

L-amino acid oxidase, and the resultant hydrogen peroxide was coupled to horseradish peroxidase. The reactive zone was then very effectively located by the starch-iodide reaction. The technique may also prove applicable in polyacrylamide gel electrophoresis if a small percentage of soluble starch is incorporated in the polyacrylamide gel during its preparation.

I wish to thank Professor C. O'HEOCHA and Dr. P. O'CARRA for their helpful interest, and the Department of Education, Dublin, for a research maintenance grant.

Department of Biochemistry,  
University College,  
Galway (Ireland)

M. J. MURPHY

- 1 J. J. EVANS, *Plant Physiol.*, 43 (1968) 1037.
- 2 H. DELINCÉE AND B. J. RADOLA, *Biochim. Biophys. Acta*, 200 (1970) 404.
- 3 C. E. SEARLE, *Chemistry Brit.*, 6 (1970) 5.
- 4 G. DISCOMBE, *Brit. Med. J.*, 3 (1967) 615.
- 5 B. C. SAUNDERS, A. G. HOLDES SIEDLE AND B. P. STARK, *Peroxidase*, Butterworths, London, 1964, p. 24.
- 6 H. E. KASINSKY AND D. P. HACKETT, *Phytochemistry*, 7 (1968) 1147.

Received April 27th, 1970

*J. Chromatog.*, 50 (1970) 539-540

CHROM. 4792

### Densitometrische Bestimmung von Fe(II)-Fe(III)-Gemischen nach elektrophoretischer Trennung mittels N-(2-Hydroxyäthyl)iminodiessigsäure

Die in der Praxis bedeutsame Trennung von Eisen(II)- und Eisen(III)-ionen lässt sich u.a. auch mittels der Migrationsmethoden erreichen. Die Voraussetzungen für eine erfolgreiche Trennung sind vor allem durch die unterschiedliche Ladung sowie Tendenz zur Komplexbildung beider Valenzformen der Eisenionen gegeben. Man benutzte zu diesem Zweck Papierchromatographie<sup>1</sup>, Ionenaustauschchromatographie<sup>2</sup> und in letzter Zeit auch Dünnschichtchromatographie<sup>3</sup>. Durch gleichzeitige Papierelektrophorese und Papierchromatographie erreichten LINGREN *et al.*<sup>4</sup> eine Fe(II)-Fe(III)-Trennung in verdünnter Schwefelsäure.

Mit der Einführung der N-(2-Hydroxyäthyl)iminodiessigsäure (HIDA) als einen breit anwendbaren komplexbildenden Elektrolyten für Trennung von anorganischen Ionen<sup>5</sup> wurde auch die Möglichkeit einer rein elektrophoretischen Trennung der Eisenionen gegeben. Tatsächlich erzielte man eine gute qualitative Separation eines äquimolaren Gemisches beider Valenzformen auf diesem Wege<sup>6</sup>. Weitere Untersuchungen der Möglichkeiten elektrophoretischer Ionentrennung in der Lösung von HIDA erwiesen<sup>7</sup>, dass diese ohne jede Vortrennung bis zu einem Grenzverhältnis von etwa 1:500 durchaus erfolgreich verlaufen; die quantitative Bestimmung der ge-

*J. Chromatog.*, 50 (1970) 540-543

trennten Ionen erfolgte dabei mittels einer modifizierten Methode der indirekten Densitometrie nach KEIL<sup>8</sup>. In der vorliegenden Mitteilung wird über die Trennung und Bestimmung annähernd äquimolarer Fe(II)-Fe(III)-Gemische sowie über die Bestimmung kleiner Mengen von Eisen(III)-ionen in Lösungen von Eisen(II)-salzen berichtet.

### *Methodik*

Als Trägerelektrolyt diente eine 0.05 M Lösung des Mononatrium-hydroxy-äthyliminodiacetats, deren pH-Wert durch Zusatz von Salpetersäure auf 1.6 eingestellt wurde; Ionenstärke der Lösung wurde mit Kaliumnitrat bei einem Wert  $\mu = 0.1$  gehalten.

Die Standardlösungen für die Herstellung der Modellgemische erhielt man aus  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Die schwach angesäuerte Lösung von Eisen(II)-salz wurde in Gegenwart von Platinschwarz mit Wasserstoff reduziert bis zu einer negativen Reaktion auf Eisen(III) und nachher mit Stickstoff gesättigt. Der Eisen-gehalt beider Lösungen wurde komplexometrisch bestimmt.

