

CHROM. 7390

FOKUSSIERENDE EFFEKTE IN DER ELEKTROPHORESE DURCH VARIABLE POTENTIALGRADIENTEN

ANTON ZEILINGER und GERHARD REITSAMER

Atominstytut der Österreichischen Hochschulen, Schüttelstrasse 115, A-1020 Wien (Österreich)

(Eingegangen am 5. Februar 1974)

SUMMARY

Focusing effects in electrophoresis by variable potential gradients

A focusing effect in the electrophoretic separation of ions can be achieved by application of a variable potential gradient decreasing in the direction of migration of the ions. This potential gradient can be obtained by forming a wedge-shaped diverging carrier. The resulting deterioration of the separation can be reduced by application of wedges after an ordinary electrophoretic run. By this means a focusing of interesting zones can be achieved. In general, any desired potential gradient can be "tailored" by forming the carrier in the appropriate way. A simultaneous focusing of anions and cations can be achieved by use of a double wedge-shaped carrier. In this case, both anions and cations can migrate in direction of a decreasing potential gradient resulting in a focusing of both.

EINLEITUNG

Die Trennung anorganischer Ionen in der analytischen Chemie mit Hilfe elektrophoretischer Methoden auf Papier, Dünnschicht oder Azetylzellulose zeichnet sich besonders durch ihre Schnelligkeit aus, wobei der apparative Aufwand nicht allzu gross ist. Als Beispiel seien hier die raschen Trennungen der Seltenen Erden mittels Hochspannungselektrophorese von Aitzetmüller *et al.*¹ erwähnt. Es war hier möglich, alle 14 Elemente in nur 12 min aufzutrennen. Die Auftrennung von Substanzgemischen mit Hilfe elektrophoretischer Methoden wird jedoch häufig durch die Ausbildung von ausgedehnten Flecken der getrennten Ionenspecies (Schwanzbildung) gestört. Eine Methode, die es ermöglicht dieses Problem hintanzuhalten, wird bei der Elektrofokussierung von Proteinen in Gelen mit Erfolg angewendet. Hier wandern die Proteine im elektrischen Feld in einem pH-Gradienten und werden entsprechend ihren isoelektrischen Punkten an bestimmten Orten fokussiert². Ein ähnliches Verfahren, das eine Fokussierung anorganischer Ionen auf Papier gestattet, wurde von Schumacher³ eingeführt. Hier wandern die Ionen nach Anlegen eines elektrischen Feldes in einem pH-pL-Gradienten ($pL = -\log L$, $L =$ Konzentration des komplexbildenden Liganden). Die positiven Metallionen nehmen bei der Wanderung zur Kathode infolge sinkender

H^+ -Konzentration und steigender L^- -Konzentration unter zunehmender Komplexbildung so lange Liganden auf, bis der Neutralkomplex, falls er existiert, oder der erste negative Komplex gebildet wird. Der Neutralkomplex wandert nicht im elektrischen Feld, der negative Komplex wandert zurück zur Anode, verliert jedoch bald bei steigender H^+ -Konzentration und sinkender L^- -Konzentration einen Liganden und wandert zurück zur Kathode. Die Schwierigkeit dieses Verfahrens liegt in der Herstellung eines geeigneten pH-pL-Gradienten. Um die Trennung grösserer Substanzmengen nach der Schumacherschen Methode zu ermöglichen, wurde von Schönhofer *et al.*⁴ Polyacrylamidgel verwendet. In der vorliegenden Arbeit wird vorgeschlagen, einen variablen Potentialgradienten zur Fokussierung zu verwenden. Es soll hierbei der Potentialgradient so variieren, dass er in Wanderungsrichtung der Ionen schwächer wird. Dadurch wird erreicht, dass die in einem Fleck vorauslaufenden Ionen sich in einem geringeren Potentialgradienten befinden und damit langsamer wandern als die nachlaufenden. Dies bringt eine ständige "dynamische Fokussierung" mit sich. Der variable Potentialgradient kann durch eine geeignete geometrische Formung des Trägermaterials erzeugt werden. Bei Verwendung von Papier als Trägermaterial wird dieses keilförmig ausgeschnitten. Bei Verwendung von Polyacrylamidgel kann dieses gleich keilförmig gegossen werden, wobei auch die Schichtdicke variiert werden kann. Es sei erwähnt, dass keilförmig geschnittenes Papier bereits von Michl⁵ verwendet wurde, jedoch dieses so angeordnet war, dass der Potentialgradient in Wanderungsrichtung der Ionen grösser wurde, wodurch eine bessere Auftrennung mit grösseren Mengen zu erzielen war.

