

Stofftrennung durch Ionenwanderung und Elektrophorese

Von H. MARTIN

Institut für Physikalische Chemie der Universität Kiel

Zusammenfassung

Die verschiedenen Methoden zur Trennung von Stoffgemischen durch Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld – Zonenelektrophorese und Gegenstromionenwanderung – werden auf der Grundlage ihrer gemeinsamen theoretischen Voraussetzungen zusammenfassend dargestellt. Die Wirkungsweise der experimentell noch wenig entwickelten Gegenstrommethodik wird anhand einiger typischer Versuchsanordnungen (für die Anreicherung von Isotopen und seltenen Erden) etwas eingehender erörtert.

Von der Möglichkeit, Stoffgemische durch Elektrophorese oder Ionenwanderung zu trennen, ist in den letzten Jahren auf den verschiedenartigsten Gebieten und in so vielfältiger Weise derart reichlich Gebrauch gemacht worden, daß es geboten erscheint, in einem kurzen Referat statt der Einzelheiten eher die Einheit des Arbeitsgebietes, d. h. die den verschiedenartigen Methoden zugrunde liegenden gemeinsamen Prinzipien, hervorzukehren. Dabei wollen wir uns von vornherein auf Trennprozesse in Lösungen beschränken.

Ionenwanderung und Elektrophorese und alle die Phänomene und Methoden, die neuerdings unter Bezeichnungen wie «Zonenelektrophorese», «Papierielektrophorese», «Papierionophorese», «Ionographie», «Elektrochromatographie», «Agarophorese» usw. bekanntgeworden sind, lassen sich auf ein und dasselbe Grundphänomen zurückführen: auf die Wanderung elektrisch geladener Partikel im elektrischen Feld. (Im Englischen hat man dafür die Kurzbezeichnung «*electromigration*» als Überbegriff.)

Von Ionenwanderung – oder, wie vorgeschlagen ist, von «Ionophorese» – spricht man, wenn es sich um kleine Ionen wie Na^+ , Al^{+++} , $\text{C}_3\text{H}_7\text{CO}_2^-$, CrO_4^{--} usw. handelt, von Elektrophorese, wenn es sich um größere Partikel kolloider Dimension handelt, etwa um die Teilchen eines Goldsols oder um komplizierte Riesenzellen, etwa um Proteine, Enzyme, Viren, Polysaccharide usw.

Theoretische Grundlagen

Jedes Teilchen i , das eine Ladung e_i trägt, erfährt im Feld der Stärke E eine Kraft $e_i E$, die dem Teilchen in einer äußerst kurzen Anlaufzeit, vom Anlegen des Feldes an gerechnet, die Geschwindigkeit

$$w_i = \frac{e_i E}{R_i}$$

erteilt. R_i ist eine für das Teilchen charakteristische Reibungskonstante. Für sie gilt, falls die Teilchen kugelförmig sind, nach dem Stokesschen Gesetz

$$R_i = 6 \pi \eta r_i,$$

wo r_i der Radius des Teilchens und η die Zähigkeit des Mediums, d. h. des Lösungsmittels, ist. Da das Teilchen hiernach die Geschwindigkeit

$$w_i = \frac{e_i}{6 \pi \eta r_i} \cdot E \quad (1)$$

annimmt, so sieht man, daß in einer Lösung, die verschiedenartige Teilchen desselben Ladungszeichens enthält, die Teilchen dann verschieden schnell wandern und deshalb grundsätzlich trennbar sein werden, wenn sie sich in e_i/r_i , im Verhältnis Ladung zu Radius, unterscheiden. Gleichung (1) kann als die Grundgleichung sowohl der Ionenwanderung wie der Elektrophorese angesehen werden.

Handelt es sich um *gewöhnliche Kationen oder Anionen*, so hat man in dem Ansatz (1) für e_i die mit der Wertigkeit z des Ions multiplizierte Elementarladung e_0 , also

$$e_i = z e_0,$$

und für r_i den Radius des solvatisierten Ions zu setzen. So berechnete w_i -Werte sind allerdings nur für eine extrem verdünnte Lösung exakt. Durch die Ausbildung der Debye-Hückelschen Ionenwolke entgegengesetzten Ladungszeichens um das Ion i herum wird nämlich dessen Beweglichkeit zusätzlich gehemmt, und zwar, wie sich aus den Gesetzen der Ionenwanderung ergibt, um so stärker, je höher die ionale Konzentration der Lösung ist. Dieser Effekt der elektrostatischen Wechselwirkung der Ionen läßt sich durch die Anbringung einer Korrektur an Ausdruck (1) berücksichtigen.

Auf *kolloide Teilchen*, wie sie in den Lösungen von Proteinen, Enzymen usw. vorliegen, läßt sich der allgemeine Ansatz (1) in der Weise anwenden, daß man diese Teilchen als Riesenzellen bestimmter Ladung auffaßt. Die Ladung der Teilchen rührt hier daher, daß Atomgruppen wie $-\text{CO}_2\text{H}$ und $-\text{NH}_2$ dissoziieren (und Ionen aus der Lösung an der Teilchenoberfläche adsorbiert werden). Wir werden auch hier eine Debye-Hückelsche Ionenatmosphäre entgegengesetzter Ladung um das Ion herum haben, nur mit dem Unterschied, daß diese Ionenatmosphäre jetzt wegen der hohen Ladungsdichte in der Oberfläche des Kolloidteilchens sich dicht an diese Oberfläche anschmiegt: Es bildet sich eine diffuse elektrische Doppelschicht aus. Das hat, da das Riesenzellen die es umgebende Flüssigkeit zu einer bestimmten Dicke d mitschleppt, zur Folge, daß die eigentliche Teilchenladung durch mitgeschleppte Gegenionen im allgemeinen stark vermindert wird. Man rechnet hier mit einer «effektiven» Teilchenladung, indem man in dem Ansatz (1)

$$e_i = e_{\text{eff}}$$

setzt. Für r_i hat man jetzt den um die Dicke d des mitgeschleppten Flüssigkeitsmantels vergrößerten Radius des Kolloidteilchens zu setzen¹.

Sieht man davon ab, daß Ladung und Radius beide bei Riesenionen sehr viel größer als bei gewöhnlichen Ionen sind – in den e_i/r_i -Werten und deshalb auch in den w_i -Werten sind die Unterschiede weit weniger bedeutend –, so bleibt bei der stark vereinfachten Darstellung, die ich hier gewählt habe, als bemerkenswerte Besonderheit der Riesenionen zunächst nur die Tatsache, daß deren Ladung e_{eff} im Gegensatz zur Ladung ze_0 einfacher Ionen veränderlich ist: e_{eff} ändert sich mit dem Elektrolytgehalt der Lösung¹; vor allem aber, und darauf kommt es uns hier an, ist der e_{eff} -Wert bei Kolloidteilchen der hier betrachteten Art sehr stark vom pH-Wert der Lösung abhängig. Das rührt daher, daß der Dissoziationsgrad der schwach sauren oder basischen Gruppen des Riesenions stark pH-abhängig ist. Man hat hier also die Möglichkeit, die Teilchenladung und damit die Teilchengeschwindigkeit im Feld durch den pH-Wert der Lösung zu beeinflussen. Darüber hinaus ergibt sich daraus die Möglichkeit, Teilchen gleicher Größe (und Form), die sich nur in der Natur oder Anordnung der dissoziablen Gruppen unterscheiden, verschiedene Wanderungsgeschwindigkeiten zu erteilen, also elektrophoretisch trennbar zu machen, indem man einen pH-Wert aufsucht, bei welchem die Teilchen verschiedene e_{eff} -Werte annehmen.

Möglichkeiten der soeben beschriebenen Art scheinen bei einfachen Kationen und Anionen grundsätzlich nicht gegeben zu sein. Zwei chemisch verschiedene, aber im Radius und in der Wertigkeit übereinstimmende Säureanionen etwa sollten nach den vorstehenden Überlegungen, da ja deren e_i/r_i -Werte gleich und unveränderlich sind, durch Ionenwanderung grundsätzlich nicht trennbar sein. Man überzeugt sich indessen leicht, daß eine solche pessimistische Schlußfolgerung nur so lange richtig ist, wie die Ionen alle frei sind und nicht in Gleichgewichten stehen mit elektrisch neutralen Stoffen oder anderen Ionen.

