

CHROM. 8133

## APPARATUR ZUR HOCHSPANNUNGSIONOPHORESE IM TEMPERATURGRADIENTEN

E. BLASIUS, H. AUGUSTIN und G. KLEMM

*Fachrichtung Anorganische Analytik und Radiochemie der Universität des Saarlandes, 66 Saarbrücken (B.R.D.)*

(Eingegangen am 9. Dezember 1974)

### SUMMARY

#### *Apparatus for high-voltage ionophoresis in temperature gradients*

A new separation chamber for ionophoresis in a temperature gradient has been developed. Peltier elements are used for cooling and for setting the variable gradient. The better separations obtained in the case of a temperature gradient, compared to those obtained with a constant temperature, are demonstrated. A higher separation efficiency of about 30% is attained for polythionates. Non-aqueous solutions are also included in the investigations.

### EINLEITUNG

Bei der Ionophorese beeinflussen Trägermaterial, Grundelektrolyt, Feldstärke und Trenntemperatur die Ionenbeweglichkeit und die Diffusion. Die Ionenbeweglichkeiten steigen um 2 bis 3% pro Grad Temperaturerhöhung an<sup>1</sup>, so dass die Trennzeiten bei höheren Temperaturen dementsprechend kürzer werden. Weiterhin werden in einem Temperaturgradienten schnell wandernde Ionen zusätzlich beschleunigt, langsam wandernde bleiben mehr zurück, so dass die Trennungen besser werden. Die mit steigender Temperatur wegen erhöhter Diffusion parallel gehende Zonenverbreiterung verschlechtert andererseits wieder die Trennung.

Für jedes ionophoretische Trennproblem gibt es daher, was die Trenntemperatur betrifft, optimale Bedingungen. Man arbeitet entweder bei konstanter Temperatur oder im Temperaturgradienten. Ein Verschieben der Trenntemperatur in den Bereich  $< -5^{\circ}$  kann bei Verwendung nichtwässriger Grundelektrolyte erreicht werden.

In dieser Arbeit wird eine neue Trennkammer beschrieben, mit der einerseits jede beliebige konstante Trenntemperatur in einem bestimmten Bereich eingestellt und andererseits ein Temperaturgradient längs der Trennstrecke angelegt werden kann. Ausgewählte Beispiele zeigen, dass in vielen Fällen Trennungen im Temperaturgradienten denen bei konstanter Temperatur überlegen sind. Die Verwendung nichtwässriger Grundelektrolyte wirkt sich bei speziellen Trennungen, z.B. von hydrolyseempfindlichen Substanzen, vorteilhaft aus.

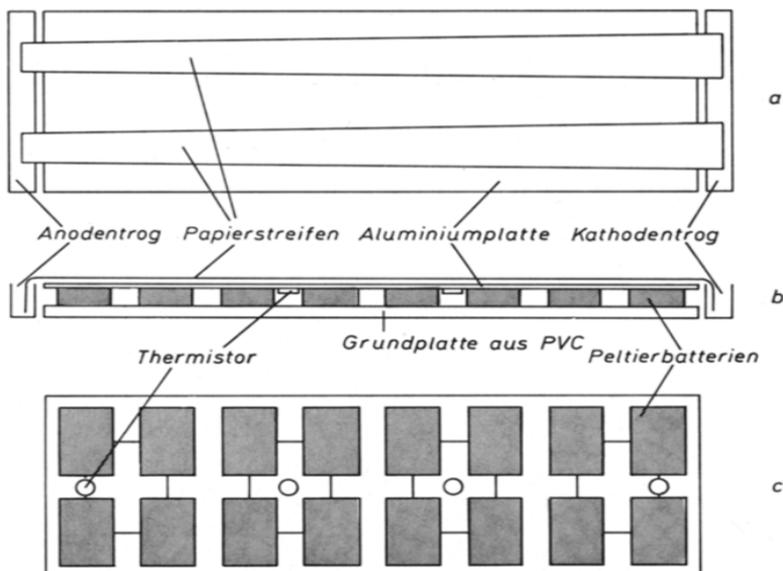


Fig. 1. Schematische Darstellung der Trennkammer mit Peltierbatterien. (a) Sicht von oben, (b) Seitenansicht und (c) Sicht von unten.

