

CHROM. 6428

## QUANTITATIVE ANALYSE VON DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAMMEN MIT GERINGEN $^{14}\text{C}$ -AKTIVITÄTEN DURCH Ag-AKTIVIERUNG UND Hg-INDIZIERUNG DER AUTORADIOGRAMME

L. HAIKAL

*Atominstytut der Österreichischen Hochschulen, Wien (Österreich)*

UND

O. BOBLETER

*Institut für Physikalische Chemie-Radiochemie, Universität Innsbruck (Österreich)*

(Eingegangen am 17. Oktober 1972)

---

### SUMMARY

*Quantitative analysis of thin-layer chromatograms with low  $^{14}\text{C}$ -activities by silver activation and mercury labeling of the autoradiograms*

The concentration of  $^{14}\text{C}$ -labeled sugars (glucose, fructose, and xylose) on thin-layer chromatograms was determined with autoradiograms (contact method; eight days' exposure). Since photodensitometric measurements did not give the precision required, the silver content of the radiograms was determined directly by neutron activation analysis. This method reduces error and facilitates the analytical procedure but requires a long decay time. The precision of the measurements was increased by application of a mercury multiplication solution ( $^{203}\text{Hg}$ -labeled) on the autoradiograms. The mercury activity can be determined immediately after exposure. The graph obtained by plotting the logarithm of the concentration against the mercury activity has a linear region from  $10^{-4}$  to  $10^{-2}$   $\mu\text{Ci}$ .

---

### EINLEITUNG

Im Rahmen einer Arbeit über die Auftrennung von  $^{14}\text{C}$ -markierten Kohlenhydraten (Glucose, Xylose, Fructose usw.) war die Erzielung von hoher Genauigkeit der quantitativen Ergebnisse von besonderem Interesse. Darüber hinaus war es wünschenswert, die Dünnschichtchromatogramme, auf denen die einzelnen Kohlenhydrate aufgetrennt vorliegen, für weitere Untersuchungen unbeschädigt zu erhalten.

Vielfach wiesen die Proben einen  $^{14}\text{C}$ -Gehalt von weniger als  $10^{-3}$   $\mu\text{Ci}$  auf. Die Bestimmung dieser geringen Aktivitäten war eine zusätzliche Schwierigkeit der Aufgabenstellung.

Nur verhältnismässig wenig Methoden erfüllen diese Voraussetzungen. Die üblichen "Chromatogram-Scanner" erfordern das Zerschneiden grösserer Chromatogramplatten und lassen sehr oft an Genauigkeit zu wünschen übrig. Es bot sich daher für die Lösung dieses Problems vor allem die Anfertigung von Autoradio-

grammen an. Damit war jedoch auch das Problem der quantitativen Auswertung von der Dünnschichtplatte<sup>1</sup> auf das Autoradiogramm übertragen.

#### *Herstellung der Dünnschichtchromatogramme und Autoradiogramme*

Aus Glucose, Fructose und Xylose wurden  $8,76 \cdot 10^{-2}$  (bzw.  $0,876 \cdot 10^{-2}$ ) molare Lösungen hergestellt, die mit den jeweiligen  $^{14}\text{C}$ -markierten Verbindungen (D- $^{14}\text{C}$ -Glucose, usw.) indiziert wurden, so dass sie  $2 \mu\text{Ci/ml}$  (bzw.  $0,2 \mu\text{Ci/ml}$ ) enthielten. Von jeder dieser Lösungen wurde eine Verdünnungsreihe auf eine Kunststoff-Dünnschichtplatte (Type Merck, 254, Kieselgur) in  $5\text{-}\mu\text{l}$  Portionen aufgetragen. Die geringste applizierte Menge der Glucose enthielt demnach z.B.  $7,88 \mu\text{g}$  (bzw.  $0,788 \mu\text{g}$ ) und hatte eine Aktivität von  $1 \cdot 10^{-3} \mu\text{Ci}$  (bzw.  $1 \cdot 10^{-4} \mu\text{Ci}$ ). Auf der Dünnschichtplatte wurde daneben die doppelte, dreifache usw. bis zehnfache Menge aufgetragen und danach durch Einsetzen in das Laufmittel eineinhalb Stunden entwickelt. Das Laufmittel bestand aus Äthylazetat-Isopropanol-Wasser (111:52:40).

