

visuellen Farben rot bzw. grün sind physikalisch somit ohne Belang und bezeichnen lediglich zwei häufige Grenzlagen der Absorptionsmaxima, bedingt durch zwei spezifische Kontrapolarisationen der $[(\text{Al},\text{Cr})\text{O}_6]$ -Gruppen. Alle angeführten Kristalle enthalten somit Cr als Cr^{3+} , und zwar, wie die Lagen der Maxima beweisen, in oktaedrischer Koordination. Hierbei ließen sich verschiedenartige $[(\text{Al},\text{Cr})\text{O}_6]$ -Positionen durch die Lage der Maxima unterscheiden (vgl. auch Tabelle 4). Ein Einbau von Cr^{3+} in Tetraederpositionen, wie er für Cr-Diopsid vorgeschlagen wird²⁰⁾, ist hiernach wenig wahrscheinlich. Da Ca-Diopside anscheinend allgemein merkliche Al-Gehalte aufweisen²¹⁾, wäre als Strukturformel vorzuschlagen: $\text{Ca}(\text{Mg},\text{Cr})_2[(\text{Al},\text{Si})_2\text{O}_6]$, z. T. auch wohl $\text{Ca}(\text{Na})(\text{Mg},\text{Cr})[\text{Si}_2\text{O}_6]$. Entsprechendes gilt für Cr-Amphibole (z. B. Smaragdit) u. a.

²⁰⁾ H. Strunz: Mineralog. Tabellen, Leipzig 1941, S. 204.

²¹⁾ C. Hintze: Handb. d. Mineralogie II, Vig. Veit. u. Co. 1897, S. 1102ff.

Von besonderem Interesse ist schließlich der Cr-Mullit²²⁾, dessen Spektrum nur Einbau von Cr^{3+} in die $[\text{AlO}_6]$ -Ketten || der c-Achse zuläßt, die seitlich teils durch $[\text{SiO}_4]$ (mit Hauptvalenzverknüpfung Si-O-Al), teils durch $[\text{AlO}_4]$ -Gruppen verknüpft werden. Das bedingt Kontrapolarisation der $[(\text{Al},\text{Cr})\text{O}_6]$ -Polyeder lediglich nach gewissen Gitterrichtungen (selektive Kontrapolarisation) und entspricht damit gut dem Pleochroismus „rot-grün“ der Cr-Mullit-Einkristalle. (Eine speziellere Behandlung dieser „gitter-selektiven“ Kontrapolarisation folgt in einer mineralogischen Zeitschrift.)

Als Untersuchungsgut dienten überwiegend Einkristalle (Natur- und Zuchtkristalle), die in Absorption vermessen wurden, teils auch Pulver (Mineral- und Sinterpulver), die in Remission²³⁾ vermessen wurden²⁴⁾. Als Meßgerät diente das vollautomatische Beckman-Spektral-Photometer, Modell DK 2, für dessen Beschaffung der Deutschen Forschungsgemeinschaft hiermit gedankt sei.

Eingegangen am 27. Januar 1958 [A 871]

²²⁾ A. Neuhaus u. W. Richardz, Ber. dtsh. keram. Ges. e.V. Ver. dtsh. Emailfachleute e.V. 35, Heft 4 [1958].

²³⁾ G. Kortüm u. G. Schreyer, diese Ztschr. 67, 694 [1955].

Analytisch-technische Untersuchungen

Messung von Absorptions- und Fluoreszenzspektren an Papierchromatogrammen

Bestimmung spezifischer Aktivitäten ^{14}C -markierter Verbindungen an Chromatographiepapier

Von Doz. Dr. F. KORTE und Dr. H. WEITKAMP

Chemisches Institut der Universität Bonn

Absorptions- und Fluoreszenzspektren werden mit Hilfe einer Ulbricht-Kugel und eines selbstregistrierenden Spektralphotometers an Papierchromatogrammen in Reflexion gemessen. Die benötigten Substanzmengen betragen etwa 0,1 bis 5 μ . Das Verfahren kann zur Identifizierung und quantitativen Bestimmung papierchromatographisch erhaltenener Substanzen benutzt werden. Von ^{14}C -markierten Verbindungen kann am gleichen Papier die Aktivität bestimmt werden. Man erhält so ohne zeitraubende und verlustreiche Elution der Substanzen vom Papier ihre spezifische Aktivität.

