

Quantitative Auswertung von Papierchromatogrammen durch Reflexionsmessungen

Von Prof. Dr. G. KORTÜM und Dipl.-Chem. JOSEF VOGEL

Institut für physikalische Chemie der Universität Tübingen

Widersprüche über die Brauchbarkeit von Reflexionsmessungen zur unmittelbaren quantitativen Analyse von Papierchromatogrammen waren der Anlaß, dieses Problem erneut zu untersuchen. Sorgfältige Messungen an mit Malachitgrün angefärbten Papieren ergaben in Übereinstimmung mit Untersuchungen von Stenius, daß die Kubelka-Munk-Funktion nicht exakt gültig ist, weil die von der Theorie vorausgesetzte gleichmäßige Verteilung des Farbstoffs in der Faser nicht zu erreichen ist. Erst bei sehr kleinen Konzentrationen des Farbstoffs erhält man eine innerhalb der Meßgenauigkeit lineare Beziehung zwischen $f(R_\infty)$ und c . Dagegen kann man unter geeigneten Bedingungen, zu denen außer „unendlicher Schichtdicke“ und diffuser Einstrahlung auch konstanter Feuchtigkeitsgehalt des Papiers gehört, mit Hilfe der Kubelka-Munk-Funktion gut reproduzierbare Eichkurven erhalten, an Hand deren sich quantitative analytische Bestimmungen leicht und sicher ausführen lassen.

Für die quantitative papierchromatographische Analyse benutzt man zwei verschiedene Methoden: Entweder man eluiert die getrennten Stoffe einzeln und analysiert die Eluate nach einer der üblichen Methoden, oder man versucht, die getrennten Stoffe direkt auf dem Papier quantitativ zu analysieren. Die erste Methode ist zeitraubend und umständlich und birgt die Gefahr von Fehlern durch Substanzverluste oder nachträglich eingeschleppte Verunreinigungen. Die zweite Methode ist zwar häufig angewendet worden, wobei verschiedenste Meßverfahren benutzt wurden¹⁾, ohne daß jedoch im allgemeinen eine befriedigende Genauigkeit erreicht wurde. Am aussichtsreichsten für diesen Zweck erscheinen photometrische Verfahren, die auch in der Mehrzahl der Fälle benutzt wurden, da sie besonders einfach sind, und da man handelsübliche Photometer verwenden kann.

Zur photometrischen Bestimmung der an Papier adsorbierten Stoffe kann man Messungen der Durchlässigkeit oder Messungen des Reflexionsvermögens benutzen. Erstere sind sehr häufig in der Literatur beschrieben worden^{1, 2)}. Um die Streuwirkung des Papiers nach Möglichkeit auszuschalten, tränkt man das Papier mit geeigneten, nichtabsorbierenden Flüssigkeiten, die einen ähnlichen Brechungsindex besitzen wie Cellulose (z. B. Paraffinöl), doch lassen sich so die Streuverluste nicht vollständig unterdrücken, abgesehen davon, daß dieses Verfahren unbehaglich ist. Hinzu kommt, daß die Schichtdicke des Papiers örtlich inkonstant und die Verteilung der absorbierenden Stoffe im allgemeinen nicht homogen ist, so daß die gemessene Extinktion noch davon abhängt, an welcher Stelle des Flecks gemessen wird. Aus diesen Gründen läßt sich in der Regel schon die photometrische Eichkurve $E = f(c)$ nicht mit der Genauigkeit aufstellen, die für quantitative Bestimmungen notwendig oder erwünscht wäre (umso mehr, als eine lineare Eichkurve nur selten erzielt wird), und die Benutzung einer solchen Eichkurve für spätere Messungen kann leicht zu sehr großen Fehlern führen, wenn etwa die Papiersorte oder -dicke oder die benutzte Bandbreite des Meßlichtes oder die Verteilung des Stoffes im Papier geringfügig variiert³⁾.

1. Bisherige Ergebnisse von Reflexionsmessungen

Die starke Streuwirkung des Papiers läßt von vornherein erwarten, daß für die quantitative papierchromatographische Analyse Reflexionsmessungen den Durchlässigkeitsmessungen überlegen sein sollten. Es ist deshalb mehrfach versucht worden, Reflexionsmessungen für diesen Zweck heranzuziehen, wobei das gleiche Papier oder einer der üblichen Weißstandards (MgO , $BaSO_4$ usw.) zum Vergleich dienten. Meßgröße ist das durch

$$R \equiv \frac{\Phi}{\Phi_0} \quad (1)$$

definierte Reflexionsvermögen der Probe, wenn man unter Φ die Leuchtdichte der Probe, unter Φ_0 die des Standards versteht. In älteren Arbeiten⁴⁾ wird zur Aufstellung der Eichkurve in Analogie zu Durchlässigkeitsmessungen die Extinktion

$$E_R = -\log R \quad (2)$$

gegen die Flächenkonzentration c (z. B. in $\gamma/Fleck$) des adsorbierten Stoffes aufgetragen. Dabei erhält man wegen des Streuvermögens des Papiers natürlich keine linearen Eichkurven, außer evtl. bei sehr kleinen Konzentrationen, und es ist viel Mühe darauf verwendet worden, durch Verwendung empirischer Funktionen zwischen E_R und c oder durch Vergleich mit Durchlässigkeitsmessungen an durchscheinend gemachten Papieren lineare Konzentrationsbeziehungen zu finden⁵⁾, die natürlich, selbst wenn man sie bekommt, immer nur für die speziellen Meßbedingungen und das spezielle Beispiel gültig bleiben.