¹ Die so resultierende Formel

$$w_i = \frac{e_{eff}}{6\pi\eta(r_i + d)} E \quad (2)$$

für die Geschwindigkeit eines Kolloidteilchens ist nicht vollständig, da sie die Effekte der elektrostatischen Wechselwirkung nur zum Teil berücksichtigt. Sie läßt aber verstehen, warum ähnlich wie bei gewöhnlichen Ionen auch bei Kolloidionen hohe ionale Konzentration der Lösung die Geschwindigkeit w_i zusätzlich vermindert: Erhöhung des Elektrolytgehalts der Lösung bedeutet Schrumpfung der diffusen Doppelschicht und somit, da nun mehr Gegenionen in den mitgeschleppten Flüssigkeitsmantel der Dicke d entfallen, eine Verminderung des e_{eff} -Werts.

Anstelle von e_{eff} wird in der Literatur häufig mit dem Begriff des elektrokinetischen Potentials ζ operiert. Man kann sich das Teilchen als Kugelkondensator der Kapazität $C = e_{eff}\zeta$ vorstellen, und da die Kapazität eines Kugelkondensators vom Radius $r_i + d$ in einem Medium der Dielektrizitätskonstanten ϵ auch $C = (r_i + d) \cdot \epsilon$ ist, ergibt sich $e_{eff} = (r_i + d) \cdot \epsilon \cdot \zeta$, eine Beziehung, die bei Kenntnis von $r_i + d$ die Umrechnung von ζ -Werten in e_{eff} -Werte gestattet.

Angenommen, das Ion i sei das Anion einer schwachen Säure. Durch Änderung des pH-Wertes der Lösung können wir zwar den Dissoziationsgrad der Säure, nicht aber die Geschwindigkeit w_i des freien Anions ändern. Die Wanderungsgeschwindigkeit (Beweglichkeit) unseres Anions ist also unabhängig vom Dissoziationsgrad.

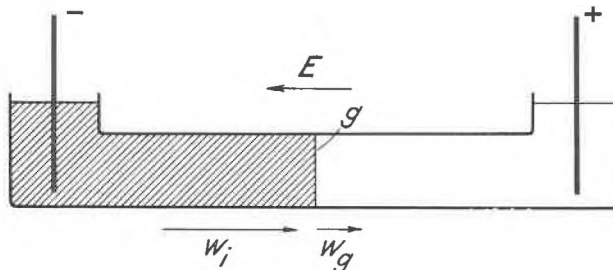


Abb. 1. Zur Erläuterung des Einflusses der unvollständigen Dissoziation eines Elektrolyten auf dessen elektrolytische Überführung

Nicht unabhängig vom Dissoziationsgrad ist aber die Überführung der Säure als Ganzes. Abb. 1 möge das veranschaulichen. Sie zeigt ein Rohr, das mit der Lösung einer starken Säure gefüllt sein mag. In der Lösung wirke ein elektrisches Feld in der angegebenen Richtung. Im linken, schraffierten Teil des Rohres soll die Lösung auch die das Anion i liefernde schwache Säure enthalten. Unter dem Einfluß der Feldstärke E bewegen sich die Anionen i mit der Geschwindigkeit w_i nach rechts (langer Pfeil). Obwohl die Anionen i auch jenseits der Grenzfläche g mit unverminderter Geschwindigkeit w_i weiterwandern, verschiebt sich die Grenze g selbst nur viel langsamer nach rechts (kurzer Pfeil). Der Grund ist der folgende: Die die Grenze passierenden Anionen i geraten in ein Medium, in welchem sie nicht mehr mit undissoziierter Säure im Gleichgewicht stehen; sie verschwinden deshalb dort, indem sie sich mit H-Ionen zu undissoziierter Säure vereinigen, solange, bis die Gleichgewichtskonzentration an Assoziat unmittelbar jenseits der Grenze aufgebaut ist. Dieser Prozeß dauert um so länger, je weniger die Säure dissoziiert ist.

Die soeben durchgeführte Überlegung zeigt, daß die Überführung einer schwachen Säure vom Dissoziationsgrad und somit von der Dissoziationskonstanten der Säure und vom pH-Wert der Lösung abhängig ist. Sie zeigt weiter, daß in der Lösung eines Säuregemischs die Säuren auch dann nicht unbedingt gleich schnell übergeführt werden, wenn diese in der Beweglichkeit ihrer Anionen genau übereinstimmen; vielmehr rufen Unterschiede allein im Dissoziationsgrad bereits Unterschiede in der Geschwindigkeit der elektrolytischen Überführung hervor. In diesem Falle beruht dann die Trennung nicht auf einem Geschwindigkeits-, sondern auf einem Konzentrationseffekt.

Das zunächst für unvollständig dissoziierte Säuren gewonnene Ergebnis unserer Überlegungen läßt sich selbstverständlich auf alle in einem Dissoziationsgleichgewicht stehenden Elektrolyte übertragen. In seinem qualitativen Gehalt bleibt es aber auch für in anderen

Gleichgewichten, etwa einem Hydrolysegleichgewicht oder einem Komplexbildungsgleichgewicht, stehende Elektrolyte gültig. Da die Einstellung solcher Gleichgewichte in hohem Maße vom Medium, in welchem die Ionen wandern, abhängen wird, kommt der Wahl des Lösungsmittels in allen Fällen, in welchen die Ionenbeweglichkeiten wenig verschieden sind, erhöhte Bedeutung zu.

Wir kommen zusammenfassend zu dem Ergebnis, daß zwei Stoffe, die sich unter Bildung elektrisch geladener Teilchen lösen, durch Ionenwanderung oder Elektrophorese nur dann gleich schnell elektrolytisch übergeführt werden, wenn sie nicht nur im e_i/r_i -Wert ihrer Ladungsträger, sondern auch in allen chemischen Gleichgewichten, an welchen die Ladungsträger beteiligt sind, übereinstimmen. Ein solch hohes Maß von Übereinstimmung zwischen verschiedenen Stoffen ist aber im allgemeinen – außer bei Isotopen – nicht zu erwarten. Die elektrische Überführung darf hiernach als eine ausgesprochen stoffspezifische Eigenschaft angesehen werden und sollte sich in hervorragender Weise zur Charakterisierung und zur Trennung verschiedener Stoffe eignen.

Einige Versuche von historischer Bedeutung

Bedenkt man, welche grundlegende Bedeutung der Stofftrennung in der präparativen und analytischen Chemie schon immer zugekommen ist – bezeichnend dafür ist, daß z. B. im Holländischen heute noch das Wort «Scheikunde», d. h. die Kunst des Trennens, als Synonym für Chemie benutzt wird –, so muß man sich wundern, daß die Ionenwanderung als Trennprinzip erst eigentlich in den letzten zehn oder zwanzig Jahren allgemeine Anwendung gefunden hat. Dabei sind die Grundphänomene seit langem bekannt: HITTORF untersuchte die Überführung der Dissoziationsprodukte von Salzen, Säuren und Basen durch den elektrischen Strom schon 1853, und OLIVER LODGE benutzte die Methode der «wandernden Grenzfläche» schon 1886 (Beobachtung der Wanderung von H^+ -Ionen durch die fortschreitende Entfärbung von Phenolphthalein).

Die ersten eigentlichen Trennversuche sind anfangs der zwanziger Jahre dieses Jahrhunderts von JAMES KENDALL und Mitarbeitern angestellt worden.