QUANTITATIVE BETRACHTUNG

Es soll im folgenden der Verlauf des Potentialgradienten unter vereinfachenden Annahmen auf einem Keil berechnet werden. Geht man aus von einem Gesetz der Form

$$dU = I \cdot dR(I) \quad (1)$$

wobei

dU = Spannungsabfall zwischen zwei Punkten der Symmetrieachse

I = Gesamtstrom durch den Streifen

$dR(I)$ = Widerstand zwischen zwei Punkten (nicht-ohmsch, daher stromabhängig)

und setzt

$$dR(I) = \frac{\varrho(i) \cdot dx}{D \cdot b(x)} \quad (2)$$

wobei

$\varrho(i)$ = spezifischer Widerstand (abhängig von Stromdichte i , die als über den Querschnitt konstant angenommen wird)

D = Dicke der Papierschicht

$b(x)$ = Breite des Papiers an der Stelle x ,

so erhält man für den Gradienten

$$\frac{dU}{dx} = \frac{I \cdot \varrho(i)}{D \cdot b(x)} \quad (3)$$

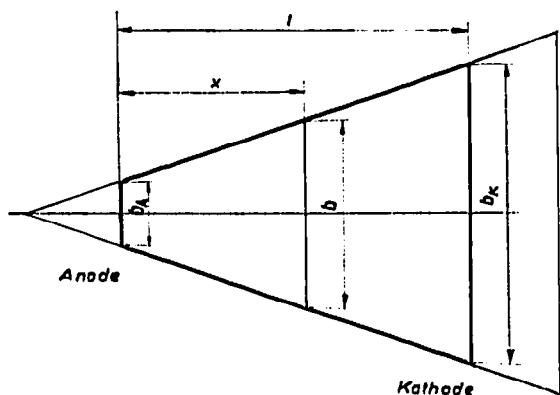


Fig. 1. Form des Papierkeils, für den die quantitativen Betrachtungen hergeleitet wurden.

Nach Anwendung des Strahlensatzes (Fig. 1) folgt

$$b(x) = \frac{(b_K - b_A) x + b_A \cdot l}{l} \quad (4)$$

Einsetzen in Gleichung 3 liefert

$$\frac{dU}{dx} = \frac{l \cdot I \cdot \varrho(i)}{D \{(b_K - b_A) x + b_A \cdot l\}} \quad (5)$$

wobei die Randbedingungen lauten

$$U(0) = U_A \quad (6)$$

$$U(l) = U_K$$

Nimmt man nun zum Zweck einer einfacheren Darstellung in erster Näherung an, dass gilt

$$\varrho(i) = \text{konstant} \quad (7)$$

so kann unter Zusammenfassung der verschiedenen Konstanten geschrieben werden

$$\frac{dU}{dx} = \frac{K_1}{x + K_2} \quad (8)$$

wobei

$K_1, K_2 =$ Konstanten, die durch die Versuchsanordnung festgelegt sind. Dies heisst, dass der Potentialgradient mit zunehmendem x kleiner wird.

METHODISCHES

Es wurden Versuche an einer Hochspannungselektrophoreseapparatur durchgeführt, bei der sich der Papierstreifen auf einer gut gekühlten Unterlage befindet. Als

Pufferlösung wurde 0.2 M Ammoniumcitrat verwendet, die angelegte Spannung betrug üblicherweise zwischen 300 und 400 V. Es wurde die Wanderung von $1 \mu\text{l}$ 0.5 M Nickelnitrat untersucht. Für die Experimente wurden stets gleichzeitig ein normaler, parallel geschnittener Papierstreifen (4 cm breit) und ein keilförmig zugeschnittenes Papier nach Fig. 2 verwendet. Der Papierkeil war an der Anodenseite nochmals verbreitert, um Effekte, die durch den grossen Potentialabfall nahe der Anode infolge Pufferströmung und Elektroosmose auftreten, möglichst klein zu halten. Die Nickelnitratlösung wurde auf der engsten Stelle des Keils und gleichzeitig auch auf dem anodischen Ende des parallelen Papierstreifens aufgetragen. Nach einer Stunde zeigte das