Die auf das vorliegende Problem zugeschnittene Theorie ist die Theorie der diffusen Streuung und der Durchlässigkeit lichtstreuender Schichten, wie sie vor allem von Kubelka und Munk^{6, 7)} in allgemeinster Form entwickelt wurde. Die Kubelka-Munk-Funktion lautet in ihrer einfachsten Form

$$f(R_\infty) \equiv \frac{(1 - R_\infty)^2}{2 R_\infty} = \frac{k}{s} = \frac{2,303 \cdot \epsilon \cdot c}{s} = \text{prop. } c, \quad (3)$$

wobei R_∞ das relative, d. h. auf R_∞ Standard = 1 bezogene, diffuse Reflexionsvermögen der Probe darstellt, wenn man die Schichtdicke so groß wählt, daß die Probe

¹⁾ Vgl. z. B. I. M. Hais u. K. Macek: Handb. Papierchromatographie, Jena 1958, Bd. I.

²⁾ Vgl. R. J. Block, E. L. Durrum u. G. Zweig: A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis, 2. Aufl. New York 1958.

³⁾ Vgl. G. Kortüm: Kolorimetrie, Photometrie und Spektrometrie, 3. Aufl. Springer 1955.

⁴⁾ Vgl. z. B. E. H. Winslow u. H. A. Liebafsky, Analytic. Chem. 21, 1338 [1949].

⁵⁾ Vgl. z. B. R. Grüttner, Klin. Wschr. 32, 263 [1954].

⁶⁾ P. Kubelka u. F. Munk, Z. techn. Physik 12, 593 [1931].

⁷⁾ P. Kubelka, J. opt. Soc. Amer. 38, 448 [1948]; vgl. auch die kurze Zusammenfassung bei G. Kortüm u. J. Vogel, Z. physik. Chem. N. F. 18, 110 [1959].

praktisch undurchlässig ist⁸). k ist der Absorptionskoeffizient, definiert durch das *Bouguer-Lambert-Beersche Gesetz*

$$\Phi = \Phi_0 e^{-kx}, \quad (4)$$

ϵ der durch

$$k = 2,303 \epsilon c \quad (5)$$

definierte molare dekadische Extinktionskoeffizient, s der im Geltungsbereich der *Kubelka-Munk-Theorie* von λ unabhängige Streukoeffizient. Wenn die *Kubelka-Munk-Theorie* anwendbar ist, muß also $f(R_\infty)$ eine lineare Funktion der Konzentration des absorbierenden Stoffes sein. Dies konnte an verdünnten Pulvermischungen und Mischkristallen bestens bestätigt werden⁹⁻¹¹.

Die *Kubelka-Munk-Funktion* (3) ist abgeleitet unter folgenden Voraussetzungen:

- Der Streukoeffizient s ist unabhängig von der Wellenlänge.
- Die einfallende Strahlung ist diffus.
- Die Schichtdicke ist so groß, daß die Proben praktisch undurchlässig sind.
- Der absorbierende Stoff ist homogen in der Probe verteilt.

Zunächst ist also zu prüfen, wie weit diese Voraussetzungen bei Papierchromatogrammen eingehalten werden können.

a) Ein von λ unabhängiger Streukoeffizient ist dann zu erwarten, wenn die streuenden Partikel groß sind gegenüber λ . Nach Untersuchungen von *Giertz*¹²) wird der Streukoeffizient von Papier mit zunehmendem λ kleiner, und zwar im gesamten sichtbaren Bereich um etwa 10 %. Man kann deshalb in kleinen λ -Bereichen s als praktisch konstant betrachten. Dies gilt auch in Gegenwart eines Farbstoffes, mit dem die Papierfaser angefärbt ist¹³).

b) Während diffuse Einstrahlung bei homogenen Pulvern nicht notwendig ist¹⁰), konnte *Stenius*¹⁴) durch eingehende Untersuchungen unter verschiedenen geometrischen Bedingungen der Ein- und Ausstrahlung an gefärbten Papieren nachweisen, daß das Reflexionsvermögen von diesen geometrischen Bedingungen abhängig ist. Dies dürfte damit zusammenhängen, daß Papier durch seine Herstellung stets eine gewisse Struktur besitzt, die Fasern also nicht völlig statistisch regellos verteilt sind, wie dies bei den Teilchen homogenen Pulver der Fall ist. Bei Messungen an Papier ist also stets diffus zu beleuchten (mit Hilfe einer Ulbricht-Kugel), und die reflektierte Strahlung unter dem Winkel 0, d. h. senkrecht zur Papierebene abzunehmen.

c) Während die Bedingung „unendlicher Schichtdicke“, d. h. un durchlässiger Schichten bei Pulvern ohne weiteres einzuhalten ist⁸), muß man bei Papier ziemlich viele Lagen übereinander schichten, damit diese Forderung erfüllt ist, und das Reflexionsvermögen sich nicht mehr ändert. Bei chromatographischen Papieren sind dafür 8–10 Lagen notwendig.

d) Im Gegensatz zu den drei ersten Bedingungen läßt sich die geforderte homogene Verteilung des absorbierenden Stoffes, die bei Pulvergemischen durch genügend langes Vermahlen der Proben ebenfalls leicht zu erzielen ist, bei der Messung von Papierchromatogrammen nicht erreichen, und zwar aus zwei Gründen nicht:

1. Wegen der Bedingung der „unendlichen Schichtdicke“ müßte man jeweils 8–10 gleiche Chromatogramme herstellen, die sowohl in der Absolutmenge der Substanz wie in ihrer Verteilung über den Fleck übereinstimmen müßten. Selbst wenn dies praktisch möglich wäre, zeigt jedoch ein System, das aus einer Reihe einzelner homogener Schichten zusammengesetzt ist, nicht das gleiche Reflexionsvermögen wie eine gleich dicke einheitliche Schicht, was mit der Oberflächenreflexion der einzelnen Schichten zusammenhängt¹⁵).