#### CHEMIKALIEN UND GERÄTE

Die Aminosäuren sind p.a.-Substanzen, bezogen von Merck (Darmstadt, B.R.D.), Fluka (Buchs, Schweiz) und Schuchardt (München, B.R.D.). Die Polythionate stellt man aus  $^{35}\text{S}$ -markiertem  $\text{SCl}_2$  (Buchler, Braunschweig, B.R.D.) und  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  nach den in der Literatur üblichen Verfahren<sup>2</sup> dar. Gemischtligandkomplexe des Chrom(III) werden nach Literaturangaben<sup>3</sup> dargestellt. Sonstige Verbindungen waren p.a.-Substanzen von Merck und Fluka.

Verwendet wird Ionophorespapier Nr. 2043 bmgl von Schleicher & Schüll (Dassel, B.R.D.). Als Hochspannungsgerät dient ein Power Supply von Camag (Berlin, B.R.D.), als Temperaturmessgerät ein TEM-1, von RIIC (London, Grossbritannien).

Die Aktivitätsverteilungskurven werden mit dem Papierchromatogramm-Scanner LB 280 von Berthold (Wildbad, B.R.D.) aufgenommen.

#### BESCHREIBUNG DER TRENNAPPARATUR

Die neue Trennapparatur behält in Anlehnung an früher beschriebene<sup>4,5</sup> das Prinzip der Aluminiumkühlplatte (hier 60 cm lang, 20 cm breit und 3 mm dick) und der elastischen Anpressung des Trägermaterials bei.

Die Kühlung erfolgt mit 16 Peltierbatterien (PKE 36 C 101, Hermann Köhler Elektrik, Nürnberg, B.R.D.). Sie sind, wie in Fig. 1c ersichtlich, unter die Aluminiumkühlplatte geschraubt. Das Schema der Kammer gibt Fig. 1.

An vier Stellen der Platte wird über vier Thermistoren der Strom von je vier zusammengeschalteten Peltierbatterien geregelt. Dadurch stellt sich eine frei wählbare Temperatur von  $-15^\circ$  bis  $35^\circ$  an jeder dieser vier Stellen ein. Das Prinzipschaltbild ist aus Fig. 2 ersichtlich.

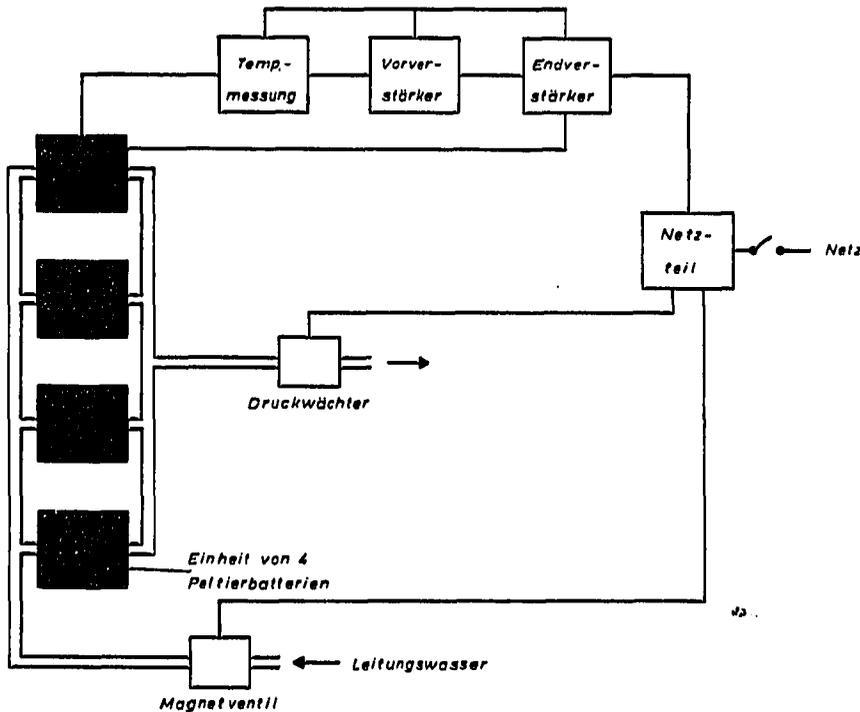


Fig. 2. Prinzipschaltbild der Apparatur mit Peltierkühlung.

