

CHROM. 5060

ZONENFORMEN BEI DER IONOPHORESE

W. PREETZ UND H. HOMBORG

Institut für Analytische Chemie und Radiochemie der Universität des Saarlandes, 66 Saarbrücken (B.R.D.)

(Eingegangen am 11. Mai 1970; geänderte Fassung am 25. September 1970)

SUMMARY

Formation of zones during ionophoresis

The formation of nonsymmetrical zone profiles during ionophoresis on carrier material as well as in free solution can be explained on the basis of concentration-dependent equilibria. The tailing which can be observed in paper ionophoresis is caused by the adsorptive interaction between the carrier and the ions which are to be separated. It can be almost eliminated by addition of polyvalent large ions to the basic electrolyte or to the test-solution. By this method the quantitative evaluation of the pherograms is made easier.

EINLEITUNG

Die Zonenionophorese auf Trägermedien, vorwiegend auf Papier, in Gelen und bestimmten Dünnschichten hat sich infolge des geringeren apparativen Aufwands in der Praxis wesentlich stärker durchgesetzt als die historisch ältere Methode der freien Ionophorese^{1,2}. Der Hauptvorteil eines porösen Trägermediums beruht auf seiner strömungsstabilisierenden Wirkung, wodurch Konvektionsstörungen weitgehend ausgeschaltet werden. Wegen der grossen Phasengrenzflächen flüssig—fest treten jedoch im Gegensatz zur freien Ionophorese eine Anzahl Wechselwirkungen auf, die die Wanderungsgeschwindigkeit geladener Teilchen beeinflussen.

Ist dafür gesorgt, dass auf einem elektrolytgetränkten Träger an allen Orten annähernd gleiche Ionenstärke und Leitfähigkeit herrschen, so wirken sich die meisten Einflüsse nach Betrag und Richtung auf alle Teilchen derselben Art im gleichen Masse aus. Das gilt für den Umwegfaktor nach KUNKEL UND TISELIUS³, durch den die Beweglichkeiten aller Ionen herabgesetzt werden, ebenso, wie für den "barrier-effect" nach MACDONALD⁴, durch den vor allem grosse Ionen gebremst werden. Auch Sog und Endosmose verursachen eine systematische Änderung der effektiven Wanderungsgeschwindigkeiten. Die genannten Effekte sind innerhalb ziemlich weiter Grenzen nicht von der Konzentration der zu trennenden Ionen abhängig und verursachen daher keine Veränderung der vorgegebenen Form der Zonen während der ionophoretischen Trennung. Vielmehr beobachtet man allgemein eine symmetrische Verbreite-

zung der Zonen durch Diffusion, die in erster Näherung umgekehrt proportional der Wurzel aus der Trenndauer ist⁵.

Im folgenden werden Einflüsse besprochen, die zur Ausbildung von charakteristischen unsymmetrischen Zonenprofilen während der Trennung führen. Die Ursachen dafür werden diskutiert und experimentelle Massnahmen zur Erreichung einer besseren Trennschärfe beschrieben.

CHARAKTERISTISCHE ZONENPROFILE

Nach dem Auftragen einer Substanz auf einen Träger in Form einer Zone, d.h. in einer Linie von mehreren cm Länge, ist die Konzentrationsverteilung durch eine steile Gausskurve gegeben, Fig. 1a. Diese Verteilungskurve verliert während der

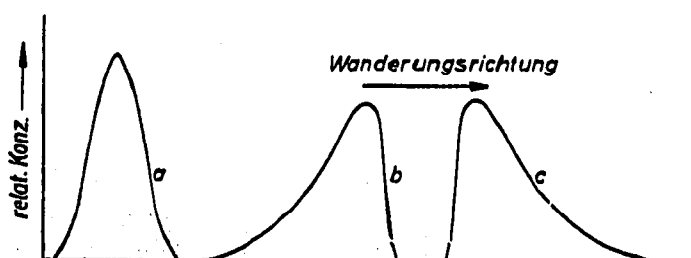


Fig. 1. Konzentrationsprofile bei der Zonenionophorese. (a) Zone am Start. (b) Zone bei Adsorption am Träger. (c) Zone ohne Adsorption am Träger bzw. in freier Lösung.

