

CHROM. 8551

EINE MODIFIZIERTE TRENNAPPARATUR ZUR TRÄGERFREIEN DURCHFLOSSIONOPHOSE

H. WAGNER, D. NEUPERT und K. SCHLICK

Fachrichtung Anorganische Analytik und Radiochemie der Universität des Saarlandes, 6600 Saarbrücken (B.R.D.)

(Eingegangen am 27. Juni 1975)

SUMMARY

A modified apparatus for carrier-free continuous ionophoresis

A simply constructed separation apparatus for carrier-free continuous ionophoresis is described. The main parts of the apparatus are made of Plexiglas (Perspex) and are exchangeable. The separation surface can thus easily be renewed after work with radioactive or biological material. The liquid layer thickness can be chosen within wide limits. The capabilities of the apparatus are shown with the help of two separation examples.

EINLEITUNG

In der Literatur sind verschiedene Apparaturen zur trägerfreien Durchflussionophorese beschrieben¹⁻⁵, die fast alle auf dem zuerst von Barrolier *et al.*⁶ angegebenen Prinzip beruhen. Die Voraussetzung für erfolgreiche Trennungen in einem trägerfreien Medium ist die Konstanzhaltung aller Parameter innerhalb der Trennapparatur. Dies führt letztlich zu einem erheblichen apparativen Aufwand. Eine im Handel erhältliche Apparatur, Elphor VaP-5 (Bender & Hobein, München, B.R.D.), hat sich bewährt und wird vor allem zur Lösung medizinischer und biochemischer Trennprobleme herangezogen.

Bei der hier beschriebenen Apparatur wird auf komplizierte Regel- und Steuervorrichtungen verzichtet und grosser Wert auf eine leichte Austauschbarkeit einzelner Bauteile gelegt, so dass nach Arbeiten mit radioaktivem oder biologischem Material die Trennfläche schnell und einfach erneuert werden kann. Ihr Einsatz beschränkt sich nicht nur auf die Durchführung von Durchflussionophoresen. Es können auch Trennungen im pH-Gradienten, Isotachophoresen und Komplexfokussierungen durchgeführt werden.

CHEMIKALIEN UND GERÄTE

Die Aminosäuren sind p.a. Substanzen, bezogen von Merck (Darmstadt,

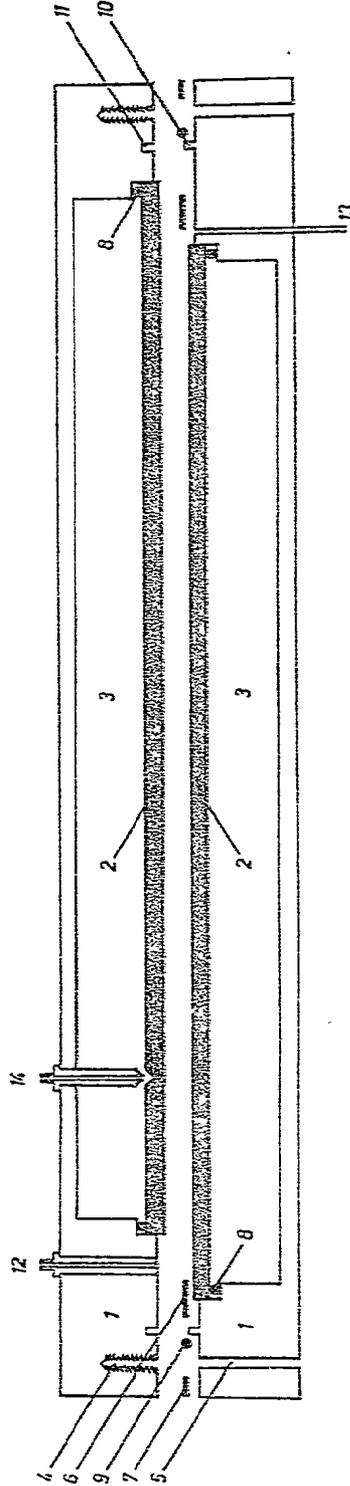


Fig. 1. Schematischer Längsschnitt durch die Trennapparatur. 1 = Plexiglasrahmen, 2 = Kühlraum, 3 = Kühlraum, 4 = Gewindelöcher für Steckschrauben, 5 = Bohrungen für Steckschrauben, 6 = Abstandshalter, 7 = Abstandshalter, 8 = Gummiring, 9 = Gummiring, 10 = Haltezapfen, 11 = Bohrungen für Haltezapfen, 12 = Zuluftstülpe für Grundelektrolyt, 13 = Abflussstülpe für Analysenlösung, 14 = Abflussstülpe für Analysenlösung.

