei dieser Dialyse ein Unterschied in der Salz-Zusammensetzung zwischen der Untersuchungslösung und der im Versuch überschichteten „gleichen“ Pufferlösung. Dazu kommt, dass die Untersuchungslösung weitere leitende Bestandteile enthält, nämlich Protein-Ionen, die der überschichteten Pufferlösung fehlen. Aus der Ungleichheit der Lösungen in bezug auf ihren Salzgehalt folgt zunächst, dass mit dem Auftreten von zwei zusätzlichen Gradienten an ihren Grenzflächen gerechnet werden muss. Ihnen entsprechen die sogenannten δ - und ϵ -boundaries, die sehr langsam wandern und sich bei Versuchen, wie demjenigen der Figur 2, der langsamsten Komponente des Gemisches, nämlich dem γ -Globulin, mehr oder weniger überlagern. Während dem ϵ -boundary, das auf der Seite der descending boundaries auftritt, ein reiner Puffergradient zu Grunde liegt, wird das ihm gegenüberstehende δ -boundary zusätzlich durch eine an seinem Ort auftretende Konzentrationsänderung des Proteins der Untersuchungslösung verstärkt, so dass es grösser als das ϵ -boundary und entsprechend besser sichtbar wird.

Da die spezifische Leitfähigkeit der Protein-haltigen Untersuchungslösung normalerweise niedriger als diejenige „ihrer“ Pufferlösung ist, so werden bei den in ihr eigenes Milieu hineinwandernden descending boundaries sich die nachfolgenden Teilchen einer Grenz-

¹⁾ *A. Tiselius*, *Biochem. J.* **31**, 1464 (1937).

²⁾ *L. G. Longsworth* und *D. A. McInnes*, *Chem. Rev.* **24**, 271 (1939).

³⁾ *L. G. Longsworth* und *D. A. McInnes*, *Am. Soc.* **62**, 705 (1940).

fläche gegenüber den vorauseilenden in einem schwächeren elektrischen Feld befinden, sich also langsamer bewegen, was zur Folge hat, dass diese Grenzfläche diffuser und damit ihr Gradient flacher wird. Umgekehrt liegen die Verhältnisse bei den rising boundaries: die Wanderung in die überschichtete Pufferlösung grösserer Leitfähigkeit beschleunigt die nachfolgenden Teilchen einer Grenzfläche gegenüber den vorauseilenden, was zur Folge hat, dass die Grenzfläche scharf und ihr Gradient steil bleibt¹⁾.

Der Potentialfall insbesondere am Orte erheblicher Konzentrations-Änderungen (also an den Grenzflächen der mengenmässig hervortretenden Komponenten) wird damit, wie auch bei eventuell möglichen kleinen Änderungen des p_H -Wertes, asymmetrisch. Damit werden es auch die Brechungsindex-Gradienten und die durch sie verursachten Kurvenzüge, wie es *A. Tiselius* und *F. L. Horsfall* beschrieben und diskutiert haben²⁾. Es ist in solchen Fällen notwendig, der Berechnung der Beweglichkeiten nicht die Kurvenscheitel-Ordinate, sondern die senkrechte Flächenhalbierende zu Grunde zu legen³⁾⁴⁾.

Die Abnahme der Leitfähigkeit der überschichteten Pufferlösung beim Hineinwandern der Proteine in diese hat ferner zur Folge, dass sich die rising boundaries schneller als die descending boundaries fortbewegen und damit grössere Beweglichkeitswerte ergeben, wenn man ihrer Berechnung, wie üblich, den Leitfähigkeitswert der Untersuchungslösung zu Grunde legt.

Die Beweglichkeiten der descending boundaries u_d folgen aus:

$$u_d = \frac{q \times s_d \times \kappa}{i \times t} \quad (1)$$

worin q den Querschnitt des U-Rohres, s_d den durchlaufenen Weg, κ die Leitfähigkeit der Untersuchungslösung, i die Stromstärke und t die Versuchszeit bedeutet.

Die analoge Berechnung der Beweglichkeitswerte u_r aus den Daten der rising boundaries, die durch die Beziehung

$$u_r = \frac{q \times s_r \times \kappa}{i \times t} \quad (1a)$$

gegeben ist, kann aber unter Hinzunahme des Faktors Pr/Pd , also des Konzentrationsverhältnisses der Proteine im Bereich der rising boundaries zu demjenigen der descending boundaries, ebenfalls zur Ermittlung der Werte u_d dienen, da

$$u_d = u_r \frac{P_r}{P_d} = - \frac{q \times s_r \times \kappa}{i \times t} \frac{P_r}{P_d} \text{ ist } ^3). \quad (2)$$

¹⁾ Diesem Effekt überlagert sich natürlich der Vorgang der Diffusion, worauf hier nicht eingegangen sei.

²⁾ *A. Tiselius* und *F. L. Horsfall*, J. exp. Med. **69**, 83 (1939).

³⁾ *L. G. Longworth* und *D. A. McInnes*, Am. Soc. **62**, 705 (1940).

⁴⁾ *E. Wiedemann*, Schweiz. med. Wschr. **75**, 229 (1945).

Für die im allgemeinen noch wichtigere Berechnung der relativen Prozent-Anteile von Gemischen aus den Flächenwerten einzelner, von Gradienten mit der Basis gebildeter Kurven ist davon auszugehen, dass bei gleichem Brechungsindex für die Einheitskonzentration die einzelnen (u. U. gegen einander extrapolierten) Flächenwerte den entsprechenden Konzentrationen proportional sind und dass die Summen der Flächenwerte beider Teilbilder gleich sein müssen, da die Grenzen des bestimmten Integrals

$$\int_{\text{Puffer}}^{\text{Untersuchungslösung}} (dn/dh) dh, \quad (3)$$

worin n den Brechungsindex in der Höhe h der Zelle bedeutet, bei beiden Teilbildern dieselben sind¹⁾. Da die vom ε -boundary auf der Seite der descending boundaries eingenommene Fläche als von einem reinen Puffergradienten herrührend abziehen ist, ihr aber wegen der gleich bleibenden Zusammensetzung der Lösung ein gleich grosser, negativer Wert innerhalb der Proteingradienten gegenüberstehen muss, so sind für eine korrekte Konzentrationsbestimmung aus den Flächenwerten der descending boundaries diese insgesamt um denjenigen des ε -boundary zu vermehren.

Analog ist bei einer Konzentrationsbestimmung aus den Flächenwerten der rising boundaries diesen ebenfalls der dem ε -boundary entsprechende Wert, multipliziert mit dem Volumen, das auf der Seite der descending boundaries durchlaufen wurde und dividiert durch das Volumen, das auf der Seite der rising boundaries durchlaufen wurde, zuzuzählen, nachdem der Flächenwert des δ -boundary in Abzug gebracht worden ist. Die Gesamtkonzentration auf der Seite der descending boundaries ist also proportional dem Flächenwert $F_d + F_\varepsilon$, wenn mit F_d die von den Kurven der descending boundaries mit der Basis eingeschlossene Fläche und mit F_ε die von der Kurve des ε -Gradienten mit der Basis eingeschlossene Fläche bezeichnet wird. Analog ist die Gesamtkonzentration auf der Seite der rising boundaries proportional dem Flächenwert $F_r + F_\varepsilon(V_d/V_r)$, wenn mit V_d bzw. V_r die Volumina $q \times s_d$ bzw. $q \times s_r$ bezeichnet werden. Der Faktor des Konzentrationsverhältnisses der Proteine in Gleichung (2) ist also:

$$\frac{P_r}{P_d} = \frac{F_r + F_\varepsilon \left(\frac{q \times s_d}{q \times s_r} \right)}{F_d + F_\varepsilon} \quad (4)$$

Um die Gleichungen (2) und (4) anwenden zu können, ist die Kenntnis der Werte F_δ und F_ε erforderlich. Die Bestimmung dieser Flächen setzt aber die Separierung ihrer Kurvenzüge auch gegenüber langsam

¹⁾ Während die Steilheit der Kurven natürlich keine Rolle spielt.