Aus den Standardlösungen wurden zwei Reihen von Modellgemischen bereitet. Die eine enthielt Fe(II) und Fe(III) in einem Molarverhältnis ungefähr 1:2, 1:1 und 2:1. Die Konzentrationen wurden so gewählt, dass im aufzutragenden Volumen von 10  $\mu\text{l}$  je 6–12  $\mu\text{g}$  beider Formen vorhanden waren. Die andere Reihe von Proben enthielt 2–4  $\mu\text{g}$  Fe(III) neben 200  $\mu\text{g}$  Fe(II) in der Einzelauftragung, was einem Prozentgehalt von 1–2% Fe(III) in Fe(II) entspricht. Zu allen Proben wurde die Lösung des Na-HIDA in solcher Menge zugefügt, dass das Molarverhältnis Fe:HIDA gleich 1 war. Um die Oxidationswirkung des Luftsauerstoffs zu beschränken, wurden die Lösungen mit Stickstoff gesättigt und in gut verschlossenen Kölbchen im Kühlschrank aufbewahrt. Der Eisen(III)-gehalt der Gemische wurde in einstündigen Zeitabschnitten jodometrisch kontrolliert; es war jedoch binnen 5 Std. keine Erhöhung zu vermerken.

Die allgemeinen Arbeitsbedingungen für die Durchführung der Elektrophorese sind einer vorhergehenden Mitteilung<sup>9</sup> zu entnehmen. Alle Versuche haben wir mit dem Chromatographiepapier Whatman No. 2, bei einer Temperatur 15° und einem Spannungsgefälle 15 V/cm unternommen. Die Trenndauer in der ersten Reihe der Proben betrug 30 Min., in der zweiten 1 Std. Eine Erhöhung der Temperatur verursacht unerwünschte Diffusion der Zonen und verschlechtert die Trennwirkung. Auch eine Verlängerung der Versuchsdauer bei unverändertem Spannungsgefälle ist aus demselben Grunde nicht zweckmässig.

### *Auswertung*

Bei jeder einzelnen Elektrophorese wurden zugleich mit den Proben zwei Standardlösungen mit bekanntem Eisengehalt aufgetragen. Die getrockneten Elektropherogramme wurden in eine 1%-ige Lösung des Diäthylthiocarbaminsäuren Natriums eingetaucht. Nach dem Austrocknen wurden die Elektropherogramme photographiert. Die Negative wurden densitometrisch ausgewertet mittels eines adaptierten und mit Linienschreiber gekoppelten Mikrophotometers (Schnellphotometer Zeiss, Jena), wie es ausführlicher in der Literatur<sup>7</sup> beschrieben wird. Die planimetrisch ermittelten Flächen der Maxima der densitometrischen Kurven wurden dann zur Konstruktion von Kalibrationskurven sowie zur Gehaltsbestimmung des zu bestimmenden Ions benutzt.

### Ergebnisse und Diskussion

HIDA übt keine stabilisierende Wirkung auf die einzelnen Valenzformen des Systems Fe(III)–Fe(II) aus. Das geht unter anderem aus der Ermittlung der Redoxpotentiale hervor; diese werden durch Komplexbildung bei denselben Bedingungen, welche bei der Trennung auftreten, nicht beeinflusst. Trotzdem erscheint HIDA für die elektrophoretische Trennung ausserordentlich geeignet: das Reagens selbst sowie seine Metallchelate sind in wässrigen Lösungen gut löslich und die Gleichgewichte der Komplexbildung stellen sich rasch ein. Demzufolge bilden sich bei der Elektromigration im allgemeinen gut abgegrenzte und meist symmetrische Zonen.

Die Vorversuche ergaben, dass die besten Trennungen eines Fe(II)–Fe(III)-Gemisches bei einem pH-Wert des Trägerelektrolyten von 1.6 erreichbar sind. Wird bei einem höheren pH-Wert gearbeitet, so dehnt sich die Zone der Eisen(II)-ionen aus und mit deren steigender Konzentration wird dann der Trenneffekt beträchtlich herabgesetzt.

Ferner wurde das Grenzverhältnis der Konzentrationen untersucht, bei welchem noch kleine Mengen des Fe(III) von einem grossen Überschuss an Fe(II) einwandfrei abtrennbar sind. Unter unseren Versuchsbedingungen wurde als solches ein Verhältnis 1:100 gefunden. Was die absoluten Gewichtsmengen betrifft, erwies sich das Auftragen von ungefähr 2 µg Fe(III) mit 200 µg Fe(II) in einem Volumen von 20 µl als geeignet. Wurden dieselben Mengen in einem kleineren Volumen aufgetragen, so hatte dies ungünstige Auswirkungen auf die Qualität der Trennung.

Schliesslich wurde festgestellt, dass die Fläche der Maxima von densitometrischen Kurven eine lineare Funktion der Gewichtsmenge von Eisenionen in einem Bereich von 1–40 µg darstellt.