B.R.D.), Fluka (Buchs, Schweiz) und Schuchardt (München, B.R.D.). Sonstige p.a. Substanzen stammen von Merck.

Als Hochspannungsgerät dient ein hochstabilisiertes Netzgerät von Knott (München, B.R.D.). Die Kühlung erfolgt mit einem Ultra-Kryomat K 40 DW der Messgeräte-Werke Lauda (Lauda, B.R.D.). Die photometrische Auswertung wird mit dem Spektralphotometer PM2D von Zeiss (Oberkochen, B.R.D.) vorgenommen.

TRENAPPARATUR

Die Trenapparatur besteht aus zwei rechteckigen Kristallglasplatten, die parallel in bestimmtem Abstand übereinander angeordnet sind und so den eigentlichen Trennraum bilden. Die Abmessungen der oberen Glasplatte betragen $320 \times 210 \times 4$ mm und die der unteren $320 \times 250 \times 4$ mm. Die gesamte Kammer ist 40 cm lang und 29 cm breit. Da die beiden Glasplatten gegeneinander versetzt sind, ist eine ausreichende Kühlung an den Zuflussstellen (12, Fig. 1) im Bereich der Abflussschläuche (13, Fig. 1) und an den Membranen (16, Fig. 2) gewährleistet.

Fig. 1 zeigt den schematischen Längsschnitt durch die Trenapparatur. In zwei 25 mm dicke Plexiglasrahmen (1) ist je eine Glasplatte (2) eingelegt. Sie schliessen nach dem Zusammenbau der Apparatur bündig mit dem Plexiglasrahmen ab. Dabei werden die Gummiringe (8) leicht zusammengespreßt und dichten so den Trennspalt gegen den Kühlraum (3) ab. Die beiden Rahmen werden durch 16 Steckschrauben zusammengehalten, die gleichmässig am Rand verteilt sind. Ein konstanter Abstand von 0.4 mm zwischen den beiden Platten wird durch PVC-Abstandstreifen (6, 7) am Rand sowie kleinen PVC-Plättchen (2×1 mm) im Trennspalt selbst, gewährleistet. Man vermeidet dadurch auch weitgehend eine Verformung des Trennspaltes, die durch einen leichten Überdruck im Kühlkreislauf auftreten kann. Die PVC-Plättchen beeinträchtigen die Trennung nicht. Die Abdichtung des Trennspaltes geschieht durch einen Gummiring (9), der an den vier Ecken durch im Plexiglasrahmen der Unterplatte eingelassene Zapfen (10) gehalten und beim Zusammenschrauben der Platten bis auf die Dicke der Abstandhalter zusammengespreßt wird. Die Haltezapfen in der Unterplatte und die dazugehörigen Aussparungen (11) in der Oberplatte verhindern auch ein Verschieben der beiden Platten gegeneinander.

Der Grundelektrolyt gelangt über neun Zuflussstüben (12), die in den Plexiglasrahmen der Oberplatte eingelassen sind, in breiter Front in den Trennspalt. Auf der gegenüberliegenden Seite befinden sich als Abflüsse 118 Polyäthylenschläuche (13), die in einem 3 mm dicken und 210 mm langen Spalt nebeneinander eingesetzt sind. Sie werden durch einen schmalen Keil festgeklemmt und nach aussen mit "UHU-plus" und nach innen mit Siliconkautschuk abgedichtet. Am Ende der ungefähr 45 cm langen Polyäthylenschläuche sind Kapillaren angebracht. Sie stecken in einer Plexiglasplatte, die auf dem Reagenzglasgestell aufliegt und durch Justieren in die Waagrechte ein gleiches Ablaufniveau gewährleistet. Der Zufluss der Analysenlösung erfolgt über eine der beiden PVC-Tüllen (14), die 40 mm von den Grundelektrolytzufüssen entfernt in die obere Kristallglasplatte eingelassen sind. Dieser Abstand bewirkt eine ausreichende Vorkühlung des Grundelektrolyten und damit im Bereich der Analysenzufuhr eine gleichförmige und laminare Strömung. Die beiden Zuflussstellen lassen eine Ausnutzung der gesamten Kammerbreite unter verschiedenen Bedingungen zu.