2. Homogene Verteilung des absorbierenden Stoffes setzt ferner voraus, daß dieser auch gleichmäßig innerhalb der einzelnen Papierschicht verteilt ist, was ebenfalls nicht zu erreichen ist. Insbesondere an den Rändern des Flecks treten stets Inhomogenitäten auf, die sich nicht vermeiden lassen und die örtlich wechselnde

⁸) Dies ist bei feinkörnigen Pulvern schon bei $x \approx 1$ mm der Fall.

⁹) G. Kortüm u. H. Schöttler, Z. Elektrochem. 57, 353 [1954].

¹⁰) G. Kortüm u. G. Schreyer, Z. Naturforsch. 11a, 1018 [1956].

¹¹) G. Kortüm u. W. Braun, Z. physik. Chem. N. F. 18, 242 [1959].

¹²) H. W. Giertz, Svensk. Papperstidn. 53, 673 [1950].

¹³) D. B. Judd u. Mitarb., J. Res. Natl. Bur. Stand. 79, 287 [1937].

¹⁴) A. S. Stenius, J. opt. Soc. Amer. 45, 727 [1955].

¹⁵) A. S. Stenius, J. opt. Soc. Amer. 44, 804 [1954].

Extinktionen und damit auch örtlich wechselndes Reflexionsvermögen bedingen. Da man jedoch praktisch nicht das differentielle, sondern das integrale Reflexionsvermögen über den gesamten Fleck und seine nächste Umgebung mißt¹⁶), treten erhebliche Abweichungen von den nach der *Kubelka-Munk-Funktion* berechneten Werten auf, wie *Stenius*¹⁷) durch sorgfältige Untersuchungen gezeigt hat: Die gemessenen Absorptionen weichen gegenüber den theoretischen nach unten ab, und zwar um so mehr, je größer die Absorption ist. Der Fehler wird ferner um so größer, je ungleichmäßiger die Verteilung des absorbierenden Stoffes ist, und zwar sowohl in Bezug auf das Mengenverhältnis des Farbstoffs wie auf das Flächenverhältnis der verschieden stark angefärbten Teilläufen. Das bedeutet, daß die durch Gl. (3) geforderte Proportionalität $f(R_\infty) = \text{prop } c$ nicht mehr erfüllt sein kann.

Die erste Anwendung der *Kubelka-Munk-Theorie* zur quantitativen Analyse von Ni^{2+} -Ionen in Papierchromatogrammen stammt von *Vaeck*¹⁸). Gemessen wurde mit dem Beckman-DU-Spektralphotometer in Reflexion bei $\lambda = 625 \text{ m}\mu$ im Maximum der Hauptbande des Rubenwasserstoffsaure-Komplexes bei gerichteteter (nicht diffuser) Einstrahlung und dem gleichen, unangefärbten Papier als Standard. Um reproduzierbare Ergebnisse zu bekommen, wurden bei jeder Konzentrationsbestimmung Eichwerte mit bekannter Ni^{2+} -Konzentration im selben Chromatogramm mitbestimmt, so daß der Meßwert an Hand der mitaufgenommenen Eichkurve interpoliert werden konnte. Die Eichkurve innerhalb des gesamten gewünschten Konzentrationsbereiches zu reproduzieren, erwies sich als nicht möglich. Trotzdem ergaben die Messungen das überraschende Resultat, daß $f(R_\infty)$ im Bereich zwischen 30 und 200 mg Ni/l der ursprünglichen Lösung linear von der Konzentration abhängt.

Neuerdings haben *Korte* und *Weitkamp*¹⁹) die quantitative Bestimmung von 2,3,6-Trimethyl-fluoren mit Hilfe von Reflexionsmessungen an Papierchromatogrammen beschrieben. Sie benutzen dazu ein Beckman-DK-Gerät mit Reflexionszusatz und Ulbricht-Kugel, arbeiten aber trotzdem mit gerichteteter Einstrahlung und mit einfachen Papierlagen, d. h. nicht mit „unendlicher Schichtdicke“ (über die Unterlage ist nichts angegeben). Sie verwenden die *Kubelka-Munk-Gleichung* (3), setzen aber für R_∞ nicht den Reflexionsgrad Φ/Φ_0 ein, sondern die Größe $\log(\Phi_0/\Phi)$, die definitionsgemäß die Extinktion darstellt. Außerdem benutzen sie die *Kubelka-Munk-Gleichung* in der Form $f(R_\infty)c = \text{konst.}$ an Stelle von $f(R_\infty)/c = \text{konst.}$, wie es Gl. (3) verlangt. Bemerkenswerterweise ergibt sich, wenn man die Konzentration in γ/Fleck angibt, bei dem erwähnten Beispiel die Größe

$$\gamma \cdot \left(1 - \log \frac{\Phi_0}{\Phi}\right)^2 / 2 \log \frac{\Phi_0}{\Phi} \quad \text{im Gebiet } 0,9 \leq \gamma \leq 3,4$$

innerhalb weniger Prozente als konstant, während $\frac{f(R_\infty)}{\gamma}$ im gleichen Gebiet um etwa 10 % variiert. Das bedeutet, daß jedenfalls die *Kubelka-Munk-Funktion* bei diesen Messungen nur annähernd gültig ist, wie sich aus den Meßbedingungen voraussagen ließ.