Ich möchte einen typischen Versuch, den KENDALL mit dem Ziel der Trennung der Chlorisotope angestellt hat, anhand von Abb. 2 kurz beschreiben:

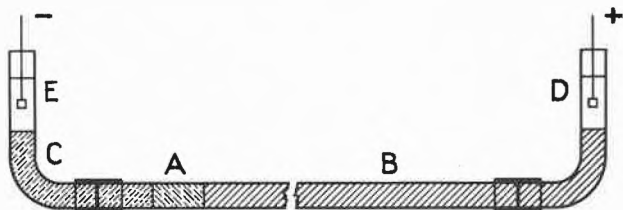


Abb. 2. Versuch zur Trennung der Chlorisotope durch Ionenwanderung in einem Gel nach KENDALL

Ein Agar-Agar-Gel *A*, das NaCl enthält, ist als kurzes Mittelstück in ein langes horizontales Glasrohr eingeführt. Rechts vom NaCl-Gel befindet sich ein NaOH enthaltendes Gel *B*, links davon ein Natriumacetat enthaltendes Gel *C*. Die nach oben gebogenen Rohrenden enthalten als Elektrodenlösungen Vorräte an NaOH (*D*) bzw. Essigsäure (*E*). Bei Stromschluß wandert die NaCl-Zone langsam nach rechts. Die Zonengrenzen bleiben dabei völlig scharf, weil die OH^- -Ionen schneller, die $CH_3CO_2^-$ -Ionen langsamer als die Cl^- -Ionen wandern². Man ließ das Mittelstück etwa 30 m weit laufen und zerschnitt es dann in Scheiben, die analysiert wurden.

Wenn die Chlorisotope 35 und 37 sich in ihren Beweglichkeiten unterschieden, mußte sich im Frontsegment des NaCl-Stücks das schnellere, im Endsegment das langsamere Isotop vorfinden. Das wurde zwar in diesem Falle nicht beobachtet. Testversuche mit anderen Ionengemischen – Ba^{++}/Ca^{++} ; Ba^{++}/Sr^{++} ; J^-/Cl^- –, deren chemisch verschiedene Komponenten sich in ihren Beweglichkeiten um bekannte Beträge, nämlich um 8, 5 und 1% unterschieden, bestätigten jedoch das ausgezeichnete Funktionieren der Methode. KENDALL und Mitarbeiter haben so auch Gemische von seltenen Erden getrennt: In einem Zehn-Tage-Versuch konnten sie Praseodym und Neodym, deren Ionen sich im Radius nur sehr wenig unterscheiden (1,16 und 1,15 Å im Gitter), fast vollständig trennen. Die Praseodymionen waren die schnelleren.

Warum diese grundlegenden Versuche zunächst unbeachtet blieben, ist schwer zu sagen. Vielleicht war die Zeit noch nicht reif dafür, das Bedürfnis nach mikroanalytischen Methoden war noch nicht so stark wie heute – wenigstens außerhalb der Biochemie. Dort aber sah man wohl zu jener Zeit noch nicht so klar den engen Zusammenhang zwischen Ionenwanderung und Elektrophorese.

In der Biochemie gewannen um jene Zeit elektrophoretische Methoden, also Methoden, die sich auf die unterschiedlichen elektrophoretischen Beweglichkeiten der Biokolloide gründeten, immer größere Bedeutung gegenüber den klassischen Fällungsmethoden. TISELIUS hat 1930 darauf hingewiesen, daß die mit letzteren Methoden verknüpften drastischen Änderungen des Lösungszustandes die Gefahr der Denaturierung mit sich bringen. Ich kann die verschiedenen älteren Arbeitsweisen hier nicht besprechen. Ich beschränke mich darauf, eine Versuchsanordnung zu beschreiben, die 1937 eine neue Epoche in der Entwicklung der elektrophoretischen Methode sowohl in analytischer wie in präpara-

² Die OH^- - und $CH_3CO_2^-$ -Ionen spielen die Rolle der sogenannten Indikatorionen. Die Grenzflächen zwischen den Chlor- und Indikatorionen bleiben scharf, wenn die Konzentrationen (c , c') und Überführungszahlen (n , n') der Chlor- und Indikatorionen jeweils die Bedingung $c'/c = n'/n$ erfüllen und der Ionenstrom von höherer zu niedrigerer Feldstärke fließt. Durch letztere Maßnahme wird eine Selbststabilisierung der Grenzfläche erzielt, die Schutz bietet nicht nur gegen Verwischung durch Diffusion, sondern auch gegen unvermeidliche äußere Störungen (Erschütterungen, Thermokonvektion).

tiver Hinsicht eröffnete: die Elektrophorese-Apparatur nach TISELIUS.

Elektrophoreseapparatur nach Tiselius

Die Apparatur dient in erster Linie dazu, elektrophoretische Geschwindigkeiten nach der Methode der wandernden Grenzfläche zu messen. Sie kann auch zu Trennungen benutzt werden.

Ein wichtiger Apparatteil ist das aus rechteckigen Küvetten gebildete U-förmige Elektrophoresegefäß

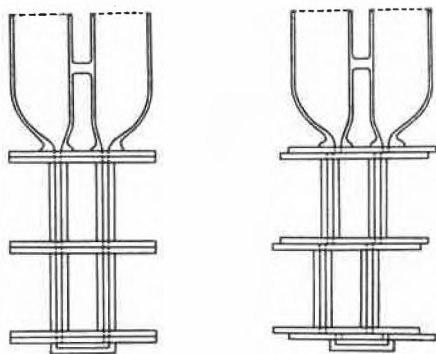


Abb. 3. U-förmiges Elektrophoresegefäß aus rechteckigen Glasküvetten nach TISELIUS

(Abb. 3). Es wird mit der zu untersuchenden Kolloidlösung gefüllt, die dann mit einer geeigneten Elektrolytlösung (Pufferlösung) überschichtet wird zwecks Herstellung der Verbindung zu großen Behältern, in welchen sich die Elektroden (reversible Silber-Silberchlorid-Elektroden) befinden (Abb. 4).

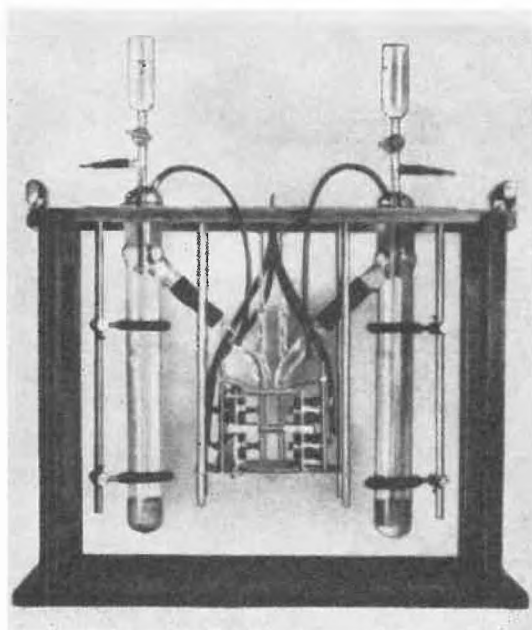


Abb. 4. Elektrophoresegefäß mit angeschlossenen Elektrodenzylindern für reversible Elektroden nach TISELIUS

Die Grenzfläche Kolloidlösung-Elektrolytlösung wird mittels der Töplerschen Schliereamethode, wie sie schon SVEDBERG für die Beobachtung der Ultrazentrifugierung einführte, beobachtet. Die Küvetten lassen sich hydraulisch gegenseitig verschieben, so daß Teile der Kolloidlösung getrennt entnommen werden können.

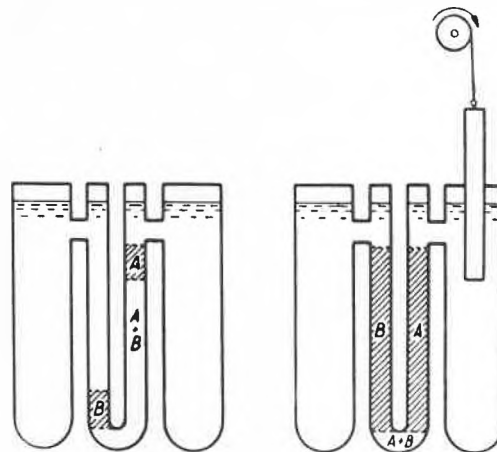


Abb. 5. Trennung eines Zweikomponentengemischs durch Elektrophorese (schematisch)

Wir wollen uns jetzt in der schematisierten Darstellung Abb. 5 (links) den Gang der elektrophoretischen Trennung eines aus zwei Komponenten *A* und *B* bestehenden Gemisches ansehen. Man sieht sofort die große Ähnlichkeit mit dem Kendallschen Ionenwanderungsversuch, Abb. 2: Der Kolloidlösungszone $A + B$ hier entspricht dort die Mittelzone *A* (mit ^{35}Cl und ^{37}Cl). Die Zonen wandern, und dabei treten eventuell neue Grenzflächen auf, falls die Komponenten verschieden schnell wandern.