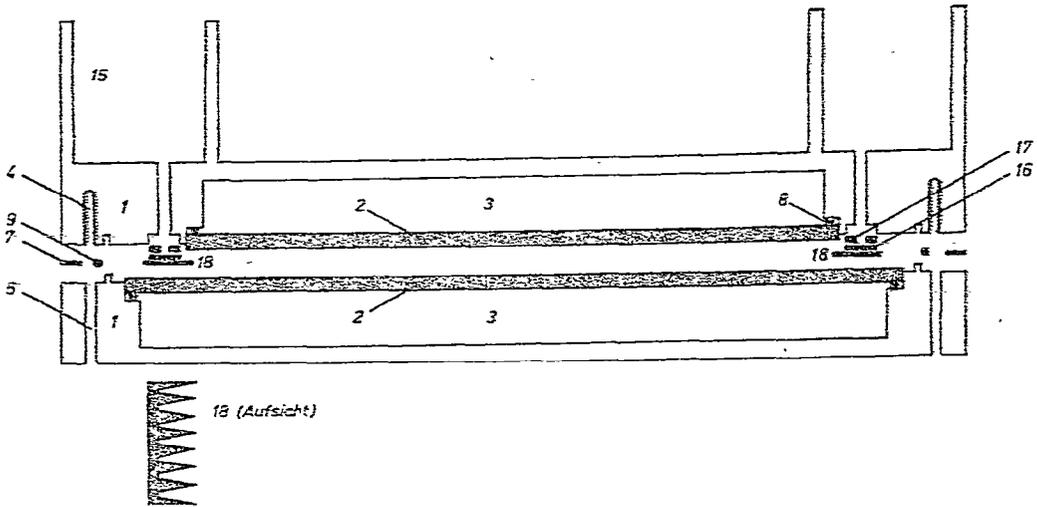


Fig. 2. Schematischer Querschnitt durch die Trennapparatur. 1 = Plexiglasrahmen, 2 = Kristallglasplatte, 3 = Kühlraum, 4 = Gewindelöcher für Steckschrauben, 5 = Bohrungen für Steckschrauben, 7 = Abstandshalter, 8 = Gummiring, 9 = Gummiring, 15 = Elektrodenrog, 16 = Austauschermembran, 17 = Dichtung, 18 = Abstandshalter.

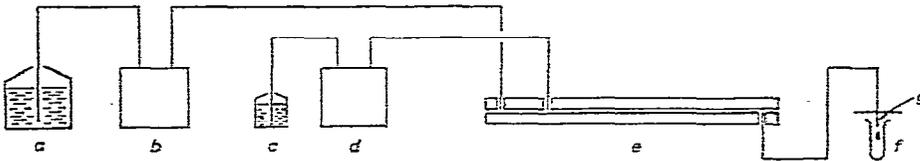


Fig. 3. Schematisches Blockschaltbild. a = Vorratsgefäß für Grundelektrolyt, b = Schlauchpumpe, c = Analysenlösung, d = Dosierpumpe für Analysenlösung, e = Trennapparatur, f = Auffanggefäß, g = Kapillare.

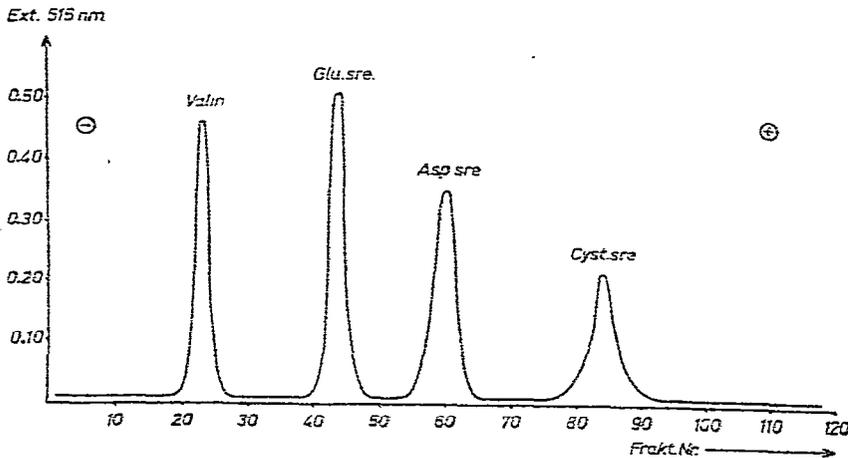


Fig. 4. Trennung eines Aminosäuregemisches. Spannung, 2500 V; Stromstärke, 100 mA; Grundelektrolyt, Essigsäure-Pyridin (pH 5.2); Grundelektrolytdurchsatz, 180 ml/h; Trenndauer, 2 h; Kühlisotemperatur, -2° .

