

106. Qualitative und quantitative Mikroanalyse von Säuregemischen durch Elektrophorese in pH-Gradienten¹⁾

von Ernst Schumacher und Tobias Studer

Herrn Prof. G. SCHWARZENBACH zum 60. Geburtstag

(9. III. 64)

1. Grundlagen. – 1.1) Vor kurzem hat der eine von uns die Theorie der elektrophoretischen Ionenfokussierung in pH-pL-Gradienten ausgearbeitet [1]²⁾. Danach ist zur optimalen Trennung eines Gemisches aus N Komponenten von Metallionen eine mindestens N Stufen enthaltende, von der Anode zur Kathode ansteigende pH-Verteilung herzustellen. Die aufeinanderfolgenden pH-pL-Stufen sind nach Ausgangsniveau und Höhe so einzurichten, dass jede Stufe Fokusort einer und nur einer Komponente des Gemisches wird. Die Plateaulänge zwischen den Stufen ist ein freier Parameter, der im Prinzip beliebige räumliche Verschiebungen zwischen den fokussierten Metallionen zulässt.

Zur bestmöglichen Trennung etwa der Seltenen Erden [2] oder der Transplutonium-Elemente [3] müssen zehn oder mehr pH-pL-Stufen in einer definierten Treppefunktion zur Verfügung stehen. Verlangt man, dass ein derartiges System einen stationären Zustand mit Regulationsvermögen darstellt, also selbststabilisierend ist, so muss es durch den Stromfluss erzeugt und aufrechterhalten werden. Ein vollständig stabiler pH-Gradient ist ein «natürlicher pH-Gradient», in dem bei stationärer Elektrolyse an jedem Punkt der Elektrophoreseapparatur die Konzentrationen aller vorhandenen Partikeln konstant bleiben (die Summe des Transports im elektrischen Feld und durch Diffusion verschwindet genau). SVENSSON hat die Bedingungen zur Herstellung natürlicher pH-Gradienten untersucht [4]. Danach ist es nicht möglich, die von uns gewünschte optimale pH-Verteilung als natürlichen pH-Gradienten zu realisieren³⁾. Die Theorie der «wandernden Grenzen» (moving boundaries) [5] ergibt jedoch eine einfache Realisierungsmöglichkeit eines Systems mit praktisch beliebig vielen sich selbst schärfenden (autogenen) pH-Stufen. Im stationären Zustand bewegt sich dieses System gleichförmig und mit zeitunabhängiger pH-Verteilung anodenwärts.

1.2) Gegeben sei das elektrophoretische System der Fig. 1.

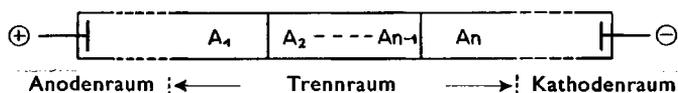


Fig. 1. Schema des elektrophoretischen Ausgangssystems

¹⁾ Über elektrophoretische Ionenfokussierung, XIII. Mitteilung, auszugsweise vorgetragen am 22. Februar 1964 an der Winterversammlung der Schweizerischen Chemischen Gesellschaft in Freiburg.

²⁾ Die Zahlen in eckigen Klammern verweisen auf das Literaturverzeichnis, S. 967.

³⁾ Natürliche pH-Gradienten werden durch Ampholyte erzeugt. Die Ampholyt-Verteilungskurven gehen kontinuierlich ineinander über, so dass keine scharfen pH-Stufen auftreten, vgl. die ausführliche Theorie [1].

A_1 bis A_n sind Molekelsäuren, deren pK -Werte in der Reihenfolge $pK_1 < pK_2 < \dots < pK_n$ ansteigen. Die Elektrodenräume seien vom Trennraum so weit entfernt, dass die darin ablaufenden elektrochemischen Vorgänge keinen Einfluss auf das Geschehen im Trennraum haben.

Bei Stromdurchgang wandern alle Komponenten A_1 anodenwärts. Die Beweglichkeit jedes Ionenbestandteils A_1 (ion constituent [6]) beträgt:

$$U_i^- = \alpha_i u_i^- \quad (1)$$

U_i^- Beweglichkeit des Ionenbestandteils i im Einheitsfeld.

u_i^- Beweglichkeit des Anions A_1^- (korrespondierende Base zu A_1).

α_i Protolysengrad der Säure A_1 .

Setzen wir zunächst voraus, dass die u_i^- -Werte aller Komponenten A_2 bis A_{n-1} nahezu gleich sind. Dann wandern die Komponenten A_1 umso schneller, je grösser der Protolysengrad α_i . Dadurch entsteht eine Trennung der A_1 in der Reihenfolge zunehmender pK -Werte in der Richtung des elektrischen Feldes, also $A_1, A_2, \dots A_1, \dots A_n$. Nach einer für das System charakteristischen Zeit (vgl. unten) bilden sich im allgemeinen n Phasen aus, die nur je *eine* Komponente A_1 enthalten und deren Phasengrenzen mit gleich grosser und, bei konstanter Stromdichte, mit gleichförmiger Geschwindigkeit zur Anode wandern. In der Phase i ist die Überföhrungszahl der Komponente A_1

$$T_i^- = \frac{U_i^-}{U_i^+ + U_i^-} = \frac{\alpha_i u_i^-}{\alpha_i u_i^+ + \alpha_i u_i^-} = \frac{u_i^-}{u_i^+ + u_i^-} \quad (2)$$

T_i^- Überföhrungszahl des Ionenbestandteils i .

u_i^+ Beweglichkeit des Gegenions H_3O^+ .

