

## 246. Zur Technik und Anwendung der Papier-Ionophorese

von Rolf Weber.

(15. VIII. 51.)

### A. Einleitung.

Im Verlauf von Untersuchungen, bei denen sich verfeinerte Nachweismethoden von Aminen in Körperflüssigkeiten als notwendig erwiesen haben, bauten wir die von *Wieland*<sup>1)</sup> beschriebene Ionophorese auf Filtrierpapier in einigen Details weiter aus. *Wieland* beschreibt eine Anordnung, bei welcher der mit Puffer getränkte Streifen frei zwischen zwei Stegen in der feuchten Kammer ausgespannt wird; die Enden des Papierstreifens tauchen in das stromführende Puffergefäß ein. Nun ist aber Filterpapier, das frei in eine Flüssigkeit eintaucht, nach Einstellung des kapillaren Gleichgewichts derart nass, dass sich beim Auftragen kleiner Mengen der zu prüfenden Lösungen die Substanzbegrenzung alsbald durch unübersichtliche hydromechanische und kapillare Effekte ausbreitet. Nach erfolgter Wanderung im elektrischen Feld und Sichtbarmachung der Aminosubstanzen mit Ninhydrin sind jedenfalls diejenigen Flecken, welche aller kleinste Substanzmengen enthalten, bedeutend mehr verwaschen als auf Grund der Verbreiterung durch reine Diffusion zu erwarten wäre. Wenn es auf den Nachweis sehr kleiner Substanzmengen und die Ausnützung geringfügiger Unterschiede in der Wanderungsgeschwindigkeit ankommt, ist es nützlich, die erwähnten Verluste an Begrenzungsschärfe auf ein Mindestmass herabzusetzen.

Wir haben eine Verbesserung in dieser Beziehung erzielt durch Verwendung eines auf Glas aufliegenden, nur mässig mit Puffer befeuchteten Papierstreifens als Träger und einer Anordnung, die das Auftreten von Flüssigkeitsströmungen als Folge von „Gradienten des Benetzungsgrades“ weitgehend vermeidet.

Die Figuren 1a, 1b und 1c illustrieren den Unterschied der Trennbilder eines Gemisches von Glykokoll (1), Mezcalin (2), Phenyläthylamin (3), Histamin (4), Cadaverin (5), Dimethylamin (6) und Monomethylamin (7) einerseits mit der Trennkammer nach *Wieland* (jetzt im Handel als „Elphor“, *Bender & Hobein*, München), andererseits mit unserer Technik. Fig. 1a zeigt die Auftrennung des Gemisches nach unserer Technik in einer Zeit von 100' und mit einer Feldstärke von  $7,5 \text{ Vcm}^{-1}$ . Die Ninhydrinanfärbung der getrennten Flecken ist auch in der photographischen Reproduktion gut erkennbar. Fig. 1b zeigt eine Trennung im „Elphor“-Gerät bei Anlegung der üblichen Spannung von 110 Volt und einer Trenndauer von 140 Min. Bei vergleichbaren Wanderungswegen sind die Flecken so diffus, dass eine Wiedergabe nur nach Anzeichnung der Begrenzungen durch Bleistiftlinien mög-

<sup>1)</sup> *Th. Wieland & E. Fischer*, *Naturwiss.* **35**, 29 (1948). Betr. Anwendung vgl. A. **564**, 152 (1949).

lich war. Fig. 1c gibt ebenfalls eine Trennung im „Elphor“ wieder, jedoch ausgeführt mit 200 Volt in 90 Min. Die Flecken sind zwar weniger diffus als in Fig. 1b, doch erfolgte die Trennung nicht so scharf wie in Fig. 1a. Eine Beschreibung unserer Modifikation vorgängig der Mitteilung einiger Ergebnisse scheint uns deshalb gerechtfertigt<sup>1)</sup>.

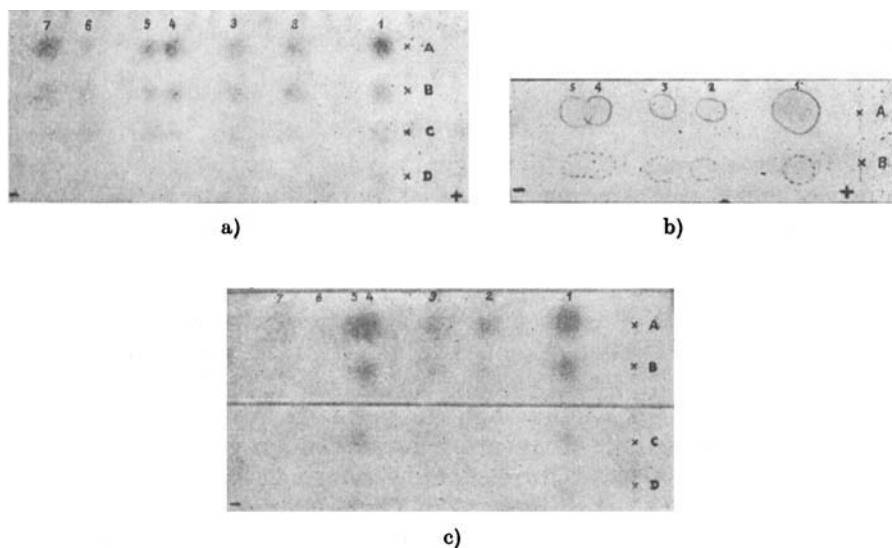


Fig. 1.