²⁾ L. G. Longworth und D. A. McInnes, Am. Soc. **62**, 705 (1940).

wandernden Proteinen voraus, wie sie beispielsweise mit der Verwendung des von *L. G. Longsworth*¹⁾ und *V. P. Dole*²⁾ eingeführten Veronal-Puffers möglich ist.

Nach Einführung der modernen, heute sehr genauen³⁾ optischen Registriermethoden für Elektrophorese-Versuche sind verschiedene Massnahmen erwogen und geprüft worden, die Milieuverhältnisse bei diesen Versuchen so zu bestimmen, dass die verschiedenen störenden Einflüsse möglichst klein werden. Damit wird letzten Endes die Absicht verfolgt, direkt auswertbare Diagramme zu erhalten, die ohne Umrechnungen oder anderweitige Hilfsmassnahmen die gesuchten Werte der relativen Mengen und Beweglichkeiten ergeben.

Einen Schritt auch in dieser Richtung stellt die Verwendung des erwähnten Veronal-Puffers dar, da in einem Milieu langsamer Pufferionen die Asymmetrien beider Teilbilder zurückgehalten werden und auch der Grössenunterschied der Extragradients (der δ - und ε -boundaries) abnimmt⁴⁾. Wie *S. E. Perlmann* und *D. Kaufmann*⁵⁾ am Beispiel dieses Puffers zeigen und *H. Svensson*⁶⁾ in allgemeiner Form ausführt, besteht eine weitere Massnahme darin, den Salzgehalt der Lösungen gegenüber ihrem Proteingehalt relativ gross zu wählen. Eine Erhöhung der Ionenstärke auf 0,25 bei einem Proteingehalt der Untersuchungslösung von nicht mehr als 1% bringt die Anomalien der Gradienten praktisch zum Verschwinden, während die Extragradients gleichzeitig kleine Werte annehmen. Da Pufferlösungen so hohen Salzgehaltes aber lange Versuchszeiten oder entsprechende hohe Stromstärken erfordern, können sie die Aufnahme scharfer Diagramme erschweren; auch ist auf diese Weise eine vollständige Eliminierung der Extragradients nicht zu erreichen. Der erwähnte Veronal-Puffer ist überdies nur innerhalb eines kleinen p_H -Bereiches benützbar, weshalb er für Versuche, bei denen der p_H -Wert zu modifizieren ist, nicht in Betracht kommt.

Eine weitere Möglichkeit, zu direkt auswertbaren Diagrammen zu gelangen, besteht darin, die Milieu-Eigenschaften bei Elektrophorese-Versuchen derart abzustufen, dass die Wanderung der rising, wie der descending boundaries unter möglichst gleichen Bedingungen erfolgt, m. a. W., dass Leitfähigkeit und Proteinkonzentration im Gebiet der rising boundaries denjenigen im Gebiet der descending boundaries (oder umgekehrt) angepasst werden. Für diesen Fall ist zu erwarten, dass nicht nur die Extragradients (die δ - und ε -boundaries) ver-

¹⁾ *L. G. Longworth*, Chem. Rev. **30**, 323 (1942).

²⁾ *V. P. Dole*, J. clin. Invest. **23**, 708 (1944).

³⁾ Über die Abbildungs-Genauigkeit des *Philpot-Svensson*-Kleinbild-Aufnahmeverfahrens wird in einer weiteren Arbeit berichtet.

⁴⁾ *L. G. Longworth*, Chem. Rev. **30**, 323 (1942).

⁵⁾ *S. E. Perlmann* und *D. Kaufman*, Am. Soc. **67**, 638 (1945).

⁶⁾ *H. Svensson*, Ark. Kem. **22** [A], Nr. 10 (1946).

schwindend klein und damit die Flächenwerte beider Teilbilder praktisch gleich und direkt auswertbar werden, sondern auch, dass die Beweglichkeiten in beiden Teilbildern praktisch gleiche Werte annehmen: da die Summanden F_e in Gleichung (4) den Wert 0 erhalten und das Verhältnis $F_r/F_d = 1$ wird, vereinfacht sich die Gleichung (2) zu: $u_d = u_r$. Freilich gilt dies nur in erster Annäherung, da in diesen Beziehungen die engeren Milieuverhältnisse nicht berücksichtigt sind, doch dürfte diese Annäherung praktisch in vielen Fällen ausreichen. Da dieses Vorgehen von der Art des verwendeten Puffers unabhängig ist, gestattet es die Anwendung beliebiger, also auch p_H -variabler und besonders gut auflösender Puffergemische, deren Ionenstärke nicht übermässig hoch gewählt werden muss. Eine Angleichung der Schärfe der sich entsprechenden Gradienten beider Teilbilder ist indessen nicht zu erwarten, doch ist dieser Umstand nicht nachteilig, da es für die Berechnung der relativen Prozentwerte ja nur auf die Gleichheit der Flächenwerte ankommt. Man wird hier im Gegenteil die grössere Schärfe und bessere Separierung der Komponenten eines Gemisches im Bilde der rising boundaries ausnützen, indem man dieses Bild den Auswertungen zu Grunde legt.

Eine Möglichkeit der Eliminierung der Extragradien ist von *W. Hacker*¹⁾, sowie von *L. G. Longworth* und *D. A. McInnes*²⁾ aufgezeigt worden. In einem Beispiel der letztgenannten Autoren, bei welchem das Verhältnis der Leitfähigkeiten und Proteinkonzentrationen des Bereichs der rising boundaries zu demjenigen der Untersuchungslösung annähernd dasselbe war, konnten durch eine diesem Verhältnis entsprechende Verdünnung der Untersuchungslösung die Extragradien zum Verschwinden gebracht werden.

Dieser Versuch war ausgeführt worden, um die bis dahin noch umstrittene Natur der Extragradien als Salzgradienten zu beweisen. Den nachstehend beschriebenen Versuchen lag die Absicht zu Grunde, eine mögliche Annäherung der Wanderungsbedingungen der rising und descending boundaries unter Eliminierung der Extragradien zur Symmetrierung der beiden Teilbilder und damit zur Vereinfachung ihrer Auswertung heranzuziehen.

Als Test diente das Plasma einer klinisch gesunden Versuchsperson, das, in der üblichen³⁾ Weise nüchtern entnommen, gegen *Michaelis*-Puffer mit den Werten $p_H = 8,9$ und $\mu = 0,1$ bei $+2^\circ$ dialysiert und mit 2,5 Teilen dieses Puffers verdünnt bereitgestellt wurde. Die auf die allgemein übliche Weise nach Übersichten dieser Untersuchungslösung mit der gleichen Pufferlösung hergestellte Elektrophorese-Aufnahme ist in Figur 2 wiedergegeben und dort diskutiert.