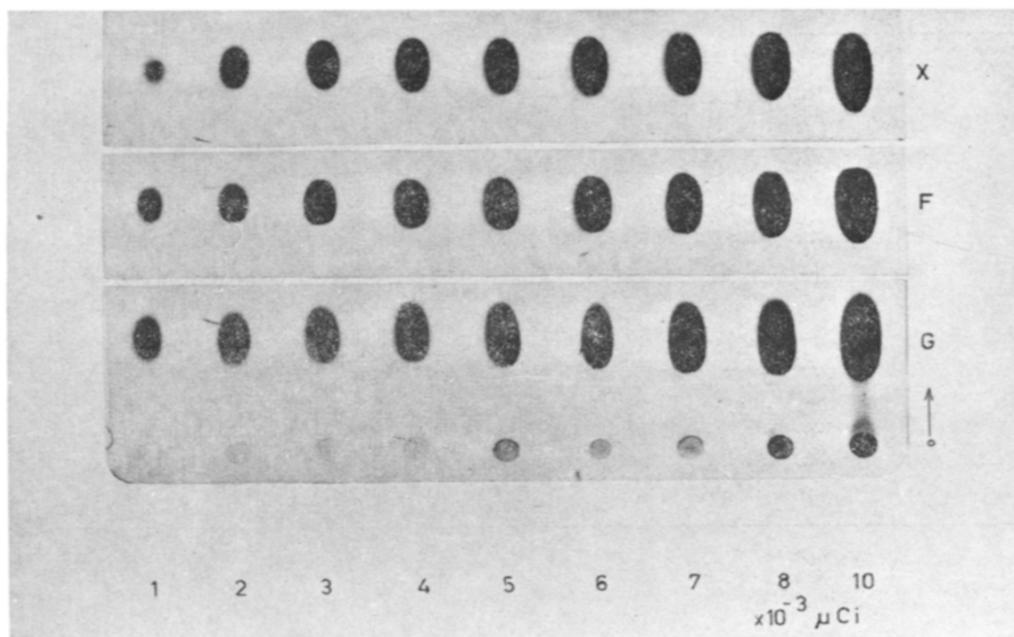


Fig. 1. Autoradiogramm der Dünnschichtchromatogramme von  $^{14}\text{C}$ -markierter Glucose (G), Fructose (F) und Xylose (X). Die Exposition des Filmes (Agfa, DW, Osray-Film) betrug acht Tage mit den angeführten Aktivitäten ( $1 \cdot 10^{-3}$ – $10 \cdot 10^{-3} \mu\text{Ci}$ ).

Nach dem Trocknen der Dünnschichtplatten wurden Autoradiogramme nach der Kontaktmethode<sup>2</sup> hergestellt, wobei die Expositionszeit infolge der geringen Strahlungsintensität acht Tage betrug. Als Filmmaterial wurden Agfa, DW, Osray-Filme verwendet. Ein Beispiel dieser Autoradiogramme ist in Fig. 1 wiedergegeben. Für die Fructose und Xylose wurde nur der Bereich der Flecken reproduziert.

#### *Chromatogrammmaktivität und Schwärzung des Filmmaterials*

Entsprechend der Belichtung des Filmmaterials mit sichtbarem Licht erhält man auch bei der Bestrahlung mit Betastrahlen sog. Schwärzungskurven<sup>3</sup>.

In Fig. 2a ist das densitometrisch ausgewertete Autoradiogramm eines Chromatogrammes wiedergegeben, das  $^{14}\text{C}$ -markierte Fructose steigender Aktivität enthielt. Wird die Bestrahlungsdosis als Exposition in logarithmischer Form aufgetragen (Fig. 2b), dann erhält man die typischen "Gradationskurven", wie sie aus der Photographie bekannt sind. Beide Darstellungen enthalten nur verhältnismässig

