

Papirna elektroforeza

Inž. kem. Janez Beravs

V prvi številki letnika 1957 naše revije smo pri obravnavanju papirne kromatografije omenili, da se tudi papirna elektroforeza vse bolj uporablja kot sodobna in eksaktna analitična metoda v kriminalistični tehniki. Preden bomo govorili o uporabnosti in uporabi papirne elektroforeze v kriminalistiki, se moramo vsaj delno seznaniti s teoretičnimi osnovami in osnovnimi delovnimi metodami papirne elektroforeze.

Teoretične osnove:

Elektroforezo imenujemo pojav, da ioni in koloidi, pa tudi drugi večji delci snovi, ki so suspendirani v kakšni tekočini, potujejo v električnem polju — odvisno od predznaka svojega naboja — proti anodi ali katodi. V enakih delovnih pogojih ne potujejo vsi delci enako hitro. Različno nabiti delci potujejo z različno hitrostjo in se med potovanjem ločijo v posamezne skupine — frakcije. Elektroforeza je torej enostavna separacijska metoda, ki jo uporabljamo tedaj, kadar imamo opravka z mešanico kemično sorodnih snovi, ki jih s klasičnimi metodami analitske kemije ne moremo uspešno razdeliti. Na potovanje iona v raztopiti v električnem polju učinkujejo različni vplivi, ki potovanje lahko pospešujejo ali pa ovirajo. Te vplive lahko razdelimo v tri različne skupine. V prvo vrsto spadajo lastnosti, ki jih ima ion sam. To so naboj iona, njegov predznak, velikost in

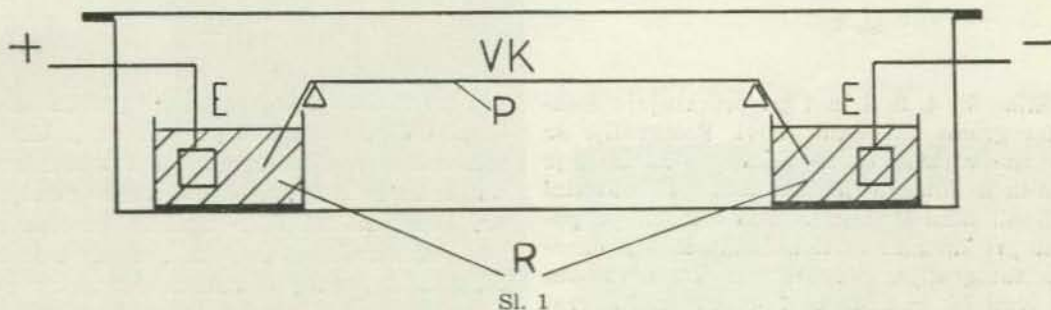
oblika, sposobnost razkroja in njegovo amfoterno zadržanje.

V drugo skupino spadajo vplivi okolice, ki ji je ion izpostavljen. To so elektrolitska koncentracija, ionska jakost, dielektrične lastnosti, pH vrednost, temperatura, viskoznost in zlasti navzočnost ter vpliv nepolarnih molekul.

V tretjo skupino pa spadajo vplivi vrste uporabljenega električnega polja, njegova jakost, čistost komponent izmeničnega toka in njegova porazdelitev vzdolž poti iona.

Delovne metode:

Danes poznamo že vrsto aparatov in postopkov, ki nam omogočajo praktično uporabo elektroforeze v kemični analitiki. Izmed vseh znanih metod se v kriminalistični praksi najbolj uporablja tako imenovana »papirna elektroforeza v vlažni komori«. Uvedli smo jo tudi v našem laboratoriju. Pri tej metodi potujejo ioni v določenem poroznem mediju, katerega pore so napolnjene s puferno raztopino. Kot porozni medij se uporablja poseben filtrirni papir, dalje papir iz steklenih vlaken, tkanine iz svile, bombaža in umetnih vlaken ter drugi porozni materiali. Pri tem postopku se ločijo posamezne komponente (frakcije) preiskovane snovi večinoma v lepo separirane cone. Za naše potrebe je ta metoda pomembna predvsem zato, ker rabi majhne količine preiskovane snovi. Shemo takšne aparature prikazuje slika št. 1.



Papirni trak »P« je vodoravno obešen v zaprti posodi iz plastične snovi. V notranjosti te posode — vlažne komore »VK« — je atmosfera nasičena z vlagami, kar preprečuje izhlapevanje topila iz papirnega traku. Oba konca papirnega traku sta pomočena v puferno raztopino »R«, ki je v obeh elektrodnih posodah »E«. Tudi naša aparatura, ki jo je izdelal dr. ing. L. Strauch iz Inštituta »Jožef Štefan« v Ljubljani, je narejena po tem načelu. Aparatura je razvidna iz slike št. 2.