Beim Einschalten öffnet sich das Magnetventil, so dass Leitungswasser durch die Peltierbatterien fließt. Ist die am Druckwächter festeingestellte Durchlaufmenge des Wassers erreicht, schaltet das Druckwächterrelais sämtliche Regel- und Steuereinheiten ein. Mit der Brückenschaltung zur Temperaturmessung wird der elektrische Widerstand des Thermistors gegen den von aussen mit dem Digitalknopf vorgeählten Widerstand gemessen. Bei Ungleichheit wird der Strom durch die Einheit von je vier Peltierbatterien so gesteuert, dass sie entweder aufheizen oder abkühlen.

Die Regel- und Steuereinheiten sind in einem Einschubgehäuse ( $75 \times 45 \times 30$  cm) untergebracht. Die Stellung eines der vier Digitalknöpfe und die zugehörige Temperatur an dem betreffenden Thermistor sind aus Fig. 3 zu entnehmen. Das Schaltschema des Gerätes gibt Fig. 4.

Der maximal erreichbare Gradient beträgt  $0.75^\circ/\text{cm}$ . Er kann entweder geradlinig oder V-förmig angelegt werden (Fig. 5). Die Temperaturmessung zu Fig. 5 erfolgt unter Einbeziehung der Plattenenden in Abständen von 5 cm mit einem Thermoelement.

Auf der warmen Seite des Ionophoreseträgers ist die elektrische Feldstärke geringer. Damit dieser Feldstärkegradient während der Trennung dem Temperaturgradienten nicht entgegenwirkt, wird das Trägermaterial (Papier- oder Dünnschichtfolie) keilförmig zugeschnitten (Fig. 6). Das schmale Ende des Streifens legt man auf die warme Seite der Aluminiumplatte. Das Kantenlängenverhältnis des Streifens richtet sich nach dem jeweiligen Trennproblem.

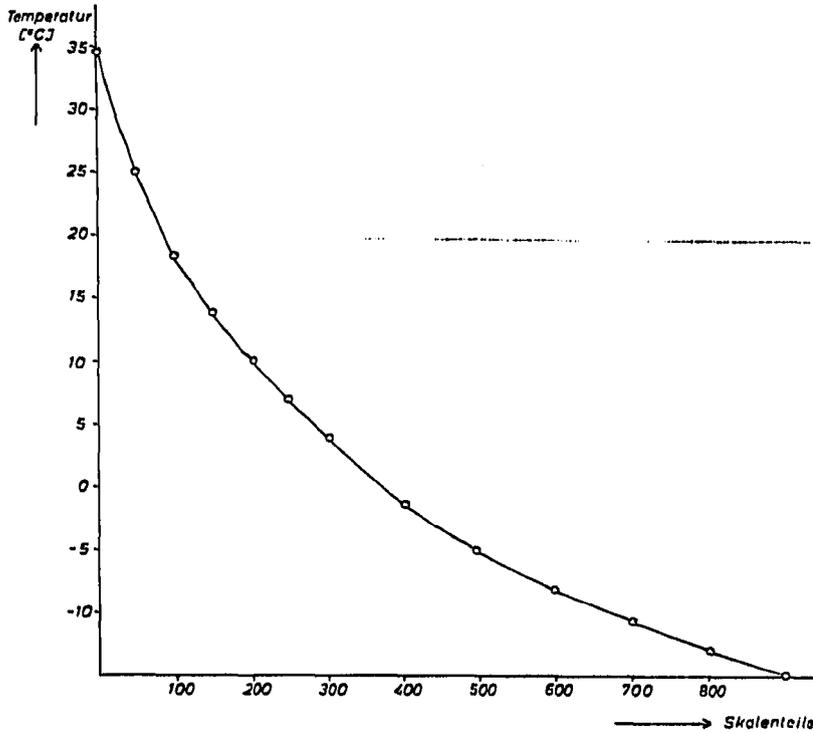


Fig. 3. Eichkurve für die Digitalanzeige.