Nach KOHLRAUSCH [5] gilt für die beharrliche Funktion:

$$\bar{\omega} = \sum_j \left(\frac{\bar{C}_j}{U_j} \right) = \text{Konst. für jeden Ort der Elektrophoreseapparatur} \quad (3)$$

Die Konst. hat den gleichen Wert für alle Orte auf der einen Seite der stationären Grenze.

j Ionenbestandteil.

C_j Konzentration des Ionenbestandteils j .

U_j Beweglichkeit des Ionenbestandteils j .

Die Summe ist über alle Ionenbestandteile des Elektrolyts zu erstrecken. Daraus folgt:

$$\bar{C}_i / T_i^- = \text{Konst.} \quad (4)$$

Da T_i^- von α_i unabhängig ist, entsteht in jeder Phase eine nur von u_i^- , nicht aber vom pK -Wert abhängige Konzentration der Säure A_1 . Die Zonenlänge der Phase i ist somit der Molzahl der Säure A_1 proportional und wegen (4) ausserdem der Konzentration der Säure A_1 umgekehrt proportional.

Die Gleichungen (1) und (3) sowie die Aussagen des vorhergehenden Abschnittes sind nur richtig, wenn die Beweglichkeiten u unabhängig von der Konzentration der Elektrolyte sind. Wenn α nicht sehr klein gegen 1 ist, muss der Einfluss der interionischen Wechselwirkungen für eine exaktere Behandlung durch die Verwendung relativer Beweglichkeiten eliminiert werden (DOLE; DISMUKES & ALBERTY [5]). In der für die folgenden Anwendungen allein wichtigen Gleichung (4) gehen die Beweglichkeiten der einzelnen Ionen in die Überföhrungszahl T_i^- ein,

die von α unabhängig ist und nur Verhältnisse von Beweglichkeiten enthält. Somit bleibt (4) auch bei höheren Ionenstärken für einprotonige Molekelsäuren gültig. Bei mehrprotonigen Säuren wird die zweite Protolysenstufe bei grösserer Verdünnung u. U. wichtig und leistet dann ebenfalls einen Beitrag zu U . Die Beweglichkeiten der aufeinanderfolgenden Deprotonierungsprodukte sind im allgemeinen keine beobachtbaren Grössen, so dass die Beweglichkeit des Ionenbestandteils i , also U_i^- , als $f(C_i^-)$ experimentell ermittelt werden muss. T_i^- mehrprotoniger Säuren kann eine geringe Abhängigkeit von C_i aufweisen, was aber zu keinen Komplikationen führt, s. u.

Die Phasengrenzen sind autogen, wenn $U_{i+1}^- < U_i^-$ ist [5]; bei $u_{i+1}^- = u_i^-$ muss also $\alpha_{i+1} < \alpha_i$ oder $pK_{i+1} > pK_i$ sein, wie vorausgesetzt. Die Phasengrenze fällt einerseits mit einem «Sprung» der elektrischen Feldstärke zusammen. Dieser ist gerade so gross, dass die Teilchen A_{i+1} bei kleinerem U_{i+1}^- genau gleich schnell wandern wie die Teilchen A_i . Andererseits ist die Phasengrenze auch der Ort einer pH-Stufe. Wenn $u_{i+1}^- = u_i^-$, so gilt $\bar{C}_{i+1} = \bar{C}_i = \bar{C}$, und

$$\Delta \text{pH} = \text{pH}_{i+1} - \text{pH}_i \cong \log \frac{\alpha_i}{\alpha_{i+1}} = \frac{1}{2} \Delta \text{pK}$$

in der Näherung $\alpha \ll 1$.

Falls $u_{i+1}^- \neq u_i^-$, so können folgende Komplikationen auftreten:

1. $U_{i+1}^- = U_i^-$, d. h. $\alpha_{i+1} u_{i+1}^- = \alpha_i u_i^-$.

Die Komponenten A_i und A_{i+1} werden nicht unterschieden und bilden eine Mischphase, deren Zonenlänge der Summe der beiden Molzahlen proportional ist.

2. $\alpha_{i+1} < \alpha_i$ aber $u_{i+1}^- > u_i^-$, so dass $U_{i+1}^- > U_i^-$.

Da der Index i der Komponenten A_i in der Reihenfolge zunehmender pK -Werte geordnet ist, bedeutet dies eine Umkehrung der Zonenreihenfolge ... $i-1, i+1, i, i+2$... Die Werte u_i^- liegen aber für eine grosse Zahl von Säuren innerhalb von $(3-4) \cdot 10^{-4}$ [$\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$]. Umkehrungen sind deshalb nur bei sehr kleinen ΔpK zu erwarten. Sie sind für die Anwendung bei der Ionenfokussierung zudem bedeutungslos.