In anderer Hinsicht sind freilich zwischen den Systemen dort (Abb. 2) und hier (Abb. 5) große Unterschiede:

1. *Dort* war die Lösung durch ein Gel gegen Konvektion geschützt;
hier haben wir eine freie Lösung, daher muß hier die dichtere Lösung stets unten sein. Die Zelle wird bei 4°C , im Dichtemaximum des Wassers, betrieben.
2. *Dort* konnte durch die Wahl geeigneter «Indikatorionen» vor und hinter der Mittelzone für eine Selbststabilisierung beider Grenzflächen gesorgt werden²;
hier ist es schwierig, geeignete Indikatorionen zu finden. Wenn aber der Beitrag der Kolloidionen zur Leitfähigkeit klein ist, darf man zum Überschichten das Ultrafiltrat der Kolloidlösung (oder eine Pufferlösung von ähnlicher Leitfähigkeit wie die Kolloidlösung) benutzen. Auf diese Weise bleiben die Teilchen in der gleichen Umgebung und ändern ihre Ladung (ζ -Potential¹) nicht.
3. Bei dem Kendallschen Versuch konnten zwei Komponenten zwar entmischt, aber nicht räumlich auseinandergelöst werden; die Zonen der beiden Komponenten blieben in Kontakt.
Hier können die Zonen der getrennten Komponenten *A* und *B* im Prinzip beliebig weit auseinandergesogen werden, weil hier ein Trägerelektrolyt, die Pufferlösung, vorhanden ist. Praktisch geht das hier nur deshalb nicht, weil bei der Fortsetzung der Elektrophorese über den in Abb. 5 (rechts)

gezeigten Fall hinaus instabile Grenzflächen – dichtere Lösung oben! – auftreten müßten³.

Die zuletzt genannte Schwierigkeit entfällt, wenn man die mit Trägerelektrolyt versehenen Lösungen zum Schutz vor Konvektion in ein poröses Medium oder ein Gel einbettet. Es gelingt so, die Zonen räumlich ganz zu trennen, also vollständige Trennungen durchzuführen, unabhängig davon, ob es sich um kolloide oder molekular-disperse Lösungen handelt. Man kommt so zur Zonenelektrophorese bzw. Zonenionophorese.

Einige typische Meßergebnisse, wie sie nach der Methode der wandernden Grenzfläche mit Hilfe der Töppler-Methode (mit parallelen Spalten) und mit Hilfe der Svensson-Methode (mit schiefe Spalt) erhalten werden, sind aus den Abb. 6 und 7 ersichtlich.

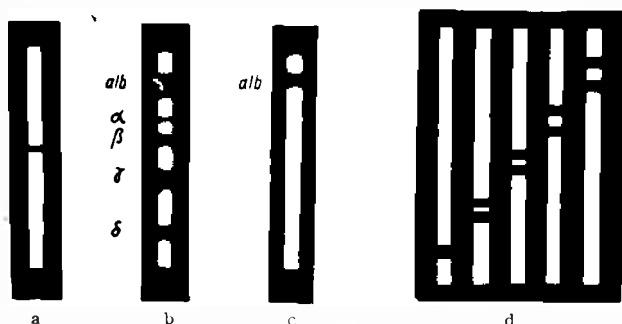


Abb. 6. Schlierenaufnahmen einer Elektrophoresekammer mit wandernden Grenzflächen: a) Eieralbumin, b) Pferdeserum, c) Serumalbumin aus Pferdeserum mittels Elektrophorese isoliert, d) Mischung von Eieralbuminen des Perlhuhns und der Ente (nach LANDSTEINER und VAN DER SCHEER)

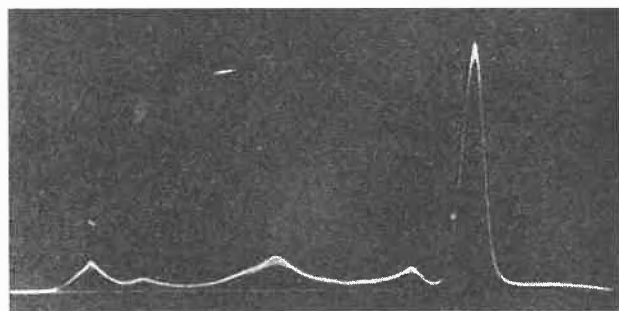


Abb. 7. Elektrophoresediagramm von normalem Blutserum, erhalten mit einer Apparatur von STRÜBIN, Basel (entnommen aus M. LEDERER, Paper Electrophoresis)

Zonenelektrophorese (Zonenionophorese)

Die moderne Technik der Zonenelektrophorese hat sich parallel mit der Technik der Säulen- und Papierchromatographie entwickelt.

1946 berichten CONSDEN, CORDON und MARTIN über die erste Zonentrennung von Aminosäuren und von Peptiden durch Wanderung in Silica-Gel. Unter den vielen Füllmaterialien (Trägersubstanzen), die für die Stabilisierung der Lösungen gegen Konvektion in Betracht kommen, Filterpapier, Stärke, Glaspulver, Glas-

³ Der Senkkörper in Abb. 5 rechts dient dazu, die Grenzflächen in der Elektrophoresekammer in gewünschte Positionen zu bringen.

wolle, Asbest, Silica- oder Agar-Gel usw., hat Filterpapier die größte Bedeutung erlangt.

1948 berichten WIELAND und FISCHER über die Trennung von Aminosäuren auf einem 1 cm breiten und 20 cm langen, horizontal ausgespannten, mit Pufferlösung befeuchteten Filtrierpapierstreifen, dessen Enden je in eine Schale mit Pufferlösung tauchten, an welche eine Gleichspannung gelegt werden konnte. Die Probe wird an einer vorher markierten Stelle in der Mitte des Streifens aufgebracht.

1950 hat DURRUM nach einem ganz analogen Verfahren Proteine getrennt.

Die Papierelektrophorese hat sich sehr rasch zu einer äußerst wichtigen mikrochemischen Analysen- und Trennmethode insbesondere für biochemische und klinische Laboratorien entwickelt. Der Aufwand ist mit dem, der zum Betrieb einer Tiselius-Apparatur gehört, nicht zu vergleichen.

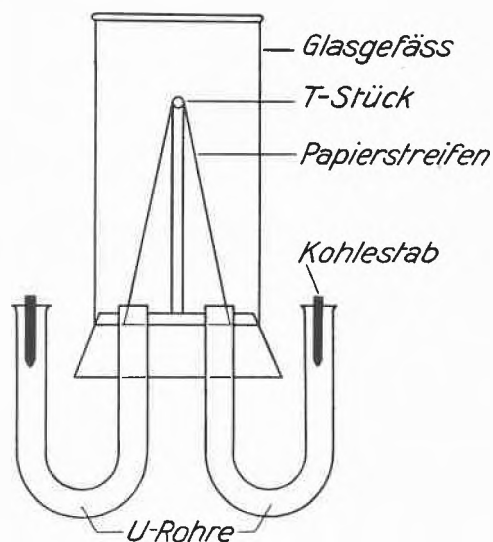


Abb. 8. Einfache Papierelektrophoreseapparatur nach DURRUM (Ausgangsposition der zu trennenden Probe ist die auf dem T-Stück aufliegende Mitte des Papierstreifens)

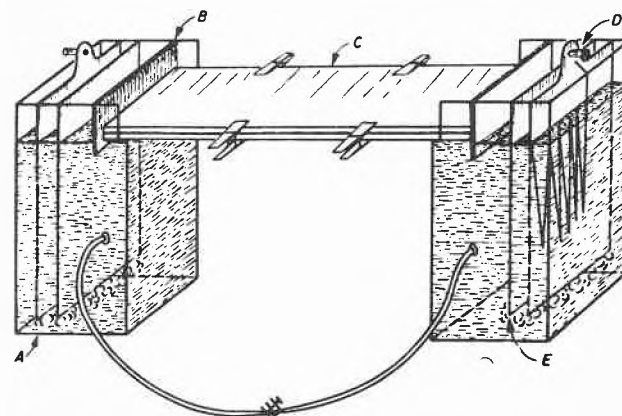


Abb. 9. Papierelektrophoresapparatur nach KUNKEL und TISELIUS (A: Elektrodengefäß, B: poröses Papier zur Herstellung des Kontaktes zwischen Papierstreifen und Elektrodengefäß, C: Glasplatten mit Papierstreifen, D: Elektroden, E: Platte zum Schutz des Papiers vor pH-Änderungen)

In den Abb. 8 und 9 sind zwei von vielen verschiedenen gebräuchlichen Anordnungen des Filterpapierstreifens, der Behälter für die Pufferlösung und der Elektroden wiedergegeben. Bei der Anordnung nach Abb. 9 ist das Papier zwischen Glasplatten gelegt, um die Verdampfung der Lösung unter dem Einfluß der Stromwärme zu vermeiden.