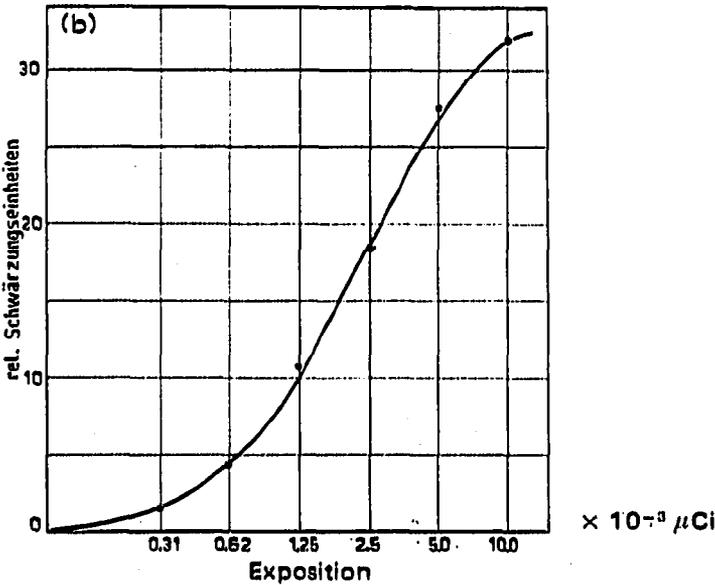
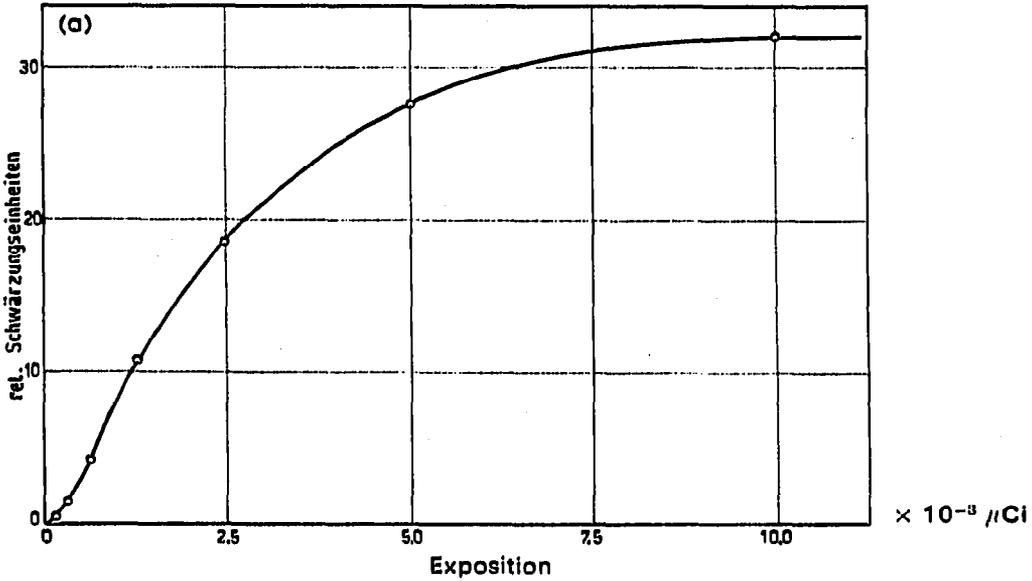


Fig. 2. Schwärzungskurve des Autoradiogrammes (Agfa, DW, Osray-Film) von  $^{14}\text{C}$ -markierten Fructosflecken einer Dünnschichtplatte, (a) Die Schwärzung ist in Abhängigkeit von der Exposition ( $1 \cdot 10^{-3}$ – $10 \cdot 10^{-3} \mu\text{Ci}$  und acht Tage) aufgetragen. (b) "Gradationskurve". Die Schwärzung ist in Abhängigkeit vom Logarithmus der Exposition aufgetragen. Messwerte wie in (a).

kurze gerade Abschnitte und verlangen daher für die quantitative Auswertung einer unbekanntenen Probe die Anfertigung von zahlreichen Vergleichsproben. Es sollte daher untersucht werden, inwiefern eine direkte Bestimmung des Silbers im Filmmaterial durch Aktivierungsanalyse und Indizierung der photodensitometrischen Methode überlegen ist.