Zur Beurteilung des «Auflösungsvermögens» muss die Theorie der Phasengrenzen entwickelt werden. Dies sei für die ausführliche Arbeit [1] vorbehalten. Unten wird gezeigt, dass $\Delta pK = 0,02$ noch trennbare Säurezonen ergibt.

Für die charakteristische Einstellzeit des Systems sind bei gegebener Stromdichte Zahl und Länge der entstehenden Phasen sowie deren ΔU_{ik} -Werte massgebend. Die Entmischung des Paares i, k mit dem kleinsten ΔU ist zeitbestimmend, vgl. [1].

2. Qualitative und quantitative Analyse von Säuregemischen. – 2.1) Die oben entwickelten Grundlagen haben wir im Fall der qualitativen und quantitativen Analyse von Säuregemischen, die ja in verschiedenen Gebieten der Forschung und der angewandten Chemie ein Problem ist, experimentell geprüft. Durch Aufnahme von Titrationskurven kann man in Lösungen $< 10^{-2} \text{M}$ Puffergebiete nur zuverlässig unterscheiden, wenn sie um mehr als 2 pH-Einheiten auseinander liegen. Eine vorgängige Trennung an Anionentauschersäulen hat selbst bei Verwendung sorgfältiger Gradientenelution ein Auflösungsvermögen, das 0,5 pK-Einheiten kaum übertrifft. Eine eigentliche Mikromethode fehlt. Die oben beschriebene elektrophoretische Trennung eines Säuregemisches als System stationär wandernder Grenzen dürfte für diese Probleme eine einfache Lösung darstellen.

Trägt man ein Säuregemisch zwischen einer 0,01 bis 0,2M HCl-Anodenlösung und einer 0,02 bis 0,5M Na-Acetat-Kathodenlösung auf einen Papierstreifen in unserer Apparatur für Ionenfokussierung [2]⁴⁾ auf, so wird das oben angenommene elektrophoretische System mit $A_1 = H_3O^+$; $A_2 - A_{n-1}$: Analysengemisch; $A_n = HAc$ realisiert. Nach Stromdurchgang bilden sich die folgenden Zonen aus (Fig. 2):

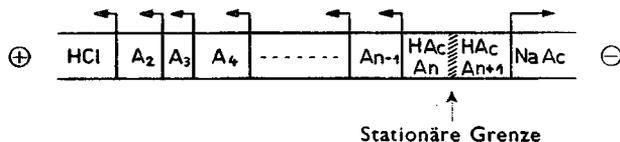


Fig. 2. Schema der durch Elektrophorese entstehenden Säurezonen

Die Zonenkonzentrationen betragen:

$$\bar{C}_i = (T_i^- / T_1^-) C_{HCl} \quad (4a)$$

Die Zonenlängen sind mit der Menge m_i verknüpft:

$$l_i = (m_i/a) \bar{C}_i \quad (5)$$

m_i Molzahl der Komponente i .

a Querschnitt der Flüssigkeitssäule des feuchten Papierstreifens.

Nach Eichung von a , oder genauer des Ausdrucks B :

$$l_i = \frac{T_1^-}{a T_i^- C_{HCl}} m_i = B m_i \quad (5a)$$

mit einer bekannten Menge m_i erfolgt die Bestimmung von unbekanntem m_i in einem Analysengemisch durch Ausmessen der Zonenlänge l_i .

Das entstehende Trennmuster ist übrigens genau gleich, auch wenn statt der Säuren deren korrespondierende Basen, etwa als Na^+ -Salze, aufgetragen werden.

Die Reihenfolge der Säurezonen ergibt die qualitative Analyse, da automatisch eine Ordnung nach steigendem pK-Wert eintritt (mit Ausnahme der Möglichkeit einer Umkehr benachbarter Säuren, wenn ΔpK sehr klein ist). Zur Sichtbarmachung der Zonen eignet sich ammoniakalische Silbernitratlösung. Nach Besprühen des getrockneten Streifens mit diesem Reagens exponiert man ihn einige Minuten am Sonnenlicht und bewahrt ihn dann im Dunkeln auf. Hierbei nehmen die Zonen in einigen Std. verschieden intensive grau bis braunrote Töne an, so dass sie leicht unterscheidbar sind und ausgemessen werden können. Etwas weniger vielseitig, aber rascher sichtbar, ist die Entwicklung der Zonen mit schwefelsaurer Permanganatlösung.

Fig. 3 zeigt das Trennmuster eines Zehnkompontengemisches unter den Bedingungen und Daten der Tabelle.

2.2) Prüfung der Konstanz der Zonenlängen bei gegebener Menge einer Komponente: $10 \mu l$ einer 0,2M Ameisensäure werden nach den Bedingungen der Fig. 3 bei 4 mA untersucht. In 3 min entsteht eine 5,0 mm breite Zone, die nach 10 bzw. 20 min unverändert bleibt.

