

CHROM. 6480

## ZUR ANWENDUNG DER REMISSIONSSPEKTRALPHOTOMETRIE AM ISOLIERTEN TÜPFEL FÜR DIE QUANTITATIVE AUSWERTUNG VON DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAMMEN

GERHARD ACKERMANN UND WOLFGANG LÖWE

*Bergakademie Freiberg, Sektion Chemie, Lehrstuhl für analytische Chemie, Freiberg/Sachs. (D.D.R.)*

---

### SUMMARY

*Application of reflectance spectrophotometry to isolated spots for the quantitative evaluation of thin-layer chromatograms*

The quantitative evaluation of thin-layer chromatograms by reflectance measurements on the isolated test material has various advantages in comparison with *in situ* methods of determination.

The isolation of the spots on the thin-layer plate leads to the possibility of making measurements independent of the spot geometry and other factors. Also, operations can be carried out on the separated test material (e.g., homogenization, quantitative conversion with reagents, removal of disturbing excess of reagents), which considerably increase the reproducibility of the measurements. The efficiency of the procedure was demonstrated in several examples.

---

### EINLEITUNG

Die reflexionsspektralphotometrische Auswertung von Dünnschicht-Chromatogrammen *in situ* ist mit recht hohen Messfehlern behaftet, weil die Voraussetzungen für die Gültigkeit der hier anzuwendenden KUBELKA-MUNK-Funktion<sup>1</sup> nicht streng erfüllt sind.

Zur Umgehung dieser Mängel empfehlen FRODYMA *et al.*<sup>2-4</sup> ein Verfahren, das auf der Entnahme der angefärbten Flecken von der dünn-schichtchromatographischen (DC) Platte, Homogenisierung des isolierten Probematerials und dessen remissionsspektralphotometrischer Auswertung beruht. Die Verfasser konnten eine deutliche Verbesserung der Reproduzierbarkeit der Messwerte feststellen. Im Rahmen einer umfassenden Arbeit über die Anwendung der Remissionsspektralphotometrie in der Analytik<sup>5</sup> haben wir uns noch einmal ausführlich mit dem Verfahren von FRODYMA *et al.* beschäftigt und versucht, mögliche Fehlerquellen aufzufinden und sie zu eliminieren.

### EXPERIMENTELLES

Die Durchführung der Remissionsmessungen am isolierten Probematerial erfolgte mit dem Spektralphotometer VSU Z, VEB Carl Zeiss, Jena, unter Verwendung des Remissionsmessansatzes R O/r.

Um mit möglichst kleinen Probemengen arbeiten zu können, wurde ein zum Photometer passender Mikroprobenhalter entwickelt<sup>6</sup>, in dem die Schichtdicke der Probe variiert werden kann. Zur Füllung des Messraumes werden ca. 60 mg Trägermaterial (Kieselgel) benötigt, um eine "unendliche Schichtdicke" im Sinne der KUBELKA-MUNK-Funktion zu erzielen<sup>7</sup>.

Durch Verwendung heterogener Probekörper konnte die benötigte Probemenge bis auf 15 mg reduziert werden. Dabei erhöhte sich gleichzeitig die Empfindlichkeit des Verfahrens. Die heterogenen Messkörper setzen sich in diesem Falle aus einer oberen dünnen Schicht des von der DC-Platte abgekratzten Probematerials und einer unteren Schicht aus reinem Trägermaterial der gleichen Art zusammen. Dieser Teil hat die Aufgabe, eine "unendlich dicke" Schicht zu gewährleisten. Wie aus Fig. 1 hervorgeht, erhält man einwandfreie Eichgeraden. Das beweist, dass ganz offensichtlich die Präparation solcher inhomogener Probekörper keine Schwierigkeiten bereitet.

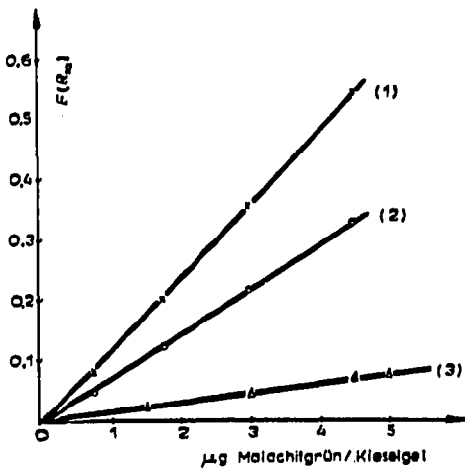


Fig. 1. Einfluss der Art des Probekörpers auf die Eichfunktion. (1) 20 mg Kieselgel; (2) 40 mg Kieselgel; (3) 100 mg Kieselgel (homogener Probekörper).

#### DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Abweichungen von der Proportionalität der KUBELKA-MUNK-Funktion  $F(R_\infty)$  ( $R$  = Reflexionsgrad) zur Oberflächenkonzentration treten dann auf, wenn bei der Messung der Probe gegen das Trägermaterial dessen Eigenabsorption nicht eliminiert wird<sup>1</sup>. Man muss daher an Stelle des relativen Remissionsgrades  $R'_\infty$  die absoluten Werte  $R_\infty$  in die KUBELKA-MUNK-Gleichung

$$F(R_\infty) = \frac{(1 - R_\infty)}{2R_\infty} \quad (1)$$

einsetzen, um Eichgeraden zu erhalten, wie das aus Fig. 2 hervorgeht. Dafür ist eine zusätzliche Messung des Trägermaterials gegen einen Weissstandard mit bekanntem absolutem Remissionsgrad notwendig. Der Ordinatenwert für die zu bestimmende Substanz ergibt sich aus der Differenz

$$F(R_\infty)_{\text{Substanz}} = F(R_\infty)_{\text{Substanz}} + \text{Träger} - F(R_\infty)_{\text{Träger}} \quad (2)$$

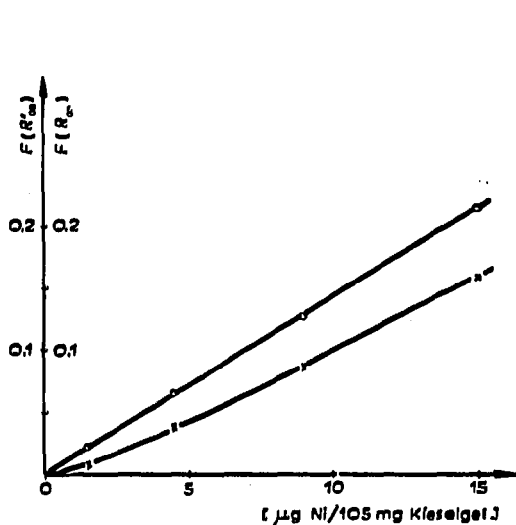


Fig. 2. Einfluss der Eigenabsorption des Trägermaterials auf die Eichfunktion:  $\times$ — $\times$ ,  $F(R'\infty)$ /Oberflächenkonzentration;  $\circ$ — $\circ$ ,  $F(R\infty)$ /Oberflächenkonzentration. Standard: Kieselgel,  $\lambda$  620 nm.

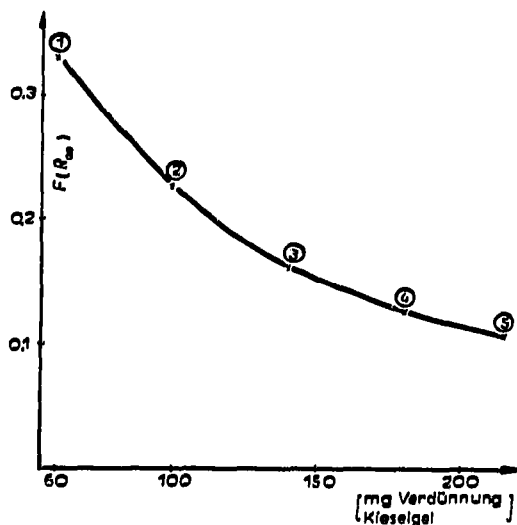


Fig. 3. Einfluss der Verdünnung auf den Remissionsgrad Nickel-Rubeanwasserstoff-Komplex auf Kieselgel. Oberflächenkonzentration:  $12 \mu\text{g Ni/mg Kieselgel}$ . 1–5: Probenummern.

und liefert eine Gerade, die dann unabhängig von der unterschiedlichen Eigenabsorption des Trägermaterials ist.

Im Gegensatz zu den amerikanischen Autoren haben wir stets eine der Tüpfelgröße angepasste Trägermenge von der Platte abgekratzt und dann mit Trägermaterial auf eine vorgegebene Masse ergänzt.

Wie die Verdünnungsreihe (Fig. 3) zeigt, besteht eine strenge Beziehung zwischen der Oberflächenkonzentration ( $\mu\text{g}$  Substanz/mg Träger) und der Probenmasse. Rechnet man z.B. die  $F(R\infty)$ -Werte auf eine einheitliche Trägermasse (Bezugspromenmasse) um, so erhält man bei einer Darstellung wie Fig. 3 eine Parallele zur Abszisse.