Praktična uporaba:

V našem laboratoriju smo se ukvarjali le z elektroforezo črnih. Delali smo z naslednjimi pufernimi raztopinami:

pufer pH: 1,9 = 30 ml 80 % mravljinčne kisline + 120 ml ledocta + 150 ml acetona v 1000 ml H₂O, napetost 1500–1800 V, čas 20 minut, temperatura 15° C;

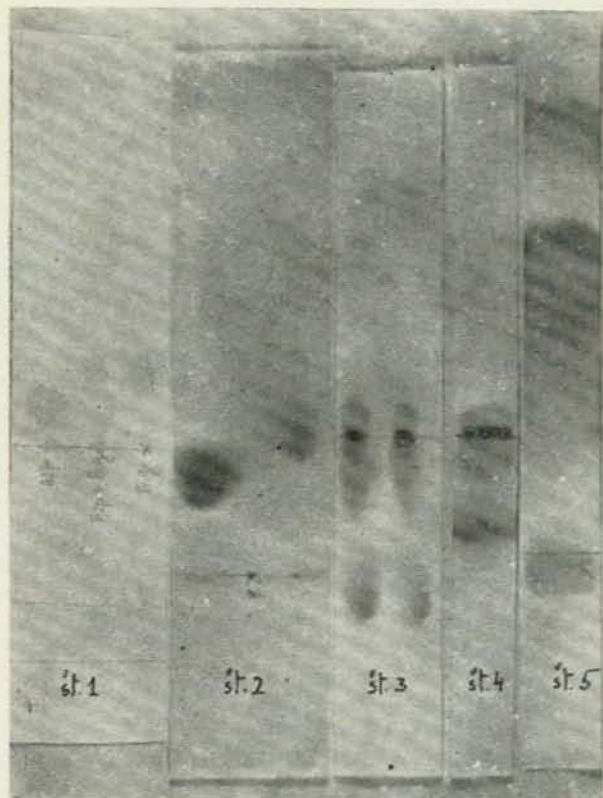
pufer pH: 4,9 = 10 ml piridina + 8 ml ledocta v 3000 ml H₂O, napetost 300 V, čas 4 ure, temperatura 20° C;

pufer pH: 8,6 = 5,88 g Na-veronal + 3,88 g Na-acetat + 1,38 g K-oksalat + 2 ml conc., HCl v 1000 ml H₂O, napetost 100 V, čas 4 ure, temperatura 18° C.

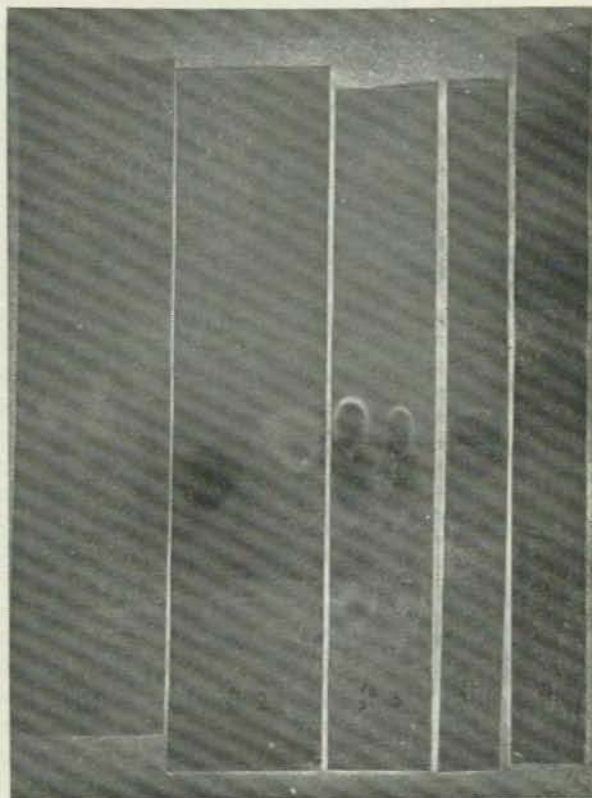
Še najbolj zadovoljive rezultate smo dobili pri delu s puferji pH 4,9 in pH 8,6.

Slika št. 3 prikazuje elektroferogram modrih črnih in barvnih tušev, izdelan pri upo-

rabi puferja pH 4,9. Primerjava posameznih elektroferogramov nam pokaže, da so razlike tako očitne, in to v smeri in dolžini poti ter v barvnih tonih, da nam lahko takšen elektroferogram povsem zanesljivo služi kot materialni dokaz o identičnosti oziroma neidentičnosti različnih črnih.