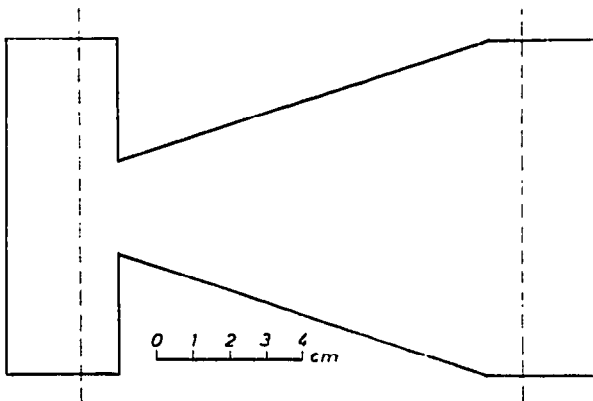


Fig. 2. In den Versuchen verwendeter Papierkeil. Die senkrechten strichlierten Linien geben die Lagen der Elektroden an.

Experiment, dass der Nickelfleck auf dem Keil etwa halb so gross war als auf dem parallelen Streifen. Mit einem hochohmigen Voltmeter und Platinspitzen wurde die Potentialverteilung in dem Papierstreifen und dem Papierkeil gemessen. Die Messungen unmittelbar zu Beginn des Versuches zeigten, dass der Potentialgradient im Papierstreifen über die volle Länge des Streifens konstant war, während er im Papierkeil die erwartete Abnahme von der Anode zur Kathode hin aufwies. Dieses Verhalten blieb auch nach einiger Zeit (30 bis 60 min) im Prinzip erhalten, jedoch zeigten sich in unmittelbarer Nähe von Anode und Kathode Abweichungen davon, was auf Pufferströmungen und elektroosmotische Effekte zurückgeführt wird.

Da eine Ausbildung des Papierkeils in der angegebenen Form jedoch den negativen Nebeneffekt einer schlechteren Auftrennung mit sich bringt, wird eine Kombination von konventionellen Streifen mit Keilen vorgeschlagen, wodurch ein örtlich und zeitlich variierender Potentialgradient erreicht wird. Es wurden einfache Messungen mit der in Fig. 3 dargestellten Anordnung durchgeführt. Es wird hier zuerst ein konventioneller Elektrophoreseversuch mit einem parallelen Papierstreifen begonnen. Nachdem die Auftrennung im wesentlichen abgeschlossen ist, werden an den Stellen, an denen eine Fokussierung gewünscht wird, Keile nach Fig. 3 aufgelegt, wodurch der Potentialgradient wieder die erwünschte Form erhält. Es wurde auch hier mit den gleichen Versuchsbedingungen wie vorher gearbeitet. Der Potentialverlauf

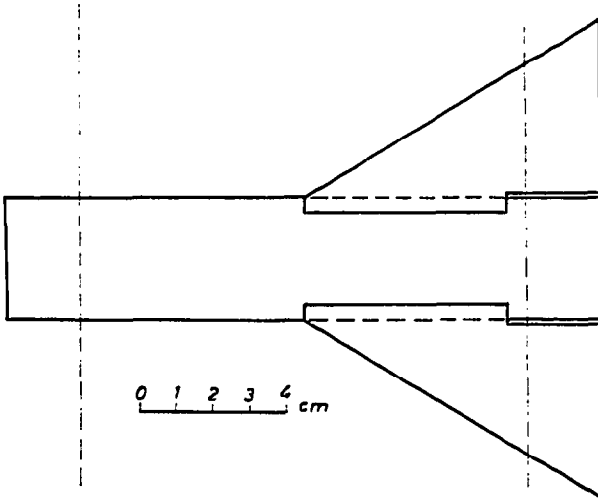


Fig. 3. Verwendete Kombination eines konventionellen Papierstreifens mit den nachträglich angelegten Papierkeilen. Die Keile sind an der Elektroden­seite ausgeschnitten, um einen guten elektri­schen Kontakt zu gewährleisten.