Aus der grösseren Wanderungsgeschwindigkeit der rising boundaries war zu schliessen, dass die Leitfähigkeit der überschichteten Pufferlösung kleiner bzw. ihr Salzgehalt niedriger als derjenige der Untersuchungslösung sein musste. Eine passende Erhöhung dieser

¹⁾ Koll. Z. **62**, 37 (1933).

²⁾ loc. cit.

³⁾ Vgl. *E. Wiedemann*, Schweiz. med. Wschr. **76**, 241 (1946).

Werte (auf diejenigen der Untersuchungslösung) sollte die Wanderungsgeschwindigkeit der rising boundaries im Prinzip auf diejenige der descending boundaries herabsetzen und gleichzeitig sollten bei gleichen Salzkonzentrationen die durch deren Ungleichheit bedingten Extragradiënten verschwinden. Gegenüber dem Vorgang von *L. G. Longworth* und *D. A. McInnes*, die Untersuchungslösung passend zu verdünnen, weist derjenige einer Variierung der Konzentration der überschichteten Pufferlösung den Vorteil auf, nur einen Faktor, nämlich die Salzkonzentration (und damit die Leitfähigkeit), nicht aber zugleich die Proteinkonzentration zu ändern. Damit entfällt die Bedingung, dass das Verhältnis der Leitfähigkeiten und Proteinkonzentrationen beider Wanderungsbereiche übereinstimmen muss, und die Möglichkeit der Eliminierung der Extragradiënten bleibt nicht mehr auf die speziellen Fälle beschränkt, in denen dieses Verhältnis von vornherein dasselbe ist. Der Effekt ist jedoch bei beiden Massnahmen der gleiche: Mit Erreichung der nämlichen Salzkonzentration in beiden Wanderungsbereichen verschwinden die Extragradiënten; da zugleich die Puffer-Leitfähigkeiten identisch werden (was in erster Annäherung stets zutreffen dürfte), so nehmen auch die Protein-Beweglichkeiten als Funktion der Pufferleitfähigkeiten und damit auch die Proteinkonzentrationen in beiden Wanderungsbereichen im Prinzip gleiche Werte an, wenn man von den Differenzen absieht, die sich bei Gemischen mit mehreren Komponenten aus der auf das Milieu bezogenen Wanderungsrichtung ergeben.

In einer Versuchsreihe mit der oben erwähnten Plasma-Lösung wurde die überschichtete Pufferlösung in ihrer Konzentration variiert. So konnten in unmittelbar hintereinander ausgeführten Tests, bei denen ausser den Milieubedingungen der descending boundaries auch alle weiteren Faktoren, wie Temperatur, Stromstärke und Versuchszeit, sowie die Aufnahmebedingungen die gleichen waren, die Aufnahmen der nachfolgenden Figur 3 erhalten werden, deren Auswertungen anschliessend folgen.

Qualitativ ist dieser Bilderfolge zu entnehmen, dass:

1. Mit zunehmender Konzentration der überschichteten Pufferlösung die durch die Puffergradiënten verursachte Asymmetrie der Teilbilder mehr und mehr abnimmt, um schliesslich zu verschwinden,
2. dass die anfänglich recht verschiedenen Wanderungsgeschwindigkeiten beider Teilbilder sich mehr und mehr angleichen und
3. dass die unterschiedliche Steilheit der Kurven der Albumingradiënten etwas grösser wird.

Diese Befunde entsprechen den auf S. 173—174 angeführten Erwartungen.

Die Aufnahmen der Figur 3 wurden auf die früher¹⁾ angegebene Weise ausgewertet. In Tabelle I folgt zunächst die Zusammenstellung der gefundenen relativen Prozentwerte der einzelnen Proteine bzw.

¹⁾ Vgl. *E. Wiedemann*, Schweiz. med. Wschr. **76**, 241 (1946).

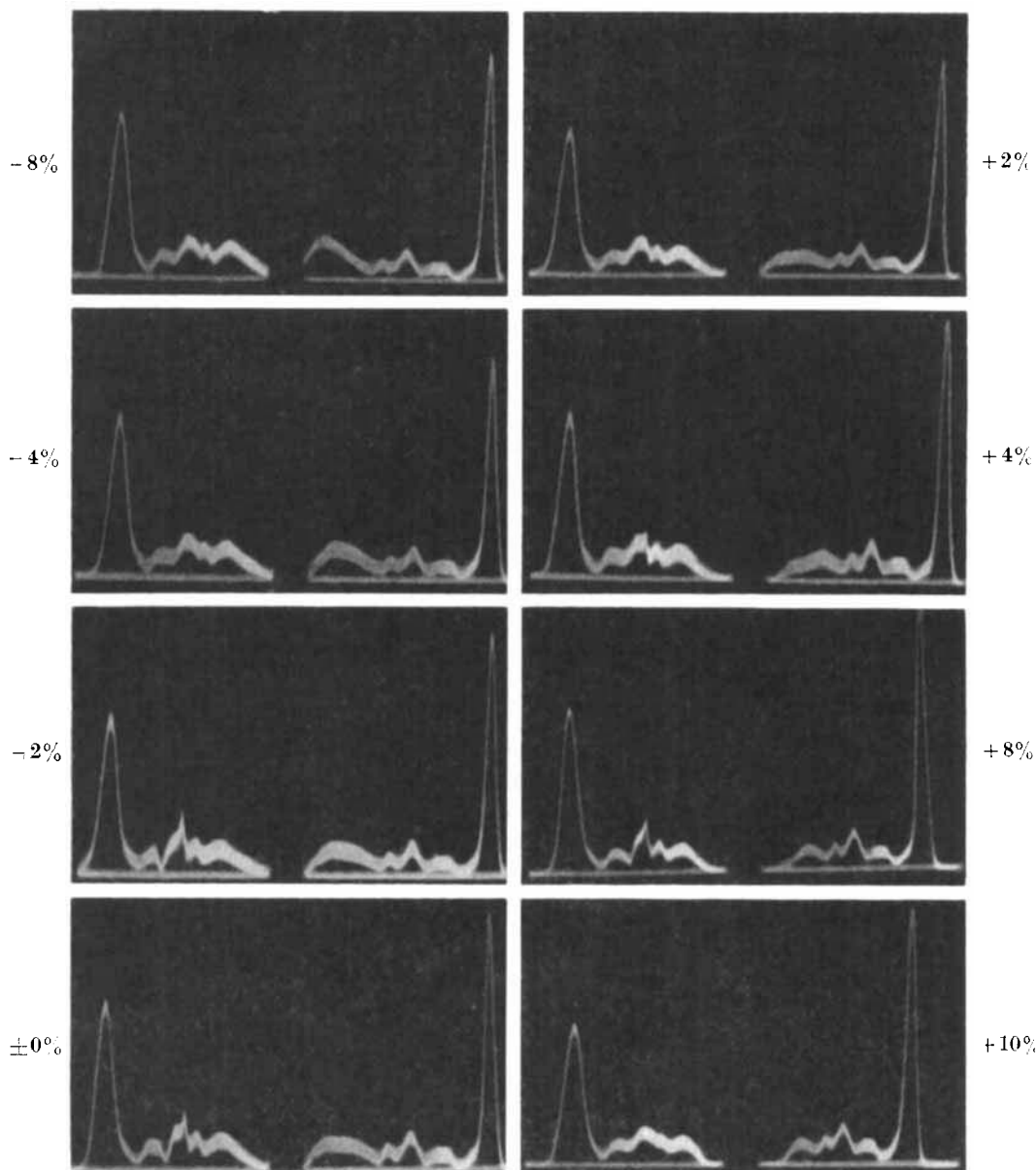


Fig. 3.

