

ZONENELEKTROPHORESE
IN ÄTHANOLISCHEN PUFFERLÖSUNGEN

JERKER PORATH UND KLAUS STÖRIKO

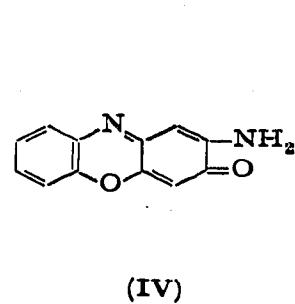
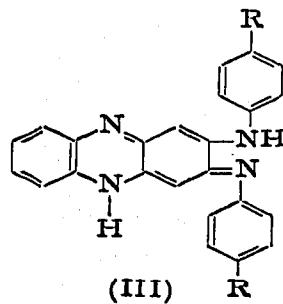
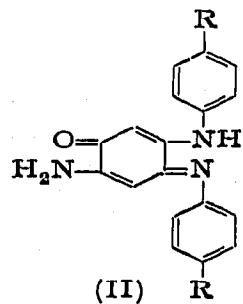
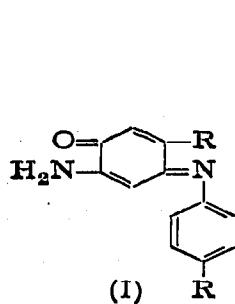
Biochemisches Institut der Universität Uppsala (Schweden)

(Eingegangen den 4. Juli 1961)

In den letzten Jahren wurde der Anwendungsbereich der Zonenelektrophorese in Säulen durch Einführung neuer Trägersubstanzen und durch Verbesserung der Apparaturen stark erweitert. Wenig Aufmerksamkeit wurde indessen der Verwendung nicht-wässriger Lösungsmittel für die Elektrolytlösungen geschenkt, die in mancher Hinsicht Vorteile gegenüber der Elektrophorese in wässrigen Lösungen erwarten lässt (Fraktionierung wasser-unlöslicher Substanzen, geringere Adsorptionseffekte, Anwendung hoher Spannungen)¹. PAUL UND DURRUM² gelang es, Farbstoffgemische durch Papierelektrophorese in organischen Lösungsmitteln zu trennen; eine Fraktionierung von Sterinen liess sich in dieser Weise nicht erreichen. Günstige Ergebnisse erzielte HASHIMOTO³ bei der papierelektrophoretischen Trennung von Triterpenyl-bisulfaten in der papierchromatographisch vielfach bewährten Partridge-Mischung. MAKI⁴ stellte verschiedene Wanderungsgeschwindigkeiten von zweiwertigen Metallkationen bei der Papierelektrophorese in nicht-wässrigen Elektrolytlösungen fest.

Erste Versuche zur Säulenelektrophorese in organischen Lösungsmitteln wurden mit Glasperlen als Trägermaterial in äthanolischer Salsäure unternommen⁵; verschiedene Oxydationsprodukte des Anilins konnten voneinander getrennt werden. Die Einführung des inzwischen gut bewährten Pevikons als Stabilisator^{6,7} und die Entwicklung einer weitgehend kontinuierlich arbeitenden Apparatur⁸ legten die Fortführung dieser Versuche nahe.

Als Modellsubstanzen wurden mehrkernige aromatische und heterocyclische chinoide Farbstoffe (I-IV) verwendet, die sich durch Oxydation von Anilin und seinen Homologen darstellen lassen^{9,10}.



a: R = H b: R = CH₃ c: R = Cl

Elektrolytlösungen verschiedener Acidität in 90% Äthanol dienten als Lösungsmittel. Es erwies sich als notwendig, zur Verhinderung unerwünschter Verdunstung weitgehend geschlossene Gefäße zu verwenden.

Die Trennung von Farbstoff-Gemischen konnte in der Pevikon-stabilisierten Elektrophorese-Säule mit dem blosen Auge gut verfolgt werden. Am unteren Ende der Säule wurden die einzelnen Zonen durch Gegenstrom-Eluierung kontinuierlich ausgespült und fraktioniert aufgefangen. Die Extinktionswerte der einzelnen Fraktionen wurden bei verschiedenen Wellenlängen gemessen.