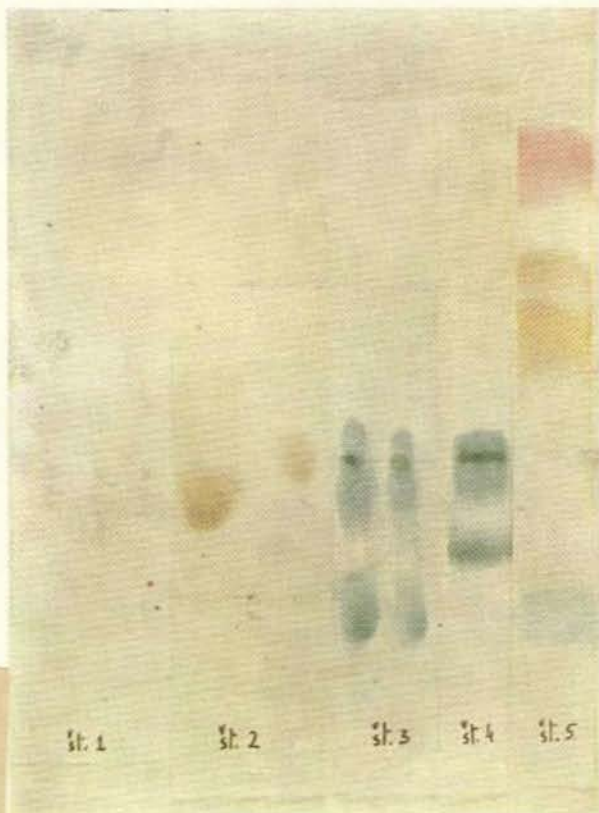
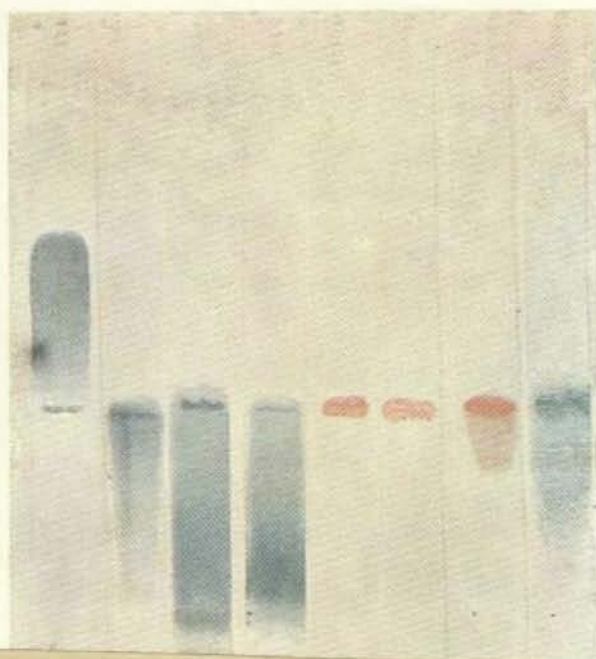
Sl. 2



Sl. 3

Slike št. 4, 5, 6 in 7 pa prikazujejo elektroferograme različnih snovi. Fotografije so izdelane v različnih tehnikah. Slika št. 4 je črno-bela fotografija, posneta pri navadni svetlobi, slika št. 5 je barvna fotografija, posneta pri navadni svetlobi, slika št. 6 je črno-bela fotografija, posneta pri kratkovalovni UV svetlobi, in slika št. 7 je barvna fotografija, posneta pri kratkovalovni UV svetlobi. Elektroferogram št. 1 na omenjenih slikah nam kaže separacijo polipeptidov z visokotlačno elektroforezo pri napetosti 1800 V v puferju pH: 1,9. Elektroferogram št. 2 prikazuje separacijo sladkorjev glukoze in galaktoze pri napetosti 300 V v boratnem puferju pH: 8,6. Elektroferograma št. 3 in št. 4 kažeta separacijo barvil črnih, eluiranega iz peresa, ki se je uporabljalo za pisanje z modrimi, zelenimi in rdečimi črnili. Iz elektroferograma, zlasti iz tistega, ki je bil izdelan