Durch diesen Zusammenhang wird das remissionsspektralphotometrische Verfahren am isolierten Probematerial unabhängig von der Fleckengröße, die durch Laufzeit, Weg, Auftragsvolumen und Dicke der Trägerschicht auf der DC-Platte beeinflusst wird. Ausserdem ist man in der Lage, die Proben so zu verdünnen, dass die Remissionsgrade in einem günstigen Messbereich liegen<sup>8</sup>. Während der Druck (bis maximal  $20 \text{ kp/cm}^2$ ) mit dem das Trägermaterial in den Probenhalter gepresst wird, ohne nennenswerten Einfluss ist, wird der Remissionsgrad vom Feuchtigkeitsgehalt der Probe deutlich beeinflusst. Beim Trocknen der DC-Platten bzw. des isolierten Probematerials muss aber berücksichtigt werden, dass sich beim Erwärmen die einzelnen Substanzen recht unterschiedlich verhalten.

Ein reversible Verringerung der Farbintensität trat z.B. bei dem am DC-Träger adsorbierten Nickel-Diacetyldioxim-Komplex auf. Der Eisen(II)-Dipyridyl-Komplex wurde bei höherer Temperatur praktisch vollständig zerstört. Eine Farbvertiefung trat hingegen beim Nickel-Rubeanwasserstoff-Komplex auf. Die bekannte

bathochrome Verschiebung des Extinktionsmaximums fanden wir z.B. beim Germanium-Phenylfluoron-Komplex und beim Zirkonium-Alizarin S-Lack.

Im Gegensatz zu FRODYMA *et al.*<sup>2</sup> stellten wir fest, dass eine im Achatmörser durch Verreiben hergestellte Mischung des Tüpfels mit dem Trägermaterial die KUBELKA-MUNK-Funktion nicht ganz exakt erfüllt, da eine gleichmässige Verteilung der Substanz über die Oberfläche des Sorbens gefordert wird. Sie kann durch Verreiben natürlich nicht erzielt werden. Ausserdem muss berücksichtigt werden, dass dabei ggf. eine Veränderung der Korngrösse auftritt, die nach Lit. 8 einen wesentlichen Einfluss auf die Messwerte ausübt.

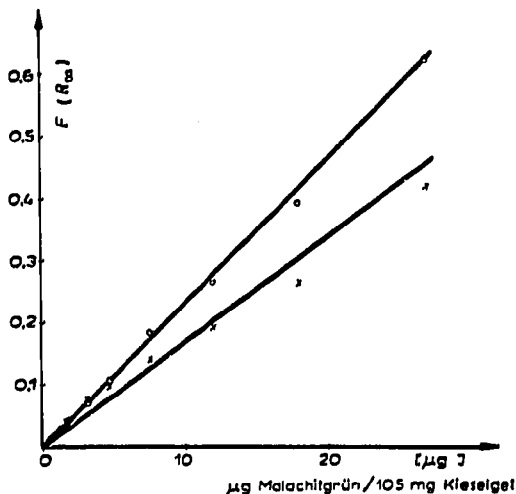


Fig. 4. Einfluss der Art der Homogenisierung Malachitgrün.  $\circ - \circ$ , Nass mit Alkohol homogenisiert;  $\times - \times$ , trocken homogenisiert.

Rascher, schonender und gleichmässiger kann die Homogenisierung erfolgen, wenn man beim Verreiben ein Lösungsmittel zugibt. Am Beispiel des auf Kiesegel chromatographierten Malachitgrüns (Fig. 4) erkennt man deutlich, dass die mit Lösungsmittel homogenisierten Proben eine höhere Lichtabsorption aufweisen, was auf eine gleichmässiger Bedeckung zurückzuführen ist. Ausserdem ist es möglich, bei der nassen Homogenisierung durch gleichzeitige Zugabe von Reagens eine bessere Anfärbung zu gewährleisten. Bei der beschriebenen Verfahrensweise muss also der Umsetzung mit dem Reagens auf der Platte nicht mehr die sonst übliche Aufmerksamkeit geschenkt werden. Da beim Besprühen der Platten mit einem Reagens bekanntlich nie eine völlig gleichmässige Färbung — besonders des Untergrundes — erreicht werden kann, ist es zweckmässig, bei schwerlöslichen Substanzen das überschüssige und meist störende Reagens nach der Umsetzung wieder auszuwaschen. Tabelle I beweist am Beispiel der Kobalt-Bestimmung mit Rubeanwasserstoffsäure, dass der Variationskoeffizient durch das angegebene Verfahren signifikant verringert werden kann.