Fig. 2 zeigt den schematischen Querschnitt der Trennapparatur. Auf die beiden Längsseiten der Oberplatte sind Tröge (15) ($350 \times 35 \times 50$ mm) aufgesetzt, die zur Aufnahme der Elektroden (Pt-Draht, Durchmesser 0.4 mm) und des Trogelektrolyten dienen. Der kammförmige Abstandsstreifen (18) hat die Aufgabe, die Membran (16) zusammen mit der Dichtung (17) auf die Auflagefläche in der Aussparung des Spaltes anzupressen und gleichzeitig eine möglichst grosse Kontaktfläche zum Grundelektrolytfilm freizuhalten. Der Kühlsolestrom wird durch schmale Plexiglasstege mehrfach umgekehrt. Hierdurch wird ein gleichmässiges Abführen der Jouleschen Wärme über die gesamte Fläche der Glasplatten erreicht.

Die Durchflussgeschwindigkeit des Grundelektrolyten, die neben der angelegten Spannung die Trennschärfe beeinflusst, wird mit einer Schlauchpumpe gesteuert, deren Förderleistung stufenlos regulierbar ist. Das schematische Blockschaltbild der Versuchsanordnung gibt Fig. 3 wieder. Die Analysenlösung wird mit einer Dosierpumpe zugeführt.

TRENNUNG EINES AMINOSÄUREGEMISCHES

Fig. 4 zeigt die Trennung eines Aminosäuregemisches im Pyridin-Essigsäure-Grundelektrolyten von pH 5.2. Auf der Ordinate ist die Extinktion der durch die Ninhydrinreaktion erhaltenen Färbung, auf der Abszisse die Fraktions-Nummer aufgetragen.

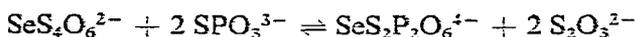
Valin ist ungeladen. Die übrigen drei sauren Aminosäuren werden zur Anode hin abgelenkt.

ABTRENNUNG DES $\text{SeS}_2\text{P}_2\text{O}_6^{4-}$ AUS DEM REAKTIONSGEMISCH $\text{SeS}_4\text{O}_6^{2-}$ - SPO_3^{3-}

In einer Anzahl von Arbeiten finden Blasius und Mitarbeiter⁸⁻¹⁰ mit Hilfe der Radiohochspannung-ionophorese neue Verbindungen und auch Verbindungsklassen, z.B. Seleno- und Telluropolythionate sowie Selenan-sulfan-phosphonate und Telluran-sulfan-phosphonate. Eingesetzt werden entsprechend radioaktiv-markierte Ausgangsprodukte. In verschiedenen Fällen wird durch Doppelmarkierung auch das Verhältnis einzelner Elemente in den Zonen der Pherogramme ermittelt. Die Mengen der getrennten Verbindungen bei der Radiohochspannung-ionophorese liegen im μg -Bereich. Demgegenüber gelingt mit der beschriebenen Apparatur die präparative Abtrennung z.B. von $\text{SeS}_2\text{P}_2\text{O}_6^{4-}$ aus dem Reaktionsgemisch von $\text{SeS}_4\text{O}_6^{2-}$ mit SPO_3^{3-} .

Als Grundelektrolyt dient 0.02 M HCl-0.1 M Glykokoll-Lösung (pH 3). Die angelegte Spannung beträgt 2300 V bei einer Stromstärke von 190 mA. Die neutrale Reaktionslösung wird direkt in den Trennspace zu der Grundelektrolytlösung gegeben. Infolge der relativ kurzen Verweilzeit von maximal 10 min und der intensiven Kühlung tritt keine Selenabscheidung auf. Die klar abtropfende Lösung wird in gekühlten Reagenzglasern aufgefangen.