Früher beschrieben wir ein Verfahren zur Aktivitätsbestimmung ^{14}C -markierter Verbindungen an Chromatographiepapier¹⁾. Die Zählausbeuten betragen an Papier 2043b (Schleicher u. Schüll) bei der Messung mit einem Geiger-Müller-Zählrohr mit Glimmerfolie ($0,96 \text{ mg/cm}^2$) 3,7% im Proportionalbereich. Bei der Messung mit einem Methan-Durchflußzähler mit Hostaphan-Folie ($0,78 \text{ mg/cm}^2$) beträgt die Zählausbeute 5,0 und fensterlos 9,2%.

Zur Ermittlung der spezifischen Aktivität war es erforderlich, die Substanzen vom Papier zu eluieren und in üblicher Weise durch Aufnahme des Durchsichtsabsorptionspektrums die Substanzmenge zu bestimmen. Um die mit der Elution verbundenen Schwierigkeiten zu umgehen, haben wir versucht, Absorptions- und Fluoreszenzspektren direkt am Papier in der Reflexionsanordnung aufzunehmen. Für derartige Messungen sollte eine Ulbricht-Kugel geeignet sein, die uns in Form einer serienmäßig zu erhaltenen Reflexionseinheit²⁾ in Verbindung mit einem selbstregistrierenden Spektralphotometer zur Verfügung stand. Die Anordnung wurde durch eine Filtereinheit und für die Aufnahme von Fluoreszenzspektren durch eine Hg-Hochdrucklampe ergänzt. Die Anordnung gestattet die

Aufnahme von Spektren bei monochromatischer Beleuchtung³⁾ oder monochromatischer Beobachtung⁴⁾.

In monochromatischer Beleuchtung können u. a. registriert werden: Absorptionsspektren in Durchsicht und Reflexion, Trübungsmessungen, diffuse und totale Reflexion, Fluoreszenzanregungsspektren. In monochromatischer Beobachtung werden Fluoreszenzspektren aufgenommen.

Absorptionsspektren von nicht fluoreszierenden Substanzen

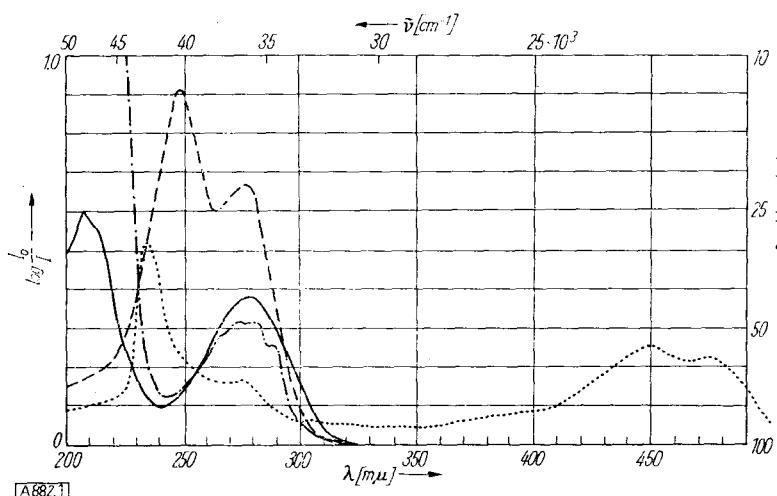
Zur Aufnahme der Spektren benötigt man ein Chromatogramm der Probe und ein Vergleichschromatogramm. Die erforderlichen Substanzmengen entsprechen den zur Durchsichtsspektroskopie benötigten Absolutmengen. (Wenn bei einer Schichttiefe von 1 cm gemessen wird, braucht man etwa 2- bis 3 mal mehr Substanz als bei der Durchsichtsspektroskopie pro cm^3 .) 2,3,6-Trimethoxy-fluorenon (9) z. B. hat in methanolischer Lösung ein Absorptionsmaximum bei $278 \text{ m}\mu$, der Ig I_0/I -Wert beträgt für

³⁾ Monochromatisches Licht fällt auf das Papierchromatogramm, das gesamte reflektierte Licht wird ohne spektrale Zerlegung gemessen.