⁴⁾ Diese Apparatur liefert die Firma METROHM A.G., Herisau.

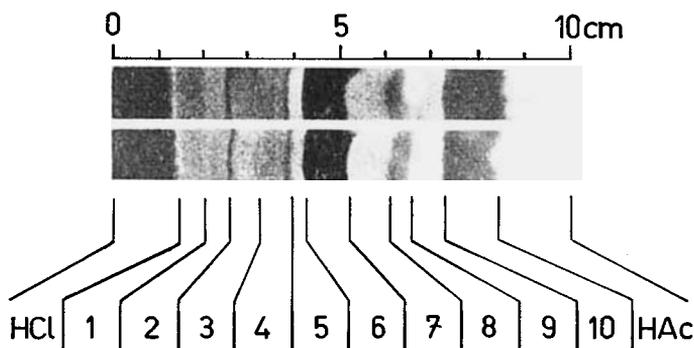


Fig. 3. Zwei Elektropherogramme des gleichen 10-Säuren-Gemisches

Die Numerierung der Zonen stimmt mit derjenigen der Tabelle überein. Auf der schwarz-weißen Wiedergabe sind einige Zonengrenzen, die stark verschiedene Farbtonungen trennen, weniger deutlich sichtbar als in Wirklichkeit. Die Figur ist ein Beispiel für die Reproduzierbarkeit des Trennmusters.

Identifizierung und Daten der auf dem Elektropherogramm der Fig. 3 getrennten Säuren

A_1				0,025 M HCl
Kathodenlösung				0,43 M $\{\text{Na}^{\oplus}\text{CH}_3\text{COO}^{\ominus}\}$
Stromstärke				3 mA (stabilisiert)
Zeit				10 min
Flüssigkeitsquerschnitt				$1,23 \cdot 10^{-3} \text{ cm}^2$
Stromdichte				0,244 $[\text{A cm}^{-2}]$
Mengen				je 0,2 μMol
Nr.		pK	α %	pH der Zone (berechnet unter der Annahme $u_i^- = \text{Konst.}$)
	HCl		100	1,60
1	Trifluoressigsäure	0,33	96	1,62
2	Dichloressigsäure	1,3	73	1,74
3	Maleinsäure	1,9	49	1,91
4	Phosphorsäure	2,13	42	1,99
5	Chloressigsäure	2,85	21	2,28
6	Weinsäure	3,04	17	2,36
7	Citronensäure	3,14	14	2,44
8	Ameisensäure	3,77	7,9	2,70
9	Milchsäure	3,86	7,1	2,75
10	Ascorbinsäure	4,10	5,6	2,85
	Essigsäure	4,76	2,6	3,18

2.3) *Linearität zwischen Säuremenge und Zonenbreite*: Je 5 μl von Ameisensäurelösung verschiedener Konzentrationen werden bei 3 mA 10 bis 30 min lang wie unter 2.2) der Elektrophorese unterworfen. Fig. 4 zeigt den gefundenen Zusammenhang zwischen Zonenbreite und Molzahl, der die Theorie bestätigt. Die Beziehung wurde mit analogem Resultat bei Oxalsäure (zweiprotonig!), Chloressigsäure, Milchsäure und Ascorbinsäure⁵⁾ verifiziert. Sie bleibt auch gültig, wenn z.B. die Ameisensäure-

⁵⁾ Wir danken Herrn Dr. med. CHR. SCHLATTER für die sorgfältige Ausführung einer Versuchsreihe mit Ascorbinsäure.

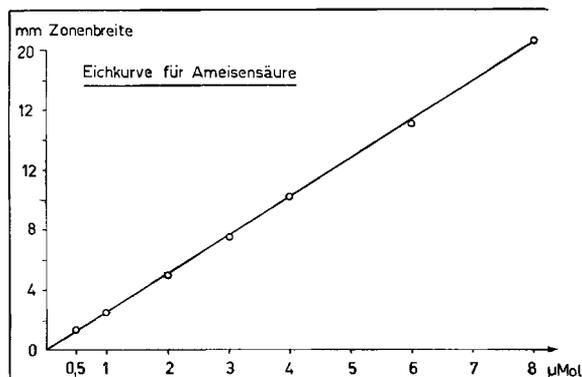


Fig. 4. Die Zonenbreite ist proportional der aufgetragenen Molmenge einer Säure (Ameisensäure)

menge im Gemisch mit Maleinsäure, Phosphorsäure, Monochlor-, Dichloressigsäure und Milchsäure variiert wird.

2.4) *Proportionalität zwischen Zonenlänge und reziproker Konzentration der Anodensäure*: 5 μ l von 0,4M Ameisensäure werden bei verschiedenen HCl-Konzentrationen in der Anodenlösung wie unter 2.3) untersucht. Fig. 5 bestätigt den erwarteten linearen Zusammenhang.