Die Umsetzung von $\text{SeS}_4\text{O}_6^{2-}$ mit SPO_3^{3-} zu $\text{SeS}_2\text{P}_2\text{O}_6^{4-}$ verläuft nach:



Da SPO_3^{3-} im Unterschuss eingesetzt wird, liegen im Reaktionsgemisch nur noch die

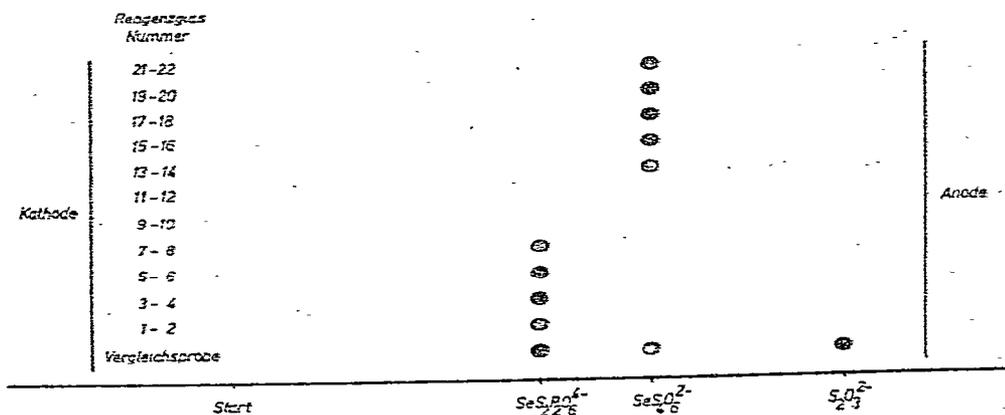


Fig. 5. Papierionophoretische Kontrolle der Abtrennung des $\text{SeS}_2\text{P}_2\text{O}_6^{4-}$. Grundelektrolyt, pH 3; Trennzeit, 2 h; Spannung, 3500 V; Stromstärke 80 mA; Temperatur, 0°; aufgetragene Menge, 5 μl 0,02 M Reaktionslösung, je 10 μl aufgefangene Lösung; Sprühreagenz, AgNO_3 -Lösung.

anderen drei Komponenten vor. Nach der Trennung ist in 18 Auffanggläsern sulfidischer Schwefel enthalten. Thiosulfat ist in den Auffanggläsern nicht nachzuweisen, da es infolge seiner hohen Wanderungsgeschwindigkeit durch die Austauschermembran in den Elektrodentrog wandert. Eine Überlappung der beiden Zonen tritt nicht auf. Acht Reagenzgläser enthalten nur $\text{SeS}_2\text{P}_2\text{O}_6^{4-}$, weitere zehn lediglich $\text{SeS}_4\text{O}_6^{2-}$. Dazwischen liegt eine Leerzone.

Die hochspannungsiophoretische Reinheitskontrolle zeigt Fig. 5. Zum Vergleich dient die Reaktionslösung. $\text{SeS}_2\text{P}_2\text{O}_6^{4-}$ wird als Benzidinsalz gefällt. Die Elementaranalyse stimmt mit den berechneten Werten überein.

DANK

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

ZUSAMMENFASSUNG

Es wird eine konstruktiv einfache Trennapparatur zur trägerfreien Durchflussionophorese beschrieben. Die wesentlichen Bauteile der Apparatur sind aus Plexiglas gefertigt und auswechselbar. Somit kann die Trennfläche nach Arbeiten mit radioaktivem oder biologischem Material leicht erneuert werden. Die Trennspaltdicke ist in weiten Grenzen frei wählbar. Die Leistungsfähigkeit der Apparatur wird an zwei Trennbeispielen demonstriert.

LITERATUR

- 1 K. Hanig, *Z. Anal. Chem.*, 181 (1961) 244.
- 2 K. Hanig, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 338 (1964) 211.
- 3 W. Preetz und H. L. Pfeiffer, *Talanta*, 16 (1969) 1444.

- 4 K. Wiek, *J. Chromatogr.*, 13 (1964) 111.
- 5 N. Seiler, J. Thobe und G. Werner, *Z. Anal. Chem.*, 252 (1970) 179.
- 6 J. Barrolier, E. Watzke und H. Gibian, *Z. Naturforsch. B*, 13 (1958) 754.
- 7 S. Blackburn, *Methods Biochem. Anal.*, 13 (1965) 1.
- 8 E. Blasius und A. Knöchel, *J. Radioanal. Chem.*, 13 (1973) 363, 373 und 381.
- 9 E. Blasius und A. Knöchel, *J. Radioanal. Chem.*, 14 (1973) 335.
- 10 E. Blasius und N. Spannhake, *Z. Anorg. Allg. Chem.*, 399 (1973) 315 und 321.