Trennung eines Gemisches einiger Aminoverbindungen nach verschiedenen Techniken. 1: Glykokoll, 2: Mezcalin, 3: Phenyläthylamin, 4: Histamin, 5: Cadaverin, 6: Dimethylamin, 7: Monomethylamin.

a) Unsere Anordnung: Citratpuffer pH 3,8; Versuchsdauer 100 Min.; Stromstärke 3,0 bis 3,3 mA bei 9 cm Streifenbreite; Spannung 1300 V bei ca. 150 cm totaler Länge des Streifens; Feld im Arbeitsgebiet 7,5 Vcm<sup>-1</sup>. — Je 1 mm<sup>3</sup> Lösung aufgetragen.

Verdünnungen (in Grammatomen Stickstoff pro Liter):

	A	B	C	D
Subst. 1 bis 5 .	1/100	1/200	1/500	1/1000
Subst. 6 u. 7. .	1/20	1/40	1/100	1/200

1 bis 5 im Original noch bei D deutlich sichtbar, Nachweisgrenze also 10<sup>-9</sup> Mol Aminstickstoff.

b) „Elphor“-Kammer mit der üblichen Betriebsspannung: Citrat, pH 3,8; 140'; 1,3 mA auf jedem der 4 cm breiten Streifen; 110 V längs der 28 cm langen Streifen. A 1/100 normal; B 1/500 normal; noch sichtbar, aber sehr diffus.

c) „Elphor“ mit erhöhter Spannung: pH 3,8; 90'; 2,4 mA je 4 cm Breite; 200 V längs 28 cm. Verdünnungen wie in Fig. 1a: Substanz 1—5 noch bei C (2·10<sup>-9</sup> Mol N) sichtbar.

<sup>1)</sup> Eine Ausführungsform mit aufliegendem Streifen wurde inzwischen in der Literatur erwähnt: K. A. Kraus, Am. Soc. **72**, 4328 (1950).

### B. Einzelheiten unserer Technik.

Während der Benetzungsgrad des Papierstreifens in der Elphorkammer etwa 210% (Flüssigkeitsgewicht per Papiergewicht) beträgt, arbeiten wir zur Erzielung scharfer Trennbilder mit einem solchen von 150%. Ein derartig schwach benetzter Streifen würde, wenn das Ende frei in wässrige Flüssigkeit eintaucht, binnen kurzem Puffer aufsaugen. Durch eine geeignete Diaphragmenanordnung lässt sich jedoch der Kapillarstrom weitgehend unterdrücken. Wir haben zudem die Gesamtlänge der schwach feuchten Papierbahn sehr gross gewählt (150 cm), verwenden aber nur das mittlere Drittel dieser Strecke zur Ausführung von Trennungen. Zur Erzeugung der nötigen Feldstärke ( $7\text{--}12 \text{ Vcm}^{-1}$ ) sind natürlich an die Enden entsprechend hohe Spannungen (1000–1500 Volt) anzulegen. Die praktische Anordnung ist in Fig. 2a und 2b dargestellt.

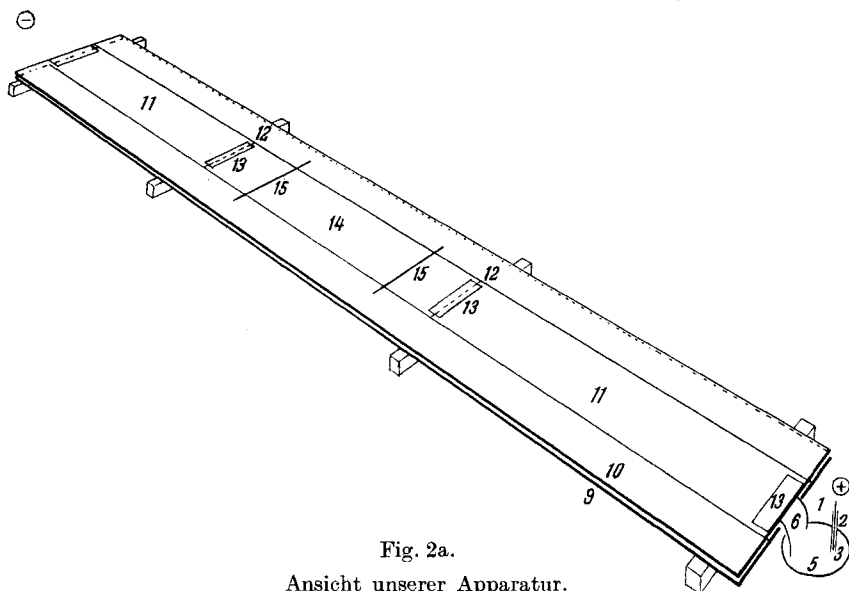


Fig. 2a.

Ansicht unserer Apparatur.

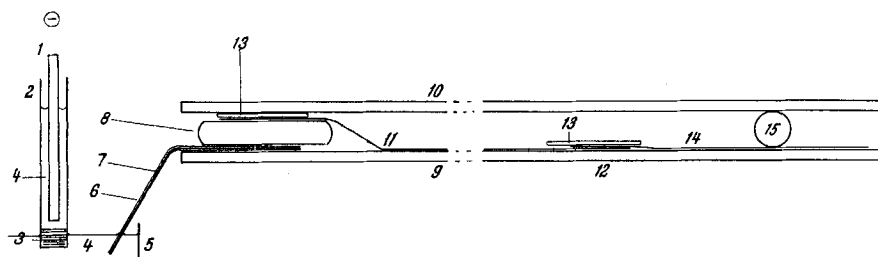


Fig. 2b.

Einzelheiten der Elektrodendiaphragmen und der Papierauflage.