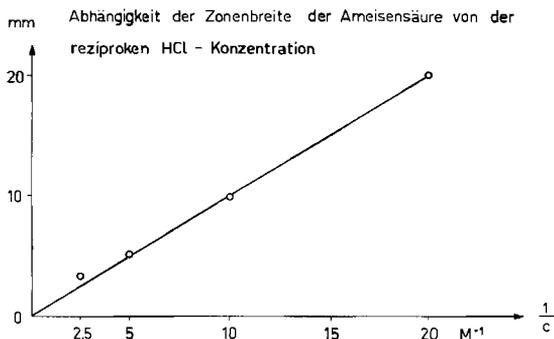


Fig. 5. Die Zonenlänge einer Säure (Ameisensäure) ist bei gleicher Molmenge der Konzentration der Anodensäure umgekehrt proportional

2.5) *Zum Auflösungsvermögen*: Das Paar Ameisensäure/Milchsäure mit einer pK-Differenz von 0,10 ergibt nach Fig. 3 eine sehr scharfe Zonengrenze. Zwischen Milchsäure mit pK = 3,862 [7] und Glykolsäure mit pK = 3,882 [7] beträgt Δ pK = 0,02 (bei ionaler Stärke \rightarrow 0; 25°). 10 μ l einer 0,2M Lösung eines 1:1-Gemisches der beiden Säuren werden 45 min lang einem Strom von 4 mA unterworfen. Nach Entwicklung mit Silbernitrat und Belichtung kann eine deutliche Trennlinie beobachtet werden. Dabei ergibt die Identifizierung anhand der Farbe, dass Milchsäure von den beiden das grössere U^- besitzt, was mit dem etwas geringeren pK-Wert übereinstimmt.

2.6) *Grenzen der Methode. - Mikromethode*: Bei $[A_1] = 0,1$ M HCl ergeben z. B. 0,04 μ Mol Ascorbinsäure eine Zonenlänge von 1 mm auf einem 12 mm breiten Papierstreifen. Für $[A_1] = 0,025$ M HCl und einen 1 mm breiten Papierstreifen tritt eine ebenso lange Zone mit 10^{-9} Mol Ascorbinsäure auf. Wegen der Empfindlichkeits-

grenze des Nachweises mit ammoniakalischer Silbernitratlösung liegt die Bestimmungsgrenze für die meisten Säuren zwischen 10^{-8} und 10^{-9} Mol.

Mikropräparative Trennungen: Die obere Grenze wird für $[A_1] \sim 0,5\text{ M HCl}$ auf einem Streifen von 12 mm Breite bei ca. 10^{-5} Mol/Komponente erreicht.

Grenzen der pK-Werte: Bei Säuren mit pK-Werten wesentlich grösser als 5 sind die Trennzeiten stark verlängert. Da die elektrische Feldstärke ungefähr umgekehrt proportional dem α -Wert der Zone ansteigt, tritt der grösste Teil des gesamten Spannungsabfalls innerhalb der Zone mit dem höchsten pK-Wert auf. Dies setzt der Anwendung höherer Spannungen eine Grenze, da die Stromwärme aus den schlechtestleitenden Zonen nicht genügend wirksam entfernt werden kann, was zu teilweisem Austrocknen und sogar zu Überschlügen führt.

Löslichkeit: Das verwendete CCl_4 -Kühlbad [2] für den Elektrophoresestreifen ist für die rasche Säureanalyse unentbehrlich. Ohne Kühlbad müsste die Stromdichte etwa um den Faktor 10 reduziert werden. Höhere Fettsäuren oder aromatische Säuren sind in CCl_4 besser löslich als in Wasser, sie werden also aus dem Papierstreifen ins Kühlbad eluiert. In solchen Fällen muss CCl_4 durch Fluorkohlenstoff-Verbindungen ersetzt werden.

Mengenverhältnisse und Spurenanalyse: Nach Gleichung (4a) bildet sich für jede Säure unabhängig von ihrer Gesamtmenge eine stationäre Konzentration \bar{C}_i aus, welche durch die HCl-Konzentration der Anodenlösung festgelegt ist. Gl. (4a) verliert aber ihre Gültigkeit, wenn die Zonenlänge einer seltenen Komponente i kleiner wird als die Diffusivität der Grenzschicht zwischen den Komponenten $i-1$ und $i+1$. Dann kann die stationäre Konzentration \bar{C}_i nicht erreicht werden. In diesem Fall versucht man durch Vermindern der HCl-Konzentration bis gegen 10^{-3} M die Bedingungen der Gl. (4a) zu erreichen. Jedenfalls kann man mit diesem Mittel Mengenverhältnisse von der Grösse 1:1000 überbrücken. Die häufigen Komponenten werden mit z.B. 1 M HCl -Anodenkonzentration ausgemessen; Spuren, evtl. Verunreinigungen von Hauptkomponenten, ergeben bei 10^{-3} M HCl gut entwickelte Zonen, während sich unter diesen Bedingungen die Zonen der häufigen Komponenten über den Trennstreifen hinausdehnen. Schliesslich wird die Minimalmenge durch die Nachweisgrenze (s. oben) festgelegt. Wir haben diese Zusammenhänge mit EDTA-2- ^{14}C geprüft.