2. Experimentelles

Zur Messung diente ein Zeiss-Spektralphotometer PMQ II mit Quarzoptik und einer Glühlampe, bzw. Wasserstoff-Lampe H 30 als Strahlungsquelle und einem RCA-Elektronenvervielfacher IP 28 als Empfänger; die maximale Bandbreite betrug 30 Å, in der Regel war sie jedoch erheblich geringer. Der Reflexionsansatz (in eigener Werkstatt hergestellt) war mit einer innen mit MgO bedampften Ulbricht-Kugel ausgerüstet, die diffuse Beleuchtung und Beobachtung in der Flächennormale zuließ. Als Testsubstanz diente Malachitgrün (p. A. von Merck), da es ein über das ganze sichtbare Gebiet sich erstreckendes Absorptionspektrum besitzt (Abb. 1). Zu allen Untersuchungen wurde Chromatographiepapier Nr. 2043a von Schleicher & Schüll benutzt. Um die gesamten Stoffmengen/Fleck bestimmen zu können, wurden die Substanzflecke stets kleiner als die Probenöffnung der Ulbricht-Kugel ($\varnothing 25 \text{ mm}$) gehalten.

¹⁶) In Durchsicht hat man gelegentlich die differentiellen Extinktionen gemessen, indem man das Papier in schmale Streifen zerschnitten und diese einzeln gemessen hat (vgl. R. J. Block, Science [Washington] 108, 608 [1948]; B. H. Bull u. Mitarb., J. Amer. chem. Soc. 71, 550 [1949]). Das Verfahren ist jedoch umständlich und nicht sehr genau.

¹⁷) A. S. Stenius, Svensk. Papperstidn. 54, 663, 701 [1951].

¹⁸) S. V. Vaeck, Nature [London] 172, 213 [1953]; Analyt. chim. Acta 10, 48 [1954].

¹⁹) F. Korte u. H. Weitkamp, diese Ztschr. 70, 434 [1958].

Das Malachitgrün wurde aus methanolischer — teilweise auch aus wässriger — Lösung verschiedener Konzentration in Mengen zwischen 0,01 und 0,02 ml auf das Papier aufgebracht und etwa 20 min an der Luft getrocknet. Weißstandard war reines Papier, das mit Lösungsmittel behandelt wurde. Zur Einhaltung der Bedingung „unendliche Schichtdicke“ wurden Standard und Probe über einem Hintergrund von 10 Lagen weißen Papiers gemessen.

Meßergebnisse

In Abb. 1 ist das Reflexionsspektrum an Papier gemeinsam mit dem Durchsichtsspektrum (wässrige Lösung) des Malachitgrüns wiedergegeben. Der Vergleich beider lehrt, daß die Bandenmaxima bei dem ersten gegenüber dem Durchsichtsspektrum zu längeren Wellenlängen hin verschoben sind. Abgesehen von dieser geringfügigen Bandenverschiebung geht aus Abb. 1 aber eine weitgehende Übereinstimmung der Durchsichts- und Reflexionsspektren hervor. Es ist also möglich, mittels Reflexionsmessungen und unter Benutzung der Kubelka-Munk-Funktion die typischen Farbkurven von Stoffen zu erhalten, die an Papier adsorbiert sind, analog wie dies auch bei verdünnten Pulvergemischen der Fall ist. Die Methode läßt sich also zur qualitativen Analyse benutzen, insbesondere auch dann, wenn sich Stoffe zwar papierchromatographisch trennen lassen, aber noch keine geeigneten Verfahren existieren, sie anzufärben.

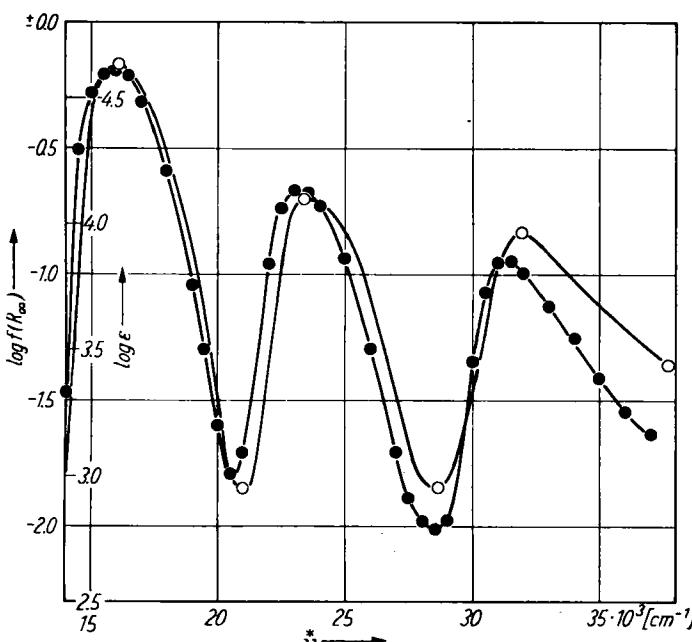


Abb. 1. Absorptionsspektren des Malachitgrüns. ○○ Durchlässigkeitsmessungen in wässriger Lösung (Pestemer). ●●● Reflexionsmessungen (an Papier adsorbiert).