Ionophorese ihre symmetrische Gestalt, wenn die Beweglichkeit der zu trennenden Ionen innerhalb der Zone von ihrer örtlichen Konzentration abhängt, d.h. wenn die Teilchen des höher konzentrierten mittleren Teils schneller oder langsamer wandern als diejenigen, die sich an der verdünnteren Vorder- oder Rückfront befinden. Das ist immer der Fall, wenn die Ionenwanderung durch konzentrationsabhängige Gleichgewichte beeinflusst wird oder eine Änderung in der Ionenstärke eintritt. Vor allem Dissoziations-, Hydrolyse-, Hydratations- und Komplexgleichgewichte sowie Adsorptionsvorgänge haben zur Folge, dass statt der Beweglichkeit u nur die kleinere Nettobeweglichkeit u_n beobachtet wird².

Dissoziationsgleichgewichte

Für den Fall unvollständiger Dissoziation gilt:

$$u_n = u \cdot \alpha \quad (1)$$

α ist der Dissoziationsgrad, der nach dem Ostwaldschen Verdünnungsgesetz von der Konzentration der beteiligten Ionen abhängt. Demnach besitzen wegen des höheren Dissoziationsgrades in den Bereichen der verdünnteren Flanken die dort befindlichen Ionen eine höhere Nettobeweglichkeit als im konzentrierteren Mittelteil der Zone. Die Folge davon ist, dass bei der Wanderung im elektrischen Feld die Ionen der Vorderfront dem Schwerpunkt der Zone vorausseilen, während die Teilchen der Rückfront mit gleichfalls höherer Geschwindigkeit in den konzentrierten Teil der Zone hineinwandern. Es bildet sich das Konzentrationsprofil der Fig. 1c heraus. Die Zone zeigt eine sehr scharfe konzentrierte Rückfront, während die Flanke in Richtung der Wanderung kometen- oder schweif förmig ausläuft.

Das gleiche Zonenprofil ergibt sich, wenn die Ionenstärke in der Zone grösser als im umgebenden Grundelektrolyten ist, weil auch dann die effektive Ionenbeweglichkeit nach den Flanken hin zunimmt.

Das in Fig. 1c dargestellte Zonenprofil wird vor allem bei der Ionophorese in freier Lösung beobachtet. Auf Trägern findet man es nur, wenn keine Adsorption eintritt. Eine Umkehrung in die Form der Fig. 1b ergibt sich für freie Lösungen dann, wenn bei der Sekundärdissoziation schwacher Komplexe Teilchen mit kleinerer Ladungszahl entstehen. Das Auftreten dieser Form auf Trägern weist immer auf adsorptive Wechselwirkungen hin.

Adsorption und chromatographischer Effekt

Die üblicherweise verwendeten Trägermedien, insbesondere auch Papier, vermögen eine aufgetragene Substanz in geringem Umfang zu adsorbieren. Die festgehaltene Menge richtet sich nach einem Gleichgewicht, das durch eine Adsorptionsisotherme beschrieben werden kann⁶. Vom hochkonzentrierten mittleren Teil einer zunächst symmetrischen Zone wird ein prozentual kleinerer Anteil der Substanz adsorbiert als von den verdünnteren Flanken. Die effektive Beweglichkeit ist deshalb in der Mitte höher als an den Seiten. Die Folge ist die Ausbildung des Zonenprofils der Fig. 1b mit einer scharfen konzentrierten Vorderfront und einer schweifartigen Rückfront. Besonders ausgeprägt ist diese adsorptive Wechselwirkung bei grossen organischen Ionen, z.B. Methylenblau⁶. Aber auch bei schweren anorganischen Ionen, wie den Hexahalogenokomplexen der Platinelemente, ist sie deutlich zu beobachten. Bei kleinen einfach geladenen Ionen wie K^+ und Cl^- ist die Adsorption klein, so dass bei ihnen meistens das Profil der Fig. 1c auftritt.

Nur in einigen speziellen Fällen ermöglicht die durch teilweise Adsorption bedingte Verlangsamung bestimmter Ionen, die auch als chromatographischer Effekt bezeichnet wird, die Trennung sehr ähnlicher Ionen. Während z.B. Cu^{2+} und Cd^{2+} bei der freien Ionophorese etwa gleich schnell wandern, gelingt die Trennung auf Papier sehr einfach, weil Cu^{2+} stark gebremst wird⁷.