- 1: Kohlelektroden, 2: Glasrohr, 3: Gipsverschluss, 4: Pufferlösung, 5: Petrischalen, 6: Cellophanschlauch, 7: Filterpapierstreifen im Lumen des Cellophanschlauches, 8: Tonplättchen, 9: untere Glasplatte, 10: obere Glasplatte, 11: äussere Drittel der Papierbahn, 12: Überlappungsstelle, 13: Objektträger, 14: inneres Drittel des Papiers (Arbeitsbereich), 15: Kohlestab zum Felddausgleich.

lignes appartenant à 3 solides de saturation représentent les solutions saturées de 3 phases solides. Il y a, dans ce diagramme, 4 «*lignes à 3 phases solides*»:

3—8 saturation en A + B + C

5—8 saturation en A + C + D

7—8 saturation en A + B + D

9—8 saturation en B + C + D

Conformément à la règle des phases

$$n + 2 - \varphi = \delta,$$

il n'existe, à température donnée, qu'une seule solution qui soit simultanément saturée en A, B, C et D. Le point 8 de la fig. 4 où les 4 solides de saturation se rencontrent représente cette «*solution à 4 phases solides*». C'est un «*point invariant de l'isotherme*».

Retenons que, dans le *diagramme de solubilité* du système quinaire, chaque point, qu'il soit situé à l'intérieur ou à la surface d'un solide de saturation, représente une solution saturée *seule*. Il est le *point figuratif uniquement de la phase liquide* saturée d'une ou de plusieurs phases solides. Les mélanges hétérogènes (solution saturée + phases solides) n'ont pas de points figuratifs dans ce diagramme de solubilité, dans lequel la cote du solvant fait partie intégrante des coordonnées quoiqu'elle ne soit pas représentée par une longueur dans le diagramme tridimensionnel. Les solutions non saturées n'ont pas non plus de points figuratifs dans le diagramme. Par exemple, le point 1 de la fig. 4 représente la solution saturée de la substance A en l'absence de B, C et D.

Il arrive qu'on utilise le tétraèdre (fig. 2) ou la pyramide (fig. 1) pour représenter des mélanges de A + B + C + D sans tenir compte de la quantité de solvant S qui les accompagne («*diagramme de mélange*»). Dans ce cas, les points figuratifs ne possèdent pas de cote. Un point P dans ce *diagramme de mélange* peut alors représenter tout aussi bien un certain mélange A + B + C + D à l'état solide ou une solution saturée ou non saturée de ces 4 corps ou encore une solution saturée mélangée avec 1, 2, 3 ou 4 phases solides. Le point 1 de la fig. 4 peut donc représenter dans le *diagramme de mélange*

1. la substance A à l'état solide,
2. une solution saturée de la substance A en absence de B, C et D,
3. une solution non saturée de la substance A en absence de B, C et D,
4. un mélange de la substance A solide avec une quantité quelconque de solution saturée en A (en absence de B, C et D).

*Pour certaines opérations (p. ex. la construction des trajectoires de cristallisation) on superpose ces deux diagrammes — le «diagramme de solubilité» avec la cote de solvant et le «diagramme de mélange» sans cote de solvant — et l'on utilise alternativement l'un ou l'autre.*

Grund von Ionophoreseversuchen direkt Ionenbeweglichkeiten zu messen versucht, ist jedenfalls der Betrag der Elektroendosmose von der gemessenen kationischen Wanderung zu subtrahieren. Es fällt aber auf, dass diese Eigenwanderung der Neutralkörper von Versuch zu Versuch recht erheblich schwankt.

Wir haben diese Schwankungen folgendermassen zahlenmässig festgehalten:

Bei unsern Ionophoreseversuchen, welche bei Anlass der Prüfung von aus Körperflüssigkeiten gewonnenen Fraktionen ausgeführt wurden — alle mit dem gleichen Papier und dem gleichen Puffer —, hatten wir jeweils als „Randmarken“ ein Gemisch von Glykokoll, Mezcalin und Cadaverin bei der Trennung mitlaufen lassen. An Hand dieser Randmarken haben wir folgende Strecken gemessen (Fig. 3): Cadaverin—Glykokoll (c), Mezcalin—Glykokoll (m) und Glykokoll—Auftragungsort (g). Die Abschätzung der Fleckenmittelpunkte ist auf 1 bis 2 mm genau ohne Willkür möglich. Der Quotient  $m/c = A$  beträgt im Mittel von 95 Messungen  $0,370 \pm 0,020$  (mittlerer Fehler der Einzelmessung, d.h. Wurzel des Mittels aller Fehlerquadrate); der Quotient  $g/c = B$  beträgt  $0,214 \pm 0,110$ .

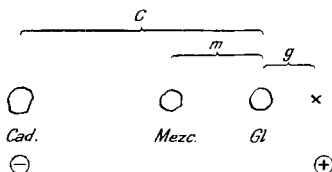


Fig. 3.