Um zu untersuchen, ob auf diese Weise auch eine quantitative Analyse möglich ist, wurden zunächst fünf Proben untersucht, die den Farbstoff in folgenden Konzentrationen enthielten:

- I. $3,81 \cdot 10^{-6}$ g/Fleck
- II. $6,82 \cdot 10^{-6}$ g/Fleck
- III. $13,98 \cdot 10^{-6}$ g/Fleck
- IV. $20,97 \cdot 10^{-6}$ g/Fleck
- V. $35,20 \cdot 10^{-6}$ g/Fleck

Die Verteilung des Farbstoffs über die Flecken war bei diesen Proben sehr regelmäßig und die Flecken hatten untereinander annähernd gleiche Größe ($\varnothing 20\text{--}22$ mm, leicht ovale Form). In Abb. 2 sind die gemessenen Spektren wiedergegeben.

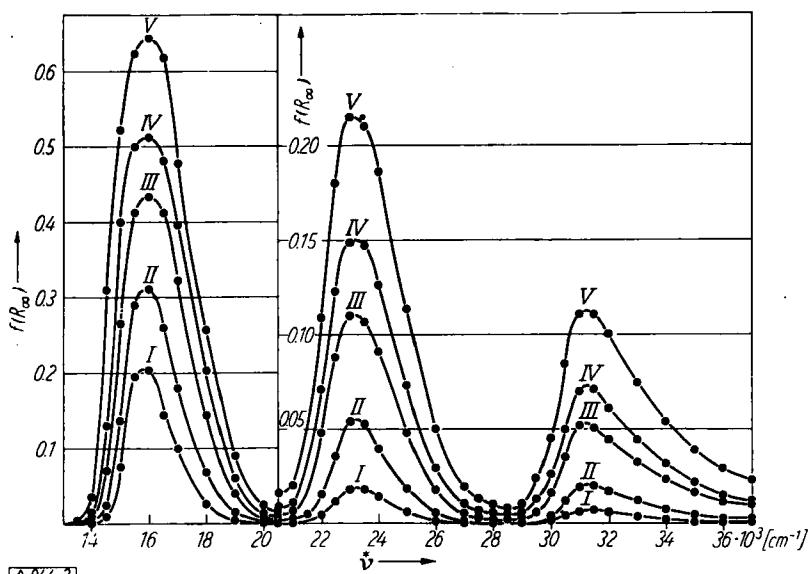


Abb. 2. Reflexionsspektren des an Papier adsorbierten Malachitgrüns bei verschiedenen Konzentrationen c

- I. $c = 3,81 \cdot 10^{-6}$ [g/Fleck]
- II. $c = 6,82 \cdot 10^{-6}$ [g/Fleck]
- III. $c = 13,98 \cdot 10^{-6}$ [g/Fleck]
- IV. $c = 20,97 \cdot 10^{-6}$ [g/Fleck]
- V. $c = 35,20 \cdot 10^{-6}$ [g/Fleck]

Trägt man die $f(R_\infty)$ -Werte der Bandenmaxima ($\tilde{\nu} = 16000, 23200$ und 31300 cm^{-1}) jeweils gegen die Farbstoffkonzentrationen pro Fleck auf, so erhält man Abb. 3. Diese Eichkurven sind gekrümmmt. Da nach der Kubelka-Munk-Theorie eine lineare Konzentrationsabhängigkeit zu erwarten ist, ist der Krümmungsgrad ein Maß für die Abweichungen von dieser Theorie. Die größten Abweichungen treten wie erwähnt bei starker Absorption, also im Bereich der längstwürgigen Bande auf. Angenähert linear ist dagegen die Kurve für die schwächste Bande bei $\tilde{\nu} = 31300 \text{ cm}^{-1}$. Bei sehr geringen Konzentrationen bzw. Extinktionen fallen die Messungen bereits in die Fehlergrenzen der Methode (gestrichelter Teil der Kurven in Abb. 3), so daß sich die Kubelka-Munk-Theorie nicht mehr prüfen läßt. Die gleiche Beobachtung machte bereits Vaeck¹⁸.

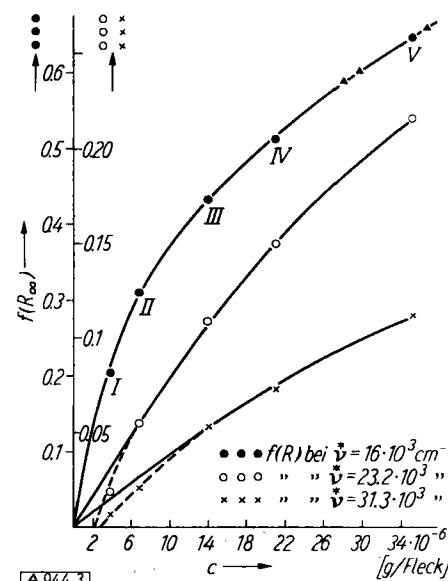


Abb. 3. Eichkurven $f(R_\infty)$ als Funktion von c in [g/Fleck]