Die Versuchsergebnisse zeigen, dass unter den angewendeten Bedingungen eine wirkungsvolle Fraktionierung gelingt; durch aufeinanderfolgende Elektrophorese in Lösungen verschiedener Acidität lässt sich die Trennwirkung vergrössern. Störende Adsorptionseffekte konnten nicht beobachtet werden.

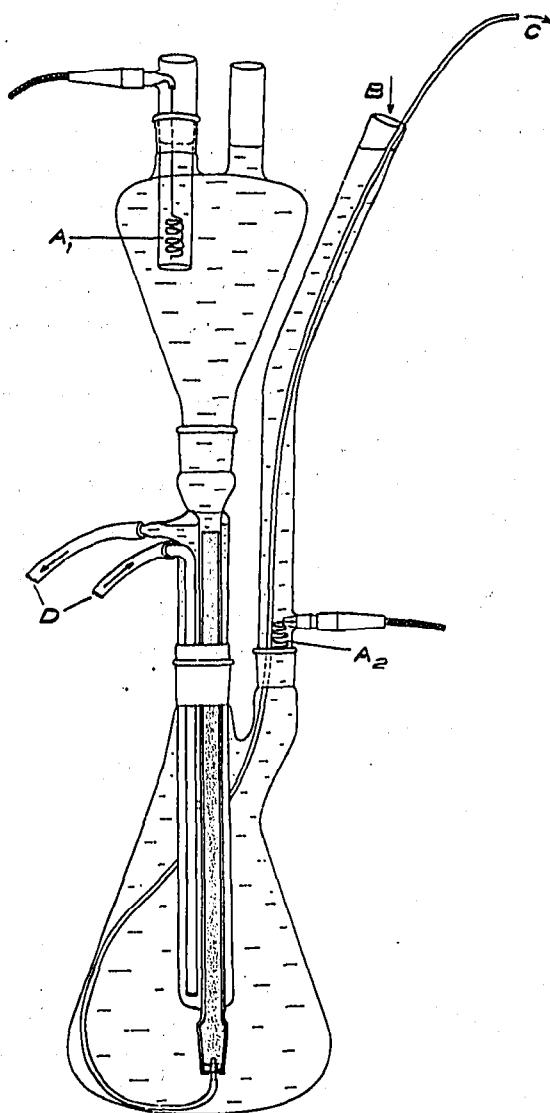


Fig. 1. Elektrophorese-Apparatur. A₁ und A₂, Elektroden; B, Zuführung von Elektrolytlösung zum Niveau-Ausgleich; C, Abführung über peristaltische Pumpe zum Fraktionssammler; D, Kühlwasser.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Apparatur

In Fig. 1 ist die verwendete Apparatur skizziert. Die Dichtung der Normalschliffe (N.S.B. 24 und 34) erfolgt durch Teflon-Manschetten ("P.T.F.E. Sleeves", Fisons Chemicals Co. Ltd., London W. 1, England). Am unteren Ende ist die wassergekühlte (*ca.* 10°) Elektrophorese-Säule (Länge 40 cm, Durchmesser 1.0 cm) mit einer porösen Platte aus Vyon I (Porous Plastic Ltd., Dagenham Docks, Essex, England) verschlossen; sie trägt den Ableitungsschlauch, der zur Regulierung des Elutionsstroms (C) durch eine peristaltische Pumpe geleitet wird. Polyäthylen-Schläuche erwiesen sich gegenüber den angewendeten Lösungen als genügend widerstandsfähig.

Äthanol-gewaschenes Pevikon C 870* wurde in der zu verwendenden Elektrolytlösung suspendiert und in die Säule gefüllt. Gleichmässige Packung kontrolliert man durch einen Filtrierversuch mit einer Farbstofflösung.