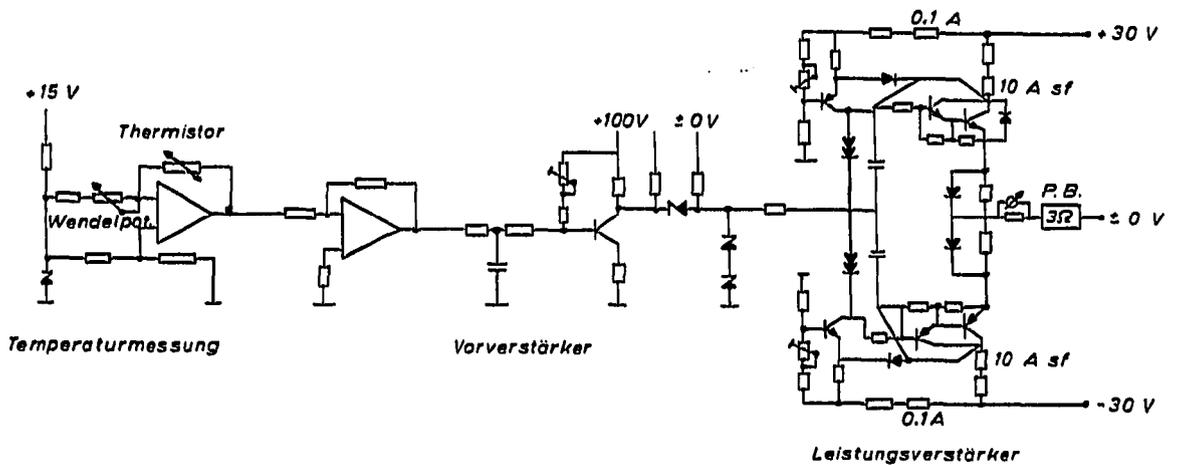


Fig. 4. Temperaturgradient bei Peltierkühlung —Schaltschema für eine Kühlgruppe. Regelbreite:  $\pm 3^\circ \cong \pm 8 \text{ A}$  pro Peltierbatteriegruppe.