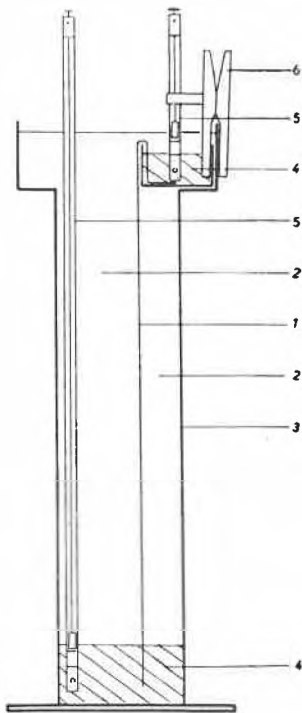


Abb. 10. Apparat für Hochvoltektrophorese. 1: Papierstreifen, 2: organisches Lösungsmittel, 3: Glasgefäß, 4: Pufferlösung, 5: Elektroden (Ag/AgCl), 6: Klammer (nach H. MICHL)

Abb. 10 zeigt eine Vorrichtung für die sogenannte Hochvoltektrophorese; hier ist die Kühlung durch Eintauchen in ein organisches Lösungsmittel intensiviert, und es können Spannungsgefälle im Streifen bis 50 V/cm angewendet werden (nach H. MICHL).

Abb. 11 vermittelt eine Vorstellung von der Leistungsfähigkeit der Papierektrophorese. Das Gemisch der neben dem Papierstreifen vermerkten Aminosäuren ist in einer Hochvoltapparatur (liegende Anordnung) unter den im Text zur Abbildung angegebenen Versuchsbedingungen durch Ionenwanderung vollständig in die Komponenten zerlegt worden. Die Strecken, die die einzelnen Komponenten bei diesem Versuch durchwandert haben, schwanken zwischen 16 und 42 cm.

Die Trennmethode der Papierektrophorese ist bereits auf viele verschiedene Stoffklassen erfolgreich angewendet worden: auf Aminosäuren, Peptide, Proteine, Amine, auf Kohlehydrate und mehrwertige Alkohole (in der Form von Borsäurekomplexen), auf zyklische Alkohole (in Boratpuffern), auf Purine, Nucleoside und Nucleotide, auf organische Säuren, Alkaloide, anorganische Ionen, Farbstoffe u. a. Sogar Isotope sind auf Papier getrennt worden!

Durch Papierektrophorese sind Isotope, und zwar die radioaktiven Natriumisotope ^{22}Na und ^{24}Na , erstmals 1955 von BONNIN, CHEMLA und SUE getrennt worden.

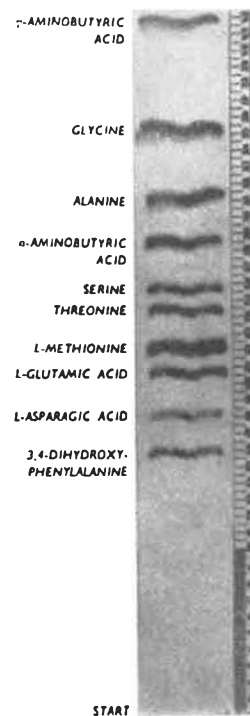


Abb. 11. Trennung eines Aminosäuregemisches durch Papierektrophorese (40 V/cm, 2 mA/cm Streifenbreite; 120 min; 10°C; Lösungsmittel: 3 ml 80% Ameisensäure, 12 ml Eisessig, 15 ml Aceton mit Wasser zu 100 ml verdünnt (pH 1,9). Farbreaktion: 0,2% Ninhydrin in Butanol) (nach H. MICHL)

Da die Unterschiede in den Beweglichkeiten bei isotopen Ionen äußerst gering zu sein pflegen, mußte man einen besonders langen Wanderweg vorsehen (einige Meter). Um die Apparatur selbst nicht ebenso lang machen zu müssen, konstruierte man eine Apparatur, die es gestattete, das Papier der wandernden Zone entgegen zu bewegen (Abb. 12). Mit Hilfe eines Geiger-Müller-Zäh-

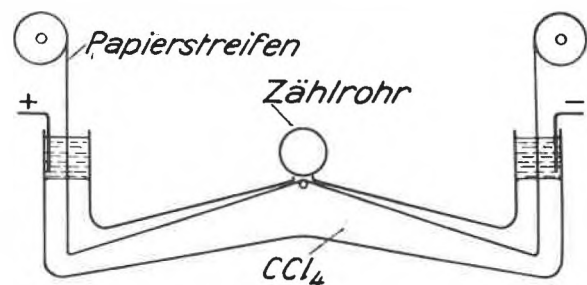


Abb. 12. ^{22}Na - ^{24}Na -Trennung durch Papierektrophorese (nach BONNIN, CHEMLA und SUE)

lers konnte man den Papiervorschub so einregulieren, daß die Zone, hier die radioaktiven Natriumionen einer NaCl-Lösung, relativ zur Apparatur stillstand. Auf seinem strombelasteten Abschnitt ließ man den Papierstreifen zwecks Kühlung in CCl_4 eintauchen. Nach einem

Versuch, bei welchem die radioaktive Zone in $1\frac{3}{4}$ Stunden 280 cm gewandert war, hatte das Häufigkeitsverhältnis $^{22}\text{Na}/^{24}\text{Na}$ an den Enden der radioaktiven Zone die Werte 0,28 und 1,83 angenommen. Es war also eine beträchtliche Entmischung eingetreten.

Die soeben beschriebene Trennmethode eignet sich sehr gut zur Messung der relativen Geschwindigkeitsunterschiede $\Delta w/w$ isotoper Ionen. Präparatives Interesse kann sie kaum beanspruchen.

Da die Papierelektrophorese bei den bisher besprochenen Arbeitsweisen Stoffgemische zwar häufig vollständig, aber immer nur in kleinen Mengen zu trennen gestattet, hat es nicht an Versuchen gefehlt, diese analytisch so bedeutungsvolle Trennmethode zu einer präparativen Methode auszugestalten. Auch Bemühungen solcher Art sind nicht ohne Erfolg geblieben.

Kontinuierliche elektrophoretische Trennung

1949 ist von SVENSSON und BRATTSTEN für präparative Zwecke die in Abb. 13 schematisch dargestellte Arbeitsweise vorgeschlagen worden. Das Rechteck soll ein aufrecht gestelltes Stück Filtrierpapier (oder irgendein anderes Kapillarsystem) darstellen, in welchem Pufferlösung (B), gleichmäßig über die Fläche verteilt, und die elektrophoretisch zu trennende Probe (C) mit konstanter Geschwindigkeit nach unten fließen. Quer dazu wirkt ein elektrisches Feld (A). Die elektrisch geladenen

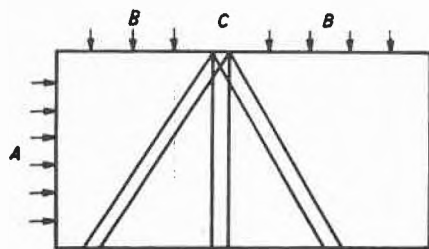


Abb. 13. Prinzip der kontinuierlich arbeitenden Zonenelektrophorese. A: elektrisches Feld, B: Pufferlösung, C: Probe

Teilchen der Probe werden auf ihrem Weg nach unten je nach dem Vorzeichen ihrer Ladung und nach Maßgabe ihrer Beweglichkeit und der angelegten Spannung mehr oder weniger stark nach links oder rechts abgelenkt werden. Man braucht also nur die unten über die ganze Breite des Papiers abtropfende Lösung in getrennten Behältern aufzufangen, um eine kontinuierliche Trennung zu verwirklichen. SVENSSON und BRATTSTEN benutzten für ihre erste nach diesem Prinzip arbeitende Trennapparatur Glaspulver als Trägersubstanz.