Vergleichende Aufnahmen eines normalen humanen Plasmas unter Änderung der Konzentration der überschichteten Pufferlösung. Aufnahmebedingungen: $t = 2,0^\circ$, $i = 9,55$ mA, $t = 8100$ Sek. (Bild -2% = 8220 Sek., Bild $\pm 0\%$ = 8400 Sek.), α der Untersuchungslösung = 0,003078, Spaltwinkel 50° gegen die Vertikale. Kleinbildaufnahmen auf Agfa-Isopan F-Film, Expositionszeit $\frac{1}{2}$ Sek. Links: descending boundaries. Rechts: rising boundaries.

Protein-Gruppen, wie sie sich aus den Teilbildern der descending und rising boundaries ergeben. Beigefügt ist der Leitfähigkeitswert der gleich gehaltenen Untersuchungslösung (Lösung_p, $\kappa = 0,003078$); ferner sind die Leitfähigkeitswerte der jeweils überschichteten Pufferlösung (Puffer, $\kappa = 0,003067$ bis $\kappa = 0,003484$) angegeben.

Der Vergleich der relativen Prozentwerte ergibt bei der Albumin-Gruppe ein deutliches Zusammenlaufen der beiden Zahlenreihen auf einen gleich grossen Wert, der bei einer Puffer-Konzentration von 8 % erreicht wird. Dasselbe gilt für die Summen der γ -Globulin-Werte mit denjenigen der Extragradiënten. Aus den vier mit einem Sternchen (*) bezeichneten Werten wurde das Mittel genommen; es wird dem richtigen Wert des γ -Globulins sehr nahe kommen. Für diesen Wert (γ -Globulin = 12,69 %) sind in den beiden letzten Kolonnen der Tab. I die Werte der Extragradiënten (% ϵ und % δ) angegeben, die demgemäss von entsprechend hohen Werten nach einem Wert 0 zu verlaufen.

Tabelle I.
Relative Prozentwerte der Aufnahmen von Figur 3.

Aufn.- Nr.	Descending boundaries:						
	$\kappa_{\text{Lösungp}}$	Albumin- Gruppe	α -Glob.- Gruppe	β -Glob.- Gruppe	Fibri- nogen	γ -Glob. + ε - boundary	Puffer- Variation
		%	%	%	%	%	\pm %
1	0,003078	53,39	11,79	10,54	4,82	19,46	— 8
2	0,003078	53,28	11,69	11,51	4,06	19,46	— 4
3	0,003078	55,22	12,33	10,62	5,50	17,33	— 2
4	0,003078	53,62	10,40	10,47	6,45	18,06	\pm 0
5	0,003078	55,22	11,01	12,90	5,50	15,37	+ 2
6	0,003078	54,53	12,12	11,47	6,00	15,87	+ 4
7	0,003078	57,97	10,36	12,09	6,14	13,44*	+ 8
8	0,003078	58,15	11,67	12,48	5,03	12,67*	+ 10
9	0,003078	(60,24)	(11,22)	(13,90)	(5,61)	(9,02)	+ 12

Aufn.- Nr.	Rising boundaries:						
	κ_{Puffer}	Albumin- Gruppe	α -Glob.- Gruppe	β -Glob.- Gruppe	Fibri- nogen	γ -Glob. + δ - boundary	Extragradienten-Werte für: γ -Globulin = 12,69%
		%	%	%	%	%	% ε % δ
1	—	45,07	7,07	10,24	3,73	33,89	6,77 21,20
2	0,003067	46,40	9,79	9,61	4,99	29,21	6,77 16,52
3	0,003125	48,96	9,57	10,32	5,07	26,08	4,64 13,39
4	0,003195	50,00	9,35	10,50	4,96	25,19	5,37 12,50
5	0,003252	50,56	9,67	11,11	6,24	22,42	2,68 9,73
6	0,003309	51,09	10,47	11,46	6,28	20,70	3,18 8,01
7	0,003425	57,29	10,97	12,77	5,99	12,98*	0,75 0,29
8	0,003484	58,69	12,27	12,07	5,32	11,65*	-0,02 -1,04
9	—	(65,60)	(12,54)	(13,51)	(4,42)	—	— —

Noch übersichtlicher ist der Verlauf der relativen Prozentwerte der rising und descending boundaries der Albumingruppe, des γ -Globulins zusammen mit den Extragradien sowie der Extragradien einzeln in Figur 4 dargestellt, in welcher auch die gemessenen Leitfähigkeitswerte gestrichelt (---) eingetragen sind. Die Übereinstimmung der relativen Prozentwerte beider Teilbilder ist für eine Pufferkonzentration von etwa 9% erreicht.

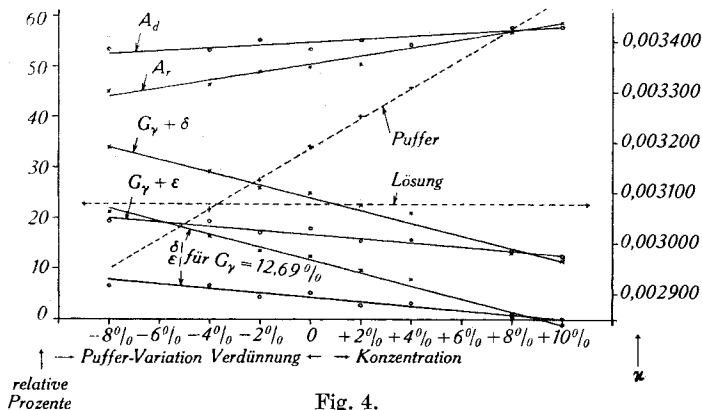


Fig. 4.

Auf die beschriebene Weise ist es also möglich, auch unter nicht besonders günstigen Versuchsbedingungen die Extragradien zu eliminieren und beide Teilbilder in bezug auf die relativen Mengen der Protein-Komponenten direkt auswertbar zu erhalten.

Die in diesen Versuchen gemessenen Werte der anodischen Beweglichkeiten u sind in Tabelle II zusammengestellt. Alle Werte sind auf die Leitfähigkeit $\kappa = 0,003078$ der Untersuchungslösung bezogen.

Der Gang der Werte ist besser an Hand von Figur 5 zu überblicken, in welcher ihr Verlauf graphisch dargestellt ist. Die Linien des mittleren Wertes der Beweglichkeiten der descending boundaries weichen bei extremen Puffervariationen, wie zu erwarten ist, ein wenig von der Horizontalen ab, verlaufen indessen in dem wichtigen Bereich (Puffer-Konzentration 0—9%) praktisch parallel zur Abszisse. Die durch diesen Abschnitt dieser Linien gegebenen Beweglichkeitswerte sind also im Einklang mit der für sie angenommenen Definition als richtig anzusehen.

Im Vergleich dazu zeigen die entsprechenden mittleren Beweglichkeitswerte der rising boundaries einen unterschiedlichen Verlauf: diejenigen der schneller wandernden Komponenten nehmen ab, um sich denjenigen der descending boundaries anzunähern, während jene der langsamer wandernden Komponenten ungefähr parallel dazu verlaufen, wobei sie etwas grösser bleiben. Nur der Beweglichkeitswert der schnellsten Komponente (der Albumin-Gruppe) sinkt auf den richtigen Wert.