Aminosäuren: Säuren mit isoelektrischen Punkten können zwar innerhalb des durch andere Säuren entstandenen pH-Gradienten fokussiert werden. Die Grundlagen der quantitativen Bestimmung, also Gl. (4a), gelten jedoch für fokussierbare, also isoelektrische Punkte besitzende Elektrolyte nicht. Derartige Systeme gehorchen den Gesetzen der Ionenfokussierung [1], welche ganz andere Konzentrationsverteilungen bewirken als diejenigen nach Gl. (4a). Hingegen dienen Systeme aufeinanderfolgender Säurezonen als Träger für die optimale Ausbildung von isoelektrischen Spektren von z.B. Aminosäuren und Metall-Metallkomplex-Systemen wie eingangs erläutert.

3. Anwendungen. – 3.1) *Organische Analyse:* Neben der Analyse von Säuregemischen in Fruchtsäften, in physiologischen Flüssigkeiten und a.m. dürfte die Methode für die Bedürfnisse der organischen Mikroanalyse und Konstitutionsermittlung brauchbar sein. C-Methyl-, Acetyl-, Benzoyl-Bestimmungen nach KUHN-ROTH, sowie Säuregemisch-Analysen nach oxydativen Abbau-Reaktionen können an 10^{-2} bis 10^{-3} Mikromol ausgeführt werden, Mengen, die normalerweise der Titration nicht mehr zugänglich sind.

3.2) *Anorganische Analyse*: Für die Analyse der Anionen eignet sich diese Methode dann, wenn stabile neutrale Protonierungsprodukte in verdünnter Lösung existieren, z.B. bei N_3^- , SCN^- , PO_4^{3-} , $\text{P}_2\text{O}_6^{4-}$, F^- u.a.m. Neutrale Hydrogenkomplexe mit EDTA, NTA und anderen Chelat-Liganden verhalten sich wie die früher beschriebenen Beispiele. Die oft nur ungenau bekannten pK^{H} -Werte lassen sich durch Eingrenzen der Zonen zwischen solche von Säuren mit gut gemessenen pK -Werten auf $\pm 0,05$ pK -Einheiten genau ermitteln.

3.3) *Basenanalyse*: Eine analoge Mikroanalyse von Basengemischen ist auf Molekelbasen beschränkt, die wasserlöslich sein und $\text{pK}_b < 6$ aufweisen müssen. Dazu zählen NH_3 und seine Derivate, z.B. NH_2NH_2 , RNH_2 , $\text{R}_1\text{R}_2\text{NH}$, $\text{R}_1\text{R}_2\text{R}_3\text{N}$ und einige cyclische N-Basen. Das elektrophoretische Ausgangssystem ist dann z.B.

Anode | 0,1M NH_4^+ | Basengemisch | 0,1M KOH | Kathode

Aromatische Amine, etwa Nitroaniline, sind zu schlecht wasserlöslich oder werden vom Kühlbad eluiert. Mit Lösungsmittelgemischen auf dem Elektrophoresestreifen haben wir noch keine Erfahrungen.

Experimentelle Ergänzungen zur Ausführung der Mikrobestimmung von Säuregemischen

1. *Vorbereitung der Proben*: Für die Elektrophorese muss eine wässrige Lösung des Säuregemisches vorbereitet werden. Die Konzentration richtet sich nach den Molmengen und Mengenverhältnissen. Ein Trennmuster von ca. 5 cm Länge ist empfehlenswert; es reicht zur Ermittlung von 6–10 Komponenten bei Mengenverhältnissen von 1:1 bis 1:10 (zwischen den seltensten und den häufigsten Komponenten) aus und entspricht auf dem unten angegebenen Papiermaterial ca. 50 μl Flüssigkeitsvolumen. Die Konzentrationen der Zonen im stationären Zustand sind etwa 10% kleiner als diejenige der Anodenlösung. 5 μl einer Lösung, die 0,1M (Total-)Konzentration der Probe aufweist, ergibt bei 0,01M HCl-Anodenlösung also die gewünschte Länge des Trennmusters von ca. 5 cm. Das gleiche Ergebnis wird mit 50 μl einer 0,01M Probenlösung erhalten; doch ist es zweckmässig, nur 5 bis 10 μl aufzutragen. Man dunstet also die 0,01M Säurelösung unter der IR.-Lampe auf etwa $\frac{1}{10}$ ein (im Falle flüchtiger Säuren nach vorheriger Neutralisation mit NaOH) oder verwendet eine 0,001M HCl-Anodenlösung und 5 μl der ursprünglichen Probe. Das letztere Verfahren liefert etwas weniger scharfe Zonen als das erste.

Die Anwesenheit von Nichtelektrolyten, von Salzen oder Molekelbasen im Probenmaterial ist zwar unschädlich, grössere Konzentrationen von Inert-Salzen (z. B. Alkali-halogenide, -sulfate u. a. m.) verzögern aber die Einstellvorgänge des Trennmusters. Hingegen ist es gleichgültig, ob die Säuren oder ihre Alkalisalze, auch zusammen mit etwas überschüssigem NaOH oder NaHCO_3 , verwendet werden.