⁴⁾ Die Probe wird durch Einstrahlen von UV-Licht in die Kugel zur Fluoreszenz angeregt und das Fluoreszenzlicht nach spektraler Zerlegung gemessen.

¹⁾ F. Korte, H. Weitkamp u. H. G. Schicke, Biochem. Z. 329, 458 [1958].

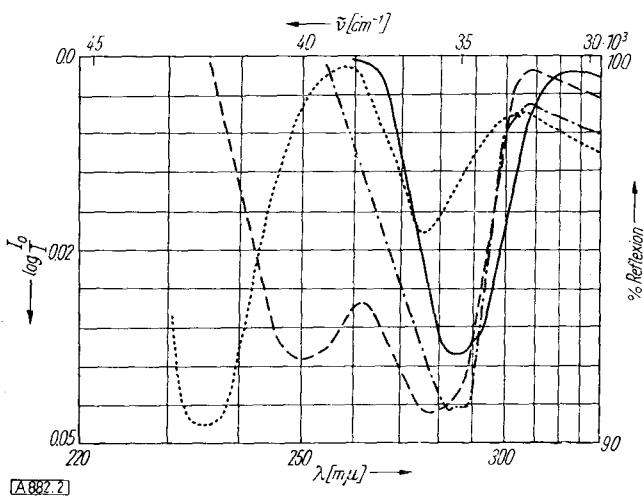
²⁾ Beckman Reflectance Unit, DK Spectrophotometer.



A882.1

Bild 1

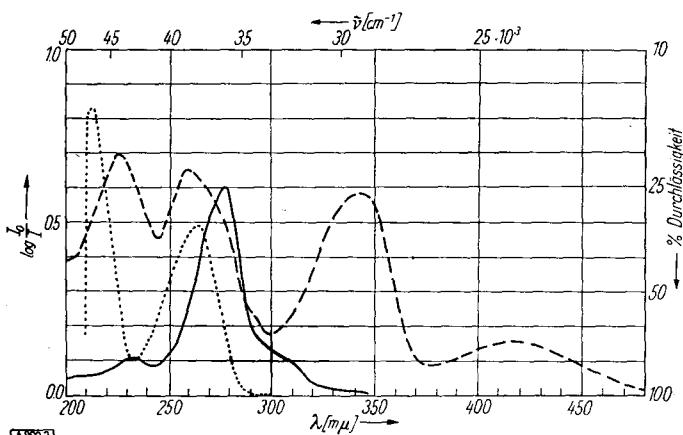
Durchsichtabsorptionsspektren
 — Orotic acid (in Water), $9 \gamma/cm^3$; $\lambda_{\max} 277 m\mu$; $\epsilon: 7800$. - - Guanine (Acetate Buffer, $p_H 4.5$), $12.5 \gamma/cm^3$; $\lambda_{\max} 274$; $246 m\mu$; $\epsilon: 8340$; 11250 . - - - D,L-Tryptophan (in Water), $8.8 \gamma/cm^3$; $\lambda_{\max} 271$; $278 m\mu$; $\epsilon: 7600$ Fluorescein (Acetate Buffer, $p_H 4.5$), $4.7 \gamma/cm^3$; $\lambda_{\max} 277$; $231 m\mu$; $\epsilon: 3400$; 39600



A882.2

Bild 2

Absorptionsspektren in Reflexion an Papier 2043a Schleicher & Schüll
 — Orotic acid, 0.36γ ; $\lambda_{\max} 284 m\mu$. - - Guanine, 3.2γ ; $\lambda_{\max} 277$; $250 m\mu$. - - - D,L-Tryptophan, 5.3γ ; $\lambda_{\max} 284 m\mu$ Fluorescein, 0.94γ ; $\lambda_{\max} 278$; $235 m\mu$