v barvni fotografiji, posneta pri kratkovalovni UV svetlobi, se lepo vidi, da je bila dosežena separacija osnovnih komponent zmesi teh črnih že po dvajsetminutnem razvijanju pri napetosti 300 V in uporabi puferja pH: 8,6. Elektroferograma št. 3 in št. 4 se razlikujeta le po načinu nanosa. Na elektroferogram št. 3 je bil nanos izvršen točkasto, na elektroferogram št. 4 pa črtasto. Elektroferogram št. 5 kaže separacijo barvil: bromfenol modro, bromkrezol zeleno, krezol rdečo, krezol škrlatno in kisli fuksin, naneseni v zmesi iz ekvivalentnih delov. Uporabljena napetost je bila 300 V v puferju pH: 4,9. Že iz navedenih rezultatov je razvidno, da se bo lahko elektroforeza v polni meri uveljavila v naši analitski praksi, zlasti še zaradi tega, ker omogoča zelo široko območje analize. V nadaljnjem bi na kratko navedel področja,

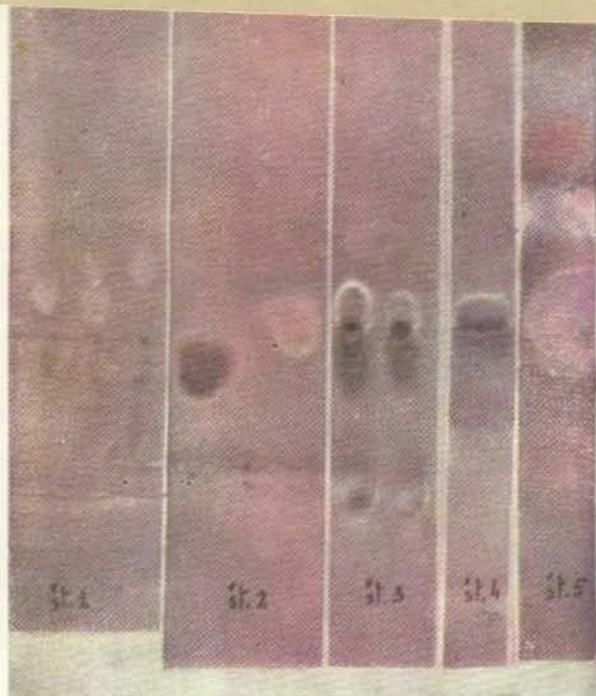


POPRAVEK. V članku *Papirna elektroforeza* je na strani 36 pravilno oštevilčenje slik takole: leva slika 4 (ne 2 kot je tiskano), desna 6 (ne 3), ker so slike 2, 3, 5 in 7 priložene v barvnem tisku.

Slika šte. 3 (levo zgoraj):
Elektroferogram modrih črnih in barvnih tušev

Slika šte. 5 (desno zgoraj):
Elektroferogram različnih snovi: polipeptidov (1), glukoze in galaktoze (2), zmes modrih, zelenih in rdečih črnih (3) in (4), zmes barvil bromfenol-modro, bromkrezol-zeleno, krezol-rdeče, krezol-purpur in kisli fuksin (5)

Slika šte. 7 (levo spodaj):
Isti elektroferogram kot desno zgoraj, le da je slika posneta pri kratkovalovni UW svetlobi



Izgled naše aparature za elektroforezo



kjer se elektroforeza že danes uspešno uporablja.

Anorganske spojine:

Znane so elektroforetske separacije vseh važnejših kationov in anionov. Lederer je raziskal elektroforezo posameznih ionov v 1 M HCl in 0,42 M HBr. Drugi avtorji so raziskovali ločitve v slabih elektrolitih, na primer v 0,1 M mlečni kislini. Ravno pri tej ločitvi je bilo ugotovljeno, da potujejo posamezni kationi v naslednjem vrstnem redu, pri čemer je prvi kation najhitrejši: Cs-Rb, Ra-Ba-Sr, Ni-Zn, Ce-Pm-Pr-Eu itd. Ločitev Cu, Pb, Cd, Bi in Hg so dosegli v M/2 HCl pri napetosti 270 V v 15 minutah. Ločitev Ti, V in Mo so izvedli tudi v M/2 HCl, ki je vsebovala 10 % vodikovega peroksida, pri 110 V v 50 minutah. Peroksid je bil dodan zato, ker tvorijo te kovine s peroksidom obarvane komplekse. Izvedli so tudi že elektroforetsko separacijo redkih elementov, radioaktivnih elementov in produktov radioaktivnega razpada. Separacijo anionov so izvedli z uporabo različnih puferjev. Sulfatni, fosfatni, selenitni in teluritni anioni so bili ločeni v M/2 HCl pri napetosti 150 V v 2 urah.

Organske kisline:

Barnet je ločil v 3 M amonijevem hidroksidu pri napetosti 300 V maščobne kisline C₁₀, C₁₄ in C₁₂. V 0,5 M natrijevem karbonatu se ločijo derivati keto-kislin. Izvedene so bile tudi ločitve dikarbonskih in trikarbonskih kislin.