2. *Vorbereitung des Elektropherogramms*: Normalerweise wird ein 12 mm breiter Filterpapierstreifen, z. B. SCHLEICHER & SCHUELL Nr. 2043a oder b (auf Rollen von 10 m Band käuflich), verwendet [2]. Für die Erfassung geringster Spuren (10^{-9} Mol) schneidet man 1 mm breite Streifen aus. Der trockene Streifen wird auf dem Kunststoffbügel der Ionenfokussierapparatur [2]⁴) montiert. Darauf trägt man mit Mikropipette und Injektionsspritze (nach dem Vorgehen in der radiochemischen Praxis, erhältlich als «Lambda-Pette Control» bei RESEARCH SPECIALTIES Co., 200 South Garrard Blvd., Richmond, California) genau 5 μl oder 10 μl der Probe in *einem* Strich quer über den Streifen derart auf, dass eine rechteckige feuchte Zone entsteht. Der Auftragsort wird zweckmässig näher der Kathodenseite gewählt, da sich das Trennmuster anodenwärts entwickelt. Jetzt werden mit Wattebäuschchen (Q-Tips) die Anoden- und Kathoden-Lösungen zuerst an den Haltern und dann von den Enden des Streifens her bis ungefähr 2 cm an die Probe heran gleichmässig appliziert. Dann steckt man den Bügel in die Vertiefungen im Tetrachlorkohlenstoff-Kühlbad, drückt die Papierenden schwach an die Papierbrücken zu den Elektrodenräumen und wartet einige Minuten, bis die wässrigen Lösungen unter dem CCl_4 zusammengeflossen sind. Die gleichmässigen Zonen erhält man dann, wenn die Probe mit möglichst

rechteckiger Begrenzung genau in die Mitte des Streifens aufgetragen wird und die Elektrodenräume nur spontan durch Kapillarität in den im Kühlbad eingetauchten Streifen über die Papierbrücken eindringen. Dieses Verfahren erfordert jedoch eine Vorbereitungszeit von ca. 20 Min. Die Papierbrücken sind dreifachgenommene, 2 cm breite Streifen aus aschefreiem Filterpapier, welche an die Querwände der Kühlbadkammer durch Kunststoffbügel angedrückt werden.

Die normale Ionenfokussierapparatur⁴⁾ enthält drei parallele Trennsysteme, die man zweckmässig auf der Anodenseite mit 0,25; 0,05; 0,01M HCl und auf der Kathodenseite mit 0,1 bis 0,4M Na-Acetat füllt. Die Konzentration der Kathodenlösung ist ohne jeden Einfluss auf das Trennmuster.

Gewöhnliche kommerzielle Elektrophoreseapparaturen sind für die hier mitgeteilte Anwendung nicht geeignet. Es ist eine wichtige Voraussetzung für den Erfolg, dass der Papierstreifen in einem flüssigen Kühlbad liegt. Die sonst notwendige Reduktion der Stromdichte und damit der Feldstärke um mindestens einen Faktor 10 erzeugt besonders bei den schlechterleitenden Zonen diffuse Grenzen und erfordert statt 5–20 Min. 2 bis 4 Std. für eine Analyse. Die drei Kammern des Apparates⁴⁾ können gleichzeitig benützt werden, vgl. aber 6.

3. *Elektrophorese*: Für reproduzierbares Arbeiten (vgl. Fig. 3) hält man zweckmässig den Strom konstant. Da der elektrische Widerstand des Streifens während der Ausbildung des Trennmusters etwa um den Faktor 10 ansteigt, ist eine erhebliche Spannungsreserve nötig. Ein zweckmässiges Speisegerät für diese Anwendung fehlt nach unseren Erkundigungen im Handel, so dass das Schaltschema unter 6. wiedergegeben ist.

Die Stromstärke wird zwischen 3 und 6 mA fest eingestellt. Werte bis etwa 10 mA sind zulässig, wenn das Probensystem nur stärkere Säuren, z. B. $pK < 3,5$, enthält und die Anodenlösung 0,25M an HCl ist. Wie Fig. 3 zeigt, genügen bei 3 mA und 0,025M HCl 10 Min. für die praktische Einstellung des stationären Zustandes bei einer Ausdehnung der Trennmuster von ca. 5 cm. Wird das Muster wesentlich länger oder ist ein Säurepaar mit einer sehr kleinen pK -Differenz in der Probe vorhanden, so sind bei gleicher Stromstärke 2 bis 3mal grössere Zeiten nötig. Die Niveaux der Elektrodenräume sollen stets etwas tiefer oder höchstens gleich demjenigen des CCl_4 -Kühlbades sein. Falls sie einige Millimeter höher sind, fliessen die wässerigen Lösungen über die Papierbrücken in den Kühlraum.