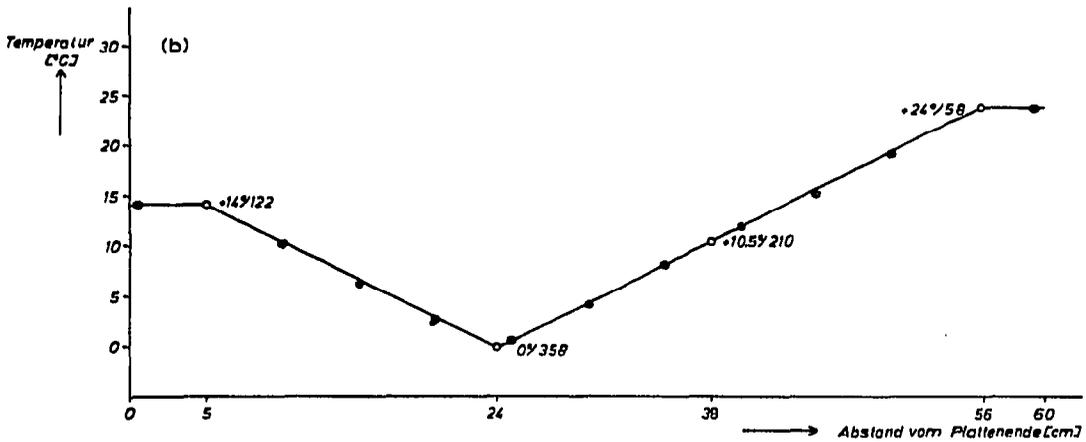
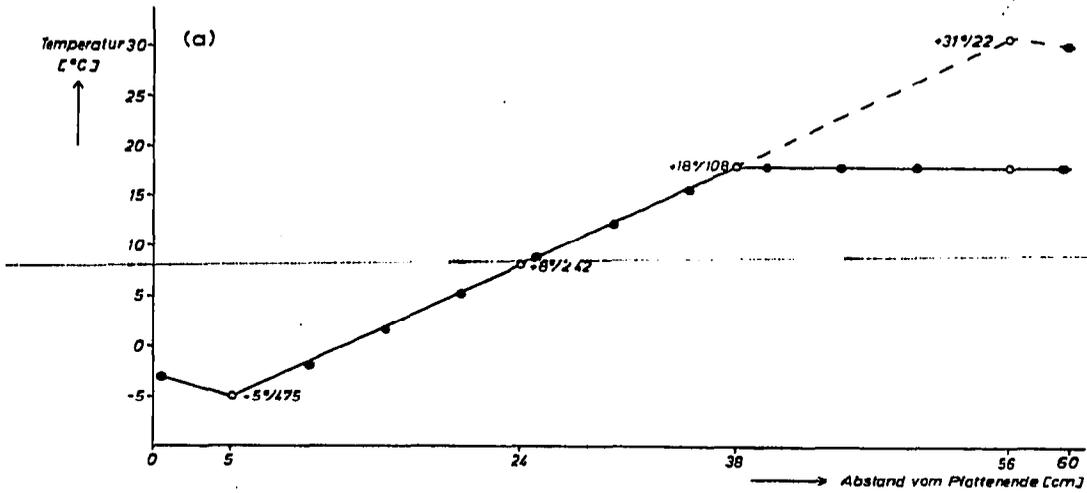


Fig. 5. Temperatur auf der Kühlplatte bei geradlinigem Gradienten (a) und V-förmigem Gradienten (b). ○, Einstell- und Messpunkte; ●, Messpunkte.

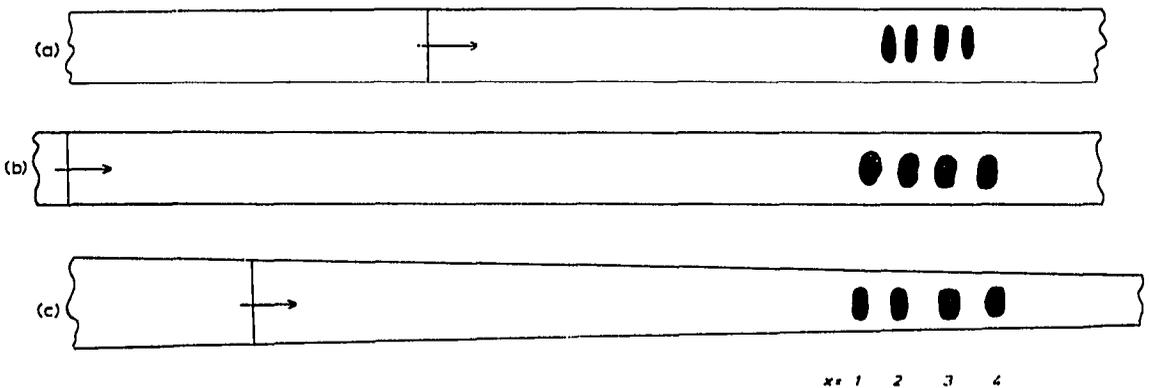
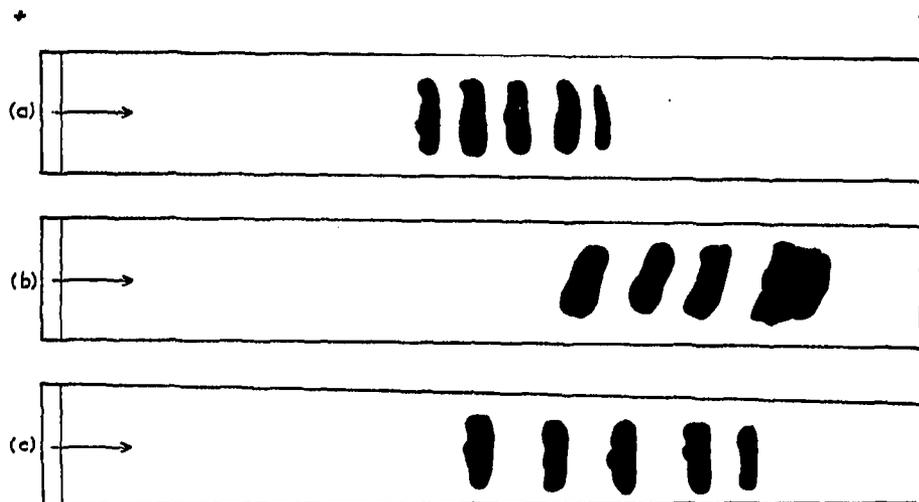