Während, wie zu erwarten war, keine lineare Konzentrations-Abhängigkeit der Kubelka-Munk-Funktion beobachtet wurde, war jedoch die Reproduzierbarkeit der Eichkurven unter konstanten äußeren Bedingungen ausgezeichnet, so daß mit ihrer Hilfe ohne weiteres Konzentrationsbestimmungen gemacht werden können, deren

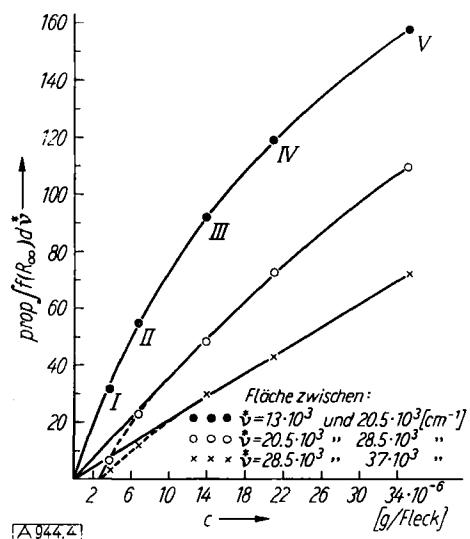


Abb. 4. Eichkurven $\int f(R_\infty) d\nu$ als Funktion von c in $[g/\text{Fleck}]$

Streuung 1–2% nicht überschreitet. Zu den konstanten äußeren Bedingungen gehört es z. B., daß die Meßproben immer in gleicher Weise in die Ulbricht-Kugel eingelegt werden, denn die „Siebseite“ des Papiers weist ein anderes Reflexionsvermögen auf, als die „Filzseite“¹⁷⁾. Trägt man nicht die $f(R_\infty)$ -Werte der Bandenmaxima, sondern die Integrale $\int f(R_\infty) d\nu$ über die ganze Bande gegen die Konzentration auf (vgl. Abb. 4), so wird die Krümmung der Eichkurven geringer, dieses Verfahren gibt noch etwas bessere Analysenwerte, ist aber natürlich auch umständlicher.

Da die Abweichungen von der Kubelka-Munk-Gleichung nach den Untersuchungen von Stenius¹⁷⁾ auf die inhomogenen

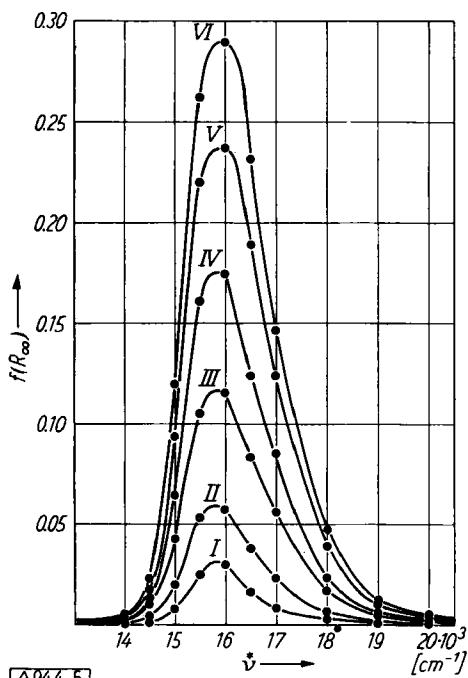


Abb. 5. Reflexionspektren des an Papier adsorbierten Malachitgrüns bei sehr kleinen Konzentrationen

I. $c = 5,57 \cdot 10^{-7}$ [g/Fleck]; II. $c = 11,13 \cdot 10^{-7}$ [g/Fleck]
III. $c = 22,27 \cdot 10^{-7}$ [g/Fleck]; IV. $c = 33,40 \cdot 10^{-7}$ [g/Fleck]
V. $c = 44,81 \cdot 10^{-7}$ [g/Fleck]; VI. $c = 55,66 \cdot 10^{-7}$ [g/Fleck]

gene Verteilung des Farbstoffs im Papier zurückgeführt werden müssen, und da diese Abweichungen mit abnehmender Extinktion geringer werden, war zu erwarten, daß bei genügend kleinen Farbstoffkonzentrationen die lineare Beziehung $f(R_\infty) = \text{konst.} \cdot c$ innerhalb der Meßgenauigkeit gültig sein sollte. Dies wurde an Hand einer weiteren Meßreihe bei Konzentrationen, die um etwa eine Zehnerpotenz niedriger lagen, bestätigt. Auch in diesem Fall waren die Flecke gleichmäßig und einheitlich groß ($\varnothing 20–22 \text{ mm}$ bei einer insgesamt ausgeleuchteten Meßfläche von $25 \text{ mm } \varnothing$). Die gemessenen Spektren sind in Abb. 5 wiedergegeben, die aus den Maxima bei $\nu = 16000 \text{ cm}^{-1}$ entnommenen ($f(R_\infty)$)-Werte, gegen die Konzentration c in g/Fleck aufgetragen, ergaben die Eichkurve der Abb. 6, die innerhalb der Meßgenauigkeit linear ist und deshalb eine Bestätigung der Kubelka-Munk-Gleichung unter den gewählten Bedingungen darstellt. Die Reproduzierbarkeit der Eichkurve lag auch hier bei mehrfacher Wiederholung der Messungen an verschiedenen Proben innerhalb der Meßgenauigkeit von 1–2%.