Der immerhin beträchtliche Unterschied der Streuung der beiden Quotienten ist einfach zu erklären. Wenn wir von der bei pH 3,8 noch kleinen Abweichung des Glykokolls vom isoelektrischen Verhalten absehen (seine Wanderung beträgt ca.  $1/30$  des „Cadaverinweges“), können wir den Ort des Glykokolls als Ausgangspunkt der rein kationischen Wanderung der beiden Basen Mezcalin und Cadaverin betrachten, A also als Wanderungswert des Mezcalins, wenn wir denjenigen des Cadaverins willkürlich als Einheit setzen. B stellt dann, im gleichen Mass ausgedrückt, praktisch den Betrag der Flüssigkeitsverschiebung dar. Wäre nun B reine Elektroendosmose, so würde die grosse Streuung der Einzelwerte von B im Verhältnis zu derjenigen von A schwer zu erklären sein, da in allen Versuchen Papiersorte und Puffer gleich waren, also auch das die Endosmose bewirkende Potential konstant bleiben sollte. Naheliegender ist dagegen die Annahme, dass die additive Verschiebung des ganzen Systems neben der Elektroendosmose auf dem ganz trivialen Einfluss kapillarer Flüssigkeitsbewegungen beruht, die ihren Ursprung in zufälligen Asymmetrien der Benetzung des Streifens haben. Das kann man durch einen einfachen Versuch belegen, indem man ein Gemisch von Aminen wie üblich auf den Streifen aufträgt, aber die Elektroden mit Wechselstrom versorgt, um ähnliche Verhältnisse bezgl. der *Joule'schen* Wärme, jedoch ohne elektrische Asymmetrie zu bekommen. Bei solchen Versuchen zeigte sich, dass sich als Folge einer kleinen Mehrbenetzung des rechten oder linken äusseren Drittels der Papierbahn der an sich ziemlich kompakt bleibende Aminfleck binnen einer Stunde um mehrere cm vom Auftragungsort entfernen kann. Die Verschiebungen, die bei möglichst gleichmässiger Benetzung übrigbleiben, entsprechen in ihren Beträgen ungefähr den Schwankungen der „Elektroendosmose“ um ihren Mittelwert.

## 2. Darstellung einiger Wanderungswerte.

Die direkt beobachteten Wanderungswerte einer Anzahl basischer Substanzen in einem Citratpuffer von pH 3,8 und teilweise in Phos-

phatpuffer von pH 7 (basische Aminosäuren) sind in Fig. 4 graphisch zusammengestellt. Als Vergleichsmaßstab sind die der Wanderungsstrecke entsprechenden Werte der scheinbaren Ionenbeweglichkeiten<sup>1)</sup> aufgetragen in  $\text{cm}^2 \text{Std.}^{-1} \text{Volt}^{-1}$  als Einheit.

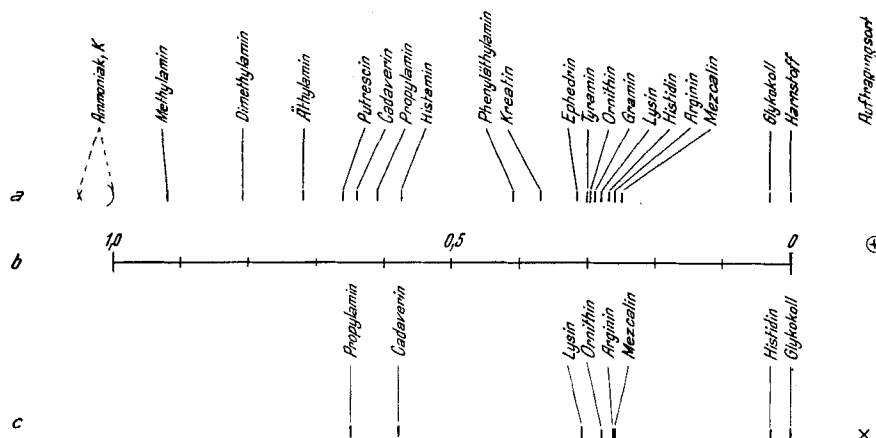


Fig. 4.

a) Wanderungswerte einiger Basen in einem Puffer von pH 3,8 der Zusammensetzung: 10,5 g Citronensäure, 2 g NaOH, Wasser auf 450  $\text{cm}^3$ , ca. 2–3  $\text{cm}^3$  n. NaOH bis pH 3,8: Wasser auf 500  $\text{cm}^3$ .

b) Vergleichsmaßstab: Scheinbare Ionenbeweglichkeit in  $\text{cm}^2 \text{Std.}^{-1} \text{V}^{-1}$ . Der Nullpunkt des Vergleichsmaßstabes ist vom Auftragungsort um den empirischen durchschnittlichen Betrag der endosmotischen Flüssigkeitsströmung in Richtung gegen die Kathode versetzt. Als Mass für diese Verschiebung gilt die Wanderung des bei pH 3,8 praktisch noch nicht dissoziierten Harnstoffs oder aber diejenige des Glykokolls, vermindert um etwa 1/30 des „Cadaverinweges“ (Dissoziationsgrad mal mutmassliche Wanderung des Glykokollkations).

c) Einige Wanderungswerte bei pH 7 (Phosphatpuffer m/15 nach Sørensen).

Die Messung der elektrischen Feldstärke im Gebiet der Wanderung erfolgte durch eine „Sonde“, bestehend aus zwei parallel ausgespannten Platindrähten oder aus zwei Graphitminen und einem hochohmigen Voltmeter; diese Messung hat jedoch bloss orientierenden Sinn. Ähnlich dem Charakter der „ $R_F$ “-Werte in der Papierchromatographie ist bei gleichem pH die Reihenfolge der Substanzen und ihre ungefähre Längenverteilung reproduzierbar, die genauen Streckenverhältnisse weisen jedoch immer von Versuch zu Versuch Verzerrungen auf, über deren Mass die oben erwähnte (Abschnitt C 1) Streuung der Werte  $m/c = A = 0,370 \pm 0,02$  ( $N = 95$ ) orientiert.

<sup>1)</sup> Betr. Ausdruck „scheinbare Ionenbeweglichkeit“: Die Wanderungsstrecke, die unter dem Einfluss der Einheit der Feldstärke in der Zeiteinheit zurückgelegt wird, hat die Dimension einer Beweglichkeit. „Scheinbar“ deshalb, weil in unseren für ein bestimmtes pH und eine bestimmte ionale Stärke des Puffers angegebenen Wanderungswerten das Verhältnis der aktiven Ionen zur Gesamtkonzentration eingegangen ist, und weil wir hier darauf verzichten, die von uns gemessenen „Beweglichkeiten“ mit den klassischen, aus Leitwerten berechneten in Beziehung zu setzen, wie dies etwa *Consden et al.* (loc. cit.) getan haben.