Fig. 6. Trennung von  $[\text{Cr}(\text{CN})_x(\text{NCS})_{6-x}]^{3-}$  ( $x = 1-4$ ). (a) Bei  $0^\circ$ , (b) bei  $10^\circ$  und (c) im geradlinigen Temperaturgradienten.

## TRENNBEISPIELE

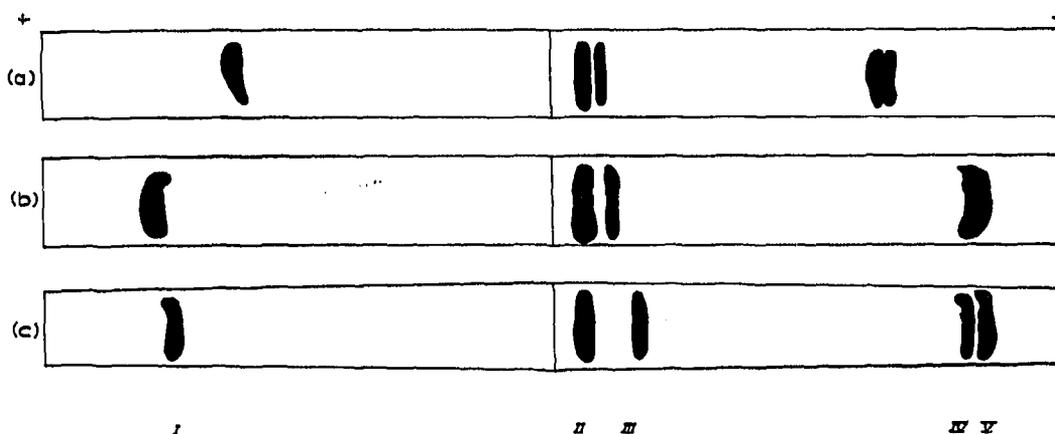
In Fig. 7 ist die Trennung eines Aminosäuregemisches im geradlinigen Gradienten gezeigt. Die Zonen sind mit Ninhydrin angefärbt<sup>6</sup>. Bei pH 1.64 des Grundelektrolyten wandern die Aminosäuren als Kationen. Die Trennung im Temperatur-



Start

I II III IV V

Fig. 7. Trennung eines Aminosäuregemisches bei pH = 1.64. (a) Bei 0°, (b) bei 10° und (c) im geradlinigen Temperaturgradienten. Spannung, 4000 V; Stromstärke, 8–15 mA; Grundelektrolyt, 2.5 M CH<sub>3</sub>COOH–1.0 M HCOOH; Trenndauer, 40 min; Gradient in (c), 0.75°/cm; Kantenlängenverhältnis, 5 cm:3 cm. I = Valin; II = α-Alanin; III = Glycin; IV = Arginin; V = β-Alanin.