Die kontinuierlich arbeitende elektrophoretische Trennmethode ist seitdem von verschiedenen Autoren wesentlich verbessert worden, und mehrere Firmen haben die Apparate zu hoher Perfektion entwickelt. Die Abbildungen 14 und 15 zeigen Ausführungsformen nach GRASSMANN und HANNIG und nach DURRUM für Papier als Trägersubstanz. Die beiden Anordnungen unter-

scheiden sich hauptsächlich dadurch, daß erstere mit einem homogenen elektrischen Feld arbeitet, während bei letzterer – was gewisse praktische Vorteile bietet – der Strom nur über die beiden unteren Ecken des Papierbogens zugeführt wird und das Feld dementsprechend inhomogen ist.

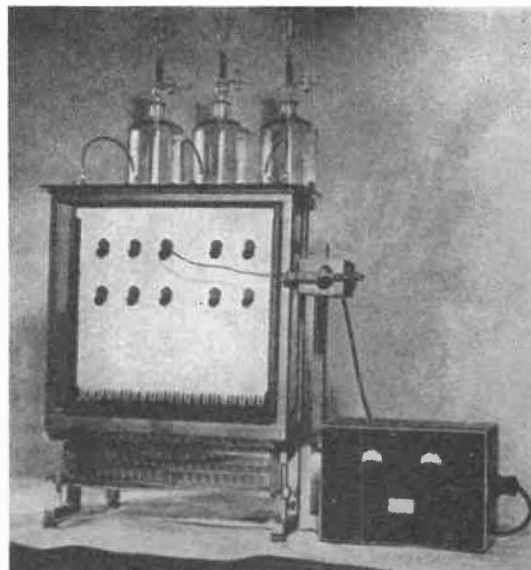


Abb. 14. Kontinuierlich arbeitende Elektrophoreseapparatur nach GRASSMANN und HANNIG. Konstruktion: BENDER und HOBEIN, München. 48 Fraktionen

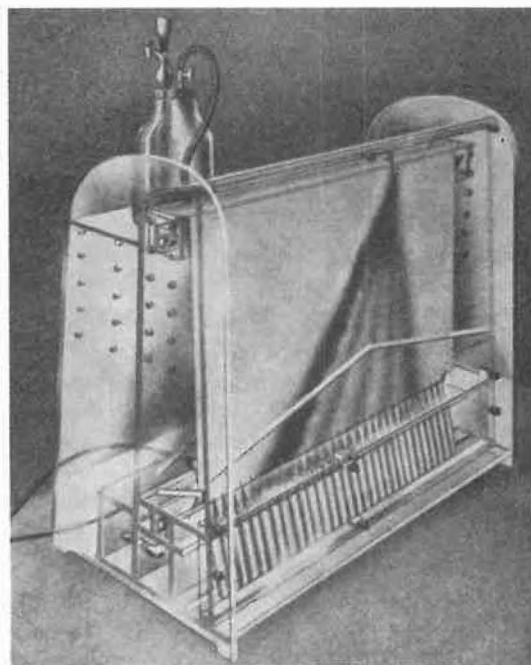


Abb. 15. Kontinuierlich arbeitende Elektrophoreseapparatur nach DURRUM. Konstruktion: Shandon Scientific Co., London

Abb. 16 zeigt eine Apparatur, die ohne Trägersubstanz arbeitet. Die Lösung fließt hier in dünner Schicht zwischen zwei nahezu horizontal liegenden, gekühlten Glasplatten.

Für sehr schwer trennbare Gemische, insbesondere Isotopengemische, die, wie wir gesehen haben, Wanderungen der Ionen über sehr lange Strecken erfordern, dürften sich präparative Verfahren der soeben beschriebenen Art weniger eignen. Ich möchte deshalb jetzt

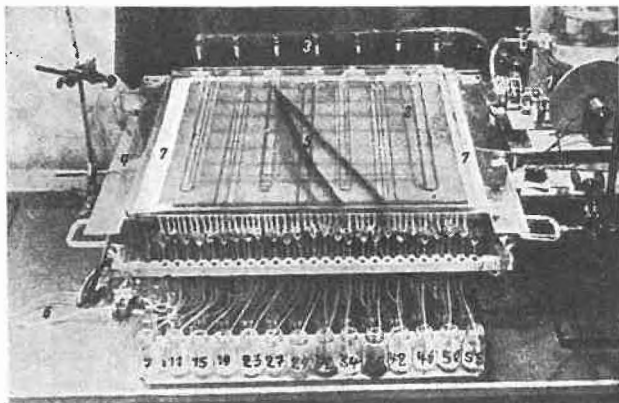


Abb. 16. Trägerfreie präparative Durchlaufelektrophorese (Labormodell der Schering AG, Berlin). 1: Dosierpumpe, 2: Platten mit Stegen für Kühlwasserlenkung, 3: Pufferauftropfvorrichtung, 4: abgedeckte Elektrodenbrücke, 5: aufgetrennte Farbstoffe, 7: Papierbrücken zu den Elektrodentrögen

noch eine Methode besprechen, die für Trennungen auch in präparativem Maßstab in Frage kommt, allerdings bisher noch wenig entwickelt ist. Es handelt sich dabei um eine Anwendung des Gegenstromprinzips auf die Ionenwanderung.

Gegenstrom-Ionenwanderung

In Abb. 17 sehen wir in schematischer Darstellung eine Versuchsanordnung, wie wir sie in Kiel für die Anreicherung von ²⁶Mg durch Gegenstromelektrolyse einer konzentrierten wäßrigen MgBr₂-Lösung benutzt haben.

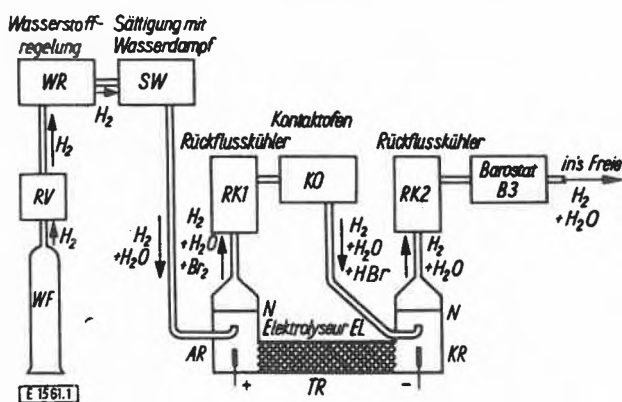


Abb. 17. Versuchsanordnung für die Trennung von Isotopen durch Gegenstromelektrolyse eines Bromids nach MARTIN und HARMSEN

Das Prinzip der Methode ist einfach: Den im Trennraum TR des Elektrolyseurs in Richtung auf den Kathodenraum KR wandernden Mg⁺⁺-Ionen (und MgBr⁺-Ionen) entgegen wird ein Strom der Lösung auf-

rechterhalten, der so stark ist, daß gerade kein Magnesium übergeführt wird. (Wenn Mg keine Isotope hätte und MgBr₂ vollständig in Mg⁺⁺ und Br⁻ zerfallen wäre, würde das bedeuten, daß die Mg⁺⁺-Ionen stillstehen; sie werden das in Wirklichkeit schon deshalb nicht, weil in einer konzentrierten Lösung neben Mg⁺⁺ auch andere Ionen wie MgBr⁺ und MgBr₂ vorkommen werden.) Falls nun, sei es in der Beweglichkeit der Ionen, sei es in den Konstanten chemischer Gleichgewichte (MgBr⁺ ⇌ Mg⁺⁺ + Br⁻; MgBr₂ ⇌ MgBr⁺ + Br⁻ usw.), d. h. also in der Konzentration der Ionen, die Isotope des Magnesiums nicht identisch sind, wird es unmöglich sein, die Bedingung, daß die Überführung des Magnesiums gleich Null sein soll, für alle Isotope gleichzeitig zu erfüllen. Die Folge muß sein, daß die Isotope mit der höheren elektrischen Leitfähigkeit in der MgBr₂-Lösung sich im Kathodenraum (KR), die mit der geringeren Leitfähigkeit sich im Anodenraum (AR) anreichern.