A882.3

Bild 3

Durchsichtabsorptionsspektren
 — 2,3,6-Trimethoxy-fluorenone-(9) (in Methanol), $1.8 \gamma/cm^3$; $\lambda_{\max} 278 m\mu$; $\epsilon: 93000$ Adenine (in $0.1N$ NaOH), $6.1 \gamma/cm^3$; $\lambda_{\max} 267$; $216 m\mu$; $\epsilon: 11100$; 18800 . - - - Berberine (in Water), $8.2 \gamma/cm^3$; $\lambda_{\max} 420$; 346 ; 262 ; $227 m\mu$; $\epsilon: 6500$; 25800 ; 29900 ; 31000

$1.8 \gamma/cm^3$, 0.60 . Nach der Chromatographie von 1.8γ in s-Butanol/Wasser/Eisessig 4:1:1 liegt bei der Aufnahme des Spektrums in der Reflexionsanordnung das Absorptionsmaximum bei $283 m\mu$ und der Ig-Wert beträgt 0,34 (vgl. Bild 3 und 5). Weitere Beispiele sind in den Bildern 1 bis 4 angegeben.

Daraus folgt, daß sich ein Spektrum in der Reflexionsanordnung mit der gleichen Empfindlichkeit aufnehmen läßt wie bei der Durchsichtsmessung, so daß sich eine zeitraubende Elution papierchromatographisch isolierter Substanzen erübriggt.

Im Vergleich zu Durchsichtsspektren sind bei der Messung an Papier die λ_{\max} -Werte um 5 bis 8 $m\mu$ zu längeren Wellenlängen hin verschoben. Diese Verschiebung entspricht den Unterschieden der Adsorptions- und Solvationsenergie⁵⁾.

Wenn die Ausdehnung der Substanzen die vom Monochromator abgebildete Fläche von 0.9×0.9 cm nicht überschreitet, läßt sich mit Hilfe der Kubelka-Munkschens-Gleichung die Substanzmenge quantitativ bestimmen, was am Beispiel des 2,3,6-Trimethoxy-fluorenon-(9) gezeigt sei (vgl. Bild 5, s. S. 436).

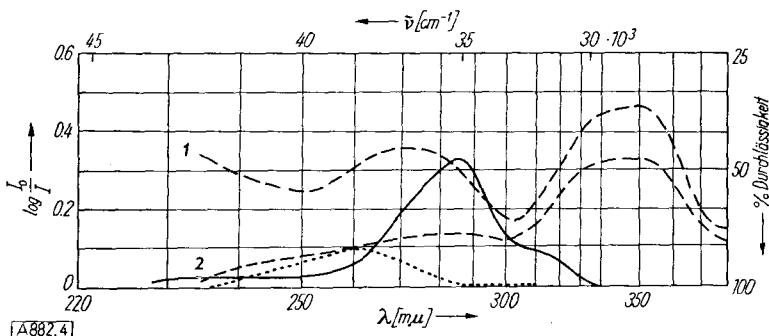


Bild 4

Absorptionsspektren in Reflexion an Papier 2043a Schleicher & Schüll
 — 2,3,6-Trimethoxy-fluorenone-(9), 1.8γ ; $\lambda_{\max} 283 m\mu$ Adenine, 1.2γ ; $\lambda_{\max} 260 m\mu$. - - - Berberin, 1.6γ ; $\lambda_{\max} 352$, $273 m\mu$.
 (1) Vor dem Detektor wurde ein Filter zur Adsorption des Fluoreszenzlichtes angeordnet, Filter UG 5, 2 mm. 2. Absorptionsspektrum der gleichen Substanz ohne Zwischenschaltung eines Filters)

Zur quantitativen Bestimmung wurden mit einer Mikrosyringe die angegebenen Gammamengen auf Chromatographiepapier aufgetragen. Nach der Chromatographie in s-Butanol/Wasser/Eisessig 4:1:1 wurden die Spektren aufgenommen. Aus den verschiedenen Kurven, Abb. 5, errechnet sich als Konstante der Kubelka-Munkschens-Gleichung

$$\frac{(1-R)^2}{2R} \cdot \text{Konz.} = \text{const.}$$

wenn die Konzentration in γ angegeben wird und $R = \log(I_0/I)$ ist, ein Wert von 1,18. Zur Bestimmung der Konstanten müssen die Substanzen in so kleinen Flecken aufgetragen werden, daß ihre Ausdehnung nach der Chromatographie die vom Monochromator abgebildete Fläche von 0.9×0.9 cm nicht überschreitet.