Start

Fig. 8. Trennung eines Aminosäuregemisches bei pH = 5.2. (a) Bei 0°, (b) bei 10° und (c) im V-förmigen Temperaturgradienten. Spannung, 4000 V; Stromstärke, 20–25 mA; Grundelektrolyt, 0.2 M CH<sub>3</sub>COOH–0.25 M C<sub>3</sub>H<sub>3</sub>N; Trenndauer, 45 min; gradient in (c), 0.75°/cm; Streifenbreite, 4 cm am Start und 3 cm an den Enden. I = Asparaginsäure; II = Serin, Valin; III = β-Alanin; IV = Arginin; V = Histidin.

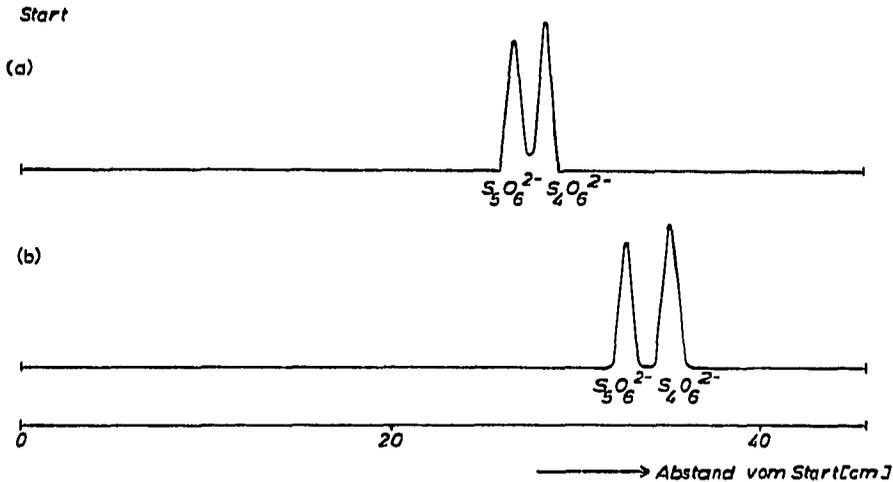


Fig. 9. Aktivitätsverteilungskurven eines getrennten Gemisches aus  $^{35}S_4O_6^{2-}$  und  $^{35}S_5O_6^{2-}$ . (a) Bei  $0^\circ$  und (b) im geradlinigen Temperaturgradienten. Spannung, 3000 V; Stromstärke, 15 mA; Grundelektrolyt, 0.3 M  $CH_3COONa$ -0.1 M  $CH_3COOH$ ; Trenndauer, 60 min; Gradient in (b),  $0.75^\circ/cm$ ; Kantenlängenverhältnis, 5 cm:3 cm.

gradienten (Beispiel unten) ist deutlich besser als die bei  $0^\circ$  (Beispiel oben). Bei der konstanten Temperatur von  $10^\circ$  (Beispiel Mitte) wandern die Aminosäuren zwar weiter als im Gradienten, die Abstände zwischen den Zonen sind jedoch kleiner und infolge Zonenverbreiterung ist Arginin von  $\beta$ -Alanin nicht sauber getrennt.

In Fig. 8 ist die Trennung eines Aminosäuregemisches im V-förmigen Gradienten dokumentiert. Asparaginsäure liegt bei dem eingestellten pH von 5.6 als Anion vor.

Auch in diesem Beispiel ist die Trennung im Temperaturgradienten eindeutig am besten.

Die Trennung eines Gemisches von  $^{35}S_4O_6^{2-}$  und  $^{35}S_5O_6^{2-}$  ist anhand der Aktivitätsverteilungskurven in Fig. 9 gezeigt.