Die Substanzen, die keine Ninhydrinreaktion geben<sup>1)</sup>, wurden wie folgt sichtbar gemacht: Harnstoff und Guanidinbasen: sehr deutlich zu erkennen durch ein Ausbleichen der rötlichen Grundfärbung, die mit Ninhydrin behandeltes Papier mit der Zeit annimmt (vgl. Fig. 7). Kreatin wird durch Besprühen mit alkalischer Pikratlösung als orangeroter Fleck sichtbar. Gramin und Basen mit ähnlichem Dampfdruck durch Besprühen mit verdünnter Lauge, Trocknen und Destillation der Substanz auf ein Stück Indikatorpapier durch kurzes Aufpressen eines Bügeleisens. Kaliumion: Besprühen mit Kobaltinitritlösung und Auswaschen des Streifens.

Die Grenze der Leistungsfähigkeit des Verfahrens haben wir an Hand der Trennung von Cadaverin und Putrescin, sowie von Mezcalin und seinem Stellungsisomeren 2-3-4 Trimethoxyphenyläthylamin („Isomezcalin“) demonstriert. Das Putrescin wandert etwa um 3% schneller als das Cadaverin. Solche Unterschiede lassen sich bei Auftragen der gleichzeitig laufenden Substanzproben in geeigneter Anordnung auch dann erkennen, wenn sich ein Gemisch beider Komponenten noch nicht in zwei getrennte Zonen aufgelöst hat, sondern bloss einen verlängerten Flecken ergibt (Fig. 5a). Beim Mezcalin-Isomezcalingemisch erzielten wir eine beinahe vollständige Trennung der Flecken durch einen vierstündigen Versuch (Fig. 5a). Bei solchen Dauerversuchen muss unter Umständen das verdunstete Wasser des Ionophoresestreifens durch gelegentliches Besprühen ersetzt werden.

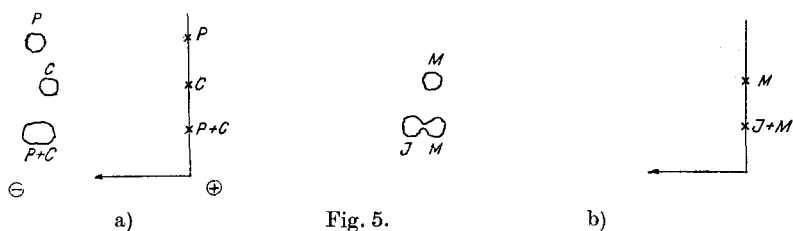


Fig. 5.

Trennungen bei geringen Wanderungsunterschieden:

- a) Putrescin (P) und Cadaverin (C), je 1 mm<sup>3</sup> einer 1/100 normalen Lösung aufgetragen. pH 3,8, Trenndauer 60 Min. bei ca. 3 mA Stromstärke.
- b) Mezcalin (M) und sein Stellungsisomeres (J), je ein  $\gamma$  aufgetragen. pH 3,8; 240 Min. Trenndauer.

### 3. Bemerkung zur Form der Substanzflecken.

Die meisten von uns in der Ionophorese geprüften einheitlichen Stoffe treten nach der Trennung und Anfärbung als Flecken auf, deren Farbtiefe von einem Zentrum gegen aussen hin abnimmt und eine beinahe kreissymmetrische Verteilung aufweist.

Man kann also annehmen, dass sich bei der Wanderung die Ausbreitung der Substanz durch Diffusion und eine für alle Teilchen gleich grosse Translationsbewegung überlagert. Dies wird dann der Fall sein,

<sup>1)</sup> Ephedrin und andere sekundäre Amine geben entgegen manchen Literaturangaben eine, wenn auch schwache Ninhydrinreaktion.

wenn die Geschwindigkeit eines Substanzteilchens unabhängig von der gerade herrschenden Substanzkonzentration ist. Wenn dagegen die Wanderung der konzentrierteren inneren Partien grösser bzw. kleiner ist als die der weniger konzentrierten Umgebung, so müssen im Verlaufe der Wanderung nichtkreisförmige Flecken entstehen, also etwa kometenartige Gebilde, deren Scheitel und Konzentrationsmaxima nach vorne bzw. nach rückwärts weisen.

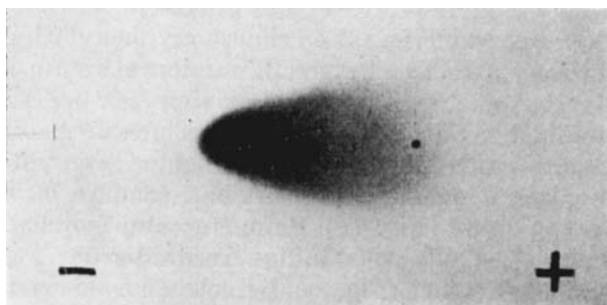


Fig. 6.

Ionophorese eines Flecks von Methylenblau (in Citratpuffer pH 3,8 4 Std. im „Elphor“<sup>1)</sup>).