In der Mehrzahl der Fälle verursacht die Schweifbildung durch Adsorption am Träger Schwierigkeiten, insofern als die Bestimmung der Wanderungsgeschwindigkeit erschwert und zusätzlich zur Diffusion eine Zonenverbreiterung hervorgerufen wird. Darunter leidet vor allem die Trennschärfe. Aber auch die Isolierung einzelner Substanzen durch Elution lässt sich bei schweifartig ausmündenden Zonen nur schlecht durchführen. Noch schwieriger ist die quantitative Auswertung solcher Pherogramme, z.B. durch photometrische oder, im Falle markierter Verbindungen, mit Hilfe radiometrischer Methoden.

Überladene Zonen

Eine Zone ist überladen, wenn die Leitfähigkeit der aufgetragenen Analysenlösung wesentlich grösser als die des Grundelektrolyten ist. Die wichtigste Bedingung für die ungestörte Zonenionophorese, nämlich gleichmässiger Spannungsabfall bzw. gleiche Feldstärke über die gesamte Wanderungsstrecke, ist dann nicht mehr erfüllt, sondern stellt sich während des Versuches erst ein. Dabei bilden sich, wie LEGOUX⁸ durch radiometrische Verfolgung der Wanderung einfacher Kationen feststellte, unsymmetrische Zonenprofile aus.

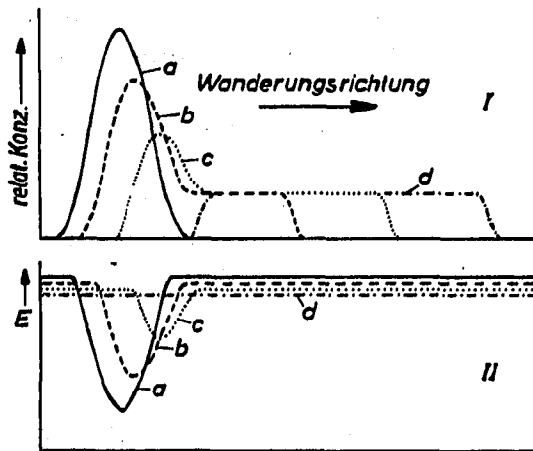


Fig. 2. Veränderung der Gestalt überladener Zonen während der Ionophorese (I). (II) Feldstärkeverlauf. Zeit: $0 = a < b < c < d$.

Die zeitliche Veränderung der Form einer überladenen Zone und des dazugehörigen Feldstärkeverlaufes ist in Fig. 2 schematisch dargestellt.

Die Feldstärke E ist umgekehrt proportional zur Leitfähigkeit κ , wie folgende Gleichung zeigt:

$$E = \frac{I}{\kappa} \cdot \frac{I}{q} \quad (2)$$

q = Querschnitt, I = Stromstärke.

Am Auftragungsort der Analysenlösung grosser Leitfähigkeit stellt sich bei Anlegen der Spannung eine geringe Feldstärke ein, Kurve a der Fig. 2, II. Vor allem auf die Teilchen des hochkonzentrierten Zentrums der Zone wirkt nur eine geringe Feldstärke ein, die Wanderungsgeschwindigkeit ist entsprechend klein. Die an der vorderen verdünnteren Flanke befindlichen Ionen werden dagegen schnell hinweggeführt. Dabei bilden sich unsymmetrische Zonenformen aus, Kurven b und c der Fig. 2, I, die der von Fig. 1c ähneln. Mit fortschreitender Zeit verbreitert sich die ursprünglich schmale Zone unter Verdünnung immer mehr. Es stellt sich ein Konzentrationsplateau ein, dessen Höhe von der Leitfähigkeit des Grundelektrolyten abhängt. Erst wenn die Einstellung gleichmässiger Feldstärke eingetreten ist, Kurve d der Fig. 2, II, wandert die gesamte, sehr breite Zone mit konstanter Geschwindigkeit und unterliegt dann den im ersten Teil des Kapitels beschriebenen Wechselwirkungen mit dem Träger.

Durch überladene Zonen wird, bedingt durch die zwangsläufig eintretende Verbreiterung, die Trennschärfe stets beeinträchtigt. Sehr scharfe Zonen bilden sich gleich zu Beginn der Trennung aus, wenn im Vergleich zum Grundelektrolyten verdünnte Lösungen aufgebracht werden, weil dann in Umkehrung des beschriebenen Vorgangs eine Aufkonzentrierung und Fokussierung erfolgt.

Prinzipiell sind jedoch diese durch Konzentrations- und Feldstärkeinhomogenitäten hervorgerufenen Veränderungen der Zonen gegenüber den im vorangehenden besprochenen Effekten zu unterscheiden.