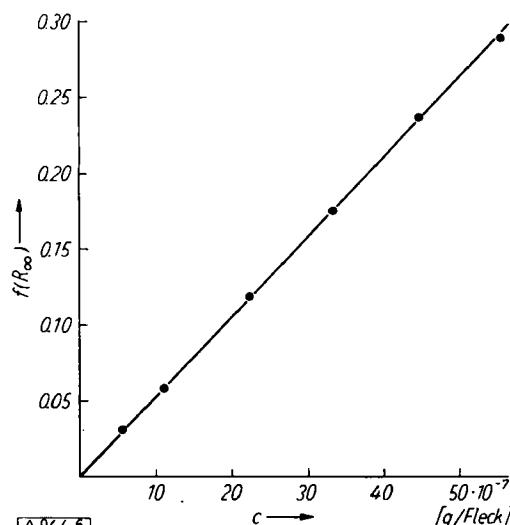


Abb. 6. Eichkurve $f(R_\infty)$ als Funktion c in $[g/\text{Fleck}]$ bei kleinen Konzentrationen

Die Ergebnisse wurden von Proben erhalten, die den Farbstoff gleichmäßig über annähernd einheitlich große Flecke verteilt enthielten; außerdem füllten die Flecke den größten Teil der gesamten Meßfläche aus. Bei praktisch vorkommenden Papierchromatogrammen werden jedoch in den seltensten Fällen Flecke von dieser Gleichmäßigkeit resultieren; häufig sind die Farbflecke ungleich groß oder enthalten den absorbierenden Stoff ungleichmäßig verteilt. Um zu prüfen, wie sich derartige ungleichmäßige Verteilungen auf die Meßwerte auswirken, haben wir Proben untersucht, die jeweils gleiche Farbstoffmengen enthielten,

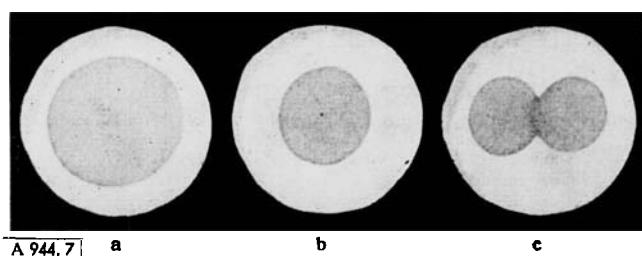


Abb. 7. Flecke gleicher Gesamtkonzentration, aber ungleicher Größe und Form

die sich aber in der Größe der Flecke unterschieden. In Abb. 7 sind drei solcher Proben wiedergegeben, Tabelle 1 enthält die dazugehörigen Meßergebnisse.

Gegeb. Konz.	Form des Flecks	$f(R_\infty)$ bei $\nu = 16000 \text{ cm}^{-1}$	Gef. Konz. nach Abb. 6 als Eichkurve
22,3·10 ⁻⁷	groß, $\varnothing 20\text{--}22 \text{ mm}$ (Abb. 7a)	0,118	22,4·10 ⁻⁷
		0,116	22,1·10 ⁻⁷
22,4·10 ⁻⁷	klein $\varnothing 15\text{--}16 \text{ mm}$ (Abb. 7b)	0,115	21,9·10 ⁻⁷
		0,114	21,7·10 ⁻⁷
22,4·10 ⁻⁷	zwei kleine Flecke (Abb. 7c)	0,115	21,9·10 ⁻⁷
		0,116	22,1·10 ⁻⁷

Tabelle 1. Meßergebnisse bei verschiedener Fleckengröße

Die gemessenen $f(R_\infty)$ -Werte und damit die ermittelten Konzentrationen sind durchweg etwas zu gering. Dieses entspricht durchaus den Erwartungen, denn nach den Untersuchungen von Stenius¹⁷⁾ werden die gemessenen Absorptionskoeffizienten im Vergleich zu den theoretisch zu erwartenden kleiner mit abnehmender Fleckgröße. Trotzdem reicht die erzielte Genauigkeit auch in solchen Fällen in der Regel aus. Bei gleicher Größe des Flecks, aber ungleichmäßiger Verteilung des Farbstoffs innerhalb desselben wurde keine Verringerung der Meßgenauigkeit beobachtet. (s. Abb. 3, ▲).

Wie die Wiederholung der Messungen an den gleichen Proben an verschiedenen Tagen ergab, sind sie nur dann innerhalb der Meßgenauigkeit der Methode reproduzierbar,

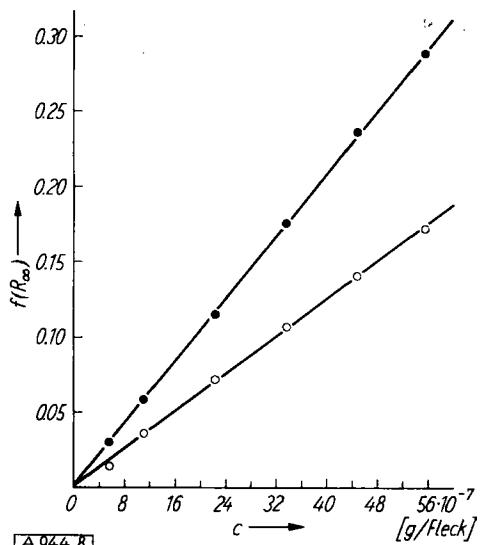


Abb. 8. Abhängigkeit der Eichkurven vom Feuchtigkeitsgehalt des Papiers. ● ● zimmertrocken; ○ ○ 24 h in wasserdampfgesättigter Atmosphäre aufbewahrt