Tabelle II.
Beweglichkeiten u ($\times 10^5$) für $\alpha = 0,003078$ der Untersuchungslösung

Aufn.-Nr.	Descending boundaries:						
	$\alpha_{\text{Lösungp}}$	Albumin-Gruppe	α -Glob.-Gruppe (α_2)	β -Glob.-Gruppe	Fibrinogen	γ -Globulin	Puffer-Variation $\pm \%$
1	0,003078	7,34	4,83	3,28	2,33	1,19	- 8
2	0,003078	7,58	5,07	3,46	2,51	1,43	- 4
3a	0,003078	8,06	5,49	4,00	3,05	1,49	- 2
4a	0,003078	8,18	5,67	4,18	3,16	1,53	± 0
5	0,003078	7,88	5,37	3,76	2,69	1,37	+ 2
6	0,003078	8,12	5,61	4,06	3,04	1,80	+ 4
7	0,003078	8,00	5,49	4,00	2,98	1,67	+ 8
8a	0,003078	8,18	5,56	3,87	2,94	1,61	+ 10
9	0,003078	(8,54)	(5,97)	(4,48)	(3,40)	—	+ 12

Aufn.-Nr.	Rising boundaries:					
	α_{Puffer}	Albumin-Gruppe	α -Glob.-Gruppe (α_2)	β -Glob.-Gruppe	Fibrinogen	γ -Globulin
1	—	9,25	6,68	4,72	3,34	1,19
2	0,003067	9,13	6,74	4,77	3,46	1,61
3a	0,003125	8,72	6,21	4,78	3,58	1,19
4a	0,003195	8,48	6,21	4,66	3,52	1,55
5	0,003252	8,83	6,39	4,54	3,28	1,49
6	0,003309	8,65	6,45	4,72	3,58	1,91
7	0,003425	8,36	6,18	4,48	3,34	1,97
8a	0,003484	8,00	5,74	4,48	3,46	1,97
9	—	(8,24)	(5,97)	(4,66)	(3,88)	—

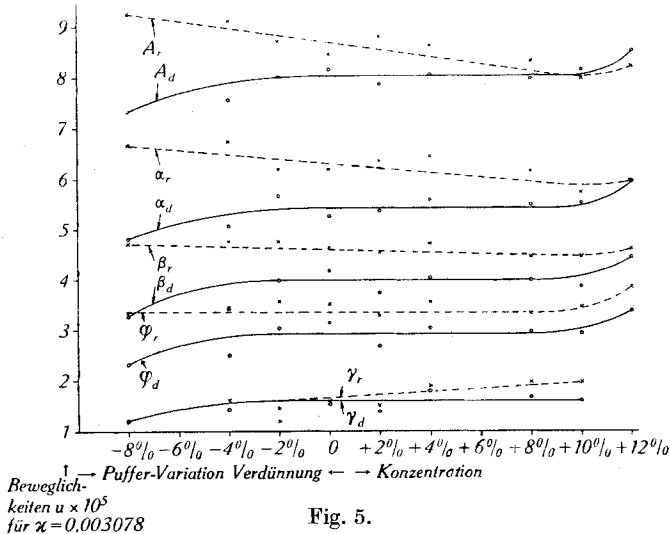


Fig. 5.

Die Änderung der Pufferkonzentration im Gebiet der rising boundaries, wie sie zur Eliminierung der Extragradiënten führt, garantiert also nur für schnelle Komponenten eines Gemisches auch eine genügende Angleichung der Beweglichkeitswerte im Bilde der rising boundaries an die richtigen Werte, während für langsame Komponenten der Einfluss der Milieuverhältnisse doch so merklich wird, dass — wenigstens im gewählten Beispiel — die Beweglichkeitswerte dieser Komponenten nicht als korrekt gelten dürfen, auch wenn die Abweichungen, die im Wert 0,5 nicht übersteigen, in vielen Fällen hingenommen werden können. Qualitativ ist der Grund dafür leicht einzusehen: An der Grenzfläche des schnellsten rising boundary nimmt, besonders wenn die ihm zu Grunde liegende Komponente mengenmässig hervortritt, die Leitfähigkeit so weit ab, dass die Wanderungsgeschwindigkeit der nachfolgenden Komponenten merklich weniger verlangsamt wird und ihre Beweglichkeitswerte noch etwas zu gross bleiben, wenn diese auf den Leitfähigkeitswert der Untersuchungslösung bezogen werden.

*H. Svensson*¹⁾ hat für den Fall, dass die boundary anomalies in den Elektrophorese-Bildern klein gehalten oder unterdrückt werden, vorgeschlagen, der Berechnung der Beweglichkeiten den Mittelwert der Geschwindigkeiten der korrespondierenden Komponenten, sowie den Mittelwert der Leitfähigkeiten der Untersuchungslösung und der überschichteten Pufferlösung zu Grunde zu legen. Zweifelsohne wird damit eine im Prinzip sehr korrekte Angabe der gewünschten Werte erreicht, doch hat diese Berechnungsweise den Nachteil der Umständlichkeit.

*C. Lagercrantz*²⁾ hat in einer mit eingebauten Platinelektroden versehenen Elektrophorese-Zelle die bei Elektrophorese-Versuchen auftretenden Leitfähigkeitsänderungen messend verfolgt und dabei die früheren prinzipiellen Ergebnisse von *L. G. Longworth* und *D. A. McInnes*³⁾ bestätigt und erweitert. An den Orten der rising boundaries traten Leitfähigkeitsabnahmen auf, die am Ort des δ -boundary durch einen Leitfähigkeitsanstieg bis auf den Leitfähigkeitswert der Untersuchungslösung kompensiert wurden; an den Orten der descending boundaries erfolgten Leitfähigkeitszunahmen, die am Ort des ε -boundary durch einen Abfall bis auf den Wert der überschichteten Pufferlösung ausgeglichen wurden.

Die Änderungen in den Konzentrations- und Leitfähigkeits-Verhältnissen, wie sie durch die Konzentrationserhöhung der überschichteten Pufferlösung bewirkt werden und zu dem beschriebenen Ergebnis führen, lassen sich an Hand von Figur 6 überblicken, in welcher über dem gestreckt gezeichneten U-Rohr für zwei Fälle,

¹⁾ Ark. Kem. **22** [A] Nr. 10, 1 (1946).

²⁾ Ark. Kem. **19** [A], No. 7, 1 (1945).

³⁾ loc. cit.

nämlich denjenigen der Übersichtung der Untersuchungslösung mit gleicher Pufferlösung („Normal“-fall), sowie denjenigen der Übersichtung der Untersuchungslösung mit passend konzentrierter Pufferlösung (Fall der Eliminierung der Extragradiënten) der Gang der Werte der Protein-Konzentration, der Gesamt-Leitfähigkeit und der Pufferkonzentration eingezeichnet ist.