Absorptionsspektren fluoreszierender Substanzen

Zur Aufnahme der Absorptionsspektren fluoreszierender Substanzen muß vor dem Detektor ein geeignetes Filter angeordnet werden, um das Fluoreszenzlicht zu absorbieren. Bei der Messung ohne Filter wird die Summe von reflektiertem Licht und Fluoreszenzlicht gemessen, wobei noch die unterschiedliche spektrale Empfindlichkeit

⁵⁾ G. Kortüm, diese Ztschr. 70, 14 [1958].

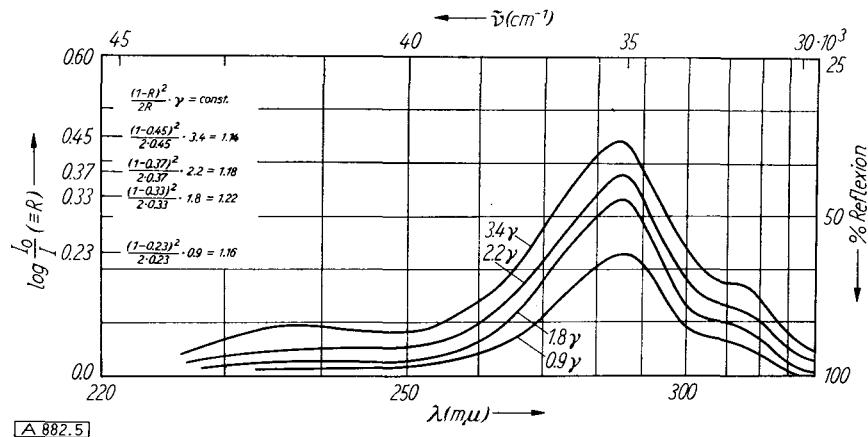


Bild 5

Zur quantitativen Auswertung des Absorptionsspektrums von 2,3,6-Trimethoxy-fluorenon (9)

des Detektors (vgl. Bild 7) in den Meßwert eingeht. Bei Verwendung eines Filters gilt das für die Aufnahme der Absorptionsspektren nicht fluoreszierender Verbindungen Gesagte (vgl. Spektren von Fluorescein und Berberin, Bild 2 bzw. 4). Es gelingt so leicht, die Absorptionsspektren fluoreszierender Verbindungen aufzunehmen.

Fluoreszenzspektren⁶⁾

Als Erregerlichtquelle dient eine Hg-Hochdrucklampe mit vorgeschaltetem Filter, das so ausgewählt wird, daß es nur die zur Anregung der Fluoreszenz benötigten Linien durchläßt. Aufgenommen wird das Energiespektrum des von der Probe ausgesandten Lichtes, und zwar wird im Einstrahlverfahren bei vorgewählter Verstärkung und konstanter Spaltbreite der Photostrom als Funktion der Wellenlänge gemessen. Da Chromatographiepapier im allgemeinen eine geringe Eigenfluoreszenz zwischen 400 und 500 m μ