EXPERIMENTELLES

Neben kontinuierlichen trägerfreien Methoden^{9,10} hat auch die diskontinuierliche Zonenionophorese auf Trägern für die Darstellung von Gemischtligandkomplexen, z.B. der Reihen $[\text{OsCl}_x\text{J}_{6-x}]^{2-}$ und $[\text{OsBr}_x\text{J}_{6-x}]^{2-}$ ($x = 0-6$), Bedeutung¹¹. Besonders bei schnell hydrolysierenden Verbindungen, wie sie die jodidreichen Komplexe darstellen, ist sie unentbehrlich.

Die Trennungen mit Hilfe der Hochspannungspapierionophorese werden in einer früher beschriebenen Apparatur¹² unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Trägermaterial:	Filterpapier, B mgl, 90 × 5 cm (Fa. Schleicher und Schüll)
Probegemisch:	ca. 100 µg Komplexsalze in 1-2 Tropfen Wasser gelöst
Elektrodenabstand:	80 cm
Spannung:	5000 V
Stromstärke:	ca. 15 mA/Streifen
Feldstärke:	60 V/cm
Trennzeit:	ca. 30 min
Kühlbadtemperatur:	-5°
Grundelektrolyt:	verschiedene gleicher Ionenstärke

Liegen in der Trennlösung alle Gemischtligandkomplexe einer Reihe nebeneinander vor, so findet man sieben etwa äquidistante Zonen. Je nach Art des verwendeten Grundelektrolyten und bestimmter adsorbierbarer Zusätze zur Trennlösung ergeben sich unterschiedliche Zonenprofile.

Trennung in Gegenwart eines nicht adsorbierbaren Grundelektrolyten

Als nicht adsorbierbarer Grundelektrolyt dient eine Lösung, die je 0.2 M an CH_3COOK und CH_3COOH ist. Verwendet man dieses Puffergemisch als Fließmittel bei der aufsteigenden Chromatographie, so ergeben sich für die Hexahalogenokomplexe von Os(IV) R_F -Werte zwischen 0.7 und 0.8. Die Rückfronten zeigen Schweifbildung.

Bei der Papierionophorese bildet der leichteste, am schnellsten wandernde Komplex ($x = 6$) eine Zone mit sehr scharfer Vorderfront. Die Konzentrationsverteilung der mittleren Zonen ist annähernd symmetrisch. Die letzte Zone läuft kometenartig aus, Fig. 3.

Auch wenn nur einige gemischte Komplexionen vorliegen ergeben sich diese typischen Zonenprofile für die am schnellsten und langsamsten wandernden Zonen. Die Abweichung von der symmetrischen Verteilungskurve wird ausser bei den End-

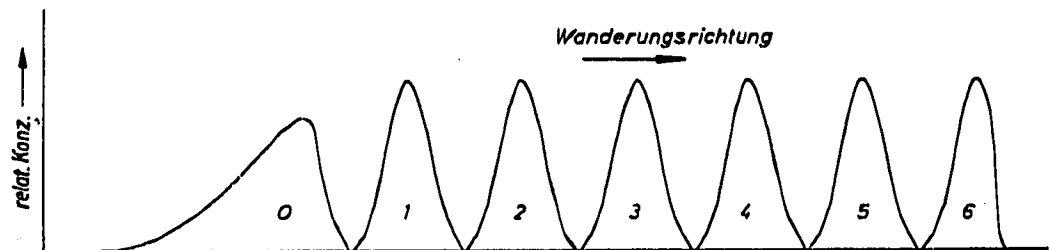


Fig. 3. Zonenprofile in Gegenwart eines nicht adsorbierbaren Grundelektrolyten. Grundelektrolyt: 0.2 M CH_3COOK + 0.2 M CH_3COOH . Komplexmischung: $[\text{OsCl}_x\text{J}_{6-x}]^{2-}$; ($x = 0-6$).