Der erste Fall, nämlich grössere Wanderung der konzentrierten Partien, wird z. B. dann eintreten, wenn die gelöste Substanz teilweise ans Papier adsorbiert wird, und ein Gleichgewicht, z. B. im Sinne der *Freundlich*'schen Isotherme, besteht. Dann wird bei grösseren Konzentrationen ein kleinerer Anteil der Gesamsubstanz auf die adsorbierte Phase fallen, also ein relativ grösserer Bruchteil der Gesamtkonzentration als dissoziierte freibewegliche Ionen vorhanden sein, als bei kleinen Konzentrationen, bei welchen sich ein grösserer Relativteil der Substanz durch Adsorption der Wanderung entzieht. Umgekehrte Verhältnisse sind zu erwarten, wenn mit grösserer Konzentration die Ionisation oder überhaupt die für die Wanderung massgebliche Verfügbarkeit der Ionen abnimmt, etwa im Sinne des *Ostwald*'schen Verdünnungsgesetzes oder einer Abnahme des Aktivitätskoeffizienten. Sehr schöne, mit dem Scheitel in der Wanderungsrichtung weisende „Adsorptions“-Kometen gibt die Ionophorese von Methylenblau auf Papier in Citratpuffer pH 3,8 (Fig. 6), während das Ammoniumion umgekehrte Kometen ergibt (vergleiche Fig. 7, Fleck 6). Bemerkenswerterweise zeigt Kaliumion ein sehr ähnliches Verhalten wie Ammoniumion. Die Angabe genauer praktischer Wanderungs-

<sup>1)</sup> Als Anregung sei angedeutet, dass die Ionophorese dem praktischen Farbchemiker nicht nur erlaubt, ionogene Farbstoffe auf Einheitlichkeit zu prüfen, sondern ihm darüber hinaus ermöglicht, durch Interpretation der Fleckenform eine rasche Orientierung über das Flotten-Faser-Gleichgewicht zu gewinnen. Statt des Filterpapiers können natürlich auch Gewebe aus verschiedenen Materialien als Träger dienen.



werte „kometenbildender“ Substanzen ist natürlich fragwürdig, da einerseits der Mittelpunkt eines Kometen schwer bestimmbar ist und andererseits im Sinne der gemachten Überlegungen bei „Adsorptionskometen“ kleinere Substanzproben weniger weit zu wandern scheinen (wenn man die immerhin scharfe Begrenzungslinie des Scheitels ins Auge fasst) als grössere, während die entgegengesetzte Gruppe von Kometen ein umgekehrtes Verhalten zeigt.

#### 4. Nachweis von Mezcalin in Blut und Plasma.

Als vorbereitende Studie zu gegenwärtig im Gange befindlichen Arbeiten zur Auffindung kleinster Mengen organischer Basen in biologischem Material wurde der Versuch gemacht, das Mezcalin im Blut einer im Mezcalinrausch sich befindenden Versuchsperson nachzuweisen, ähnlich wie es *K. Salomon et al.*<sup>1)</sup> im Urin solcher Versuchspersonen ausgeführt haben. Die Entfernung des Eiweisses aus Blut, Plasma oder Serum erfolgt praktisch mit Überchlorsäure, die dann nach Abtrennung des gefällten Eiweisses mit KOH neutralisiert und als Kaliumperchlorat entfernt werden kann. Aus dem eingeeengten, alkalisch gemachten Filtrat lässt sich die Mezcalinbase mit einem Gemisch von Butanol und Toluol extrahieren. Der Extrakt wird in Wasser aufgenommen und zur Ionophorese gebracht. Im Vorversuch wurde normales Serum mit Mezcalinsulfat versetzt (ca. 1/10000 des Serumgewichts), in der angedeuteten Weise aufgearbeitet und ionophoretisch geprüft. Aus der Grösse des in der Ionophorese erhaltenen Mezcalinfleckens errechnete sich eine Ausbeute von ca. 50%, angesichts der grossen Oberfläche des vorher zu fällenden Eiweisses, der nicht immer quantitativen Operationen einer vereinfachten Mikrotechnik und der ohnehin nur schätzungsweise möglichen Beurteilung der Fleckengrösse ein brauchbares Resultat. Die Aufarbeitung von Blut, das im Höhepunkt des Mezcalinrausches entnommen wird, führt ebenfalls zu Flecken im Ionopherogramm, die gleich weit wandern wie Mezcalin und die in Aufarbeitungen gewöhnlichen Blutes nicht auftreten. Soweit „Identitätsaussagen“ auf Grund von Ionopherogrammen erlaubt sind (der gleiche grundsätzliche Vorbehalt gilt ja auch für die Papierchromatographie), kann der Mezcalinnachweis als gelungen gelten. Die Abschätzung der Fleckenintensität ergab, dass sich, unter Voraussetzung eines Gesamtblutvolumens von 5 l, im Höhepunkt des Rausches approximativ  $\frac{1}{20}$  bis  $\frac{1}{50}$  des ursprünglich subcutan injizierten Mezcalins im Blut befindet. Weiter konnte gezeigt werden, dass das Mezcalin im Plasma und nicht etwa an die Blutkörperchen gebunden vorliegt.

a) Nachweis von in vitro zu Serum zugefügtem Mezcalin. Zu 50 cm<sup>3</sup> normalem Serum wurde 5,6 mg Mezcalinsulfat, in 0,2 cm<sup>3</sup> Wasser gelöst, beigemischt und 3 Std. bei 37° inkubiert. Fällern mit 75 cm<sup>3</sup> 10-proz. wässriger Perchlorsäure. Waschen mit

<sup>1)</sup> J. Pharmacol. Exptl. **95**, 455 (1949).