wenn der Feuchtigkeitsgehalt des Papiers konstant blieb. Den Einfluß des Feuchtigkeitsgrades zeigen die beiden Eichkurven der Abb. 8 von gleichen Proben, die einmal lufttrocken, das andere Mal nach 24stündiger Aufbewahrung in einer wasserdampf-gesättigten Atmosphäre bei gleicher Temperatur gemessen wurden. Die Benutzung einer Eichkurve zur quantitativen Analyse von Chromatogrammen setzt also voraus, daß man die Proben stets unter konstanten Feuchtigkeitsverhältnissen mißt. Dazu genügt es, sie vor der Messung einige Stunden in einem geschlossenen Gefäß mit definiertem Wasserdampf-Partialdruck (z. B. über CaCl_2) aufzubewahren.

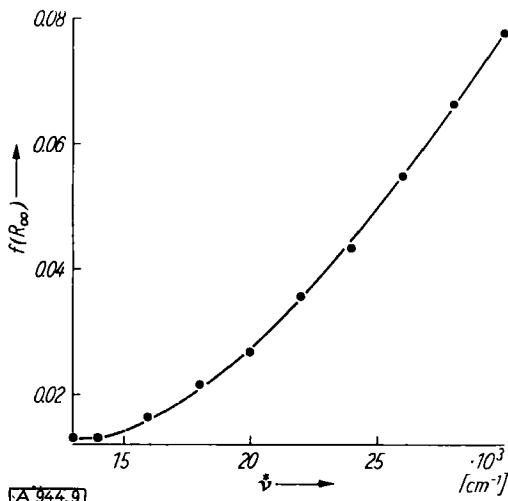


Abb. 9. Reflexionsspektren des benutzten Papiers (2043a) gegen MgO als Standard

In Abb. 9 ist schließlich noch das Reflexionsvermögen $f(R_\infty)$ des benutzten Papiers (Schleicher u. Schüll Nr. 2043a) gegen MgO als Standard als Funktion der Wellenzahl wiedergegeben. Die Absorption steigt gegen das UV hin stark an, was die Genauigkeit der quantitativen Analyse in analoger Weise verringert wie ein absorbierendes Lösungsmittel bei Durchlässigkeitsmessungen. Messungen im UV sollten deshalb möglichst vermieden werden, es empfiehlt sich, nur im UV absorbierende Stoffe vorher mit geeigneten Reagenzien anzufärben.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemie sind wir für die Gewährung von Sachbeihilfen zu Dank verpflichtet.

Eingegangen am 27. Februar 1959 [A 944]

Zuschriften

Zur Aufnahme von Absorptionsspektren papierchromatographisch isolierter Substanzen in Reflexion

Von Priv.-Doz. Dr. F. KORTE und Dr. H. WEITKAMP*

Chemisches Institut der Universität Bonn

In vorstehender Arbeit zur quantitativen Auswertung von Papierchromatogrammen untersuchen Kortüm und Vogel¹⁾ den Gültigkeitsbereich der Kubelka-Munk-Funktion. Entsprechend der Theorie von Kubelka und Munk arbeiten sie mit diffuser monochromatischer Einstrahlung. Die Ergebnisse zeigen, daß auch in dieser der Theorie entsprechenden Anordnung die Kubelka-Munk-Funktion nur für einen kleinen Konzentrationsbereich erfüllt ist.

Wir haben eine Anordnung beschrieben²⁾, in der wir monochromatisch gerichtet einstrahlen. Diese Methode wurde entwickelt, um kleine Substanzmengen, die schwer oder gar nicht vom Papier eluierbar sind, durch Absorptions- bzw. Fluoreszenzspektren neben den R_f -Werten zusätzlich zu charakterisieren. Wir haben selbstregistrierend gearbeitet und dabei nur Geräte benutzt, die serienmäßig erhältlich sind.

Nach $1\frac{1}{2}$ -jähriger, täglicher Anwendung hat sich ergeben, daß die λ_{\max} -Werte der in der Reflexionsanordnung erhaltenen Spektren gegenüber den Durchsichtsspektren um etwa $10 \mu\text{m}$ nach längeren Wellen verschoben sein können. Die Form der Spektren ist vergleichbar. Dieses Verfahren ist bei chromatographischen und elektrophoretischen Arbeiten allgemein anwendbar, zumal es nach unseren Erfahrungen möglich ist, auch quantitative Bestimmungen entsprechend der Durchsichtsspektroskopie im Spektralbereich ab $210 \mu\text{m}$ auszuführen. Voraussetzung dafür ist, daß der gesamte Substanzfleck vom Monochromator erfaßt wird. Diese Fläche beträgt beim Beckman-DK-Gerät mit Ulbricht-Kugel $\sim 0,9 \times 0,9 \text{ cm}$. Zur Aufnahme eines Spektrums werden Mengen von 0,5 bis 5γ benötigt. Das Papier benutzen wir in einfacher Lage. Obwohl die Schichttiefe nicht unendlich dick ist, werden so Spektren reproduzierbar gemessen.

Zur quantitativen Bestimmung chromatographieren wir unter gleichen Bedingungen neben der Probe bekannte Mengen der zu bestimmenden Substanz. Zur Auswertung werden die Substanzmengen gegen die prozentuale Reflexion aufgetragen und die so erhaltene Eichkurve zur Bestimmung der unbekannten Menge benutzt.