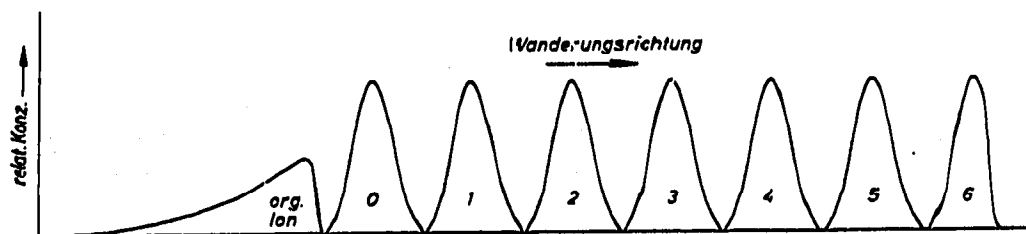


Fig. 4. Zonenprofile in Gegenwart adsorbierbarer Ionen im Probegemisch. Grundelektrolyt und Komplexbgemisch wie bei Fig. 3. Organisches Ion: 2-Naphthylamin-6.8-disulfonat bzw. 2-Naphthol-3,6-disulfonat.

gliedern auch für die übrigen beobachtet, wenn die Probe nicht zonen- sondern punktförmig aufgetragen wird.

Trennung bei Zugabe eines adsorbierbaren Ions zur Probelösung

Die im vorangehenden beschriebene Versuchsdurchführung wird nur insofern geändert, als der wässrigen Lösung der Komplexe eine kleine Menge eines Salzes zugesetzt wird, dessen grosses mehrfach geladenes Anion eine etwas geringere Beweglichkeit besitzt als das langsamste Komplexion. Es eignen sich z.B. die Dinatriumsalze der 2-Naphthylamin-6,8-disulfonsäure bzw. der 2-Naphthol-3,6-disulfonsäure. Bei der Ionophorese erhält man die durch Fig. 4 schematisch wiedergegebenen Zonenprofile.

Gegenüber der Fig. 3 fällt auf, dass jetzt auch die letzte Komplexzone ($\alpha = 0$) eine symmetrische Konzentrationsverteilung aufweist. Das organische "Hilfsion", das im UV-Licht sichtbar wird, weist dagegen extreme Schweifbildung auf, die sich bis fast an die Startlinie erstreckt.

Trennung in Gegenwart eines adsorbierbaren Grundelektrolyten

Das Acetat des bisher verwendeten Grundelektrolyten wird unter Konstanthaltung der Ionenstärke und des pH-Wertes zu einem Viertel bis zur Hälfte durch die Dinatriumsalze der erwähnten Disulfonsäuren ersetzt. In Gegenwart der gut an Papier adsorbierbaren organischen Ionen werden die Zonenprofile der Fig. 5 beobachtet.

Auch jetzt ergibt sich für die letzte Zone eine annähernd symmetrische Konzentrationsverteilung, zumindest ist die Schweifbildung im Vergleich zu Fig. 3 stark verringert. Die am schnellsten wandernde Zone weist dagegen eine kometenartige

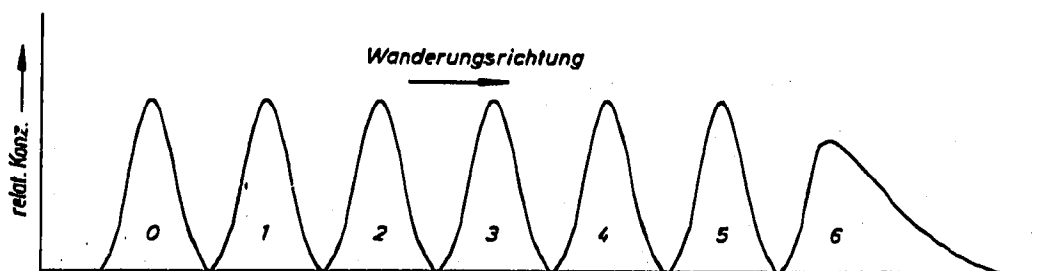


Fig. 5. Zonenprofile in Gegenwart adsorbierbarer Ionen im Grundelektrolyten. Grundelektrolyt wie bei Fig. 3, jedoch zu einem Viertel bis zur Hälfte ersetzt durch das Dinatriumsalz von 2-Naphthylamin-6,8-disulfonsäure bzw. 2-Naphthol-3,6-disulfonsäure. Komplexbgemisch wie bei Fig. 3.

Vorderfront auf. Bei gleicher Trenndauer sind die von den einzelnen Zonen zurückgelegten Wanderungsstrecken bei Anwesenheit der adsorbierbaren organischen Ionen im Grundelektrolyten um etwa 10% grösser als in reiner Acetatlösung.

DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Die bei der Ionophorese auf Trägermedien auftretenden charakteristischen Zonenprofile lassen sich durch die Wahl des Grundelektrolyten beeinflussen. Die adsorptive Wechselwirkung zwischen dem Träger und den wandernden Ionen ist um so ausgeprägter, je grösser und höher geladen diese sind.

Verwendet man als Grundelektrolyten eine Lösung, die nur kleine einfach geladene Ionen enthält, z.B. einen Acetatpuffer, so ist die Wechselwirkung mit dem Papier gering, und es werden vorzugsweise die zu trennenden, zweifach geladenen und grösseren Komplexionen adsorbiert. Das führt zum kometenartigen Ausmünden der Rückfront. Folgen mehrere Zonen sehr dicht auf einander, so schieben sie sich vor einander her, d.h. die zurückbleibenden Ionen der voranwandernden Zone werden durch die der nachfolgenden Zone desorbiert. Die Konzentrationsverteilung bleibt symmetrisch.

Setzt man dem Grundelektrolyten grosse mehrfach geladene Ionen zu, so blockieren diese weitgehend die Adsorptionszentren. Die Zonenprofile gleichen denen in freier Lösung. Die Ausschaltung der Adsorption der zu trennenden Ionen äussert sich auch in der Zunahme der Wanderungsgeschwindigkeit. Durch die Gegenwart gut adsorbierbarer Teilchen lässt sich demnach die Umkehrung der Zonenprofile von der Gestalt b in c der Fig. 1 erreichen.

Um symmetrische, gut auswertbare Zonen zu erhalten, genügt erfahrungsgemäss der Zusatz einiger Prozent der organischen Salze zum Grundelektrolyten. Ist ihre Anwesenheit für nachfolgende Untersuchungen störend, so empfiehlt sich ein kleiner Zusatz solcher gut adsorbierbarer Ionen zum Probegemisch, deren Beweglichkeit etwas geringer als die der Ionen der interessierenden Zone ist. Wie in Fig. 4 dargestellt, werden die Komplexionen der letzten Zone durch das auf das Papier aufziehende organische Ion verdrängt, so dass sich ein symmetrisches Zonenprofil ausbildet.

DANK

Wir danken dem Direktor des Instituts, Herrn Professor Dr. E. BLASIUS, für die Förderung unserer Arbeit.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Ausbildung unsymmetrischer Zonenprofile während der Ionophorese auf Trägern und in freier Lösung wird durch konzentrationsabhängige Gleichgewichte erklärt. Die bei der Papierionophorese zu beobachtende Schweifbildung beruht auf der adsorptiven Wechselwirkung zwischen dem Träger und den zu trennenden Ionen. Sie lässt sich durch Zugabe mehrfach geladener grosser Ionen zum Grundelektrolyten bzw. zur Probelösung weitgehend ausschalten. Die quantitative Auswertung der Pherogramme wird dadurch erleichtert.

LITERATUR

- 1 CH. WUNDERLY, *Principles and Applications of Paper Ionophoresis*, Elsevier, Amsterdam, London, New York, 1961.
 - 2 W. PREETZ, *Fortschr. Chem. Forsch.*, 11 (1969) 375.
 - 3 H. G. KUNKEL UND A. TISELIUS, *J. Gen. Physiol.*, 35 (1951) 89.
 - 4 H. J. MACDONALD, *Ionography, Electrophoresis in Stabilized Media*, Year Book Publishers, Chicago, 1955.
 - 5 Q. P. PENISTON, H. D. AGAR UND J. L. MC CARTHY, *Anal. Chem.*, 23 (1951) 994.
 - 6 R. WEBER, *Helv. Chim. Acta*, 34 (1951) 2031.
 - 7 M. LEDERER, H. MICHL, K. SCHLÖGL UND A. SIEGEL, *Handbuch der mikrochemischen Methoden*, Band III, Springer, Wien, 1961.
 - 8 Y. LEGOUX, *Dissertation*, Sorbonne, Paris, 1957.
 - 9 W. PREETZ UND H. L. PFEIFER, *Anal. Chim. Acta*, 38 (1967) 255.
 - 10 W. PREETZ, U. WANNEMACHER UND S. DATTA, *Z. Anal. Chem.*, im Druck.
 - 11 W. PREETZ UND H. HOMBORG, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, 32 (1970) 1979.
 - 12 E. BLASIUS UND W. PREETZ, *Z. Anorg. Allgem. Chem.*, 335 (1965) 1.
- J. Chromatog.*, 54 (1971) 115-122