4. *Trocknen und Entwickeln*: Nach beendeter Elektrophorese wird der Streifen im Bügel in horizontaler Lage über einem Föhn getrocknet [2]. Nach Besprühen mit 0,2M $[Ag(NH_3)_2]NO_3$ -Lösung wird nochmals getrocknet, 2–5 Min. am Sonnenlicht exponiert und hierauf 4 Std. im Dunkeln belassen. In dieser Zeit nehmen die einzelnen Zonen gut entwickelte Farbnuancen an, die nach mehreren Tagen nachdunkeln bis die Unterschiede wieder verschwinden. Falls diese Methode zu lange dauert, verwendet man ca. 0,1N $KMnO_4$ als Sprühreagens. Man beobachtet dann in einzelnen Zonen eine allmähliche, mit unterschiedlicher Geschwindigkeit eintretende Entfärbung, in anderen eine ebenso differenzierte Braunsteinbildung. Neben diesen allgemein ansprechenden Reagentien stehen spezifische Nachweisreaktionen einzelner Säuren zur Verfügung, die z. B. in der tüpfelanalytischen Literatur verzeichnet sind.

5. *Weitere Bemerkungen*: Hat man keine Schätzung über die Totalkonzentration des Probengemisches, so trägt man 5 oder 10 μl der Probe auf und trennt bei einer mittleren Anodenkonzentration von 0,05M HCl. Werden die Zonen des Trennmusters dabei zu eng, bzw. zu weit, so wiederholt man den Versuch bei 0,01M bzw. 0,25M HCl oder noch stärker veränderten Anodenlösungen.

Störungen des Trennmusters können verschiedene Ursachen haben, vgl. [2]. Kleine Deformationen, wie sie bei den Ameisensäure- oder Ascorbinsäure-Zonen auf Fig. 3 zu sehen sind, rühren z. B. von ungleichmässiger Befeuchtung des Papierstreifens her und können nach 2. weitgehend durch das Befeuchtungsverfahren eliminiert werden. Die kathodenwärts liegenden Zonen enthalten die schwächeren Säuren, sind also schlechterleitend und haben deshalb bei gleicher Stromdichte eine höhere Temperatur und Energiedissipation. Dieser Umstand kann Anlass zur Instabilität geben: Falls die pK -Unterschiede benachbarter Zonen nur klein sind, können durch die Temperaturerhöhung in der schlechterleitenden Zone sowohl die Protolysenkonstante als auch u^- anwachsen, wodurch zuerst eine diffuse Grenze, nach längerer Elektrophorese sogar die Tendenz zur Umkehrung der Zonen entstehen kann. In solchen Fällen hilft die Kontrolle der Temperatur des Kühlbades, die nicht über 30° steigen sollte. Bei Routinegebrauch der Apparatur emp-

SUMMARY

1. Optimal conditions for focusing electrophoresis of metalions in pH-pL gradients require a pH-pL distribution along the paper strip approaching as closely as possible a step-function. Such distributions can be realized by a moving boundary system of the same number of molecular acids as pH-steps are necessary, developing between HCl-anode and Na-acetate-cathode solutions.

2. The following properties of a moving boundary system of acids are relevant for the feasibility of microanalysis: (a) each acid component gives rise to a zone between two moving boundaries; (b) the zones form an ordered set with increasing pK-values from anode towards cathode; (c) every zone width is proportional to the mole fraction of the particular acid in it; (d) all zone widths are inversely proportional to the concentration of the anode solution and independent of the concentration of the cathode solution.

3. By measuring zone widths a quantitative determination of each acid component is accomplished; the precision depends on the zone length and amounts to $\pm 3-10\%$. The lower limit of detection with ammoniacal silver nitrate or potassium permanganate lies between 10^{-2} and 10^{-3} micromoles.

4. More than 20 acids have been tried. Examples of a 10-component mixture are discussed as well as several applications of the method.

5. A detailed experimental description is given.

Anorganisch-chemisches Institut
der Universität, Zürich

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Zusammenfassung: E. J. SCHUMACHER, Theory of Focusing Electrophoresis UCRL-10624, p. 208 (1963). Die ausführliche Arbeit erscheint demnächst.
- [2] W. FRIEDLI & E. SCHUMACHER, *Helv.* **44**, 1829 (1961).
- [3] Zusammenfassung: E. J. SCHUMACHER, Separation of Actinides by Focusing Electrophoresis, UCRL-10624, p. 210 (1963).
- [4] H. SVENSSON, *Acta chem. scand.* **15**, 325 (1961); **16**, 456 (1962); *Arch. Biochemistry Biophysics*, Suppl. **7**, 132 (1962).
- [5] F. KOHLRAUSCH, *Ann. Physik* **62**, 209 (1897); H. SVENSSON, *Arkiv Kemi* **17a**, 1 (1943); V. P. DOLE, *J. Amer. chem. Soc.* **67**, 1119 (1945); H. SVENSSON, *Acta chem. scand.* **2**, 841 (1948); E. B. DISMUKES & R. A. ALBERTY, *J. Amer. chem. Soc.* **76**, 191 (1954); J. C. NICHOL, E. B. DISMUKES & R. A. ALBERTY, *ibid.* **80**, 2610 (1957).
- [6] D. A. McINNIS, *The Principles of Electrochemistry*, Dover Publications, New York 1961, p. 59 ff.
- [7] P. B. DAVIES & C. B. MONK, *Trans. Faraday Soc.* **50**, 128 (1954).