Den Gegenstrom der Lösung haben wir erzeugt, indem wir unter Verwendung eines konstanten H₂-Hilfsstroms laufend Wasser aus der erhitzten Anodenlösung verdampft und in die Kathodenlösung hineinkondensiert haben. Die Temperatur eines Präzisionsrückflußkühlers (RK 1) bestimmt die Geschwindigkeit des Wassertransports. Der H₂-Hilfsstrom trägt gleichzeitig alles anodisch gebildete Brom fort und gibt es nach dem Passieren eines Kontaktofens (KO) als HBr an die Kathodenlösung ab mit genau der Geschwindigkeit, mit der der Bromwasserstoff im Kathodenprozeß verbraucht wird. Elektrodenprodukte treten also nach außen nicht in Erscheinung. (Da bei B3 genau so viel H₂ entweicht wie bei AR eintritt, könnte der Wasserstoff auch in Umlauf gehalten werden, und die Gegenstromelektrolyse würde dann in einem vollständig geschlossenen System ablaufen.) Elektrolysestromstärke, H₂-Strom und Rückflußkühler-Temperatur sind genau aufeinander abgestimmt.

Die Ausführung des Elektrolyseurs und einer an den Anodenraum angeschlossenen Vorrichtung für die Überwachung der Dichte der Anodenlösung nach der Schwimmerrmethode ist aus den Abb. 18 und 19 ersichtlich. Der Trennraum, der zur Unterdrückung störender Konvektionsvorgänge mit feinem Sand angefüllt ist, hat einen Querschnitt von 1,8 cm².

Mit der beschriebenen Apparatur sind in einem 55-Tage-Versuch bei einer Elektrolysestromstärke von 0,67 Amp. im Anodenraum 21 g MgBr₂ gewonnen worden mit Magnesium, in welchem ²⁶Mg von ursprünglich 11,28 auf 11,67% angereichert war. Aus der Zusammensetzung der während des Versuchs entnommenen Proben geht hervor, daß der Anreicherungsprozeß bis zum Zeitpunkt des Versuchsabbruchs unvermindert angehalten hatte.

Nehmen wir der Einfachheit halber einmal an, der beobachtete Trenneffekt rühre allein von Geschwindigkeitsunterschieden ausschließlich vorhandener Mg⁺⁺-Ionen her, so können wir aus den Daten unseres Ver-

suchs eine relative Geschwindigkeitsdifferenz $\Delta w/w$ der isotopen Mg^{++} -Ionen errechnen. Wir finden

$$\Delta w/w = \frac{w(^{24}Mg)}{w(^{26}Mg)} - 1 \approx 0,001.$$

Dieser sogenannte Einzeltrenneffekt, der, um es nochmals zu betonen, in Wirklichkeit gewiß anders, als wir es soeben getan haben, interpretiert werden muß, ist zu klein, um darauf eine präparative Trennmethode für Mg-Isotope zu gründen. Vielleicht hat es sich ungünstig auf den Einzeltrenneffekt ausgewirkt, daß wir mit einer sehr hohen Salzkonzentration gearbeitet haben. Die Versuchslösung bestand zu 32% aus $MgBr_2$. Möglicherweise haben sich Geschwindigkeits- und Konzentrationseffekte teilweise gegenseitig aufgehoben.

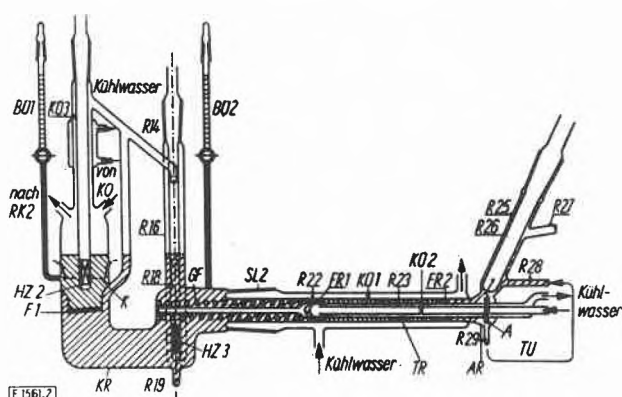


Abb. 18. Gegenstromelektrolyseur nach MARTIN und HARMSSEN

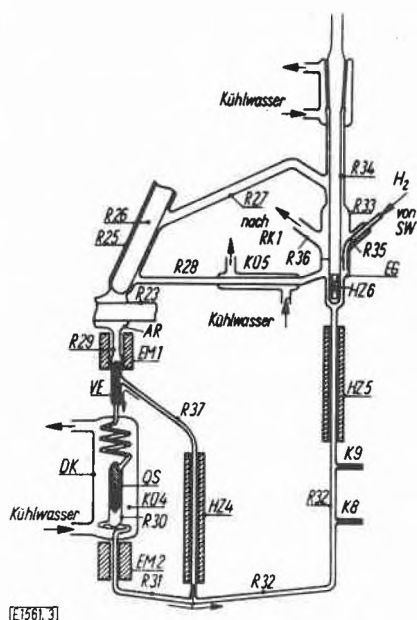
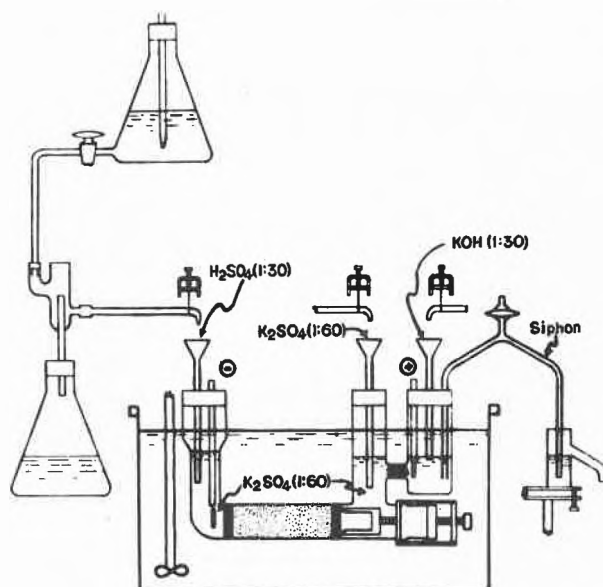


Abb. 19. Thermosiphonumlauf der Anodenlösung mit Dichtkontrolle und Verdampfer nach MARTIN und HARMSSEN

In einem weiter zurückliegenden Trennversuch, den wir allerdings nicht in der Art der gerade beschriebenen Gegenstromelektrolyse im geschlossenen System durch-

führen konnten, hatten wir mit 20prozentiger $MgSO_4$ -Lösung als Elektrolytflüssigkeit gearbeitet. Bei diesem Versuch hatten wir $\Delta w/w = 0,0024$ gefunden.