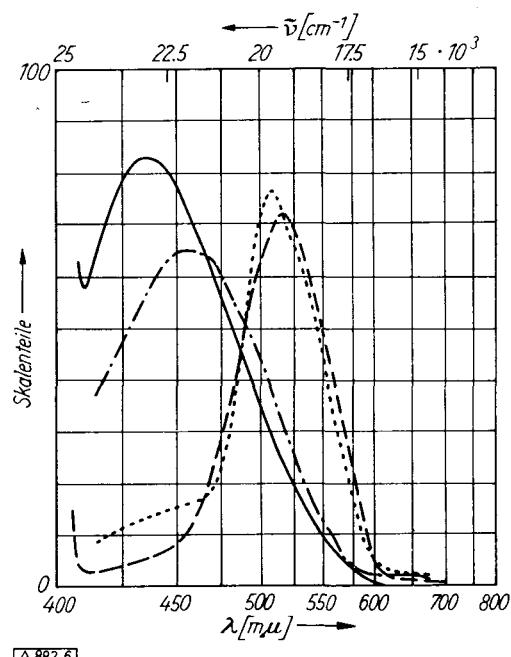


Bild 6

Fluoreszenzspektren. Zur Anregung diente eine Hg-Lampe unter Vorschaltung eines Filters mit einem Durchlaßbereich von 240 bis 400 m μ . - - Berberin 1,6 γ ; Spalt 0,30 mm; λ_{\max} 520 m μ Fluorescein 0,9 γ ; Spalt 0,50 mm; λ_{\max} 515 m μ . - - - Xanthopterin 0,6 γ ; Spalt 1,0 mm; λ_{\max} 458 m μ . — Thiochrom 5,0 γ ; Spalt 0,50 mm; λ_{\max} 438 m μ .

⁶⁾ Th. Förster: Fluoreszenz organischer Verbindungen, Vandenhoeck & Ruprecht, Göttingen 1951.

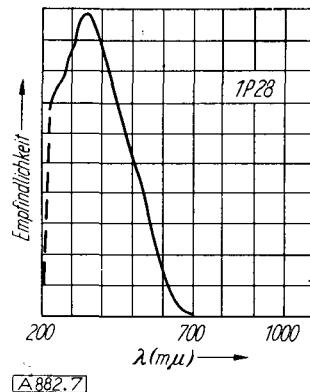


Bild 7. Charakteristik des Detektors 1 P 28 (RCA)

zeigt, muß bei quantitativen Messungen bzw. bei der Messung schwach fluoreszierender Proben die Fluoreszenzintensität des reinen Chromatographiepapiers abgezogen werden. Die zur Messung der Eigenfluoreszenz erforderlichen Vergleichsstreifen werden in der gleichen Weise wie zur Aufnahme von Absorptionsspektren angefertigt. Die kleinste noch meßbare Menge (ca. 0,1 γ) hängt somit nicht nur von der Steigerungsmöglichkeit der elektronischen Verstärkung ab, sondern wird ebenfalls durch die Eigenfluoreszenz-Intensität des Papiers bestimmt.

Die durch Abziehen der Eigenfluoreszenz-Intensität des Papiers korrigierten Kurven geben noch kein korrektes Bild des Fluoreszenzspektrums. Sie stellen die Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Detektor-Kennlinie dar, was beim Vergleich von Fluoreszenzspektren, die mit verschiedenen Geräten aufgenommen wurden, beachtet werden muß. (Die Charakteristik des von uns benutzten Sekundärelektronenvervielfachers⁷⁾ ist in Bild 7 wiedergegeben.) Hinzu kommt noch eine allerdings vernachlässigbare Abhängigkeit vom Gerät (z. B. Linearität des Verstärkers, spektrales Reflektionsvermögen der Spiegel). In Bild 6 sind einige Fluoreszenzspektren wiedergegeben. Es gelingt leicht, Fluoreszenzspektren in der angegebenen Weise sowohl zur Charakterisierung einer Substanz, als auch zu ihrer quantitativen Bestimmung aufzunehmen.

Die Beispiele zeigen, daß man in der Reflexionsanordnung schnell und einfach Absorptions- und Fluoreszenzspektren aufnehmen kann. Dieses Verfahren wird immer dann von Vorteil sein, wenn die zu untersuchenden Substanzen an Papier chromatographiert wurden. Zur Aufnahme der Spektren genügen normalerweise 0,1 bis 5 γ Substanz. Ferner ermöglicht die Methode eine schnelle quantitative Bestimmung absorbierender bzw. fluoreszierender Substanzen am Papier. Da man gleichfalls ^{14}C -Aktivitäten am Papier messen kann, erhält man so unter Vermeidung einer Elution die spezifische Aktivität papierchromatographisch isolierter Substanzen.