wurde nach einer Versuchsdauer von 60 min vermessen. In Fig. 4 sind die gemessenen Potentialgradienten in der Umgebung der Mitte des Streifens dargestellt. Kurve 1 zeigt den Potentialgradienten für den parallelen Streifen. Dieser ist erwartungsgemäss konstant. Im Vergleich dazu zeigt Kurve 2 den Potentialgradienten für einen Keil nach Fig. 2. Man erkennt leicht den gekrümmten Verlauf. Kurve 3 zeigt dann den Potentialgradienten im linearen Streifen nach Auflegen von Keilen nach Fig. 3. Der Knick im Gradienten an der Stelle, wo der Keil beginnt, ist auffallend. Es ist leicht

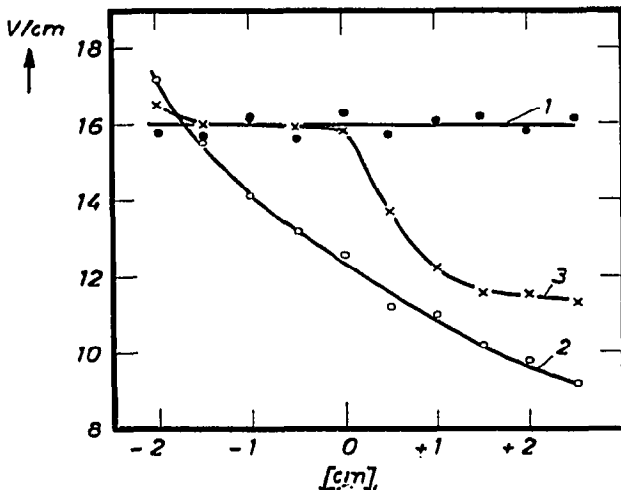


Fig. 4. Verlauf der Potentialgradienten nach 60 min Versuchsdauer in der Umgebung der Mitte der Streifen. Kurve 1: paralleler Papierträger; Kurve 2: keilförmiger Träger, nach Fig. 2; Kurve 3: paralleler Papierträger mit Keilen nach Fig. 3.

verständlich, dass es in diesem Bereich zu einer starken Fokussierung kommt. Die Versuche mit Nickelnitrat zeigten hier eine Verringerung der Ausdehnung des Flecks um das zwei- bis dreifache.

DANK

Die Autoren danken Herrn Dr. K. Buchtela für zahlreiche Diskussionen und die kritische Durchsicht des Manuskripts.

ZUSAMMENFASSUNG

Durch Anwendung eines veränderlichen Potentialgradienten in der Form, dass die Feldstärke in Wanderungsrichtung der Ionen abnimmt, ist es möglich, eine fokussierende Wirkung bei der elektrophoretischen Trennung von Ionen zu erzielen. Ein in dieser Weise ausgebildeter Potentialgradient kann dadurch erhalten werden, dass man den Träger keilförmig auseinanderlaufend ausbildet. Da daraus eine Verschlechterung der Trennungseigenschaften folgt, bietet sich die Möglichkeit an, nach Durchführung einer konventionellen elektrophoretischen Trennung durch nachträgliches Ansetzen von Keilen eine Fokussierung an bestimmten gewünschten Stellen zu erhalten. Eine Verallgemeinerung dieses Verfahrens liegt darin, dass man dem Träger eine beliebige, an die speziellen Versuchsbedingungen angepasste Form geben kann, wodurch sich jeder gewünschte Potentialverlauf "zurechtschneiden" lässt. Es ist noch zu erwähnen, dass eine gleichzeitige Fokussierung von Kationen und Anionen durch Verwendung eines doppelt-keilförmigen Trägers erreicht werden kann. Dieser hätte die Form von zwei mit der Schmalseite aneinanderliegenden Trapezen. Die Untersuchungssubstanz ist dann an der engsten Stelle aufzutragen. Es wandern dann sowohl Anionen als auch Kationen in Richtung eines schwächer werdenden Potentialgradienten, wodurch beide fokussiert werden.

LITERATUR

- 1 K. Aitzetmüller, K. Buchtela und F. Grass, *Atomkernenergie*, 10 (1965) 264.
- 2 D. Wellner, *Anal. Chem.*, 43 (1971) 59A.
- 3 E. Schumacher, *Helv. Chim. Acta*, 40 (1957) 221.
- 4 F. Schönhofer und F. Grass, *Mikrochim. Acta*, im Druck.
- 5 H. Michl, *Monatsh. Chem.*, 85 (1954) 1251.