Ogljikovi hidrati:

Monosaharide sta elektroforetsko ločila Consden in Stanier v boratnih puferjih nad 8,6 pri jakosti električnega polja 10 V/cm. Foster je ločil metil estre monosaharidov od disaharidov v boratnem puferju pH 10. Iz literature poznamo nadalje še ločitve polivalentnih alkoholov, glikogena, galaktogena itd.

Dušikove spojine:

Weber je ločil glikokol, meskalin, feniletamin, histamin, kadaverin, dimetilamin v citratnem puferju pH 3,8. Derivate indola iz rastlinskih ekstraktov so ločili v fosfatnem puferju pH 7,0. Ločitev sulfanilamidov v mešanici s humanim serumom so izvedli v veronalnem puferju pri pH 8,6. Elektroforeza aminokislin in peptidov pozna že celo vrsto elektroforetskih postopkov.

Alkaloidi:

V N/5 boratnem puferju pri pH 8,6 so ločili skopolamin in hiosciamin. V citratnem puferju pH 3,5 se ločita brucin in strihnin.

Kariyone je izčrpno raziskoval papirno elektroforezo alkaloidov in je uspešno ločil 30 različnih alkaloidov. Lederer je ločil v 5 N očetni kislini kurare alkaloida iz Strychnos trinerva. Znane so tudi elektroforetske separacije derivatov kodeina in efedrina.

Proteini:

Te snovi so ozko povezane z zgodovino elektroforeze, saj je prav ta omogočila njihovo ločitev, kajti prvi elektroforetski poskusi so obsegali prav ločitve proteinov. Pri elektroforezi proteinov se uporabljajo skoraj vse znane vrste puferjev v območju pH 1 do pH 10. Ker so proteini večinoma brezbarvne substance, jih v papirni elektroforezi barvamo navadno s kislimi organskimi barvili: bromfenol modro, azokarmin B, amidočrno 10 B itd.

Elektroforezo uporabljamo najpogosteje za ločitev krvnih beljakovin v albumine in globuline. Ločitev opravimo v veronalnem puferju pH 8,6 pri napetosti 100 do 200 V v času 5 do 20 ur. Ta metoda je postala v zadnjih letih ena izmed osnovnih analitskih metod vsakega biokemičnega in kliničnega laboratorija. Za naše delo je zlasti pomembna ugotovitev, da so se nekateri avtorji, kot R. Camba, A. Paoletta in A. Fiori, ukvarjali z elektroforezo in kromatografijo krvnih madežev živalskega in človeškega izvora ter z elektroforezo sperme, kar vse bo zelo koristilo našim kriminalističnim preiskavam. Nadalje so znane že tudi separacije lipoproteinov, fibrinogena, lizocima, glukoproteinov, hemoglobina, jajčnih beljakovin in številnih drugih proteinov, virusov in encimov.

Nukleinske kisline:

Ločitve potekajo v veronal-acetatnem puferju pH 2,5.

Znane so nadalje tudi ločitve antibiotikov streptomocinske vrste v acetatnem puferju pH 5, dalje triterpenoidov in steroidnih spolnih hormonov.

Barvila:

Elektroforetske ločitve potekajo tako v alkalnih kot v kislinskih puferjih. V 0,1 M amonijevem hidroksidu pH 11,1 so ločili eozin v tri frakcije. Prav tako so ločili mešanice eozina Y in kristalnovijoličnega fuksina. Ločijo se tudi metil oranžna, fenolfalein, bromfenol modra, krezol rdeča in druge.

Iz navedenih podatkov vidimo, da je področje elektroforetske analize zelo obširno, da se da uspešno uporabljati tudi pri kriminalističnih preiskavah in da zlasti po hitrosti daleč presega običajne kemično-analitske postopke.

Uporabljena literatura:

L. Strauch: Elektroforeza in sorodne analitske metode.
Minerva Medicolegale — Archivio di antropologia criminale, psichiatria e medicina legale — letnika 1956 in 1957.

M. Lederer: Introduction to Paper Electrophoresis and Related Methods.
R. J. Block: A Manual of Paper Chromatographie and Paper Electrophoresis.

Electrophoresis of Paper

By Ing. Chem. Janez Beravs

The article deals briefly with the theoretical basis, the working methods and the practical application of electrophoresis of paper as a method of chemical analysis. The article emphasises the applicability of the

electrophoresis of paper in criminal examinations and describes the first attempts at electrophoretic analysis in our laboratories.