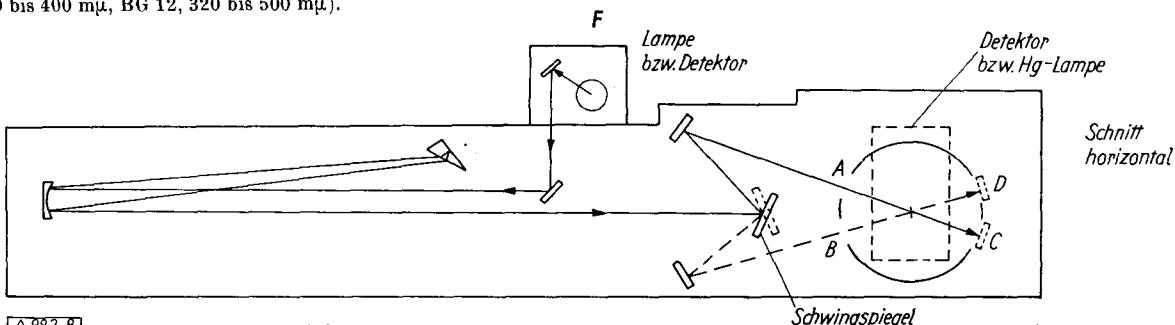
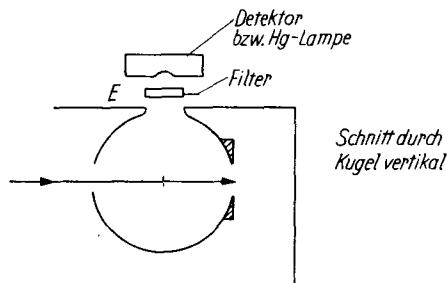
Beschreibung der Meßanordnung

Die Meßanordnung besteht aus einem Monochromator, einer Lichtquelle und einem Detektor (Bild 8). Sie unterscheidet sich von einem üblichen Zweistrahlspaktralphotometer für Transmissionsmessungen durch den Einbau einer Ulbricht-Kugel, wodurch die Anordnung in weiten Grenzen veränderlich wird. Probe bzw. Vergleichsstoff können wahlweise an den mit A, B, C, D bezeichneten Stellen eingesetzt werden. Infolge der Vertauschbarkeit von Lichtquelle und Detektor lassen sich Spektren bei monochromatischer Beleuchtung oder monochromatischer Beobachtung aufnehmen.

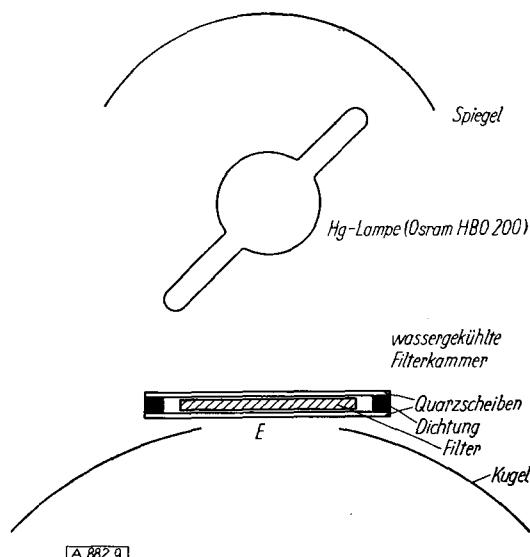
⁷⁾ RCA 1 P 28.