Um einen Überblick über den Umfang der bei der Probenpräparation und bei der eigentlichen Messung auftretenden Fehler zu bekommen, sind die Variationskoeffizienten  $\nu$  der Einzelschritte bestimmt worden. Als Testprobe bei den Einzel-

TABELLE I

EINFLUSS DES UNTERGRUNDES AUF DIE PRÄZISION DER REMISSIONSWERTE; Co-BESTIMMUNG MIT RUBEANWASSERSTOFF ( $n = 11$ )

	$v$ (%)
0.5 %ige Reagenzlösung	2.2
0.1 %ige Reagenzlösung	1.6
Nach Auswaschen des Reagenzüberschusses	0.9

proben diente der Nickel-Rubeanwasserstoff-Komplex auf Kieselgel D, von dem ein grösserer Posten bereitet worden war.

Die Ergebnisse sind in Tabelle II zusammengestellt.

Unter Berücksichtigung der im Laufe der Untersuchung gewonnenen Erkenntnisse sind dann einige Modelle zur Ermittlung der zu erwartenden Gesamtfehler untersucht worden. Die Arbeitsvorschriften dazu sind in Lit. 5 zusammengestellt.

TABELLE II

GERÄTE- UND PRÄPARATIONSFEHLER

Messobjekt	Art des Fehlers	$v$ (%)
Milchglasstandard gegen Barytplatte	Gerätefehler	0.12
Testsubstanz gegen Kieselgel D	Gerätefehler	0.18
Einzelproben gegen Kieselgel D	Präparations- und Gerätefehler	0.23

#### Nickelbestimmung auf Kieselgel D nach Detektion mit Rubeanwasserstoff

Für 13.5  $\mu\text{g}$  Nickel ergab sich ein Variationskoeffizient von 2.9 %. Die Nachweisgrenze liegt für 100 mg Kieselgel D bei 0.28  $\mu\text{g}$ .

#### Lipidbestimmung durch Verkohlen mittels konz. Schwefelsäure bei erhöhter Temperatur

Für 120  $\mu\text{g}$  Ölsäure (als Modell) ergab sich ein Variationskoeffizient von 6 %. Die Nachweisgrenze wurde zu 7.3  $\mu\text{g}$  Ölsäure bei Verwendung von 80 mg Kieselgel D festgestellt.

#### Phenolbestimmung über die Reduktion von Eisen(III) und Detektion des Eisen(II) mit 2,2'-Dipyridyl

Für die Bestimmung von 16.5  $\mu\text{g}$  Hydrochinon ergab sich ein Variationskoeffizient von  $v = 5.9$  % und eine Nachweisgrenze von 0.15  $\mu\text{g}$  bei Verwendung von 100 mg Kieselgel D. Für 19.5  $\mu\text{g}$  Gallussäure lagen die entsprechenden Werte bei  $v = 6.3$  % und  $g = 0.07$   $\mu\text{g}$ .

#### ZUSAMMENFASSUNG

Die quantitative Auswertung von Dünnschicht-Chromatogrammen durch Remissionsmessungen am isolierten Probematerial weist eine Reihe von Vorteilen gegenüber den *in situ*-Bestimmungsmethoden auf.

Durch die Isolierung des Tüpfels von der dünnschichtchromatographischen-Platte ergibt sich die Möglichkeit, unabhängig von der Fleckengeometrie und anderen Faktoren zu messen. Es lassen sich am abgetrennten Probematerial auch Operationen ausführen (z.B. Homogenisierung, quantitative Umsetzung mit Reagenzien, Entfernung störender Reagenzüberschüsse), welche die Reproduzierbarkeit der Messwerte deutlich erhöhen. An einigen Beispielen wird die Leistungsfähigkeit des Verfahrens demonstriert.

## LITERATUR

- 1 G. KORTÜM, *Reflexionsspektroskopie*, Springer, Berlin, 1969.
- 2 M. M. FRODYMA, R. W. FREI UND D. J. WILLIAMS, *J. Chromatogr.*, 13 (1964) 61.
- 3 M. M. FRODYMA UND R. W. FREI, *J. Chromatogr.*, 15 (1964) 501.
- 4 M. M. FRODYMA UND R. W. FREI, *J. Chromatogr.*, 17 (1965) 131.
- 5 W. LÖWE, *Dissertation*, Bergakademie Freiberg, 1970.
- 6 G. ACKERMANN, W. KADEN UND W. LÖWE, *Jenaer Rundsch.*, 16 (1971) 26.
- 7 P. KUBELKA UND F. MUNK, *Z. Tech. Phys.*, 12 (1931) 593.
- 8 V. T. LIEU UND M. M. FRODYMA, *Talanta*, 13 (1966) 1319.