TABELLE I

BESTIMMUNG ANNÄHERND ÄQUIMOLARER Fe(III)–Fe(II)-GEMISCHE

$Fe^{3+} : Fe^{2+}$	Fe(III)				Fe(II)			
	Ber. (µg)	Gef. (µg)	S (µg)	V (%)	Ber. (µg)	Gef. (µg)	S (µg)	V (%)
1 : 2	6.08	6.55	0.31	4.73	12.60	12.82	0.40	3.10
1 : 1	9.12	9.63	0.27	2.80	9.40	9.72	0.37	3.80
2 : 1	12.17	12.32	0.35	2.84	6.30	6.75	0.36	5.30

Aufgrund dieser Erfahrungen wurden zuerst Analysen der Modellgemische der zu trennenden Ionen mit dem Molverhältnis ungefähr 1:2, 1:1 und 2:1 durchgeführt. Die in der Tabelle I angeführten Ergebnisse stellen die Mittelwerte von zehn parallelen Einzelbestimmungen dar; die Streuung der Methode wird zugleich mittels der Standardabweichungen S und Variationskoeffizienten V charakterisiert.

Die Reproduzierbarkeit der Methode (etwa 2–5%) ist gegenüber den Resultaten von POLLARD *et al.*<sup>1,2</sup> bedeutend niedriger. Die zitierten Autoren benutzten allerdings ein Elutionsverfahren, wobei die aufgetragenen Mengen von Eisenionen zwischen 25–2500 µg lagen. Die Trenndauer bei der Papierchromatographie nahm (samt Kammersättigung) ungefähr 3.5 Std. in Anspruch. Die elektrophoretische Trennung

TABELLE II

BESTIMMUNG DES Fe(III)-GEHALTES IN Fe(II)-SALZLÖSUNG

Fe(III)		S	V
		(%)	(%)
Gegeben (%)	Gefunden (%)		
1.01	0.98	0.11	11.2
1.51	1.55	0.03	1.9
2.02	1.99	0.09	4.5

dauert dagegen unter unseren Bedingungen nur etwa 30 Min. und diese Zeit könnte bei erhöhtem Spannungsgefälle ohne Schwierigkeiten noch herabgesetzt werden. Die Resultate der dünn-schichtchromatographischen Trennung<sup>3</sup> sind mit unseren vergleichbar, wobei POKORNY für die quantitative Bestimmung ebenfalls Elutionsverfahren benutzt. Die von LINGREN *et al.*<sup>4</sup> erwähnte etwa 10%-ige Verschiebung des Konzentrationsverhältnisses zugunsten der Eisen(II)-ionen haben wir nicht beobachtet.

Die Ergebnisse der Analysen von Eisen(II)-lösungen mit Beimischung von etwa 1–2% Fe(III)-ionen sind aus der Tabelle II ersichtlich. Es handelt sich diesmal um Mittelwerte von je sechs parallelen Bestimmungen.

Die Genauigkeit ist in diesen Fällen begreiflicherweise niedriger, was auf das ungünstige Konzentrationsverhältnis zurückzuführen ist.

Bisher wurden höchstens Gemische 1:40 durch Elektrophorese qualitativ getrennt<sup>4</sup>. Eine quantitative papierchromatographische Trennung wurde im Verhältnis 1:25 durchgeführt<sup>1</sup>. Somit erscheint auch in diesem Falle die papierelektrophoretische Trennung der Gemische Fe(II)–Fe(III) unter Benutzung von HIDA als vorteilhaft.

*Lehrstuhl für Analytische Chemie,  
Pharmazeutische Fakultät,  
Komenský-Universität, Bratislava (Tschechoslowakei)*

V. JOKL  
Z. PIKULÍKOVÁ

- 1 F. H. POLLARD, J. F. W. MCOMIE, A. J. BANISTER UND G. NICKLESS, *Analyst*, 82 (1957) 780.
- 2 F. H. POLLARD, J. F. W. MCOMIE, G. NICKLESS UND P. HANSON, *J. Chromatog.*, 4 (1960) 108.
- 3 G. POKORNY, *Mikrochim. Acta*, (1968) 386.
- 4 W. E. LINGREN, G. R. REECK UND R. J. MARSON, *Anal. Chem.*, 40 (1968) 1585.
- 5 V. JOKL, M. UNDEUTSCH UND J. MAJER, *J. Chromatog.*, 26 (1967) 208.
- 6 V. JOKL, *Proc. Anal. Chem. Conf. Budapest*, (1966) 88.
- 7 Z. PIKULÍKOVÁ, V. JOKL UND J. MAJER, *Chem. Zvesti*, im Druck.
- 8 B. KEIL, *Chem. Listy*, 48 (1954) 725.
- 9 V. JOKL, J. MAJER, H. SCHARF UND H. KROLL, *Mikrochim. Acta*, (1966) 63.

Eingegangen am 3. Februar 1970; geänderte Fassung am 28. April 1970