Elektrolyt-Lösungen

Tabelle I enthält eine Zusammenstellung der zur Elektrophorese benutzten Lösungen ihrer spezifischen Leitfähigkeit und ihres pH-Werts. Um genügend grosse Leitfähigkeiten zu erhalten, mussten starke Elektrolyte gewählt werden. Die pH-Werte

TABELLE I
ELEKTROLYT-LÖSUNGEN IN 90 % ÄTHANOL

Elektrolyt-Lösung	κ bei 20° ($\Omega^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)	pH-Wert in		E (mV) in	
		90 % EtOH	H ₂ O	90 % EtOH	H ₂ O
- 0.05 M Kaliumbiphtalat	—	—	4.00	—	— 141
a 0.1 N Schwefelsäure	1.3 · 10 ⁻³	1.27	1.27	— 300	— 300
b 0.1 M Pyridiniumtrichloracetat	0.8 · 10 ⁻³	3.56	3.04	— 166	— 196
c 0.2 M Piperidin + 0.1 M Eisessig	1.0 · 10 ⁻³	10.0	11.3	+ 210	+ 280
d 0.1 N Natriumhydroxyd	1.7 · 10 ⁻³	13.8	12.9	+ 430	+ 380

wurden mit einem "pH Meter 22" (Radiometer Kopenhagen, Dänemark) gemessen; sie stellen unkorrigierte Messgrössen dar, die nur mit Vorbehalt zur Betrachtung der tatsächlichen Verhältnisse in den äthanolischen Lösungen herangezogen werden dürfen¹¹. Zum Vergleich sind die für wässrige Lösungen gleicher Molarität gemessenen pH-Werte und die dazugehörigen Potentiale mit aufgeführt.

Durchführung der Elektrophoresen

A₁ ist bei Verwendung von Elektrolytlösung a und b Anode, von c und d Kathode. Lösungen von je *ca.* 0.1 mg Farbstoff in je 0.025 ccm 90 % Äthanol (IV in a!) wurden gemischt, auf das obere Ende der Pevikon-Füllung aufgetragen und *ca.* 1 cm einsinken gelassen. Bei Anlegen der Spannung (500–800 V) liess sich Zonenverschärfung¹² gut beobachten. Sobald sich die am schnellsten wandernde Zone dem unteren Ende

* Pevikon ist ein granuliertes Vinylchlorid-Vinylacetat Copolymerisat, erhältlich bei Superf osfatbolaget, Stockholm, Schweden.

der Säule näherte, wurden die Wanderungsgeschwindigkeiten d/t (cm/sec) der einzelnen Zonen bestimmt und der hydrodynamische Eluierungsstrom in Gang gesetzt. Das Eluat wurde in Fraktionen von ca. 1 ccm pro 30 bzw. 60 Minuten aufgefangen. Zur Identifizierung der Farbstoffe dienten ihre Absorptionsspektren im sichtbaren Bereich¹³⁻¹⁵, zur Bestimmung ihrer Konzentration Extinktionsmessungen bei den Wellenlängen maximaler Absorption (Beckman-Spektrophotometer B).

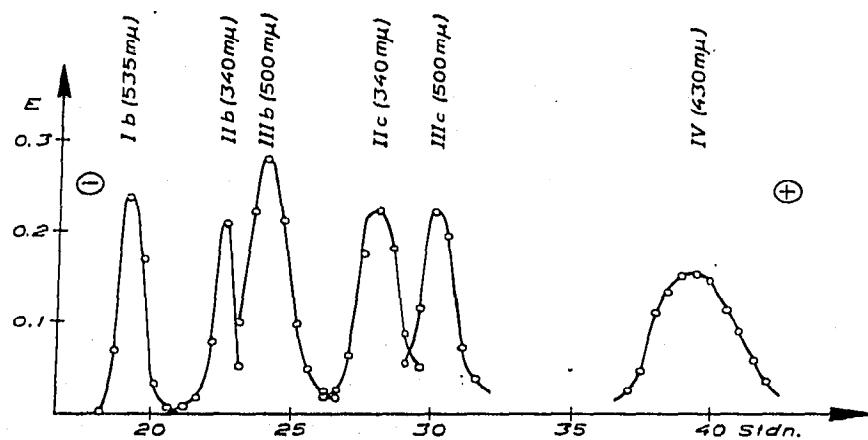


Fig. 2. Elektropherogramm einer Mischung von I b, II b, II c, III b, III c und IV in 0.1 N Schwefelsäure-90 % Äthanol; 600 V; 4.9 mA.