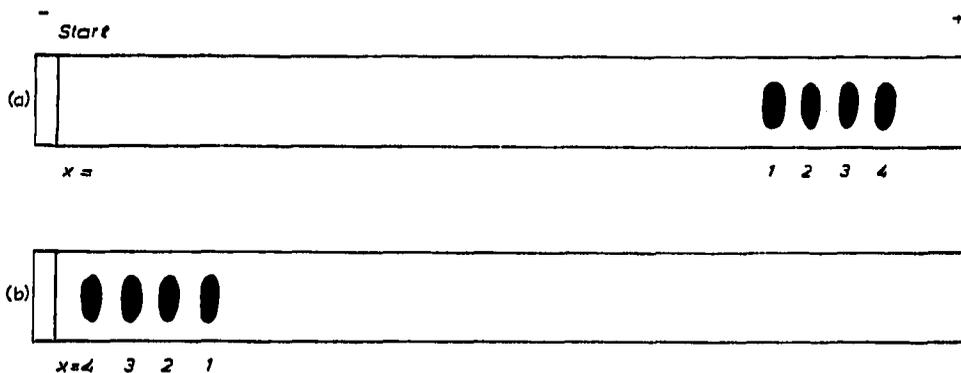


Fig. 10. Trennung von  $[Cr(CN)_x(NCS)_{6-x}]^{3-}$  ( $x = 1-4$ ). Spannung, 3000 V; Stromstärke bei (a) 25 mA und bei (b) 7 mA; Grundelektrolyt bei (a) 0.2 M  $CH_3COONa$ -0.1 M  $CH_3COOH$ -Wasser und bei (b) 1 M  $NaSCN$ - $CH_3CN$ . Trenndauer bei (a) 50 min und bei (b) 15 min; Temperatur,  $-2^\circ$ .

Die Verbesserung der Trenngüte im Temperaturgradienten gegenüber der bei konstanter Temperatur von 0° lässt sich quantitativ angeben<sup>7</sup>

$$R_s = \frac{z_1 - z_2}{2(\sigma_1 + \sigma_2)}$$

wobei

$R_s$  = Auflösung, Mass für die Trenngüte

$z_1$  = Abstand der Zonenmitte vom Start

$\sigma_1$  = halbe Bandenbreite bei 60.7% der Bandenhöhe.

Als Mittelwerte aus vier Versuchsergebnissen ergibt sich eine Auflösung von 1.4 bei 0° Trenntemperatur und 1.8 im Temperaturgradienten. Dies entspricht einer Verbesserung der Trenngüte von 28.6%.

#### VERWENDUNG EINES NICHTWÄSSRIGEN GRUNDELEKTROLYTEN

Nichtwässrige Grundelektrolyte lösen in vielen Fällen das PVC der Elektrodentröge und/oder die Plastikfolie zwischen Aluminiumkühlplatte und den Ionophoresestreifen. Daher werden Glasröge und PTFE-Folien eingesetzt.

Fig. 10 zeigt am Beispiel der Trennung gemischter Cyanothiocyanatochromate (III), dass die Verwendung eines nichtwässrigen Grundelektrolyten zu einer wesentlichen Verkürzung der Trennzeit bei gleichbleibender Trenngüte führt. Die Zonen sind an ihrer Eigenfarbe<sup>3</sup> erkennbar.

#### DANK

Die Untersuchungen wurden im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 52 "Analytik" durchgeführt.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Es wird eine neue Trennkammer für die Ionophorese im Temperaturgradienten mit Peltierkühlung entwickelt. Wie anhand von Beispielen gezeigt wird, sind die Trennungen im Temperaturgradienten besser als bei konstanter Temperatur. Speziell bei Polythionaten beträgt der Unterschied in der Trenngüte rund 30%. Auch auf die Verwendung nichtwässriger Grundelektrolyte wird eingegangen.

#### LITERATUR

- 1 W. Preetz, *Fortschr. Chem. Forsch.*, 11 (1969) 375.
- 2 E. Blasius und H. Wagner, *Chem. Z.*, 98 (1974) 154.
- 3 E. Blasius und H. Augustin, *Z. Anorg. Allg. Chem.*, im Druck.
- 4 E. Blasius und H. Augustin, *J. Chromatogr.*, 73 (1972) 298.
- 5 E. Blasius, A. Knöchel, N. Spannhake und H. Wagner, *J. Chromatogr.*, 70 (1972) 109.
- 6 S. Blackburne, *Methods Biochem. Anal.*, 13 (1965) 1.
- 7 F. Geiss, *Die Parameter der Dünnschichtchromatographie*, Vieweg, Braunschweig, 1972.