Versuche, die im Grundprinzip mit den unseren identisch sind, hat schon während des Krieges A. K. BREWER mit einer großen Zahl von Mitarbeitern am National Bureau of Standards in Washington angestellt. Abb. 20 zeigt eine typische Versuchsanordnung für die Anreicherung von ^{39}K mit K_2SO_4 als Elektrolyt. Mit einer derartigen Versuchsanordnung konnte in einem 500-Stunden-Versuch das Häufigkeitsverhältnis $^{39}K/^{41}K$ in der Kathodenlösung von 14,2 auf 24 erhöht werden; $\Delta w/w = 0,0038$. Bei einem anderen Trennversuch mit $NaCl$ als Elektrolyt wurde ^{35}Cl von 75,76 auf 80,7% angereichert; hier war $\Delta w/w = 0,0021$.



$$\frac{w_1}{w_2} = \sqrt{\frac{m_2}{m_1}} \quad (3)$$

Experimentell gefundene Isotopieeffekte werden in der Literatur häufig mit denjenigen verglichen, die sich nach Gl. (3) aus dem Massenverhältnis der Isotope errechnen. So haben BREWER und Mitarbeiter, indem sie für m_1 und m_2 die Massen der hydratisierten Ionen setzten, für die Trennung der Kaliumisotope einen Einzeltrenneffekt

$$\Delta w/w = \frac{w(^{39}\text{K})}{w(^{41}\text{K})} - 1 = \sqrt{\frac{m(^{41}\text{K} + 7\text{H}_2\text{O})}{m(^{39}\text{K} + 7\text{H}_2\text{O})}} - 1 = 0,006$$

berechnet, der in der Tat nicht allzu sehr vom experimentell gefundenen Wert $\Delta w/w = 0,0038$ abweicht.

Wir haben uns gesagt: Wenn diese Vorstellungen richtig sind, dann müßte sich ein Yttrium-Dysprosium-Gemisch in einer Trennanlage, wie wir sie für die Anreicherung von ^{26}Mg benutzt haben, spielend trennen lassen. Y und Dy haben nämlich bei fast identischen Ionenradien (1,06 und 1,07 Å) sehr verschiedene Massen: 88,92 und 162,46. Nach Gl. (3) sollte man für ein Y-Dy-Gemisch, selbst wenn man mit stark hydratisierten Ionen rechnet, große $\Delta w/w$ -Werte erwarten dürfen. Für die Hydratationszahl 10 ergibt sich

$$\Delta w/w = \frac{w(\text{Y})}{w(\text{Dy})} - 1 = \sqrt{\frac{m(\text{Dy}^{+++} \cdot 10\text{H}_2\text{O})}{m(\text{Y}^{+++} \cdot 10\text{H}_2\text{O})}} - 1 = 0,13,$$

d. i. das Hundertfache des $\Delta w/w$ -Werts, den wir für die Magnesiumisotope in konzentrierter MgBr_2 -Lösung gefunden haben. Beeinträchtigungen eines so großen Masseneffektes durch möglicherweise entgegengesetzt gerichtete Effekte der nicht ganz identischen Ionenradien brauchten wir kaum zu befürchten. Seltene Erden mit so eng benachbarten Ionenradien wie Y und Dy sind nämlich durch Ionenwanderung (ebenso wie nach chemischen Methoden) nur schwer zu trennen; die alten KENDALLSchen Versuche und neuere Gegenstrom-Trennversuche von CLUSIUS und RAMIREZ an Praseodym-Neodym-Gemischen haben das gezeigt.

Zum Abschluß möchte ich nun das Ergebnis eines vor kurzem durchgeführten Versuchs zur Trennung eines Y-Dy-Gemischs durch Gegenstromelektrolyse mitteilen⁴. Die Trennmethode war sehr ähnlich derjenigen, die sich bei der ^{26}Mg -Anreicherung bewährt hatte; auch die Trennanlage war der anhand der Abb. 17, 18 und 19 beschriebenen ähnlich. Als Versuchslösung benutzten wir eine 0,1-molare Bromidlösung, die außer YBr_3 und DyBr_3 eine kleine Menge Terbiumbromid enthielt⁵.

Das aus Abb. 21 ersichtliche Ergebnis des insgesamt 18 Tage in Betrieb gewesenen Trennversuchs ist überraschend: Das schwere Dy reichert sich keineswegs dort an, wo sich früher das schwere ^{26}Mg angereichert hatte, nämlich im Anodenraum, sondern im Kathodenraum!

⁴ Ausführliche Veröffentlichung gemeinsam mit H.-J. LÜBKE demnächst a. a. O.

⁵ Das Seltenerdgemisch war uns von der Firma Th. Goldschmidt AG, Essen, zur Verfügung gestellt worden.

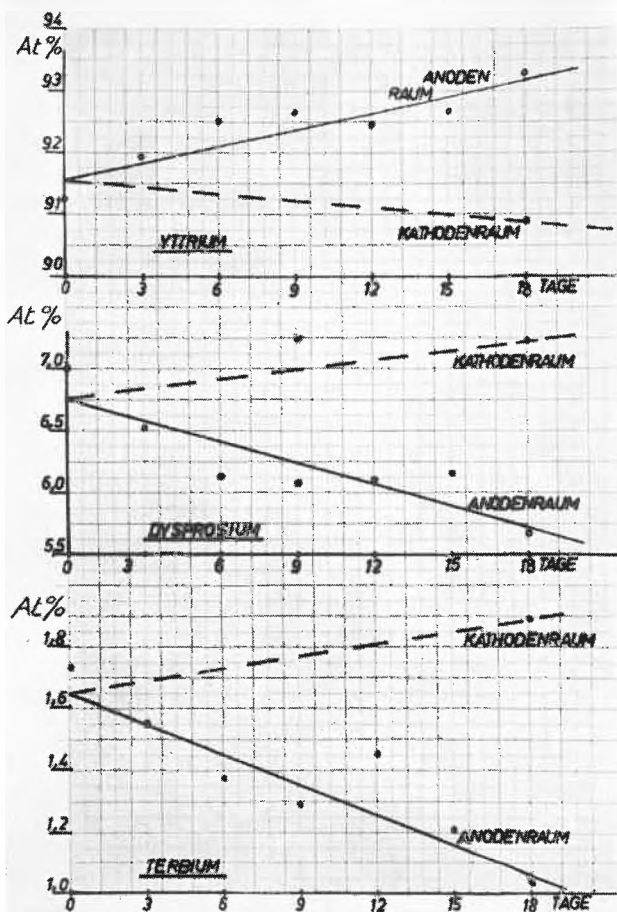


Abb. 21. Zeitlicher Verlauf der gegenstromelektrolytischen Trennung eines Y-Dy-Tb-Gemischs (MARTIN und LÜBKE)

Tabelle 1

Ion	Radius (Å)	Masse	Relative Beweglichkeitsdifferenz
Y^{+++}	1,06	88,9	$\frac{w(\text{Y})}{w(\text{Dy})} - 1 = -0,0026$
Dy^{+++}	1,07	162,5	$\frac{w(\text{Dy})}{w(\text{Tb})} - 1 = -0,0033$
Tb^{+++}	1,09	158,9	

Ein Blick auf Tabelle 1 lehrt, daß für die Trennung des Yttriums vom Dysprosium Betrag und Vorzeichen des Einzeltrenneffektes nicht entfernt dem entsprechen, was man bei einer auch nur annähernden Gültigkeit der Beziehung (3) hätte erwarten sollen. Tabelle 1 lehrt weiter, daß die große Massendifferenz, die zwischen Y und Dy, nicht aber zwischen Dy und Tb besteht, sich auf den Gang in den Ionenbeweglichkeiten nicht auswirkt. Offenbar wird das Vorzeichen und halbquantitativ sogar die Größe der Trenneffekte durch die winzigen Unterschiede in den Ionenradien bestimmt. Wenn das so ist, dann ist das Trennergebnis plausibel: Das in der Reihenfolge Y, Dy, Tb kleinste Ion (Y^{+++}) ist am stärksten hydratisiert und ist daher auch das langsamste.

Aus dem Ergebnis des Y-Dy-Tb-Trennversuchs folgt allgemein, insbesondere auch für Isotopengemische, daß der Masseneinfluß auf die Ionenbeweglichkeit durch die keine Eigenschaft des Lösungsmittels enthaltende Gleichung (3) nicht richtig wiedergegeben wird, jedenfalls nicht bei Ionen, deren Masse groß gegen die der Solvens-

molekel ist. So stoßen wir auch bei der elektrophoretischen Trennung gelöster Isotope wieder auf die Notwendigkeit, dem Lösungsmittel – hier seinem Einfluß auf den gaskinetischen Masseneffekt und auf Solvatations- und andere möglicherweise isotopenspezifische Ionen-Gleichgewichte – besondere Beachtung zu schenken.