#### AKTIVIERUNGSANALYTISCHE BESTIMMUNG DES SILBERS IM FILM

Durch die Neutronenaktivierung lässt sich das nach der Entwicklung des Autoradiogrammes vorhandene Silber quantitativ bestimmen. Zu diesem Zweck wurden die Filme im TRIGA Reaktor des Atominstiutes 3 h bei einem Neutronenfluss von  $1.7 \cdot 10^{12} \text{ n cm}^{-2} \text{ sec}^{-2}$  bestrahlt. Es erwies sich als vorteilhaft, das aktivierte Filmmaterial erst nach einigen Tagen (üblicherweise acht) zu messen<sup>4</sup>. Nach diesem Zeitraum waren nicht nur die kurzlebigen Silberisotope ( $^{108}\text{Ag}$ ,  $t_{1/2} = 2.3 \text{ min}$  und  $^{110}\text{Ag}$ ,  $t_{1/2} = 24 \text{ sec}$ <sup>5</sup>) völlig zerfallen, sondern auch die anderen aktivierbaren Elemente des Filmmaterials\* waren in ihrer Aktivität stark abgesunken.

Die Flecken wurden dann mit konstanter Flächengröße aus dem Film geschnitten und die langlebige Silberaktivität ( $^{110m}\text{Ag}$ ,  $t_{1/2} = 253 \text{ d}$ ) in einem Probenwechsler mit Geiger-Müller-Endfensterzähler gemessen. Mit fleckenfreien Filmstellen (gleicher Flächengröße) wurde der Leerwert bestimmt.

In Fig. 3 sind die auf diese Weise ausgewerteten Autoradiogramme wiedergegeben. Es ist auffallend, dass sich der lineare Bereich über eine Zehnerpotenz

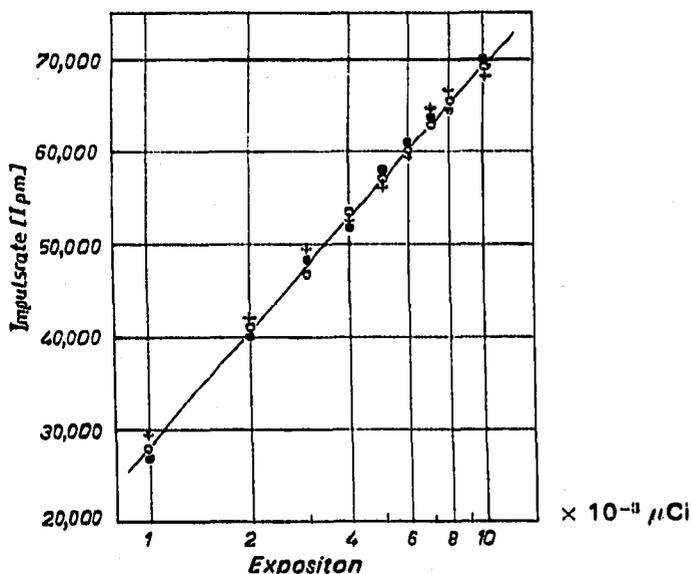


Fig. 3. Silberaktivierung des Autoradiogramms von  $^{14}\text{C}$ -markierten Glucose (●), Fructose (+) und Xylose (○) Dünnschichtchromatogrammen. Abhängigkeit der Silber-Aktivität in Impulsen per Minute (Ipm) vom Logarithmus der Exposition ( $1 \cdot 10^{-3}$ – $10 \cdot 10^{-3} \mu\text{Ci}$  und acht Tage). Filmmaterial: Agfa, DW, Osray-Film

\* Wir möchten nicht versäumen, der Firma Agfa Gevaert, Mortsel, für Auskünfte über die chemische Zusammensetzung des Filmmaterials zu danken.

erstreckt und daher wesentlich grösser ist als bei der photodensitometrischen Auswertung (Fig. 2b).

Den Vorteilen dieser Methode, wie z.B. vergrösserter linearer Bereich, stehen auch Nachteile gegenüber: verhältnismässig hoher Leerwert durch die im Filmmaterial befindlichen und eingebrachten (Entwicklung) aktivierbaren Elemente. Dadurch wird eine relativ lange Abklingzeit erforderlich.