Beispiele

Zunächst wurden die Wanderungsgeschwindigkeiten und die elektrophoretischen Beweglichkeiten der einzelnen Farbstoffe festgestellt; sie sind in Tabelle II aufgenommen. Die Basizität der Lösung c reichte zur Protopolyse der Farbstoffe nicht aus;

TABELLE II

ELEKTROPHORETISCHE DATEN

Wanderungsgeschwindigkeit d/t (cm/sec); elektrophoretische Beweglichkeit

$$u = \frac{d}{t} \cdot \frac{q \cdot \kappa^*}{i} \left(\frac{\text{cm}}{\text{sec}} \cdot \frac{\text{cm}}{\text{A} \cdot \Omega} \right)$$

Elektrolyt-Lösung	a		b		c		d	
	U (angelegte Spannung)	600 V	U (angelegte Spannung)	600 V	U (angelegte Spannung)	700 V	U (angelegte Spannung)	500 V
i (Stromstärke)	4.9 mA		4.6 mA		4.6 mA		4.4 mA	
	$d/t \times 10^4$	$u \times 10^8$						
Substanz I b	+ 5.5	+ 4.6	+ 5.3	+ 2.9				
Substanz II a	+ 4.7	+ 3.9	+ 2.4	+ 1.3				
Substanz II b	+ 4.7	+ 3.9	+ 3.1	+ 1.7				
Substanz II c	+ 3.9	+ 3.25	+ 1.4	+ 0.75				
Substanz III a	+ 4.4	+ 3.7	+ 3.0	+ 1.6				
Substanz III b	+ 4.4	+ 3.7	+ 3.1	+ 1.7				
Substanz III c	+ 3.6	+ 3.0	+ 1.4	+ 0.75				
Substanz IV	+ 2.6	+ 2.2	{ + 1.1	+ 0.6	{ < ± 0.4		-	-
			{ + 1.4	+ 0.75				

* Den Querschnitt q findet man durch Multiplikation des Säulenquerschnittes mit einem Korrekturfaktor¹⁶ (0.4) für die Pevikon-Füllung.

die Wanderungsgeschwindigkeiten waren sehr gering. In Lösung d. konnte eine scharfe Trennung erzielt werden; jedoch machten sich Oxydationsreaktionen an der Anode und Veränderungen der Pevikon-Füllung unter dem Einfluss der stark alkalischen Lösung sehr störend bemerkbar.

In den Figuren 2 bis 4 sind einige Fraktionierungen dargestellt.

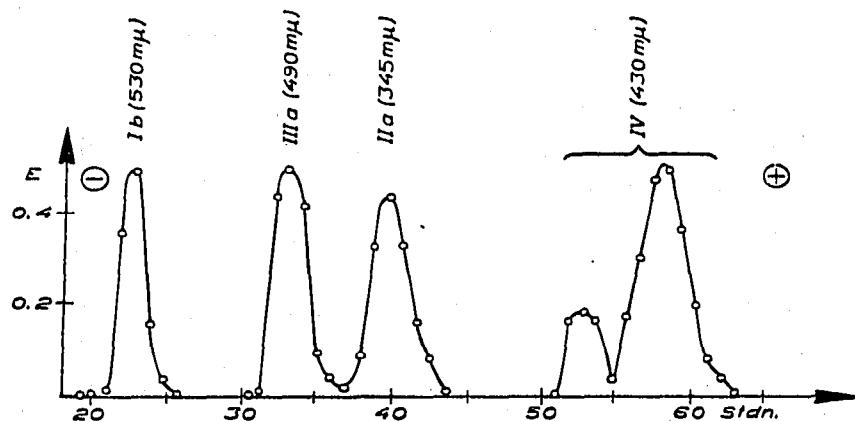


Fig. 3. Elektropherogramm einer Mischung von I b, II a, III a und IV in 0.1 M Pyridiniumtrichloracetat-90 % Äthanol; 600 V; 4.6 mA.