Für beide Fälle sei angenommen, dass ein aus nur zwei Komponenten (A, B) bestehendes Gemisch, in welchem die Komponente A überwiegt, eine bestimmte, gleiche Zeit lang anodisch gewandert sei, so dass die Grenzflächen die angegebenen Lagen einnehmen. Ferner sei in Übereinstimmung mit den bei der Untersuchung von Proteinen im allgemeinen vorliegenden Verhältnissen angenommen, dass der Beitrag der Proteine zur Leitfähigkeit je ein negativer sei und dass sich während des Versuches weder die Konzentration und Leitfähigkeit der überschichteten Pufferlösung, noch der Untersuchungslösung in den nicht von Gradienten durchlaufenen Bereichen geändert habe. Dann ergibt sich für die beiden Fälle unter Hinzuziehung der in den Versuchen Nr. 4 und Nr. 7 gemessenen Leitfähigkeiten der Untersuchungs- und der Pufferlösungen das Folgende:

1) Normalfall: Jenseits A_r und ε bleiben Leitfähigkeit ($\kappa = 0,003195$) und Pufferkonzentration unverändert, ebenso zwischen δ und A_d Leitfähigkeit ($\kappa = 0,003078$) und Gesamtkonzentration (Puffer + Proteine), wenn angenommen wird, dass sich während des Versuches die Milieu-Grenzen um gleiche, kleine Strecken $O-\delta$ und $O'-\varepsilon$ in anodischer Richtung fortbewegt haben. Wenn nun weiter, ebenfalls in Übereinstimmung mit dem Ergebnis von Versuch Nr. 4, die durchlaufenen Strecken $O-A_r$ und $O-B_r$ etwas grösser als die Strecken $O'-A_d$ und $O'-B_d$ sind, also die Proteinkonzentration im Bereich der rising boundaries etwas kleiner als im Bereich der descending boundaries geworden ist, so muss der Gang der Proteinkonzentration der folgende sein: Sie steigt bei A_r vom Wert Null auf den dieser Komponente entsprechenden Wert, vermindert um einen Betrag, welcher der durch die schnellere Wanderung hervorgerufenen Verdünnung entspricht. Sie steigt weiter bei B_r um den dieser Komponente entsprechenden Wert, ebenfalls vermindert um den der schnelleren Wanderung dieser Komponente entsprechenden Wert. Da aber bei δ die ursprüngliche Proteinkonzentration der Summe beider Komponenten erreicht wird, muss dort noch ein weiterer Konzentrationsanstieg erfolgen, welcher der verbliebenen Differenz entspricht und dessen Grösse der Zunahme der Wanderungsgeschwindigkeiten im Bereich der rising boundaries proportional ist. Das δ -boundary entsteht also (zum Teil, vgl. weiter unten) auch auf Grund eines Protein-Konzentrationsgradienten¹⁾. Bei A_d nimmt dann die

¹⁾ L. G. Longworth und D. A. McInnes, Am. Soc. **62**, 705 (1940).

Proteinkonzentration um den der Komponente A entsprechenden Wert ab, um sich bei B_d weiter um den der Komponente B entsprechenden Betrag, also auf den Wert O, zu vermindern. Die Leitfähigkeiten seien diejenigen des Versuchs Nr. 4, d. h. die Leitfähigkeit in dem nicht von Gradienten durchlaufenen Pufferbereich habe den Wert $\kappa = 0,003195$, jene im nicht von Gradienten durchlaufenen Bereich der Untersuchungslösung den Wert $\kappa = 0,003078$. Bei negativem Beitrag der Proteine zur Leitfähigkeit sinkt diese bei A_r um einen grösseren und bei B_r nochmals um einen kleineren, der jeweiligen Proteinkonzentration entsprechenden Betrag ab. Ihr Wert liege dann unter demjenigen der Untersuchungslösung ($\kappa = 0,003078$). Da sie diesen Wert aber bei δ wieder erreicht, muss dort ein Leitfähigkeitsanstieg stattfinden, obschon der am gleichen Ort auftretende kleine Protein-Konzentrationsgradient einen gegenteiligen Effekt bewirkt. Der also erhebliche Leitfähigkeitsanstieg bei δ kann somit nur einen entsprechenden Konzentrationsanstieg der Puffersalze zur Ursache haben, der sich gleichzeitig als Konzentrationsgradient abzeichnet und damit die Hauptursache (vgl. oben) des δ -boundary bildet. Bei A_d nimmt dann die Leitfähigkeit um einen grösseren und bei B_d nochmals um einen kleineren Betrag zu, womit sie erheblich über den Wert $\kappa = 0,003195$ ansteigt. Da dieser Wert aber bei ϵ wieder erreicht werden muss, also an einem Orte, vor dem die Proteinkonzentration bereits Null geworden ist, kann diese Leitfähigkeitsabnahme ihren Grund nur in einer entsprechenden Konzentrationsabnahme der Puffersalze haben, die sich ebenfalls als Konzentrationsgradient abzeichnet und alleinige Ursache des ϵ -boundary ist. Die Puffer-

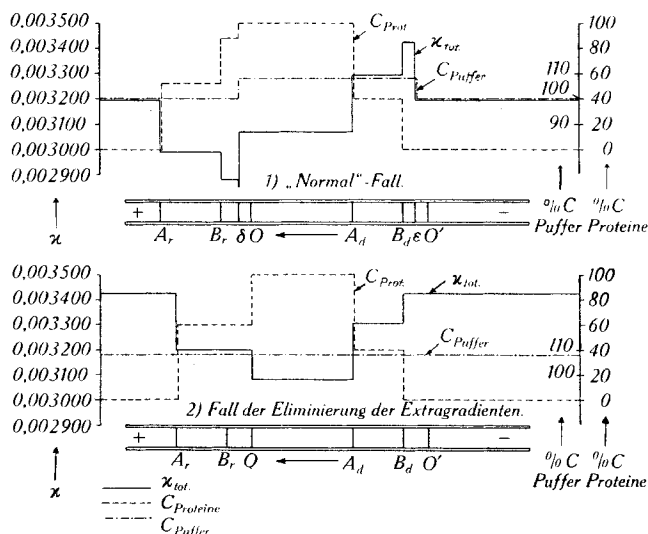


Fig. 6.

konzentrationsänderungen, die nur an den Orten δ und ε auftreten können und sich dort durch Brechungsindexgradienten zu erkennen geben, sind auf Grund des Leitfähigkeitsverlaufs in ihrem Vorzeichen bestimmt: Am Ort δ kann die Pufferkonzentration nur zunehmen, während sie am Ort ε um den gleichen Betrag wieder abnimmt.

2) Fall der Eliminierung der Extragradienten: Aus dem Vorstehenden folgt, dass die Eliminierung der Extragradienten durch eine Gleichstellung der Pufferkonzentrationen zu erreichen sein muss. Die einfachste der Möglichkeiten ist diejenige der Konzentrationserhöhung der überschichteten Pufferlösung auf den Wert, den die Untersuchungslösung in bezug auf ihren Salzgehalt besitzt. Im Falle des beschriebenen Beispiels war es erforderlich, die Pufferkonzentration um 8% bzw. die Leitfähigkeit der überschichteten Pufferlösung von 0,003195 auf $\kappa = 0,003425$ zu erhöhen, um die Extragradienten zum Verschwinden zu bringen. Der Verlauf der Proteinkonzentration ist für diesen Fall prinzipiell dem bereits beschriebenen gleich, da die Proteinkonzentration die gleiche ist. Da aber die Konzentration der überschichteten Pufferlösung im Bereich der rising boundaries nun der Pufferkonzentration im Bereich der descending boundaries gleich ist, reduzieren sich die im Normalfall wegen der geringeren Salzkonzentration der überschichteten Pufferlösung erhöhten Wanderungsgeschwindigkeiten der rising boundaries hier (in erster Annäherung) auf die Werte der descending boundaries. Da damit die Proteinkonzentrationen in beiden Wanderungsbereichen dieselben werden, so muss (ausser den Extragradienten, wie sie infolge von Pufferkonzentrationsänderungen entstehen) auch der Proteinkonzentrationsgradient am Ort δ verschwinden, so dass nur die Konzentrationsanstiege bei A_r und B_r und gleich grosse Konzentrationsabnahmen bei A_d und B_d auftreten können. Da die Pufferkonzentration durchwegs dieselbe bleibt und sich damit die Pufferleitfähigkeit ebenfalls nicht ändert, ist der Verlauf der gesamten Leitfähigkeit nur noch vom Verlauf der Proteinkonzentration abhängig und diesem umgekehrt proportional. Die Konzentrations- und Leitfähigkeitsverhältnisse vereinfachen sich also für den Fall der Eliminierung der Extragradienten.