Gemisch von 75 cm<sup>3</sup> 10-proz. Perchlorsäure und 45 cm<sup>3</sup> Wasser. Filtrate mit 50-proz. KOH versetzt bis pH 4, nach Stehen im Eisschrank filtriert, Filtrat im Vakuum auf ca. 20 cm<sup>3</sup> eingengt, erneut gekühlt und filtriert, dann mit NaOH auf pH 11 gestellt und 4mal mit 12 cm<sup>3</sup> Butanol-Toluol-Gemisch (1:1 Vol.) ausgeschüttelt. Extrakte im Vakuum eingedampft, Rückstand in 2 cm<sup>3</sup> Wasser aufgenommen, filtriert. Trockenrückstand des Wasserextraktes 8 mg. Eine Lösung dieser „Rohbasen“ in 1,7 cm<sup>3</sup> Wasser ergab in der Ionophorese, verglichen mit Kontrollösungen von Mezcalin, ähnliche Flecken wie eine Lösung von 1,5<sub>00</sub> Mezcalinsulfat. Demnach musste der Rückstand 2,5 mg enthalten, entsprechend einer Ausbeute von rund 50%.

b) Untersuchung von Blut im Mezcalinrausch. Zwei subcutane Injektionen von 0,3 bzw. 0,2 g Mezcalinhydrochlorid (in 20-proz. Lösung) wurden im Abstand von  $\frac{3}{4}$  Std. gegeben.  $3\frac{1}{2}$  Std. nach der ersten Injektion wurde 100 cm<sup>3</sup> Blut entnommen und sofort mit 150 cm<sup>3</sup> 10-proz. Perchlorsäure enteiweissst. Nachwaschen der Eiweissfällung mit Gemisch von 150 cm<sup>3</sup> 10-proz. Perchlorsäure + 90 cm<sup>3</sup> Wasser. Weitere Aufarbeitung wie unter a). Das Produkt der Aufarbeitung (Rohbasen), 11 mg, enthielt gemäss der ionophoretischen Prüfung 0,25 mg Mezcalin. Umgerechnet auf 5 l Blut und unter Annahme einer Ausbeute von 50% beim Aufarbeiten wären somit insgesamt  $0,25 \cdot 100/50 \cdot 5000/100 = 25$  mg in der Blutbahn vorhanden, also nach roher Schätzung rund  $\frac{1}{20}$  der injizierten Menge.

c) Verteilung zwischen Plasma und Zellen. Ein weiterer Rauschversuch wurde, ähnlich wie unter b) beschrieben, durchgeführt, jedoch mit dem Unterschied, dass das Blut vor der Eiweissfällung mit Citrat versetzt und dann in Plasma und Blutkörperchen aufgeteilt wurde. In den Blutkörperchen wurde kein Mezcalin gefunden, dagegen fand sich im Plasma analog berechnet wie unter b), wieder im Sinne einer rohen Schätzung, ca.  $\frac{1}{50}$  der ursprünglichen Mezcalinmenge in der Blutbahn.

## 5. Basen des Urins.

Als vorläufiges Ergebnis sei noch erwähnt, welches Bild die ninhydrinfärbenden Basen des menschlichen Urins in der Ionophorese darbieten.

Die an Basen angereicherten Fraktionen wurden aus Urin durch Verwendung von Ionenaustauschern gewonnen. In frischem Urin lassen sich durch einmalige Behandlung mit der Hydroxylform des starken Anionenaustauschers Amberlite IRA-400 alle Säurereste durch OH' ersetzen, so dass der Urin durch diese Operation zu einer farblosen, stark alkalischen Flüssigkeit wird. Daraus kann man die Basen durch Bindung an das schwach saure Harz IRC-50, ungefähr in der Reihenfolge ihrer Stärke, fraktioniert herausholen und nachher aus dem Harz durch Behandlung mit verdünnter Säure (HCl) eluieren. Der zur letzten Operation nötige Überschuss an Säure wird durch Behandlung des Eluates mit einer kleinen Menge der Hydroxylform von IRA-400 entfernt. Der alkohollösliche Teil der durch Eindampfen der neutralen Lösung erhaltenen Hydrochloride (ca. 100–200 mg pro 100 cm<sup>3</sup> Urin) wurde ionophoretisch untersucht und mit Ninhydrin angefärbt.

Diese „Rohbasengemische“ einer grösseren Anzahl aufgearbeiteter normaler und pathologischer Urine gaben ein in qualitativer Hinsicht ähnliches Bild (Beispiele in Fig. 7). Mit grosser Sicherheit liessen sich bekannten Substanzen zuordnen die Flecken 1 (Harnstoff) und 6 (Ammoniak). Flecken 4 und 5 entsprechen wahrscheinlich Dimethyl- und Monomethylamin. Der langgezogene Fleck 2 bedeckt gerade das Gebiet der basischen Aminosäuren und dürfte einem Gemisch dieser Basen entsprechen. Mit Vorbehalt möchten wir uns über die Natur des Fleckens 3 äussern, der bei pH 3,8 ungefähr wie das Cadaverin wandert. Er fand sich ohne Ausnahme in den Ionophorogrammen einer grösseren Anzahl aufgearbeiteter Harnе. Um seine Wanderung besser mit andern Substanzen vergleichen zu können, haben wir das „Rohbasengemisch“ zunächst durch die kontinuierliche, mit Filterpapier arbeitende Ionophoresevorrichtung von *Grassmann & Hannig*<sup>1)</sup> in

<sup>1)</sup> W. Grassmann & K. Hannig, Naturwiss. 37, 397 (1951).

weitere Fraktionen zerlegt. Als Trägerpuffer bei dieser „mikropräparativen“ Trennung eignet sich, weil nachher wieder entfernbare, Bariumacetat-Essigsäure. Auf diese Weise liessen sich Fraktionen gewinnen, die sich nachher auf Grund der ionophoretischen Prüfung als beinahe oder ganz einheitlich erwiesen. Die dem Fleck 3 entsprechende Fraktion

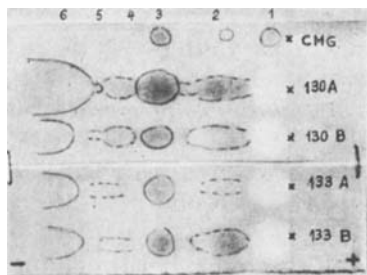


Fig. 7a.