INDIZIERUNG DES FILMBILDES MIT QUECKSILBER-203

Versuche, die bei der Exposition entstandene Silbermenge durch Silberindizierung und "physikalische Entwicklung"<sup>6</sup> nachzuweisen, bewährten sich wegen der relativ kleinen Silberaktivität und zu geringen Haftfestigkeit des Silbers nicht. Wir wählten daher die "Verstärkermethode", nämlich die Indizierung des Filmbildes mit Quecksilber.

Die sogenannten "Verstärker" werden in der photographischen Technik verwendet, um flauere Bilder mit geringer Deckkraft kontrastreicher zu gestalten<sup>7</sup>. Für quantitative Arbeiten ist ein "proportional arbeitender Verstärker", der die vorhandene Schwärzung proportional verstärkt, zu bevorzugen. Der gut bekannte Quecksilberverstärker (10 g HgCl<sub>2</sub> und 10 g KBr in 500 ml Wasser) eignet sich für diese Aufgaben in besonderem Masse.

Die Wirkung der Verstärkerlösung beruht darauf, dass die belichtete, entwickelte und fixierte Schicht in Folge der Umwandlung der Silberkörner in Silber-

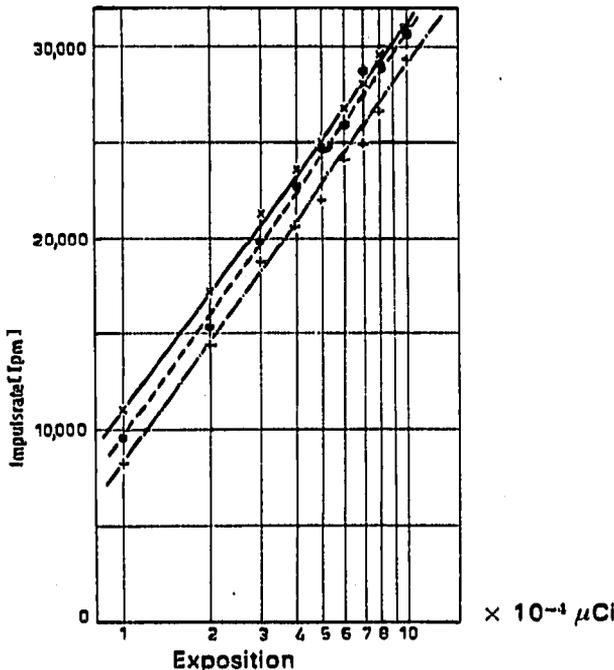


Fig. 4. <sup>203</sup>Hg-Indizierung eines Autoradiogramms (Agfa, DW, Osray-Film) von <sup>14</sup>C-markierten Glucose (x), Fructose (●) und Xylose (+) Dünnschichtchromatogrammen. Die Abhängigkeit der Quecksilber-Aktivität in IpM ist gegen den Logarithmus der Exposition aufgetragen (1 · 10<sup>-4</sup> - 10 · 10<sup>-4</sup> μCi und acht Tage).

bromid völlig ausbleicht, wobei eine äquivalente Menge von Quecksilber(I)bromid gebildet wird. Nach dem Wässern (das natürlich auch zwischen den vorhergehenden Entwicklungsschritten sorgfältig durchgeführt wird), taucht man den Film am besten in verdünnte Ammoniaklösung, was bezweckt, dass an den Stellen, an denen Quecksilber(I)bromid entstand, schwarzes Quecksilberamidobromid niederschlägt.

Wird die Verstärkerlösung mit aktivem  $^{203}\text{Hg}$  versetzt, so kann der Quecksilberniederschlag durch die vorhandene  $\gamma$ -Strahlung dieses Isotops bestimmt werden.

In Fig. 4 sind die Ergebnisse von  $^{203}\text{Hg}$ -indizierten und verstärkten Autoradiogrammen von Verdünnungsreihen bestimmter Kohlehydrate (Glucose, Fructose und Xylose) auf Dünnschichtchromatogrammen wiedergegeben.

Wie aus dieser Abbildung zu ersehen ist, wurde die Genauigkeit gegenüber der Silber-Aktivierung wesentlich erhöht. Zudem weist diese Methode den Vorteil auf, dass sie mit käuflichen  $^{203}\text{Hg}$ -Lösungen durchgeführt werden kann und einen wesentlichen Zeitgewinn erbringt.