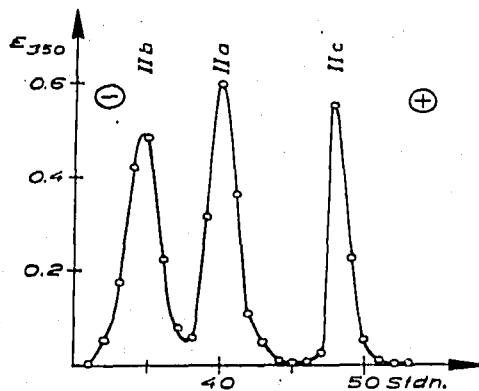


Fig. 4. Elektropherogramm einer Mischung der Homologen II a, b und c in 0.1 M Pyridiniumtrichloracetat-90 % Äthanol; 600 V; 4.5 mA.

DISKUSSION

Bei den vorliegenden Versuchen handelt es sich um Arbeiten orientierenden Charakters; es wurde kein Wert darauf gelegt, experimentelle Unterlagen für eine Umrechnung der gemessenen linearen Wanderungsgeschwindigkeiten in theoretisch exakte elektrophoretische Beweglichkeiten zu schaffen. Elektroosmotische Effekte wurden nicht berücksichtigt. Tatsächlich kann der Einfluss der Elektroosmose als sehr gering betrachtet werden; das Pevikon enthält nämlich keine basischen Gruppen, und die wenigen Carboxyl-Gruppen, die sich u.U. auf der Teilchenoberfläche befinden können, sind sicher im sauren Elektrolytmedium fast völlig ungeladen. Elektroosmose kann höchstens an der Wand des Glasrohres auftreten. Die Verbreiterung der Zonen ist jedoch recht gering und nicht grösser, als sie etwa infolge molekularer und konvektiver Diffusion zu erwarten ist.

Messungen relativer Wanderungsgeschwindigkeiten oder absoluter Beweglichkeiten sollten wertvolle Aussagen über die relative Acidität oder Basizität von ionischen oder ionoiden Gruppen ermöglichen. Dies lässt sich an Hand des Versuchs mit den Homologen II verdeutlichen (Fig. 4). Infolge der durch die *para*-ständigen Methyl-Gruppen an den Stickstoffatomen erhöhten Elektronendichte ist die Basizität von II b grösser als bei der unsubstituierten Verbindung II a; daher wandert II b in schwach saurem Medium schneller als II a (Tabelle II; Fig. 4). Umgekehrt erniedrigen die *para*-ständigen Chloratome in II c die Elektronendichte und schwächen damit den Basencharakter gegenüber II a, weshalb II c langsamer wandert. In

stärker saurem Milieu verringern sich die Basizitätsunterschiede; infolgedessen gleichen sich die Beweglichkeiten teilweise einander an (Tabelle II).

Die Elektronendichte an den Stickstoffatomen hängt nicht nur von dem durch die *para*-ständigen Substituenten verursachten induktiven Effekt ab, sondern auch von den Mesomerieverhältnissen. Durch die Phenazin-Gerüste in III wird die Anzahl der mesomeren Strukturen gegenüber II erhöht. Offenbar führt dieser Umstand zu einer Schwächung des Einflusses der Methyl-Gruppen, so dass III a und III b im sauren Medium praktisch gleiche Beweglichkeit besitzen (Tabelle II).

Wesentlich ist, dass der Sauerstoff in I, II und IV den Basencharakter der *ortho*-ständigen Amino-Gruppe erniedrigt. Dadurch wird der Einfluss der anderen Stickstoffatome auf die elektrophoretischen Eigenschaften im sauren Milieu besonders deutlich.

Fig. 3 zeigt, dass IV in zwei Komponenten aufgeteilt wird. Ihre Absorptionspektren im sichtbaren Bereich sind identisch. Möglicherweise handelt es sich dabei um zwei tautomere Formen.

In extrem basischem Medium kann infolge Ausbildung von substituierten Nitrid-Ionen ebenfalls eine elektrophoretische Trennung erreicht werden (Tabelle II).