Absorptionsspektren. Zur Aufnahme von Absorptionsspektren wird monochromatisch beleuchtet. Als Lichtquelle dient eine Deuterium-Lampe, deren Strahlungsintensität größer ist als die einer Wasserstoff-Lampe (220 bis 350 $\mu\mu$), bzw. eine Wolfram-Lampe (350 bis 2800 $\mu\mu$). Als Detektor dient im Bereich 220 bis 700 $\mu\mu$ ein Sekundärelektronenvervielfacher (z. B. RCA 1 P 28), im Bereich 400 bis 2800 $\mu\mu$ eine Bleisulfid-Zelle. Die zur Spektroskopie erforderlichen Proben- und Vergleichschromatogramme werden erhalten, indem man auf einen Chromatographie-Papierstreifen die zu untersuchende Substanz so aufträgt, daß noch ein etwa 3 cm breiter Randstreifen frei bleibt. Nach der Chromatographie wird der Substanzfeck ausgeschnitten und in C angeordnet. Die Fläche gleichen R_f -Wertes des Randstreifens wird als Bezugssubstanz (Weißstandard) in D festgestellt. Bei nicht fluoreszierenden Substanzen wird in dieser Anordnung das Spektrum aufgenommen. Bei fluoreszierenden Substanzen wird vor dem Detektor in E ein Filter angeordnet, um das Fluoreszenzlicht zu absorbieren (z. B. Schott UG 5, Durchlaß 240 bis 400 $\mu\mu$, UG 2, 300 bis 400 $\mu\mu$, BG 12, 320 bis 500 $\mu\mu$).

(vgl. Bild 9). In E wird ein Filter angeordnet, das so ausgewählt ist, daß die im Bereich der Fluoreszenzstrahlung liegenden Hg-Linien völlig absorbiert werden. Wir verwenden für Fluores-



[A 882.8] Bild 8
Skizze der Meßanordnung



[A 882.9] Bild 9
Anordnung der Hg-Hochdrucklampe zur Aufnahme von Fluoreszenzspektren

Fluoreszenzspektren. Zur Aufnahme von Fluoreszenzspektren wird der Detektor an die Stelle der Lichtquelle F gesetzt und oberhalb der Kugel eine Hg-Lampe so angeordnet, daß sie einen möglichst großen Teil ihrer Energie in die Kugel strahlt

zenzen oberhalb 410 $\mu\mu$ das Schott-Filter UG 5, 5 mm Stärke (gehärtet), Durchlaß 240 bis 400 $\mu\mu$. Zur Registrierung kurzwelligerer Fluoreszenzen verwenden wir Interferenzfilter, die die Hg-Linien $\sim 365 \mu\mu$ bzw. $\sim 334 \mu\mu$ durchlassen. Wegen der Wärmeeempfindlichkeit dieser Filter haben wir eine Wasserkühlung vorgesehen.

Zur Aufnahme der Spektren werden Probe und Vergleichschromatogramm in der gleichen Weise wie zur Absorptionspektroskopie hergestellt. Bei Energieschaltung (Einstrahlverfahren) werden nacheinander Probe- und Vergleichsstreifen in C angeordnet und die Fluoreszenzintensitäten registriert.

Für quantitative Bestimmungen werden mit einem Fluoreszenznormal⁸⁾ bei vorgeählter Spaltgröße und Wellenlänge durch Verändern der elektronischen Empfindlichkeit die Skalenteile 0 und 100 festgelegt. Anschließend werden die Ausschläge für bekannte Konzentrationen registriert und die λ_{\max} -Werte in eine Eichkurve eingetragen. An Hand der Eichkurven werden unbekannte Substanzmengen bestimmt.

Spektren. Die Spektren (Bild 1 bis 6) wurden so wiedergegeben, wie sie von den Spektralphotometern aufgezeichnet wurden. Die Durchsichtsspektren wurden mit dem DK 1 Spektralphotometer der Firma Beckman aufgenommen, die Reflexionsspektren und Fluoreszenzspektren hingegen mit einem DK 2-Spektralphotometer mit nicht linearer Wellenlängenaufzeichnung. Zur Aufnahme der Reflexionsspektren wurden die Substanzen an Papier 2043a der Firma Schleicher & Schüll mit s-Butanol/Wasser/Eisessig 4:1:1 als mobile Phase chromatographiert.

Eingegangen am 8. April 1958 [A 882]

⁸⁾ Z. B. Eppendorf Nr. 4031 oder Uran-Glas.