#### DISKUSSION

Durch die beiden Methoden der Silber-Aktivierung und Quecksilber-Indizierung konnte gezeigt werden, dass ein verhältnismässig grosser linearer Bereich auftritt. Diese auch vom photographischen Standpunkt interessante Tatsache ist für die vorliegende analytische Aufgabe von besonderem Vorteil, da nicht eine ganze Eichkurve zur Bestimmung einer unbekannt Probe aufgenommen werden muss, sondern schon zwei Punkte im ausgewählten Schwärzungsbereich als Referenzgrösse genügen.

Die Quecksilber-Indizierungs-Methode weist neben dem Vorteil der Zeiterparnis und der Anwendbarkeit in Laboratorien, die über keine Neutronenaktivierungseinrichtungen verfügen, auch den Vorzug der verbesserten Genauigkeit auf. Dadurch konnten in Fig. 4 die Geraden für Glucose, Fructose und Xylose getrennt dargestellt werden. Dies bedarf jedoch einer Erklärung, da für die Verdünnungsreihen der drei Zucker die gleichen spezifischen Aktivitäten eingesetzt wurden. Wie aus einer geringen Schwärzung der Flecken-Laufstrecken in den Autoradiogrammen zu entnehmen ist, bleibt ein kleiner Teil der Substanz (und damit der Aktivität) auf dem vom Fleck zurückgelegten Weg. Da tatsächlich die Xylose-Flecken mit dem grössten  $R_f$ -Wert die kleinsten Impulszahlen nach der Indizierung des Filmes aufweisen, wird im Aktivitätsverlust auf der Laufstrecke die Erklärung für diesen Effekt zu suchen sein.

Die Quecksilber-Indizierung weist auch noch den Vorteil auf, dass durch die Aktivität der Quecksilbersalzlösung die Verstärkung in weiten Grenzen variiert werden kann.

Eine Optimalisierung des quantitativen Nachweises von  $^{14}\text{C}$ -markierten Dünnschichtchromatogrammen lässt sich daher verhältnismässig leicht erreichen.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Die Konzentration schwachaktiver  $^{14}\text{C}$ -markierter Zucker (Glucose, Fructose und Xylose) auf Dünnschichtchromatogrammen wurde über Autoradiogramme (Kontaktmethode; acht Tage Exposition) bestimmt. Da die photodensitometrische

Auswertung nicht die erforderliche Genauigkeit erbrachte, wurde der Silbergehalt der Radiogramme durch Neutronenaktivierungsanalyse ermittelt. Diese Methode verringert den Messfehler und erleichtert die Auswertung, erfordert jedoch lange Abklingzeiten. Durch Indizierung der Autoradiogramme mit einer Quecksilber-Verstärkerlösung (mit  $^{203}\text{Hg}$  versetzt) konnte die Messgenauigkeit weiter verbessert werden. Die Auswertung kann unmittelbar nach der Exposition durchgeführt werden. Zudem wird bei entsprechender Auftragung der Messwerte ein linearer Bereich über eine Zehnerpotenz der Konzentration gefunden.

## LITERATUR

- 1 E. STAHL, *Dünnschicht-Chromatographie*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1967, S. 133.
- 2 H. LAUDA, in E. BRODA UND T. SCHÖNFELD (Herausgeber), *Handbuch der mikrochemischen Methoden*, Bd. 2, Springer-Verlag, Wien, 1955, S. 378 ff.
- 3 R. H. HERZ, *The Photographic Action of Ionizing Radiation*, Wiley-Interscience, New York, 1969, S.167.
- 4 R. M. CHATTERS AND C. JACOBS, *Isotop. Radiat. Technol.*, 8 (1971) 309.
- 5 F. BAUMGÄRTNER, *Kerntechnik*, 3 (1961) 356.
- 6 G. JOOS UND E. SCHOPPER, *Grundriss der Fotografie und ihrer Anwendungen besonders in der Atomphysik*, Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt/Main, 1958, S. 15, 234.
- 7 R. M. CHATTERS UND C. JACOBS, *Photogr. Appl. Sci. Technol. Med.*, 4 (1970) 26 und 47.