Ionophoresen je zweier Basenfraktionen (A und B) zweier Urine (130 und 133). Cadaverin, Mezcalin und Glykokoll (CMG) als Randmarken. pH 3,8. Die Ausbleichung der Ninhydringrundfärbung durch den Harnstoff (1) widerstand nach wochenlangem Aufbewahren ganz deutlich, wobei allerdings die positiven Aminflecken verblassen und deshalb markiert werden mussten.

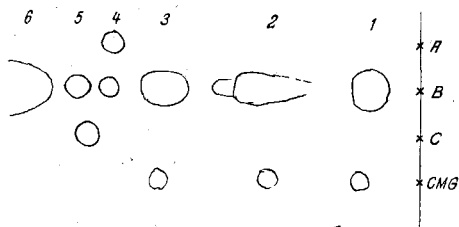


Fig. 7b.

Ionophorese einer weiteren Urinaufarbeitung bei pH 3,8. Deutung der Flecken 4 und 5 als Di- und Monomethylamin. A: Dimethylamin, B: Urinbasen, C: Monomethylamin, CMG: vgl. a.

war in ihrer Wanderung mit keiner der in dieser Mitteilung als Beispiele erwähnten Substanzen identisch. Bei pH 3,8 wandert sie etwas weniger weit, bei pH 7 etwas weiter als das Cadaverin, zeigte also ein Verhalten, das demjenigen des Propylamins sehr ähnlich war. Ein genauerer ionophoretischer Vergleich mit Propylamin bei pH 3,8 zeigte aber, dass unsere Substanz ein wenig weiter wandert als das Propylamin (Fig. 8). Überdies schliesst auch die bei der Aufarbeitung der Substanz beobachtete geringe Flüchtigkeit der Base die Identität mit dem Propylamin aus. Genauerer Aufschluss über die Natur des „Fleckens 3“ hoffen wir durch Gewinnung grösserer Mengen dieser Substanz gemäss der erwähnten Technik von *Grassmann & Hannig* zu erhalten.

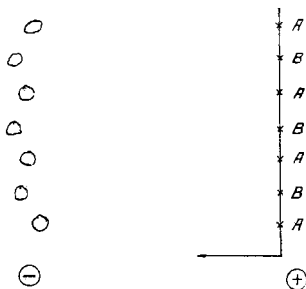


Fig. 8.

Unterscheidung der unbekannten Substanz des „Fleckens 3“ in Fig. 7 (B) von Propylamin (A) bei pH 3,8, ca. 4 mA und 90 Min. Trenndauer. Das mehrfache Auftragen zweier Proben in abwechselnder Reihenfolge erleichtert die Erkennung wirklicher Wanderungsdifferenzen gegenüber zufälligen Krümmungen der Wanderungsfront.

Die vorliegende Arbeit entstand als analytische Vorstudie zu Untersuchungen, die unter Leitung von Prof. *F. Georgi* mit Hilfe eines Bundesbeitrages zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung durchgeführt werden. Fräulein *H. Schaad* und Fräulein *Y. Hediger* sei für ihre Mitarbeit bestens gedankt.

### Zusammenfassung

1. Eine Anordnung zur ionophoretischen Trennung wird beschrieben, die den Nachweis kleinster Substanzmengen und die Ausnützung von nur 3% betragenden Unterschieden der Wanderungsgeschwindigkeit gestattet.

2. Die direkt beobachtete „scheinbare Ionenbeweglichkeit“ einiger Amine und Aminosäuren bei zwei Trenn-pH's (3,8 und 7) wird angegeben.

3. Das Auftreten „kometenförmiger“ Flecken bei der Ionophorese gewisser Substanzen wird interpretiert.

4. In dem Plasma sich im Mezcalinrausch befindlicher Versuchspersonen wird mit Hilfe der beschriebenen Methode Mezcalin nachgewiesen.

5. Die basenhaltigen Fraktionen aus menschlichem Urin werden inophoretisch untersucht.

Wissenschaftliches Laboratorium  
der psychiatrischen Universitätsklinik  
„Friedmatt“, Basel.

---

## 247. Über Curare-Alkaloide aus Calebassen.

6. Mitteilung<sup>1)</sup>.

### Radio-C-Curarin-I-chlorid

von **H. Schmid, K. Schmid, P. Waser** und **A. Ebnöther**.

(15. VIII. 51.)

Von den bis heute bekannt gewordenen Curare-Alkaloiden aus Calebassencurare nehmen, wie aus den Untersuchungen von *P. Waser*<sup>2)</sup>, sowie *W. D. M. Paton & W. L. M. Perry*<sup>3)</sup> hervorgeht, Toxiferin I und C-Curarin-I infolge ihrer grossen Aktivität und geringen Toxizität eine Sonderstellung ein. Um den Mechanismus ihrer paralysierenden Wirkung und ihr Schicksal im tierischen Körper näher studieren zu können, haben wir nun ein C-Curarin-I-chlorid bereitet, das am basischen N(b)-Atom eine mit C-14 markierte Methylgruppe trägt. (Das nicht basische N(a)-Atom liegt in einem Indoleinsystem vor<sup>4)</sup>).

<sup>1)</sup> 5. Mitteilung: *Helv.* **33**, 1486 (1950).

<sup>2)</sup> *Helv. physiol. pharmacol. Acta* **8**, 342 (1950).

<sup>3)</sup> *Brit. J. Pharmacol.* **6**, 299 (1951).

<sup>4)</sup> Vgl. eine spätere Mitteilung.