Aus den Diagrammen ist noch das Folgende zu entnehmen: Tritt eine mengenmässig überwiegende, schnelle Komponente auf, so erfolgt die Wanderung ihrer Grenzflächen im 2. Fall in Bereichen nahezu gleicher Leitfähigkeit. Die Folge davon ist, dass die Beweglichkeiten ihrer beiden boundaries fast identisch werden. Tritt nach dieser Komponente eine mengenmässig kleine auf, so befinden sich deren Grenzflächen in Bereichen verschiedener Leitfähigkeit, woraus folgt, dass die Beweglichkeiten ihrer beiden boundaries nicht gleich sein können.

Aus den in Versuch Nr. 4 und Nr. 7 gemessenen Leitfähigkeitswerten, die zur Aufstellung der Schemata der Figur 6 herangezogen worden sind, folgt, dass im Versuch

Nr. 4 die Pufferleitfähigkeit der Untersuchungslösung mit $\kappa = 0,003425$ und ihre Proteinleitfähigkeit mit $\kappa = -0,000347$ anzunehmen ist. Der Gesamt-Leitfähigkeitswert im Versuch Nr. 4 fällt daher im Bereich der rising boundaries von $\kappa = 0,003195$ auf den Wert $\kappa = 0,002848$. Er steigt dann am Orte δ von diesem seinem tiefsten Wert auf denjenigen der Untersuchungslösung, $\kappa = 0,003078$, so dass die Zunahme $\Delta\kappa = 0,000230$ beträgt. Der höchste Leitfähigkeitswert wird am Ort B_d mit $\kappa = 0,003425$ erreicht, worauf am Orte ε eine Abnahme um $\Delta\kappa = 0,000230$ auf den Wert der Pufferlösung $\kappa = 0,003195$ erfolgt.

Die den bei δ und ε auftretenden Leitfähigkeitsänderungen zu Grunde liegenden Puffer-Konzentrationsänderungen sind in Versuch Nr. 7 durch entsprechende Erhöhung der Konzentration der überschichteten Pufferlösung aufgehoben worden. In diesem Versuch sinkt deshalb der Gesamt-Leitfähigkeitswert im Bereich der rising boundaries von $\kappa = 0,003425$ auf $\kappa = 0,003078$, um sich im Gebiet der descending boundaries von diesem Wert wieder auf den erstgenannten zu erheben.

Allgemein kann ausgesagt werden, dass die Bedingung für die Eliminierung der Extragradients darin besteht, dass zu ihrer Beseitigung Konzentrations- bzw. Leitfähigkeitssprünge zwischen dem Milieu der wandernden Stoffe und der überschichteten Pufferlösung aufzuheben sind. Um Komplikationen zu vermeiden, soll bei einer solchen Massnahme das Milieu der descending boundaries unverändert bleiben. Es ist also die überschichtete Pufferlösung anzupassen. Meistens ist ihre Konzentration zu erhöhen, doch sind auch Fälle denkbar, in denen sie zu erniedrigen wäre; auch die Eliminierung nur einer der beiden Extragradients erscheint möglich, indem nur die der entsprechenden Seite überschichtete Pufferlösung angepasst würde, doch hat ein solches Vorgehen zunächst keine praktische Bedeutung.

Die Art und Grösse der erforderlichen Korrektur der überschichteten Pufferlösung kann nur angegeben werden, wenn Vorzeichen und Grösse der Konzentrations- bzw. Leitfähigkeitssprünge am Ort δ bzw. ε bekannt sind; diese Daten müssen durch entsprechende Messungen oder durch Reihenversuche ermittelt werden.

Da die Anpassung der überschichteten Pufferlösung zum Zwecke der Eliminierung der Extragradients mit ihren erwünschten Folgen von der Wahl des Puffers unabhängig ist, mit anderen Massnahmen zur Verringerung der boundary anomalies, also zur Verbesserung der Elektrophorese-Bilder kombiniert werden kann und sehr leicht durchführbar ist, sollte sie besonders auch bei Plasmaanalysen Anwendung finden, zumal dabei gewöhnlich grössere Versuchsreihen unter praktisch gleichbleibenden Bedingungen durchzuführen sind, für welche die erforderliche Puffer-Konzentrierung von vorneherein bestimmt und beibehalten werden kann.

Man ermittelt in diesem Falle zunächst an Hand einiger Testversuche jene Konzentrierung der überschichteten Pufferlösung, bei welcher die Extragradients verschwinden, auf etwa $\pm 1\%$ genau. Eine Pufferlösung dieser Konzentration wird dann unter Wahrung gleicher Versuchsbedingungen als Überschichtungslösung verwendet.

Damit wird ausser der Eliminierung der Extragradierten und in Übereinstimmung mit der Theorie erreicht, dass die Flächenwerte und damit die relativen Prozentwerte der einzelnen Komponenten in beiden Teilbildern gleich gross werden und damit diesen direkt, d. h. ohne Korrekturen richtig entnommen werden können. Demzufolge ist es dann gleichgültig, welches Teilbild zur Bestimmung der Flächenwerte herangezogen wird, doch empfiehlt es sich, hierzu das Bild der rising boundaries zu benützen, da es die Vorteile aufweist, schärfer

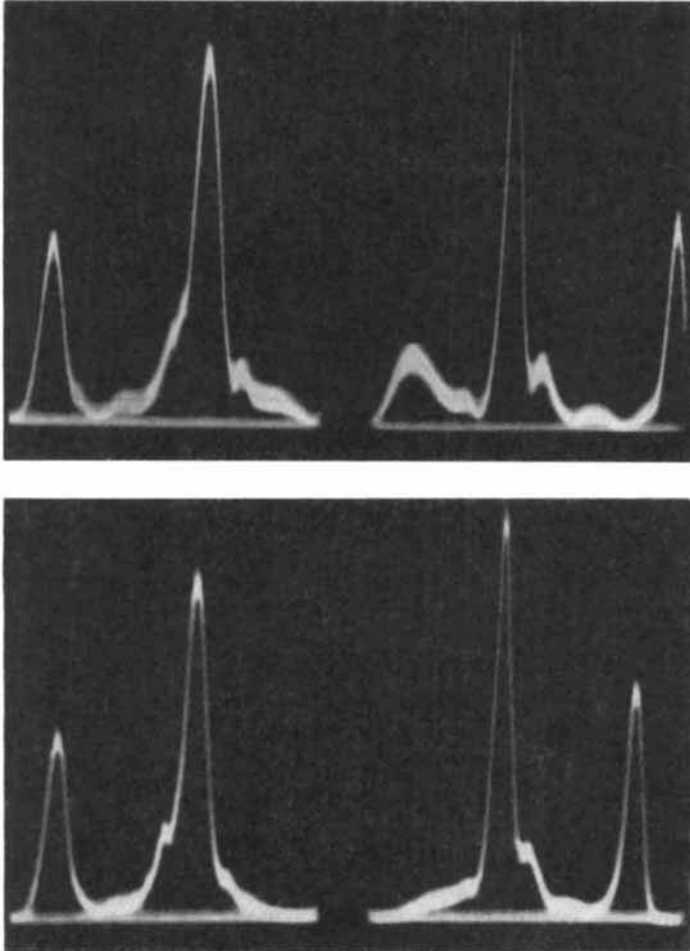


Fig. 7.