Diese orientierenden Versuche zeigen deutlich, dass Messungen elektrophoretischer Beweglichkeiten in organischen Lösungsmitteln im Prinzip benutzt werden können, um quantitative Aussagen über induktive und mesomere Effekte zu machen. Die ausgezeichneten Trennungen, wie sie aus den Figuren 2 bis 4 hervorgehen, wurden unter Verwendung einer relativ einfachen Apparatur und eines Füllmaterials, dessen Konvektionshemmende Eigenschaften sicher noch wesentlich verbessert werden können, erzielt. Man mag daher mit Recht erwarten, dass elektrophoretische Methoden in Zukunft ein wichtiges Hilfsmittel bei der Analyse organischer Substanzen bilden werden. Die Anwendung der Zonenelektrophorese in der präparativen organischen Chemie im Gramm-Masstab dürfte auf einige apparate-technische Schwierigkeiten stossen, ist aber selbstverständlich im Prinzip möglich.

DANK

Die Anilin-Farbstoffe wurden freundlicherweise von Herrn Dr. G. ENGELSMA, Leiden, Niederlande, zur Verfügung gestellt.

J. P. erhielt finanzielle Unterstützung vom Staatlichen Naturwissenschaftlichen Forschungsrat, Stockholm, Schweden.

K. St. dankt dem Deutschen Akademischen Austauschdienst, Bonn, für ein Forschungsstipendium.

ZUSAMMENFASSUNG

Anilin-Farbstoffe können durch Säulenelektrophorese in äthanolischen Elektrolytlösungen effektiv getrennt werden; die dabei verwendete Apparatur wird beschrieben. Aus dem elektrophoretischen Verhalten der untersuchten organischen Substanzen können Aussagen über deren intramolekulare Wechselwirkungen abgeleitet werden.

SUMMARY

Aniline dyes can be efficiently separated by column electrophoresis in ethanolic buffer solutions; the apparatus employed is described. From the electrophoretic behaviour of the investigated organic substances conclusions concerning their intramolecular interactions may be derived.

LITERATUR

- 1 A. TISELIUS, in M. BIER, *Electrophoresis*, Academic Press Inc., New York, 1959, S. xix.
- 2 M. H. PAUL UND E. L. DURRUM, *J. Am. Chem. Soc.*, 74 (1952) 4771.
- 3 Y. HASHIMOTO, *Experientia*, 9 (1953) 194.
- 4 M. MAKI, *Japan Analyst*, 4 (1955) 156; *C. A.*, 50 (1956) 10596.
- 5 J. PORATH, *Chem. Weekblad*, 53 (1957) 533.
- 6 H. J. MÜLLER-EBERHARD, *Scand. J. Clin. & Lab. Invest.*, 64 (1959) 298.
- 7 J. A. GLOMSET UND J. PORATH, *Biochim. Biophys. Acta*, 39 (1960) 1.
- 8 J. PORATH, E. B. LINDNER UND S. JERSTEDT, *Nature*, 182 (1958) 744.
- 9 G. ENGELSMA UND E. HAVINGA, *Tetrahedron*, 2 (1958) 289.
- 10 G. ENGELSMA, *Dissertation*, Rijksuniv., Leiden, 1959.
- 11 R. G. BATES, *Electrometric pH Determinations*, John Wiley & Sons Inc., New York, 1954, S. 150.
- 12 J. PORATH, *Biochim. Biophys. Acta*, 22 (1956) 151.
- 13 H. J. TEUBER UND G. JELLINEK, *Chem. Ber.*, 87 (1954) 1841.
- 14 F. KEHRMANN UND M. SANDOZ, *Helv. Chim. Acta*, 3 (1920) 110.
- 15 S. J. ANGYAL, E. BULLOCK, W. G. HANGER, W. C. HOWELL UND A. W. JOHNSON, *J. Chem. Soc.*, (1957) 1592.
- 16 H. G. KUNKEL UND R. TRAUTMANN, in M. BIER, *Electrophoresis*, Academic Press Inc., New York, 1959, S. 253.

J. Chromatog., 7 (1962) 385-391