Pathologisches Plasma (β -Myelom-Fall). Obere Aufnahme nach Übersichten der Untersuchungslösung mit gleicher Pufferlösung.

Untere Aufnahme nach Übersichten der Untersuchungslösung mit um 8% konzentrierter Pufferlösung.

und nicht durch die „ β -Globulin disturbance“¹⁾ beeinträchtigt zu sein. Die durchlaufenen Strecken dagegen müssen in der üblichen Weise²⁾ dem Bilde der descending boundaries entnommen werden.

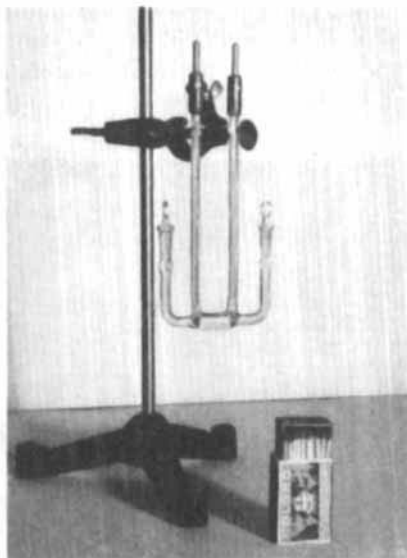


Fig. 8.

Leitfähigkeits-Messzelle

für Protein-Lösungen nach *Th. Shedlovsky* mit konisch-ringförmigen Platin-Elektroden.

Die beiden Aufnahmen der Figur 7 zeigen am Beispiel eines stationären pathologischen Falles (Plasma-Aufnahme eines β -Myelom-Patienten) den Fortschritt, der sich durch die Anwendung der beschriebenen Massnahme im Elektrophoresebild ergibt (während dessen Auswertungen andernorts³⁾ folgen sollen): Das obere, in der üblichen Weise hergestellte Bild zeigt erhebliche Extragradientsen, so dass die in diesem Falle wichtige Bestimmung der noch vorhandenen kleinen relativen Menge γ -Globulin so gut wie unmöglich ist. Zudem sind die Beweglichkeiten der Komponenten in den beiden Teilbildern sehr verschieden, so dass bei voller Ausnützung des Bildfeldes im Bereich der descending boundaries dasjenige der rising boundaries vom Albumin-Gradienten bereits überschritten wird. Das untere Bild, bei dessen Versuch die Konzentration der überschichteten Pufferlösung um 8 % erhöht worden war, zeigt dagegen keine Extragradientsen mehr und

¹⁾ Vgl. hierzu: *D. H. Moore* und *J. Lynn*, *J. Biol. Chem.* **141**, 819 (1941).

²⁾ *E. Wiedemann*, *Schweiz. med. Wschr.* **75**, 229 (1945).

³⁾ *Schweiz. med. Wschr.*

erlaubt deshalb auch die Bestimmung des kleinen γ -Globulin-Anteiles in beiden Teilbildern, in denen überdies die Beweglichkeiten der einzelnen Komponenten nahezu gleich gross geworden sind.

Die für die Berechnung der Beweglichkeiten nach der Formel (1) erforderliche Bestimmung der Leitfähigkeit κ der Untersuchungslösung erfolgt womöglich während des Elektrophorese-Versuches im Elektrophorese-Thermostat. Eine dafür sehr geeignete Messzelle hat *Th. Shedlovsky*¹⁾ angegeben. Figur 8 zeigt die vom Verfasser benützte Leitfähigkeits-Messzelle, die derjenigen von *Th. Shedlovsky* nachgebildet, in ihrem Aufbau aber noch etwas vereinfacht ist, so dass sie sehr bequem in den Thermostaten eingesenkt werden kann.

Da es von Bedeutung ist, die Genauigkeit zu kennen, mit welcher die gesuchten Werte erhalten werden können, sei hierüber das Folgende ausgeführt:

Die relativen Prozentwerte, wie sie z. B. in der Aufnahme Nr. 7 oder Nr. 8 (Tabelle I) durch Auswertung der beiden Teilbilder erhalten worden sind, stimmen jeweils bis auf $\pm 0,5\%$ im schlechtesten Falle, meistens aber besser überein. Während der Fehler bei der Abbildung der Gradienten in Kurvenzüge, sowie bei deren Vergrösserung verschwindend klein ist und auch die Planimetrierung der gesamten Fläche eines Teilbildes wie diejenige der einzelnen, gegen einander extrapolierten Flächen ohne Einführung eines merklichen Fehlers erfolgt, besteht eine gewisse Unsicherheit bei der Vornahme der Extrapolationen selbst, deren Behebung die Genauigkeit der Bestimmung der relativen Prozentanteile bei der Analyse von Gemischen wahrscheinlich zu steigern vermöchte. Die übliche Zuhilfenahme idealer Verteilungskurven nach *Gauss*²⁾ bei der Extrapolation der Kurvenzüge bleibt leider, wenn es auf höchste Genauigkeit ankommt, insofern problematisch, als die Elektrophorese-Kurven (im Gegensatz zu Diffusions-Kurven) infolge der an den Gradienten auftretenden Milieuänderungen der *Gauss*-Funktion nur näherungsweise entsprechen können.

Bei den vergleichbaren Werten der Beweglichkeiten der descending boundaries (Aufnahmen Nr. 4–8, Puffervariation 0 bis $+10\%$, Tabelle II) beträgt der maximale Unterschied, angeführt in der Reihenfolge der Komponenten, 0,30, 0,30, 0,42, 0,47 und 0,27 Einheiten $\times 10^5$, so dass mit einer mittleren Abweichung von etwa $\pm 0,15$ bis $\pm 0,20 \times 10^5$ zu rechnen ist. Da von den Werten der Gleichung (1) q , κ und t sehr genau bestimmbar sind, werden die beobachteten Unterschiede zum kleineren Teil auf eine nicht ganz ausreichende Anzeigegenauigkeit des verwendeten Milliampèremeters

¹⁾ *L. G. Longworth, Th. Shedlovsky und D. A. McInnes, J. exp. Med.* **70**, 399 (1939).

²⁾ *Vgl. K. Pearson, Phil. Trans. Roy. Soc., London [A]* **185**, 107 (1894).

und zum grösseren Teil auf die besonders bei flacheren Gradienten nicht ganz sichere Festlegung der senkrechten Flächenhalbierenden ihres Bildes zurückzuführen sein. Da aber die Bedeutung der Beweglichkeiten gegenüber jener der aus den Flächenwerten ableitbaren relativen Prozentzahlen im allgemeinen zurücktritt, dürften Massnahmen zur Verbesserung der Beweglichkeitsmessung nur in besonderen Fällen nötig sein.

Der Verfasser dankt Herrn Prof. Dr. *A. Stoll* herzlich für die grosszügige Unterstützung seiner Arbeiten. Er dankt ferner seinem Mitarbeiter, Herrn *A. Laforce*, für die sehr verständnisvolle und umsichtige Mithilfe bei der Ausführung der Versuche und Messungen.

Chemisch-pharmazeutisches Laboratorium „Sandoz“
(Prof. Dr. *A. Stoll*), Basel.
